



AMANDA ALVIM NEGRETI

**“ATIVIDADE BIOLÓGICA DO COMPOSTO
TRANS-[RU(NO)CL(CYCLAM)](PF₆)₂ NA PROLIFERAÇÃO/MIGRAÇÃO DE
CÉLULAS ENDOTELIAIS E NA ADESÃO PLAQUETÁRIA”**

CAMPINAS,

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

AMANDA ALVIM NEGRETI

**“ATIVIDADE BIOLÓGICA DO COMPOSTO *TRANS*-
[RU(NO)CL(CYCLAM)](PF₆)₂ NA PROLIFERAÇÃO/MIGRAÇÃO DE
CÉLULAS ENDOTELIAIS E NA ADESÃO DE PLAQUETÁRIA”**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Biologia Funcional e Molecular, na área de Fisiologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marta Helena Krieger

Este exemplar corresponde à versão final da DISSERTAÇÃO defendida pela aluna **AMANDA ALVIM NEGRETI**, e orientada pela Profa. Dra. Marta Helena Krieger

Campinas

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

N312a Negreti, Amanda Alvim, 1987-
Atividade biológica do composto *trans*-[Ru(NO)Cl(cyclam)](PF₆)₂ na
proliferação/migração de células endoteliais e adesão de plaquetária / Amanda
Alvim Negreti. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Marta Helena Krieger.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de
Biologia.

1. Células endoteliais. 2. Proliferação de células. 3. Doadores de oxido nitrico.
I. Krieger, Marta Helena, 1958-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto
de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Biological activity of the compound *trans*-[Ru(NO)Cl(cyclam)](PF₆)₂ in
the proliferation/migration of endothelial cell and platelet adhesion

Palavras-chave em inglês:

Endothelial cells

Cell proliferation

Nitric oxide donors

Área de concentração: Fisiologia

Titulação: Mestra em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Marta Helena Krieger [Orientador]

Ana Paula Couto Davel

Fabiola Taufic Monica Iglesias

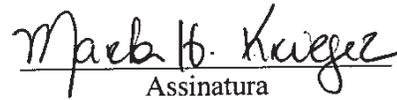
Data de defesa: 04-04-2014

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 04 de abril de 2014

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Marta Helena Krieger (orientadora)


Assinatura

Profa. Dra. Ana Paula Couto Davel


Assinatura

Profa. Dra. Fabiola Taufic Monica Iglesias


Assinatura

Profa. Dra. Dora Maria Grassi Kassis

Assinatura

Profa. Dra. Angelina Zanescio

Assinatura

RESUMO

O óxido nítrico (NO) é um agente biológico multifuncional que vem sendo alvo de diversos estudos. A sua capacidade de promover a reendotelização ou inibir a formação da neointima após injúria vascular é reconhecida nos últimos anos devido a sua eficácia em atuar na proliferação e na migração de células endoteliais, bem como na sua capacidade de inibir a adesão e agregação plaquetária. A neointima intra-stent pode ser combatida com o desenvolvimento de stents eluidores de drogas (SED). Os nitrosilos complexos de rutênio se destacam dentre os doadores de NO, devido a sua capacidade de liberar o NO de forma controlada e incorporados a veículos. Este estudo se propôs padronizar as condições de cultivo das células endoteliais umbilicais humana (HUVEC) “saudáveis”, verificar a margem de segurança do composto *trans*-[Ru(NO)Cl(cyclam)](PF₆)₂, nomeado Ru(cyclam)NO, em células HUVEC por meio de ensaios de citotoxicidade, verificar sua capacidade de promover proliferação/migração celular e a inibição da adesão de plaquetas humanas, e, também verificar a biocompatibilidade deste composto quando incorporados em plataformas de aço. Expressão de proteínas fenotípicas da célula endotelial foi utilizada para padronização de cultivo de HUVEC. A concentração de 0,5mM foi definida como ótima nas condições experimentais. A ação do composto foi caracterizada pelas respostas de manutenção da proliferação (incorporação de timidina triaciada - 3HT) e no aumento da migração celular (ensaio *transwell*), entretanto foi capaz de reduzir as ações estimulatórias do fator de crescimento epidermal (EGF). A citotoxicidade do complexo e das plataformas de incorporação foi determinada por ensaio de redução do 3-brometo de 4,5-dimetil-2-tiazolil-2,5-difenil-tetrazólio (MTT). Em relação ao nitroprussiato de sódio (SNP) a toxicidade induzida pelo composto nas concentrações de 0,5mM a 2,0mM foi reduzida, mesmo na maior concentração após 24 horas de exposição (MTT: 59% ± 4,42). O complexo mostrou ser capaz de reduzir a adesão ao fibrinogênio de plaquetas humanas ativadas ou não. A biocompatibilidade total das plataformas de inox, matriz de siloxano e matriz de siloxano incorporado com Ru(cyclam) foram demonstradas pelo ensaio de redução de MTT e a funcionalidade pelo ensaio de migração *transwell*. A margem de segurança do Ru(cyclam)NO e de suas respectivas plataformas de imobilização foram caracterizadas como baixa e ausente citotoxicidade. As avaliações funcionais evidenciaram que o Ru(cyclam)NO manteve a proliferação celular, estimulou a migração das HUVEC e inibiu a adesão de plaquetas humanas. Estas evidências constituem-se de pontos fundamentais para se obter a reendotelização.

Palavras chaves: doador de óxido nítrico, proliferação/migração de células endoteliais, nitrosilos complexos de rutênio, célula endotelial umbilical humana, biocompatibilidade.

ABSTRACT

Nitric oxide (NO) is a multifunctional biological agent that has been the subject of several studies. In recent years, its ability to promote re-endothelialization or inhibit neointimal formation after vascular injury is recognized due to its efficacy in stimulates proliferation and migration of endothelial cells, as well as its ability to inhibit platelet adhesion and aggregation. The in-stent neointimal can be prevented with the development of drug-eluting stents (DES). Nitrosyl ruthenium complexes highlighted from the NO donors, due to their ability to release NO in a controlled manner and incorporated into vehicles. This study aimed to: 1) standardize the cultivation conditions of " healthy " human umbilical endothelial cells (HUVEC); 2) verify the safety margin of the compound *trans* - [Ru(NO)Cl(cyclam)](PF₆)₂, named Ru(cyclam) O, in HUVEC cells by cytotoxicity assay; 3) determine its ability to promote proliferation/migration cell and inhibition adhesion of human platelets; and also 4) verify biocompatibility of this compound when incorporated in slides. Phenotypic expression of the endothelial cell protein was used to standardize cultured HUVEC. A concentration of 0.5 mM was set to the optimal experimental conditions. The Ru(cyclam)NO action was characterized by responses of the proliferation maintenance (tritiated thymidine incorporation - 3HT) and migration cell increased (transwell assay), however was able to reduce the stimulatory actions of epidermal growth factor (EGF). The cytotoxicity of the compound and its incorporation slides was determined by reduction of 3- bromide, 4,5-dimethyl -2-thiazolyl -2 ,5 -diphenyl tetrazolium bromide (MTT). In relation to sodium nitroprusside (SNP), Ru(cyclam)NO showed reduced toxicity from 0.5 mM to 2.0 mM, even at the highest concentration that was 59% ± 4.42 of the cell viability. The Ru(cyclam)NO was shown to reduce adhesion to fibrinogen of human platelets activated or not. The total biocompatibility of stainless slide with siloxane matrix and siloxane matrix incorporated with Ru(cyclam)NO were demonstrated by MTT reduction assay and their functionality by transwell migration assay. The safety margin of Ru(cyclam)NO and their respective slide incorporated were characterized as low or absent cytotoxicity, respectively. Functional evaluations showed that the Ru(cyclam)NO maintained cell proliferation and stimulated the migration of HUVEC, well as well, inhibited adhesion of human platelets. These obtained evidences are key points to get the re-endothelialization

Key words: nitric oxide donor, proliferation/migration of endothelial cells, ruthenium nitrosyl complexes, human umbilical endothelial cell, biocompatibility.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	xiii
AGRADECIMENTOS	xv
ÍNDICE DE FIGURAS	xvii
ÍNDICE DE TABELAS	xix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xxi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. ENDOTÉLIO	1
1.1. ÓXIDO NÍTRICO E SEU MECANISMO DE AÇÃO	2
1.2. PROLIFERAÇÃO E MIGRAÇÃO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS.....	5
1.3. DISFUNÇÃO ENDOTELIAL.....	7
1.4. ANGIOPLASTIA	9
1.5. DOADORES DE ÓXIDO NÍTRICO	13
1.5.1. NITROSILOS COMPLEXOS DE RUTÊNIO	14
2. OBJETIVOS.....	18
2.1. Objetivos gerais	18
2.2. Objetivos específicos.....	18
3. MÉTODOS.....	19
3.1. Obtenção do composto trans-[Ru(NO)Cl(cyclam)](PF₆)₂ e das plataformas	19
3.2. Linhagem celular e manutenção das culturas	20
3.3. Western blotting.....	21
3.4. Ensaio de viabilidade celular	23
3.4.1. Ensaio de redução de MTT.....	23
3.5. Ensaio de proliferação celular	25
3.5.1. Incorporação de timidina triciada	25
3.6. Ensaio de migração celular	25
3.6.1. Transwell	25
3.7. Ensaio de adesão celular.....	28

3.8. Análise estatística	29
4. RESULTADOS	30
4.1. Padronização da cultura de células endoteliais umbilicais humanas (HUVEC)	30
4.2. Avaliação da viabilidade celular: ensaio de redução de MTT	32
4.3. Avaliação da proliferação celular em resposta ao Ru(cyclam)NO em HUVEC estimuladas pelo EGF	34
4.4. Avaliação da migração celular em resposta ao Ru(cyclam)NO em HUVEC estimuladas pelo EGF.....	35
4.5. Avaliação da adesão plaquetária em resposta ao Ru(cyclam)NO	37
4.6. Avaliação de biocompatibilidade de plataformas incorporadas com Ru(cyclam)NO	38
4.6.1. Avaliação da viabilidade celular em HUVEC e RASM: Ensaio de redução de MTT.....	38
4.6.2. Análise da migração celular em HUVEC e RASM expostas às plataformas de imobilização do Ru(cyclam)NO.....	39
5. DISCUSSÃO.....	41
6. SUMÁRIO E CONCLUSÃO	52
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus por toda graça, misericórdia e amor, e aos meus pais, Edgard e Sônia. Por todo amor, apoio e dedicação, sem vocês não seria possível a realização deste trabalho. Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por todo Seu amor, por ser meu refúgio, fortaleza, por tudo o que És. Sem a Sua presença em minha vida nada disso seria possível.

Agradeço aos meus pais, aos meus irmãos Lucas e Aline e a minha cunhada Fernanda, por todo apoio, conselhos, conversas, confiança e pela certeza que sempre estiveram ao meu lado. Amo vocês!

Á minha prima-irmã Iara, seu marido Johny e minha adorada afilhada Manuela, por todo apoio, por ter sido minha família em Campinas, pelos momentos de descontração, alegrias, tardes de domingo relaxantes. Saibam que nada era melhor do que sair do trabalho e encontrar vocês Ica, Johny e a princesa mais linda e especial Manuela, para alegrar meu dia, sem vocês não seria a mesma coisa.

Á minha avó linda Dulcinéa, aos meus primos Bruna, Fernando, Eduardo, Paula e Loredana, a minha tia Rosa e à todos os meus familiares, pois são à base de minha vida e meu maior presente, sem vocês eu não seria a mesma.

Às minhas amigas de toda vida Amanda, Mariana, Sabrina, Dayene, Raissa, Thaís, Mayara, Renata, Lilian, Thaíssa, Gisele, Bruna e Cláudia por toda amizade, confiança, respeito, amor, paciência e companheirismo, sei que sempre posso contar com vocês. Vocês tornam a minha vida mais bela e com muito mais sentido.

Á todos meus amigos que mesmo distante estão sempre no meu coração.

Não poderia deixar de agradecer de uma forma especial uma pessoa que é muito especial em minha vida, ao Samuel, que esteve presente em toda esta fase. Obrigada pelo apoio constante, conversas, conselhos e por todos os momentos especiais.

Á minha orientadora, Prof^a Dra. Marta Helena Krieger, por toda confiança, todo apoio oferecido, ajuda e compreensão. Agradeço-te muito por esta oportunidade. Obrigada por tudo Marta, seu apoio foi fundamental.

Às minhas amigas de laboratório, Mariana, Daniele e Mirian. Juntas, passamos por tantas coisas, não é? Conversas, conselhos, momentos de choro, de muitas risadas, de danças rsrs... Obrigada pela amizade que construímos. Posso dizer que fiz amigos para

vida toda. Amo vocês. E, ao meu amigo Leandro, que mesmo distante sempre esteve à disposição, obrigada pelo apoio amigo!

Aos meus queridos amigos do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Jamaira, Aline, Rodolfo, Luiz Alberto, pela amizade, pela constante disposição, por todos os momentos de descontração e conversas. Vocês se tornaram especiais.

Aos meus queridos amigos Hygor, Carmem, Andressa, Amanda, pela amizade, apesar de termos passado pouco tempo juntos vocês sempre estiveram dispostos a me ajudar. Adoro vocês!

Agradeço muito ao Dr. Danilo Damas e ao Dr. Valério por todo o apoio e contribuições preciosíssimas.

Agradeço muito a Prof^a Dra. Ana Paula Davel e Dra. Maria Andrea por tudo o que fizeram por mim, por todas as conversas, conselhos, ajudas, pela amizade e disposição constante, vocês foram importantíssimas para realização deste trabalho.

Aos professores Dr. Elia Tfouni e Dr. Fábio Gorzoni Doro, pela colaboração, elaboração e fornecimento do complexo estudado, e pela colaboração nas discussões científicas e agradeço também os professores Dr. Hernandes Faustino de Carvalho e Dr. Carlos Almicar Parada por permitirem que eu realizasse parte de meu trabalho em seus laboratórios.

Agradeço a Dra. Sissi Marcondes e Dra. Cláudia Lumy Yano pela orientação nos ensaios de adesão celular e pela disposição durante todo o desenvolvimento do estudo.

Enfim, agradeço a todos que conviveram comigo neste período, todos que me ouviram, que me ajudaram que responderam minhas diversas perguntas, saibam que contribuíram muito para meu aprendizado e cada um de vocês tem um lugar especial em meu coração. OBRIGADA!

A CAPES e FAPESP pelo auxílio financeiro.

ÍNDICE DE FIGURAS

	<i>Pág.</i>
Fig. 1 Estrutura química do doador de NO <i>trans</i> -[Ru(NO)Cl(cyclam)](PF ₆) ₂	17
Fig. 2 Representação esquemática do protocolo experimental utilizado para análise de migração quimiotática	27
Fig. 3 Expressão das proteínas NOSe e VE-caderina, em HUVEC cultivada em meio DMEM, e em HUVEC cultivadas em M200 completo	31
Fig. 4 Fotomiografia de células endoteliais umbilicais humanas (HUVEC)	32
Fig. 5 Resposta proliferativa de HUVEC na presença ou não de EGF após 24 horas de tratamento, mensurada através de ensaio de incorporação de timidina triciada.	34
Fig. 6 Resposta migratória de HUVEC na presença ou não de EGF após 6 horas de tratamento, mensurada através de ensaio de migração <i>transwell</i>	36
Fig. 7 Análise da adesão de plaquetas humanas ao fibrinogênio expostas ao complexo Ru(cyclam)NO e SNP	38
Fig. 8 Citotoxicidade induzida após 24 horas de exposição às plataformas de imobilização.	39
Fig. 9 Migração celular induzida após 24 horas de exposição às plataformas de imobilização do complexo Ru(cyclam)NO.	40

ÍNDICE DE TABELAS

	<i>Pág.</i>
Tab. 1 Agentes terapêuticos em stents farmacológicos	11
Tab. 2 Citotoxicidade do complexo Ru(cyclam)NO e SNP	33

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTP	Angioplastia Coronária Transluminal Percutânea
ADMA	Dimetilarginina assimétrica
ADP	Adenosina trifosfato
AMPc	Cíclic Adenosine Monophosphate (monofosfato cíclico de adenosina)
bFGF	Fibroblast Growth Factor (fator de crescimento e fibroblastos)
BH₄	Tetrahydrobiopterina
BSA	Bovine Serum Albumin (albumina do soro bovino)
CML	Célula muscular lisa
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (meio Eagle modificado por Dulbecco)
DMSO	Dimetilsulfóxido
EBSS	Earl's Balanced Salt Solution
EDCF	Fator contrátil derivado do endotélio
EDHF	Fator hiperpolatizante derivado do endotélio
EDRF	Fator relaxante derivado do endotélio
EGF	Epidermal Growth Factor (fator de crescimento epidérmico)
EGFR	Receptor de EGF
ET-1	Endotelina-1
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GCs	Guanilato Ciclase Solúvel
GMPc	Cíclic Guanosine Monophosphate (monofosfato cíclico de guanosina)
GNSO	S-nitrosoglutatona
GTP	Guanosine-5'-triphosphate (trifosfato de guanosina)
HUVEC	Célula endotelial umbilical humana
JNK	c-Jun NH ₂ -terminal Kinase (proteína quinase c-Jun ativada por estresse)

L-NAME	N ^G -nitro-L-arginina-metil-ester
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase (proteína quinase ativada por mitógenos)
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
NOS_e	Óxido nítrico sintase endotelial
NOS_i	Óxido nítrico sintase induzível
NOS_n	Óxido nítrico sintase neuronal
PBS	Phosphate Buffered Saline (tampão fosfato salino)
PDGF	Platelet-derived Growth Factor (fator de crescimento derivado de plaquetas)
PDMS	Polidimetilsiloxano
PGL₂	Prostagladina
PRP	Plasma rico em plaquetas
RASM	Rabbit Aortic Smooth Muscle Cells (células musculares lisas derivadas de aorta de ratos)
SDS	Docecil Sulfato de Sódio
SEDs	Stents Eluidores de Drogas
SFB	Soro Fetal Bovino
SNP	Nitroprussiato de sódio
TCA	Ácido tricloroacético
TXA₂	Tromboxano

1. INTRODUÇÃO

1.1. ENDOTÉLIO

O endotélio recobre todos os vasos do organismo, desde o coração, grandes, médias, pequenas artérias, microartérias e capilares, bem como toda a árvore venosa, veias pós-capilares, pequenas, médias e grandes veias que conduzem o sangue de volta ao coração e os vasos linfáticos (Nascimento C. A. *et al.*, 2003). As células endoteliais apresentam-se justapostas, onde há pouca substância extracelular, e seu eixo orienta-se na direção do fluxo sanguíneo. A superfície de contato entre as células e o tecido conjuntivo subjacente é chamada lâmina basal, a qual é composta por colágeno tipo IV, proteoglicanos e as glicoproteínas laminina e entactina. A lâmina basal realiza, entre suas funções, a regulação da proliferação e diferenciação celular, por meio da ligação com fatores de crescimento, da influencia na polaridade celular, do metabolismo celular, e ainda, organiza as proteínas nas membranas plasmáticas de células adjacentes afetando a transdução de sinais através dessas membranas e serve como caminho e suporte para a migração de células (Junqueira e Carneiro, 2004).

Durante muito tempo pensou-se no endotélio vascular simplesmente como uma barreira a passagem do fluxo sanguíneo. Atualmente, é reconhecido que as células endoteliais não somente se constituem em uma barreira de permeabilidade seletiva entre os espaços vascular e intersticial como também tem um papel muito importante na regulação da homeostase vascular (Lemman e Burnett, 1992). Segundo revisão de Krieger e Consolin-Colombo (2013), as primeiras evidências da participação do endotélio foram demonstradas por Furchgott e Zawadzki (1980), que experimentalmente mostraram que a remoção da camada endotelial de artérias isoladas produzia prejuízo das respostas dilatadoras à acetilcolina. Bioensaios subsequentes

revelaram que as células endoteliais causam relaxamento por liberação de potente substância vasoativa, a qual foi denominada fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF). O EDRF estimula a guanilato ciclase solúvel (GCs) nas células musculares lisas (Ignarro *et al.*, 1986), aumenta a produção de monofosfato cíclico de guanosina (GPMc) (Lüscher *et al.*, 1986; Furchgott *et al.*, 1989), e é rapidamente destruído pelo ânion superóxido (Gryglewski *et al.*, 1986). Estes fatos experimentais levaram à proposta e demonstração que o EDRF é a molécula de NO. Além do NO, outros fatores derivados do endotélio e a presença de junções intercelulares do tipo “gap” podem causar vasorelaxamento-dependente do endotélio por meio da hiperpolarização das células musculares lisas subjacentes (Moncada *et al.*, 1989). Coexistem os fatores constritores derivados do endotélio (EDCF; do inglês endothelium-derived contracting factors) como a endotelina (ET-1), angiotensina II local e circulante, produtos da via da cicloxigenase como o tromboxano A₂ (TXA₂) e espécies reativas de oxigênio como o ânion superóxido (O₂⁻) (Michel e Vanhouette, 2010). Em condições normais, o equilíbrio entre estes fatores vasoconstritores e os vasorelaxantes parece pender para uma situação de vasodilatação, com predomínio da ação da prostaciclina (PGI₂) e do NO (Giaid e Saleh, 1995). Assim, quando a produção de NO endotelial é removida ou reduzida instala-se uma cadeia de eventos caracterizados pela disfunção endotelial, ou seja, o prejuízo das funções protetoras exercidas pelo endotélio saudável.

1.1.ÓXIDO NÍTRICO E SEU MECANISMO DE AÇÃO

O NO é um radical livre, gasoso, inorgânico, incolor, com meia vida de depuração curta (3 a 5 segundos). Ele apresenta um elétron desemparelhado na última camada e é altamente difusível devido suas características lipofílicas e baixo peso molecular. O NO era considerado até meados da década de 80 apenas um membro de uma família de poluentes ambientais indesejáveis e potenciais carcinógenos. Contudo,

nas últimas décadas ele tem sido considerado uma molécula sinalizadora chave na via de transdução de sinal e isso ocorre em diversos tipos celulares que estão envolvidos em uma série de funções fisiológicas. Assim, o NO reúne propriedades de neurotransmissão, de mediador constitutivo e indutível, ou mesmo de agente citotóxico e, sobretudo modula o sistema cardiovascular. Pelo seu alto coeficiente de difusão através das membranas biológicas ele também apresenta uma importante característica de atuar como mediador de processos intracelulares e extracelulares diversos. (Palmer *et al.*, 1987; Feldman *et al.*, 1993; Wink *et al.*, 1996; Culotta e Koshland Junior 1992; Ignarro, 2000). O NO é produzido pela enzima chamada de óxido nítrico sintase (NOS) (Förstermann *et al.*, 2012), sendo que três isoformas desta enzima foram descritas em mamíferos, a NOS neuronal (NOSn), NOS induzível (NOSi) e NOS endotelial (NOSe).

No citosol das células musculares lisas, o NO interage com o ferro do grupo heme da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), a qual produz uma alteração conformacional e conseqüentemente sua ativação. A GCs ativa catalisa a saída de dois grupamentos fosfato da molécula de guanosina trifosfato (GTP), resultando na formação de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc). O acúmulo desta molécula na célula muscular promove o relaxamento, através da inibição da entrada de cálcio, da liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático e do aumento do seqüestro de cálcio pelo mesmo (Moncada *et al.*, 1991).

A via GCs-GMPc é o ponto final melhor compreendido na sinalização do NO. A ativação da GCs e o aumento na produção de GMPc ocorre em torno de 10 mM (Basudhar *et al.*, 2013). O NO e tem sido demonstrado mediar vários processos, incluindo relaxamento vascular, modulação da permeabilidade iônica e inibição da agregação plaquetária.

O NO liberado para o lúmen de um vaso sanguíneo é um inibidor da agregação plaquetária e da adesão de várias moléculas e plaquetas à parede vascular. A inibição da adesão de leucócitos à parede do vaso é devido à interferência do NO na capacidade da molécula de adesão de leucócitos CD11/CD18 se ligarem na superfície da célula endotelial e suprimir a expressão CD11/CD18 em leucócitos. A inibição da agregação e adesão plaquetária protege o músculo liso da exposição do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) impedindo a formação da placa fibrosa. Atualmente é reconhecida que a NOSe é essencial para a função de células progenitoras endoteliais migrarem e aderirem para a reparação vascular (Förstermann *et al.*, 2010).

A perda da NOSe também está relacionada com a proliferação celular. Jenkins e colaboradores (1995) mostraram que as células tumorais humanas de adenocarcinoma de cólon transfectada com a forma induzível da NOS produzindo quantidades de NO de 9-14, 5 uM, proliferaram mais que as não transfectadas. O NO inibe a síntese de DNA e proliferação de células musculares lisas vasculares mediado pelo GMPc.

O NO é capaz de inibir a adesão e agregação plaquetária, determinando as propriedades não adesivas do endotélio (Yan *et al.*, 1996). A inibição plaquetária é importante na prevenção de eventos trombóticos associados à insuficiência cardíaca e à trombose cerebral (Gordge *et al.*, 1998).

O efeito de inibição da agregação plaquetária promovida pelo NO tem sido verificada com a utilização de diferentes classes de doadores. Várias evidências sugerem que o principal mecanismo pelo qual o NO inibe a ativação das plaquetas seja por meio da ativação da guanilato ciclase plaquetária, a qual resulta no aumento intracelular nos níveis de GMPc e redução do fluxo de cálcio intracelular, o que resultará na inibição da expressão de P-selectina e a da conformação de GP IIb/IIIa.

Entretanto, outros mecanismos de ação do NO tem sido descritos, os quais podem ser independentes da produção de GMPc (Sorrage *et al.*, 2011). Tais mecanismos mediados pelo NO incluem a ribosilação da molécula de adenosina trifosfato (ADP) e a inibição da desidrogenase gliceraldeído-3-fosfato B (Ridden e Owen, 1999).

Em conclusão, o NO medeia ativamente muitas das funções protetoras exercidas pelo endotélio saudável, e, em conjunto com PGI₂, exerce potente efeito antiaterogênico e tromborresistente, prevenindo adesão e agregação plaquetária.

1.2. PROLIFERAÇÃO E MIGRAÇÃO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS

Entre os papéis descobertos do NO, a regulação da proliferação celular se destaca. Como muitos atestam, o maior efeito exercido pelo NO sobre a proliferação de vários tipos celulares em condições normais e em algumas células tumorais aparece ser controlado pela interferência na progressão do ciclo celular e a subsequente inibição do processo proliferativo. Há, no entanto, estudos que descrevem a ação estimulatória do NO na proliferação de células endoteliais (Ziche *et al.*, 1994; Yasunari *et al.*, 2001). A razão para este fenômeno ambivalente ainda não é totalmente conhecida, embora recentes achados sugiram que a concentração do NO é um fator determinante na direção da ação (Villalobo, 2006).

Assim, a propriedade do NO poder estimular a proliferação de células endoteliais, tem levado a investigação da eficácia de terapias baseadas em doadores de NO para promover a reendotelização após angioplastia (Yasunari *et al.*, 2001).

No tecido vascular, tem sido demonstrado que o NO promove a síntese do DNA em células endoteliais (Ziche *et al.*, 1994), estimulando a proliferação destas. Ao contrário das células endoteliais, doadores de NO inibem a mitogênese e proliferação das células musculares lisas vasculares (Garde e Hassid, 1989). Assim, a especificidade

celular juntamente como gradiente de concentração local do NO constituem de fator crucial para a discriminação dos efeitos desta molécula no tecido vascular.

Luczak e colaboradores (2004) demonstraram que a proliferação de células endoteliais umbilicais humanas (HUVEC), *in vitro*, foi inibida por concentrações maiores que 5 μ M de SNP, mas estimulada por concentrações menores que 1 μ M.

A migração de células endoteliais, a partir da superfície do lúmen arterial adjacente é o principal recurso na reconstituição da superfície de áreas lesadas. O endotélio é fundamental para prevenção de trombose e para controlar o crescimento e função das células musculares lisas arteriais (Muto *et al.*, 2007). O exato estímulo para indução da replicação e migração endotelial ainda permanece desconhecido, contudo a perda de contato das células endoteliais adjacentes que permanecem viáveis após injúria parece ser um dos principais fatores “*in vivo*” (Gurjar *et al.*, 2001).

Estudos utilizando modelos animais e culturas de células mostraram que o *shear stress*, significativamente, influencia a morfologia, função e migração das células endoteliais (Ward *et al.*, 2001; Becher *et al.*, 2010). Assim, a melhor compreensão quanto à migração das células endoteliais para áreas lesadas, constitui importante área de estudo para o desenvolvimento de novas estratégias para obtenção do processo de reendotelização.

O fator de crescimento epidermal (EGF) é um estimulador crítico e específico, que se liga ao seu receptor nas células endoteliais. Ele pode induzir a proliferação e a migração de células endoteliais de forma dependente da concentração. Estudos têm demonstrado que a utilização de doadores de NO em conjunto com EGF produzem uma redução da resposta estimulatória deste último (Carpenter e Cohen, 1990; Shao *et al.*, 2008).

O receptor do fator de crescimento EGF (EGFR) é uma glicoproteína transmembranar que constitui um dos quatro membros da família erbB de receptores de tirosina quinase. A ligação de seus ligantes específicos no EGFR leva a autofosforilação deste receptor de tirosina quinase e ativação subsequente das vias de transdução de sinal que estão envolvidas na regulação da proliferação, diferenciação e sobrevivência celular (Roy e Herbst, 2004).

Murillo-Carretero e colaboradores (2002) verificaram que o efeito anti-proliferativo do NO em fibroblastos que superexpressam o EGFR humano pode ser devido à sua interação com o EGFR (Estrada *et al.*, 1997). Isto também foi demonstrado em várias células tumorais que expressam naturalmente este receptor (Murillo-Carretero *et al.*, 2002; Ruano *et al.*, 2003; Gonzalez-Fernandez *et al.*, 2008). Nestes estudos foi demonstrado que a proliferação celular dependente de EGF foi inibida pelos doadores de NO devido a sua capacidade de inibir a autofosforilação do EGFR. Ainda foi sugerido por Murillo-Carretero e colaboradores (2002) que o EGFR sofre um processo de S-nitrosilação na presença de doadores de NO, pois a inibição foi invertida na presença de ditioneitol (Estrada *et al.*, 1997).

1.3.DISFUNÇÃO ENDOTELIAL

O endotélio vascular desempenha um papel fundamental na manutenção da função vascular normal, modulando tônus vascular, inflamação e homeostase (Brunner *et al.*, 2005). Devido a diversas funções e sua localização, o endotélio tem um papel importante na iniciação e/ou progressão das doenças cardiovasculares, incluindo a aterosclerose. Por outro lado, as funções do endotélio podem apresentar-se comprometidas (disfunção endotelial) em algumas patologias como um resultado do estresse oxidativo. Este pode influenciar a reatividade vascular através de alterações em

processos de transdução de sinal dependentes de cálcio em células musculares lisas e em células endoteliais. (Schilling e Elliot, 1992).

Segundo Shane e colaboradores (2008) a disfunção endotelial é o termo usado quando se refere a uma perda funcional do endotélio (ex: vasodilatação, inibição da agregação plaquetária e adesão leucocitária). Embora tenha causas multifatoriais, o comprometimento na biodisponibilidade do NO é o mecanismo chave para esta patologia (Muzzel *et al.*, 1997). Entretanto, ambos os eventos, tais como a deficiência de NO e a inibição crônica do NO podem induzi-la (Pereira *et al.*, 2011).

Há concordância na atual literatura, de que a reduzida atividade biológica do NO, causada tanto pela redução na síntese como pelo aumento da degradação pelo estresse oxidativo, tem sido identificada como o mecanismo de maior relevância no processo multifatorial na disfunção endotelial, bem como na sua participação das principais disfunções cardiovasculares (Pepine *et al.*, 2009). Assim, a redução na biodisponibilidade do NO e a conseqüente disfunção endotelial determinam no ambiente vascular o desencadeamento de eventos tais como alterações no tônus, disfunções trombóticas, proliferação e migração de células musculares lisas (CML) e a adesão de leucócitos (Madamanchi *et al.*, 2005). Ocorre, também, o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Cai, 2005), redução na expressão e na atividade das NO sintases, devido a mudanças nos seus substratos ou co-fatores, como no aumento dos níveis de dimetilarginina assimétrica (ADMA) (De Genarro *et al.*, 2009), e ainda, o desacoplamento da NOS endotelial, devido à oxidação aumentada de BH₄ (Sessa W.C., 2004).

1.4.ANGIOPLASTIA

A angioplastia coronária transluminal percutânea (ACTP), adquiriu papel de destaque no manejo da cardiopatia isquêmica, desde sua introdução por Andreas Grüntzig, em 1977 (Grüntzig, 1979), e consiste no remodelamento do vaso através da dilatação da obstrução coronariana. Em praticamente todos os pacientes submetidos à ACTP ocorre algum grau de espessamento da camada íntima e formação de neoíntima (Luz e Solimene, 1997). Inúmeros esquemas de terapêutica farmacológica e dispositivos endovasculares não foram capazes de solucionar integralmente o problema da reestenose, o índice situa-se em 20 a 40% dos casos (Kipshidze *et al.*, 2005). A necessidade de procedimentos diagnósticos e cirurgias de revascularização determina um marcante prejuízo à evolução dos pacientes que desenvolveram reestenose e eleva, consideravelmente, os custos do tratamento. Fatores que predizem incidência maior de reestenose incluem diabetes mellitus, angina instável, abordagem de lesões já reestenóticas, lesões em pontes de safena e oclusões crônicas (Guérios *et al.*, 1998). Os procedimentos de intervenção vascular representam um enorme avanço no tratamento das obstruções das patologias acima descritas, e seu espectro de indicações e segurança vem se expandindo progressivamente.

Objetivando solucionar as limitações do procedimento de angioplastia por cateter balão, os stents eluidores de drogas, também chamados stents farmacológicos, foram desenvolvidos e apresentados como alternativos ou adjuvantes à angioplastia convencional. Estes permitem a liberação local, numa concentração apropriada, de um agente efetivo que previna o desenvolvimento da reestenose intra-stent, sem toxicidade sistêmica.

Segundo Htay e Liu (2005), um sistema de liberação para esta finalidade consiste de três componentes: 1) uma plataforma metálica; 2) uma matriz carreadora que armazene o agente terapêutico e permita sua difusão no tecido vascular de forma controlada; e 3) um agente terapêutico efetivo que impeça o crescimento neointimal após a implantação do stent (TAB 1).

Em 2002, surgiu a primeira geração de stents farmacológicos, dispositivos endovasculares eluidores de drogas como o sirolimus (Cypher[®], Cordis Corporation, Miami, FL, USA) e o paclitaxel (Taxus[®], Boston Scientific Corporation, Natick, MA, USA), capazes de inibir a proliferação do tecido endovascular, levando ao controle da reestenose. A necessidade de revascularização após implante de stents farmacológicos como esses foi reduzida para menos de 10% (Lüscher *et al.*, 2007).

Novas gerações de stents farmacológicos foram desenvolvidas desde então, utilizando plataformas cada vez mais adaptáveis e biocompatíveis, produzidas com ligas de cobalto-cromo ou platina-cromo, reduzindo os danos causados ao endotélio durante a implantação, e liberando agentes terapêuticos com maior precisão, immobilizados em matrizes biodegradáveis, aumentando a margem de segurança e reduzindo a incidência de eventos adversos (Khan *et al.*, 2012).

Tabela 1. Agentes terapêuticos utilizados em stents farmacológicos.

Antineoplásicos, anti-inflamatórios e imunomoduladores	Antiproliferativos	Inibidores de migração e moduladores de MEC	Fatores que facilitam a cicatrização e reendotelização
Sirolimus	QP-2, Paclitaxel	Inibidores de prolilhidroxilase	BCP671
Tacrolimus	Actinomicina	Halofunginona	VEGF
Everolimus	Metotrexato	Inibidores de C- proteínase	Estradióis
Leflunomide	Angioeptina	Probucof	Compostos doadores de NO
M-Prednisolona	Vincristina		Anticorpos CEP
Dexametasona	Mitomicina		Bioresst
Interferon	Estatinas		
Ácido micofenólico	C- <i>myc</i> antisense		
Mizoribina	Abbott ABT-578		
Ciclosporina	RestenASE 2- Clorodeoxiadenosina		
Tranilast	PCNA ribozima		

Abreviações: MEC, matriz extracelular; CPE, células progenitoras endoteliais; NO, óxido nítrico; PCNA, antígeno nuclear de células proliferativas; VEGF, fator de crescimento vascular derivado do endotélio; QP-2, 7-hexanoiltaxol.

Adaptado de Htay e Liu, 2005.

Isto levou a grande expansão no uso desses dispositivos. Estima-se que até 2007, nos EUA, os stents farmacológicos foram empregados em até 90% das cirurgias de revascularização (Lüscher *et al.*, 2007), e, no Brasil, dados revelam um aumento progressivo e estatisticamente notável no uso de stents farmacológicos no período de

2000 a 2005, passando de 0,14% dos casos entre 2000 e 2001 para 14% entre 2004 e 2005 (Cardoso *et al.*, 2007).

No entanto, com o uso extensivo dos SEDs, outras questões têm sido abordadas, especialmente em relação ao risco de trombose tardia associada aos mesmos, que embora não seja alto (0,5 a 0,6% ao ano), mostrou-se persistente por longos períodos, diferentemente da reestenose, cuja ocorrência temporal é bem definida, ou seja, elevada nos primeiros seis meses após o procedimento e muito rara um ano ou mais após o mesmo (Daemen *et al.*, 2007; Lagerqvist *et al.*, 2007). Segundo a maioria dos especialistas, o favorecimento de formação de trombos após o implante do stent deve-se ao prejuízo da capacidade de reconstituição do endotélio e a exposição a moléculas trombogênicas que constituem um estímulo contínuo a agregação de plaquetas, ou então, a reação inflamatória persistente na parede arterial, que pode induzir um processo de remodelamento positivo, com aumento do lúmen arterial e alterações no fluxo sanguíneo (Stefanini e Holmes, 2013; Avelar *et al.*, 2008).

Recentemente, muitos outros complexos têm sido estudados como doadores de NO, incluindo complexos de rutênio, complexos de nitrito e espécies relacionadas (Lunardi *et al.*, 2009). O NO e a sua interação com complexos de metais de transição tem sido empregada para criar compostos potencialmente úteis como medicamentos eluidores de NO. No entanto, a grande dificuldade no desenvolvimento de novos dispositivos contendo doadores de NO é a modulação da sua estabilidade e o controle de sua liberação. Assim, diferentes estratégias para viabilizar a utilização de doadores de NO em aplicações biológicas têm sido exploradas. Os estudos em colaboração com o professor Dr. Elia Tfouni do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto apresentados na revisão “*Deposition of Organic-Inorganic Hybrid Coatings over the 316L Surgical Stainless Steel and Evaluation on*

Vascular Cells” publicado no periódico *Canadian Journal of Chemistry* mostraram as estratégias utilizadas para recobrimento de plataformas simulando stents farmacológicos. Foi demonstrado, neste estudo, que o revestimento de superfície de materiais metálicos utilizando a técnica sol-gel é uma abordagem adequada para a obtenção de materiais híbridos com melhores propriedades para um ambiente biológico e com melhores potenciais candidatos para aplicações biomédicas. Assim no estudo, a superfície aço inoxidável (SS) foi revestido com ormosil preparado a partir de tetraetoxisilano (TEOS) e de um organossilano 3-glicidoxipropiltrimetoxisilano (GLYMO) e ou polidimetilsiloxano (PDMS). As propriedades estruturais e de superfície das amostras e materiais que podem influenciar o seu desempenho no ambiente cardiovascular foram caracterizadas. Os ensaios biológicos realizados em plataformas com seus respectivos revestimentos mostram-se desprovidos de qualquer efeito citotóxico sobre as células endoteliais umbilicais humanas (HUVEC) e células musculares lisas (RASM) por meio da viabilidade celular após 24 horas de incubação e analisados pelo ensaio de redução de MTT. O aspecto funcional dos materiais foi avaliado através do ensaio de migração celular, transwell, com o qual, não foi observado aumento da migração celular nas células HUVEC e RASM quando comparadas ao controle após 24 horas (Doro *et al.*, 2014).

1.5.DOADORES DE ÓXIDO NÍTRICO

Vários compostos doadores de NO tem sido estudados como potenciais agentes terapêuticos, e tem sido explorados quanto as suas funções biológicas e seus aspectos farmacológicos (Janero, 2000; Lehmann J, 2000; Megson, 2000). As drogas doadoras de NO tem um importante efeito terapêutico no tratamento de várias doenças cardiovasculares (Gruetter *et al.*, 1979). Estes doadores produzem os efeitos do NO

endógeno quando aplicados em sistemas biológicos, por isto eles são principalmente adequados para mimificar uma resposta relacionada ao NO endógeno ou substituí-lo quando deficiente (Ignarro *et al.*, 1999). Atualmente, ainda presenciamos um aumento nas pesquisas farmacológicas para a concepção de novas drogas capazes de influenciar a produção endógena desta molécula.

Os doadores de NO mais conhecidos são os nitratos orgânicos, descobertos a mais de um século, a nitroglicerina, por exemplo, que é usada principalmente para alívio da dor aguda associada à angina pectoris, bem como o nitroprussiato de sódio (SNP), um complexo inorgânico utilizado como vasodilatador em casos de hipertensão severa (Kodja *et al.*, 1995; Friederich e Butterworth, 1995; Feelish, 1998). Contudo, ambas as classes dos compostos apresentam efeitos colaterais indesejáveis. A exposição contínua a nitroglicerina leva ao desenvolvimento de tolerância ao nitrato. O uso de SNP em pacientes com função hepática comprometida está associado com acúmulo de cianeto e seu metabólito tiocianato. Levando isto em consideração, os novos compostos de nitrosilo de rutênio possuem melhores propriedades farmacológicas e podem atuar como doador de NO e têm sido desenvolvidos como alternativos de vasodilatadores (Pereira *et al.*, 2011).

1.5.1. NITROSILOS COMPLEXOS DE RUTÊNIO

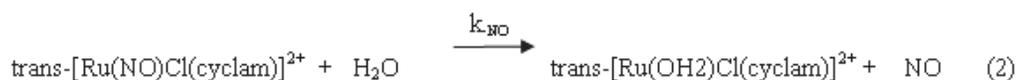
Nos últimos anos, tem havido um interesse crescente na química dos complexos de rutênio e a suas adequações como potenciais agentes terapêuticos devido suas características citotóxicas geralmente baixas (Hutchings *et al.*, 2005). O interesse na modelagem química dos complexos de rutênio assumiu significado adicional pelo importante papel envolvendo a transição do metal nos processos biológicos (Ford *et al.*, 1993; Wink *et al.*, 1996). O rutênio tem uma alta afinidade pelo NO, sendo

esta uma característica marcante da sua química. Uma vez que este sistema tenha sido demonstrado ser um agente doador de NO sob estímulo externo, uma variedade de complexos de rutênio está sendo desenvolvido e estudado. Comparados com outros doadores de NO, estes complexos tem a vantagem de poderem ser liberados em um alvo biológico específico. O NO liberado a partir de complexos de rutênio induz o relaxamento do músculo liso vascular via ativação da produção de GMPc e ativação de canal de potássio, bem como a diminuição das concentrações de cálcio citosólico em aortas de ratos normotensos (Lunardi *et al.*, 2009).

A potência de alguns compostos de rutênio com relação à indução do relaxamento vascular é menor quando comparado com SNP, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Marcondes *et al.*, 2002). O tempo decorrido até que alguns complexos de rutênio possam induzir o relaxamento máximo é maior quando comparado ao SNP, indicando que os compostos de rutênio proporcionam uma liberação mais lenta e sustentada de NO nos sistemas biológicos (Tfouni *et al.*, 2003).

As três principais propriedades que fazem dos complexos de rutênio adequados para aplicações biomédicas são: a) versatilidade de ligantes; b) uma série de estados de oxidação: Ru (II), Ru(III) e Ru(IV) e c) capacidade de mimetizar a ligação do ferro em certas moléculas biológicas, como a albumina e a proteína transportadora de ferro transferrina, o que lhe confere baixa toxicidade. Acredita-se que devido a capacidade do complexo de rutênio imitar o modo de ligação do ferro e a de muitas moléculas biológicas como a transferrina e a albumina sérica, possa ser explicado sua baixa toxicidade em geral (Allardyce e Dyson, 2001). Devido a estas características, esses complexos de rutênio podem ser úteis como agentes de liberação ou captação de moléculas decisivas em processos biológicos. A capacidade destes complexos de liberar

NO de forma coordenada e em uma taxa constante é de grande interesse na atualidade, o que favorece o uso da clínica (Tfouni *et al.*, 2012).



A redução do NO (equação 1) é uma etapa importante para liberação de NO nesta classe de complexos, e o complexo resultante após a dissociação de NO é seu correspondente aquo (equação 2). Este aquo complexo pode, por outro lado, atuar como seqüestrador de nitrito (NO_2^-), que, após uma reação de fotólise secundária, pode formar NO e O^- , renovando fonte de NO, o que eleva o potencial desses complexos (Osti e Franco, 2007).

Diante do conhecimento destas propriedades, os complexos de rutênio tem sido o foco de pesquisa do grupo de pesquisa do Prof. Dr. Elia Tfouni e do Prof. Dr. Douglas W. Franco, que tem estudado caracterizado e sintetizado estes complexos, resultando em uma série de trabalhos publicados em revistas de alto impacto. Há mais de dez anos nosso grupo de pesquisa tem colaborado com estes estudos na caracterização da atividade biológica destes compostos. O presente estudo foi desenvolvido utilizando o complexo de rutênio *trans*-[Ru(NO)Cl(cyclam)](PF₆)₂ (FIG. 1), nomeado neste estudo apenas como, Ru(cyclam)NO, que é capaz de liberar NO, por redução, *in vivo*. Sua atividade como vasodilatador já foi investigada em outros estudos de nosso grupo, demonstrando que tal complexo é capaz de induzir relaxamento completo e redução da pressão arterial (Tfouni *et al.*, 2003), tais efeitos são mediados pela difusão do NO pelas células e estímulo à guanilato ciclase solúvel (GCs), que cataliza a produção do segundo

mensageiro monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) em trifosfato de guanosina (GTP) (Torsoni *et al.*, 2002). Quando administrado em ratos normotensos ou hipertensos, o composto *trans*-[Ru(NO)Cl(cyclam)](PF₆)₂ induz uma redução da pressão arterial, especialmente nos ratos hipertensos, sendo o tempo de duração do efeito cerca de 20 vezes mais longo que o resultante da administração de nitroprussiato de sódio a ratos normotensos ou hipertensos (Marcondes *et ail*, 2002; Tfouni *et al.*, 2012).

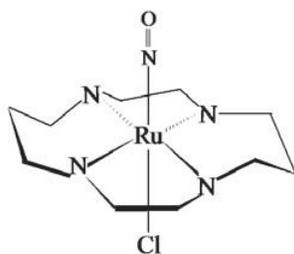


Figura 1. Estrutura química do doador de NO *trans*-[Ru(NO)Cl(cyclam)](PF₆)₂

Visando verificar a capacidade de reendotelização almejada nas injúrias vasculares após angioplastia, nossa proposta foi a de investigar as respostas do complexo Ru(cyclam)NO nas células endoteliais umbilicais humanas (HUVEC).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

O presente estudo se propôs avaliar as ações nas respostas proliferativas e migratórias do complexo de rutênio trans-[Ru(NO)Cl(cyclam)](PF₆)₂, nomeado como Ru(cyclam)NO em células vasculares, bem como a sua capacidade de inibir a adesão de plaquetas.

2.2. Objetivos específicos

1. Determinar a citotoxicidade do Ru(cyclam)NO por meio da avaliação da viabilidade celular de HUVEC na atividade funcional das mitocôndrias;
2. Determinar os efeitos do Ru(cyclam)NO na proliferação celular de HUVEC estimulada pelo fator de crescimento EGF, por meio de ensaios de incorporação de timidina triciada;
3. Determinar os efeitos do Ru(cyclam)NO na migração celular de HUVEC estimulada pelo fator de crescimento EGF, por meio do ensaio de migração transwell;
4. Avaliar a capacidade do Ru(cyclam)NO na inibição da adesão de plaquetas ativadas ou não;
5. Determinar a biocompatibilidade das plataformas de inox, matriz de siloxano e matriz de siloxano incorporado com Ru(cyclam)NO por meio da avaliação da citotoxicidade e da avaliação funcional em HUVEC e RASM.

3. MÉTODOS

3.1. Obtenção do composto $\text{trans-[Ru(NO)Cl(cyclam)](PF}_6)_2$ e das plataformas

O composto de rutênio doador de NO $\text{trans-[Ru(NO)Cl(cyclam)](PF}_6)_2$ (PM: 656,78g/mol), nomeado neste estudo como **Ru(cyclam)NO**, bem como as plataformas de inox, matriz de siloxano e matriz de siloxano incorporado com Ru(cyclam), foram produzidos e gentilmente cedidos pelo grupo de Química Inorgânica e Analítica do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo – USP, sob coordenação do Prof. Dr. Elia Tfouni, e pelo Prof. Dr. Fábio Gorzoni Doro, do Departamento de Química Geral e Inorgânica da Universidade Federal da Bahia.

As concentrações de Ru(cyclam)NO e SNP utilizadas nos experimentos foi similar ao estudo *in vitro* de Torsoni e colaboradores (2003). Após experimentos pilotos foram determinadas para este estudo as concentrações 0,5mM, 1,0mM, 1,5mM e 2,0mM, para ensaios de citotoxicidade, e, fixado em 0,5mM para os outros experimentos. Para ambos os compostos o veículo utilizado foi meio M200 e as soluções foram preparadas imediatamente antes do uso, filtradas em membrana Millipore 0,22 μm , e mantidas ao abrigo da luz. As plataformas utilizadas consistiam em amostras controle, que são placas de aço inoxidável, amostras de placas de aço com a matriz de siloxano incorporada pelo processo de sol-gel, e amostras de placas de aço com a matriz incorporada juntamente com o complexo Ru(cyclam)NO.

3.2.Linhagem celular e manutenção das culturas

Neste trabalho, foram utilizadas células da linhagem HUVEC (células endoteliais umbilicais humanas), obtidas da empresa Life Technologies Brasil. Essas células foram cultivadas em meio de cultura M200 suplementado com 1 ug/ml de hidrocortisona, 10 ng/ml de fator de crescimento epidérmico humano (EGF), 10 ng/ml de heparina, 3 ng/ml de fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF), gentamicina/anfoterecina (Zhang *et al.*, 2006; Hafizah *et al.*, 2010) e foram acrescentados soro fetal bovino (SFB) com concentração final de 20% em estufa à 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO_{2s}. A manutenção da linhagem foi realizada através de repiques periódicos e a semeadura foi feita em garrafas estéreis (TPP, Trasadingen, Switzerland), estoque ou placas experimentais. As células foram utilizadas somente entre as passagens 2 a 8.

As células musculares lisas arteriais de coelho (RASM), seleção de linhagem imortalizada previamente estabelecida, foram generosamente fornecidas pela Dra. Helena Nader, do departamento de Bioquímica da Universidade Federal de São Paulo (São Paulo, SP, Brasil). Essas células foram cultivadas em meio F-12 10% SFB com 100 U/ml de penicilina e 10 mg / ml de estreptomicina em estufa à 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO_s. A manutenção da linhagem foi realizada através de repiques periódicos e a semeadura foi feita em garrafas estéreis (TPP, Trasadingen, Switzerland), estoque ou placas experimentais.

3.3. Western blotting

Células HUVEC foram cultivadas em garrafas para cultura de 25cm², em DMEM 10% e/ou em M200 suplementado, e quando atingiram cerca de 80% de confluência foram carenciadas utilizando meio DMEM e M200 com 0,5% de SFB durante a noite. Foram analisadas as proteínas marcadoras de células endoteliais VE-caderina e NOSe.

Após o período de carência, o meio de cultura foi removido e as células lavadas três vezes com PBS gelado e mantidas a 4°C. O homogenato total foi obtido utilizando tampão RIPA (50 mM Tris HCl pH 7.4; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1% Triton X-100; 1% desoxicolato de sódio; 0,1% SDS) acrescido de 10 µl/ml de um coquetel de inibidores de proteases (AEBSF 104 mM, aprotinina 90 µM, bestatina 4 mM, E-64 1,4 mM, leupeptina 2 mM, pepstatina A 1,5 mM) além de 1 mM de ortovanadato de sódio e PMSF (todos da Sigma, St Louis, MO, USA), por 15 minutos, e então as garrafas foram raspadas, as amostras transferidas para eppendorfs previamente resfriados, sonicadas (3x 5 segundos, 8W, no gelo), e centrifugadas a 12.000 rpm, por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi recolhido para outro eppendorf, e uma alíquota foi utilizada para dosagem de proteínas, através do método de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), utilizando-se uma curva de concentração com albumina bovina (BSA).

As amostras foram então incubadas a 100°C por 5 minutos juntamente com tampão de Laemmli 2x (azul de bromofenol 0.1%, fosfato de sódio 1 M, glicerol 50%; SDS 4%, 2-mercaptoetanol 10%) na proporção 1:1, e então submetidas à eletroforese em gel bifásico de poliacrilamida, que consiste em um gel de empilhamento (tris 0,5 M pH6.8, acrilamida/bis-acrilamida (30/0,8) 5%, SDS 0,1%) e um gel de resolução (tris 1,5 M

pH 8,8, acrilamida/bis-acrilamida (30/0,8) 8%, SDS 0,1%), polimerizados pela adição de TEMED e persulfato de amônio. A corrida foi efetuada inicialmente a 70 V (40 minutos) e depois a 100 V até fim do gel por aproximadamente 2 horas, em meio a tampão de corrida (tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,4%), e em cada gel foi adicionado 5 µl de um padrão de peso molecular (#1610373 Precision Plus Protein - Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). As amostras foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) durante 2 horas a 120 V, em gelo, em meio a tampão de transferência (tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%). Após a transferência, a membrana foi bloqueada com solução de 5% de leite desnatado em TBS-T (NaCl 1,6 M, tris 0,2 M, tween-20 0,1%), durante 90 minutos, em temperatura ambiente e sob agitação suave.

A membranas foram incubadas com o anticorpo primário VE-caderina (SC-52751 – mouse – monoclonal – 1:1000) e NOSe (BD-610297 – mouse – monoclonal – 1:1000) por 12-16 horas a 4°C, sob agitação suave, e após este período, a membrana foi lavada três vezes por cinco minutos em solução de TBS-T, e então incubada com o anticorpo secundário anti-IgG conjugado com HRP de camundongo (#1721011 - Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) na diluição 1:5000, durante 2 horas, à 4°C e sob agitação suave.

As membranas foram novamente lavadas em TBS-T, por três vezes de 5 minutos, e então incubadas por 5 minutos com os reagentes de quimiluminescência (ácido p-cumárico 201 µM, luminol 1,24 mM, tris 1,5M pH 8,8, H₂O₂ 0,018%) e expostas por 5 minutos em um fotodocumentador Gbox iChemi XR (Syngene International Ltd, Bangalore, Índia).

3.4. Ensaio de viabilidade celular

3.4.1. Ensaio de redução de MTT

A avaliação da viabilidade celular foi efetuada por meio do ensaio de redução do tetrazólio 3-brometo de 4,5-dimetil-2-tiazolil-2,5-difenil-tetrazólio – Sigma (MTT) segundo Mosmann (1983).

A viabilidade, neste método, é avaliada por meio da medida da capacidade das células de reduzir o MTT a formazan azul. O formazan azul é um pigmento insolúvel extraído das células e quantificado espectrofotometricamente. A redução deste tetrazólio é catalisada pela enzima desidrogenase succínica, presente na membrana mitocondrial. Então, a atividade dessa enzima reflete na funcionalidade metabólica das mitocôndrias e a viabilidade celular. Assim, a inibição da atividade enzimática causada pela substância a ser analisada leva a uma diminuição da quantidade de formazan azul formado.

As células HUVEC foram semeadas em placas de 96 poços (5000 células / mL, 100 uL / poço) e cultivadas em atmosfera úmida a 37 °C, 5% CO₂ durante 24 h. Em seguida, as células foram sincronizadas durante a noite com meio contendo 0,5% de soro fetal bovino. Após sincronização do ciclo, as células foram tratadas com os compostos Ru(cyclam)NO e nitroprossiato de sódio (SNP). Em um primeiro momento as células endoteliais foram tratadas com Ru(cyclam)NO nas concentrações 0,008 mM, 0,028 mM, 0,089 mM e 0,268 mM por 24 horas. Contudo, nestas concentrações não foram obtidas alterações maiores que 20% na viabilidade das células (experimentos piloto e resultados não apresentados). Assim sendo, nos experimentos aqui em apresentação, as células foram incubadas por 24 horas nas concentrações 0,5 mM, 1,0 mM, 1,5 mM e 2,0 mM. Após incubação, o meio celular foi descartado, e as células foram lavadas, uma vez, com EBSS (NaCl 17,1 mM; KCl 0,7 mM; KH₂PO₄ 0,05 mM;

NaH₂PO₄ 0,04 mM; D-glicose 0,7 mM; pH 7,4) estéril. Em seguida, o meio foi aspirado e 100 µl de solução de MTT (0,5 mg/mL em meio contendo 0,5% de soro fetal bovino) foram adicionados a cada poço. Após incubação por 4 horas 37°C, 5% CO₂, o sobrenadante foi removido e os cristais de formazan azul foram dissolvidos em 150 µl de DMSO. As placas foram agitadas gentilmente a 37°C, 5% CO₂, durante 2 horas. A absorbância foi registrada a 570 nm utilizando um leitor de microplacas de ELISA (Biotek). Cada valor das diferentes amostras e controle foi baseado na média de três poços, e o erro padrão da média foi calculado baseado nos valores obtidos por três experimentos independentes.

Para análise da citotoxicidade das células expostas as plataformas de inox, matriz de siloxano e matriz de siloxano incorporado com Ru(cyclam)NO, as células da linhagem RASM e HUVEC foram semeadas em placa de 12 poços (1 x 10⁶ células) e expostas as plataformas de inox, matriz de siloxano e matriz de siloxano incorporado com Ru(cyclam)NO por 24 horas. Após este período, foram adicionadas a solução de MTT (0,5 mg/ml) por 4 horas, a 37°C, 5% CO₂, e então determinada a absorbância em 570 nm utilizando um leitor de microplacas de ELISA (Biotek). Cada valor das diferentes amostras e controle foi baseado na média de três poços, e o erro padrão da média foi calculado baseado nos valores obtidos por três experimentos independentes.

3.5. Ensaio de proliferação celular

3.5.1. Incorporação de timidina triciada

A taxa de proliferação celular foi medida pelo aumento da população celular em um período de 24 horas após sua exposição ao complexo Ru(cyclam)NO. As células foram semeadas ($5,0 \times 10^4$ células/poço) em placas de 24 poços, cultivadas em 5% CO₂ em atmosfera úmida a 37 ° C durante 24 h. Em seguida, as células foram sincronizadas durante a noite com meio M200 contendo 0,5% SFB. Após este período retirou-se o meio de cultura das cavidades e as células foram lavadas com EBSS. Então, as células foram pré-tratadas ou não com o fator de crescimento EGF (25 ng/mL) por 2 horas e após este período tratadas ou não com Ru(cyclam)NO por 24 horas na concentração de 0,5 mM em estufa de 5% CO₂, a 37°C. Ao final do tratamento, o meio contendo o composto foi removido e as células foram cultivadas novamente em meio completo, nas mesmas condições anteriores por 24 horas. Nas últimas 4 horas finais, foi adicionado 1 µCi [³H]-timidina, um análogo do nucleotídeo timina em cada poço. Ao final, as células foram lavadas com tampão EBSS gelado, fixadas com ácido tricloroacético 5% e lisadas com NaOH 0,2 N + 0,2%SDS. A incorporação ao DNA celular foi determinada por meio contagem em cintilação em contador Beckman-LS 5000 TD (Beckman Instruments, Fullen, Califórnia, EUA). Os resultados estão expressos em porcentagem versos o controle.

3.6. Ensaio de migração celular

3.6.1. Transwell

O ensaio de migração transwell detecta tanto a migração celular quanto o aumento da motilidade. O NO aumenta a motilidade das células endoteliais resultando no aumento da migração celular através da membrana (Kawasaki *et al.*, 2003).

O ensaio de migração celular por quimioatração foi realizado de acordo com técnicas descritas por Pescatore e colaboradores (2012).

No ensaio de migração transwell, as células HUVEC foram carenciadas durante a noite e então tripsinizadas e ressuspensas em meio M200 completo contendo 20% de SFB, para inativação da tripsina. Foram então centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos. Após centrifugação, as células foram novamente ressuspensas em meio M200 contendo apenas 0,5% SFB. As células foram então contadas, e adicionadas à parte superior do inserto $5 \cdot 10^4$ células, em um volume final de 200 μ l de meio M200 0,5% SFB e/ou Ru(cyclam)NO 0,5 mM. Na parte inferior do inserto, foi adicionado 500 μ l de M200 0,5% SFB e/ou EGF (25 ng/mL). As células foram incubadas em estufa a 37°C e 5% CO₂, sendo estimulada a migração nos períodos de 12, 8 e 6 horas. Verificou-se que a resposta mais adequada para quantificação foi após 6 horas. Como controle do experimento, alguns insertos continham apenas M200 0,5% SFB.

As células que não migraram (parte superior da membrana) foram removidas com um swab delicadamente, e as células que migraram (parte inferior da membrana) foram fixadas com metanol e coradas pela técnica de Hematoxilina-Eosina (HE), e após secagem durante a noite as membranas porosas dos insertos foram delicadamente removidas com o auxílio de um bisturi, e foram colocadas sob lâminas e, após adição de 10 μ l de uma solução de glicerol 80% em PBS, foram adicionadas lamínulas por sob as membranas, garantindo a integridade da membrana. Quatro campos randomizados por membrana foram utilizados para contagem do número de células que migraram em um microscópio invertido Leica DM2000 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Foram realizados três experimentos independentes ao menos em triplicatas.

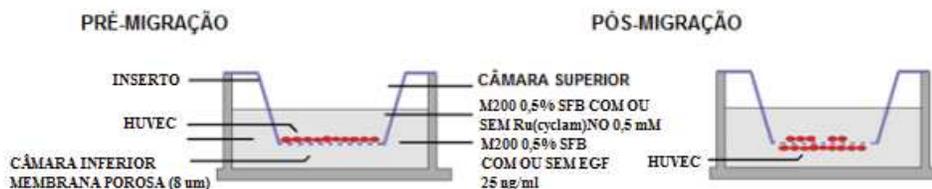


Figura 2. Representação esquemática do protocolo experimental utilizado para análise de migração quimiotática. Esquerda, as células são adicionadas à câmara superior de insertos com membranas porosas, na presença ou ausência do complexo Ru(cyclam)NO, e induzidas à migração para câmara inferior utilizando um meio condicionado com EGF (25 $\mu\text{g/ml}$). **Direita,** após o período de migração de seis horas as células migrantes aderem à superfície inferior da membrana porosa.

Para a análise da migração das células RASM e HUVEC incorporadas nos plataformas de inox, matriz de siloxano e matriz de siloxano incorporado com Ru(cyclam). As células RASM e HUVEC foram carenciadas durante a noite e então tripsinizadas e ressuspensas em meio F-12 e M200 contendo 10% e 20% de SFB, respectivamente, para inativação da tripsina. Foram então centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos. Após centrifugação, as células foram novamente ressuspensas em meio F-12 para RASM e M200 para HUVEC contendo 0,5% SFB. As células foram então contadas, e adicionadas à parte superior do inserto $5 \cdot 10^4$ células, em um volume final de 200 μl . Na parte inferior do inserto, foi adicionado 500 μl de F-12 10% SFB para RASM e M200 completo 20% SFB para HUVEC na ausência ou presença das plataformas. Após a exposição, foi adicionado a solução de MTT (0,5 mg/ml) e expostas por 4 horas, na estufa (37°C, 5% CO₂). As células a partir do topo da câmara *transwell* foram removidas (células residuais) e as células que migraram para o lado oposto da membrana foram transferidas para placa de 24 poços contendo 400 μl de dimetilsulfóxido (DMSO). Após 1 h de agitação suave, 100 μl das amostras foram removidos para placa de 96 poços e então determinada a absorbância em 570nm utilizando um leitor de microplacas de ELISA (Biotek).

A porcentagem da atividade migratória foi calculada pela seguinte fórmula:

$\%migração = \frac{A}{A+B} \times 100$, onde, A é a absorbância das células que migraram e B a absorbância das células residuais. Cada valor das diferentes amostras e controle foi baseado na média de três poços, e o erro padrão da média foi calculado baseado nos valores obtidos por três experimentos independentes.

3.7. Ensaio de adesão celular

As plaquetas lavadas foram obtidas coletando-se o sangue humano proveniente de doadores normais, na presença de tampão ACD-C (citrato de sódio 12,4 mM, ácido cítrico 13 mM e glicose 11 mM) na proporção 9:1. Inicialmente foi preparado o plasma rico em plaquetas (PRP) através da centrifugação do sangue total a 1100 rpm, 23 °C durante 12 minutos. O PRP foi diluído em tampão de lavagem (NaCl 140 mM, KCl 0,5 mM, citrato trissódico 12 mM, glicose 10 mM e sacarose 12,5 mM, pH 6) e centrifugado por 10 minutos a 2300 rpm. Esse procedimento foi repetido por mais uma vez e finalmente as plaquetas foram ressuspensas em solução de Krebs-Ringer desprovida de Ca^{2+} (NaCl 118 mM, $NaHCO_3$ 25 mM, KH_2PO_4 1,2 mM, $MgSO_4$ 1,7 mM e glicose 5,6 mM, pH 7,4). O número de plaquetas foi ajustado para uma solução estoque de 2×10^8 plaquetas/ml, através da contagem manual, utilizando-se solução de oxalato de amônio 1% em câmara de Newbawer. Nesta suspensão de plaquetas foi adicionado $CaCl_2$ com concentração final de 1 mM. As placas de 96 cavidades foram previamente incubadas com solução de fibrinogênio 50 $\mu g/mL$ a 4 °C durante 24 horas. Esse revestimento tem por finalidade criar uma camada de fibrina no fundo da placa onde deverá ocorrer a adesão específica ao fibrinogênio. As placas foram lavadas 2 vezes com solução de Krebs-Ringer para a remoção do excesso de fibrinogênio e incubadas por 1 hora com solução de BSA. O BSA se liga a sítios não específicos como partes da placa onde o

revestimento não foi efetivo, assim, toda a adesão deve ocorrer de modo específico. Após a remoção do BSA, as placas foram lavadas com Krebs-Ringer e então as plaquetas foram incubadas nas seguintes concentrações com os compostos SNP (1 mM e 10 mM) por 10 minutos e Ru(cyclam)NO (0,01 mM, 0,1 mM, 1 mM e 10 mM) por 40 minutos. A ativação das plaquetas foi testada em experimentos piloto utilizando-se ADP (5 μ M e 10 μ M), Colágeno (25 μ g/ml e 50 μ g/ml) e Trombina (50 mU/ml) por 30 minutos a 37°C. Após o tempo de incubação, para a remoção das plaquetas não aderidas, as placas foram lavadas com Krebs-Ringer. As plaquetas aderidas às cavidades foram quantificadas através da determinação da atividade de fosfatase ácida. As cavidades contendo as plaquetas foram incubadas por 1 hora em temperatura ambiente com solução de p-nitrofenil (5 mM) em tampão citrato 0,1 M, pH 5,2, contendo 0,1% de Triton X-100. Após o período de incubação foi adicionado NaOH (2 N) que tem por finalidade interromper a reação de produção da fosfatase ácida. A quantificação da fosfatase ácida foi feita utilizando um leitor de microplaca modelo Spectra Max (Molecular Devices– Sunnyvale, CA) no comprimento de onda 405 nm. A porcentagem de plaquetas aderidas foi calculada com relação à curva padrão, a qual foi obtida através da adição de concentrações conhecidas de plaquetas (0 – 1,0 x 10⁶ plaquetas/cavidade) a poços não revestidos com fibrinogênio. Os ensaios foram feitos no mínimo em triplicata.

3.8. Análise estatística

Os resultados submetidos à análise estatística estão representados como média \pm erro padrão dos valores. As diferenças entre as médias dos valores foram avaliadas pela análise de variância de uma via para variáveis não paramétricas, seguido de teste de bonferroni, utilizando o *software* GraphPadPrism v.5. Foram considerados estatisticamente significantes valores de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Padronização da cultura de células endoteliais umbilicais humanas (HUVEC)

Na fase inicial do presente estudo, as HUVEC foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com 10% SFB. Foi observado em diversas passagens celulares durante o cultivo, alterações nas características morfológicas destas células. Para determinação da alteração fenotípica, foi realizado um ensaio visando à obtenção de proteínas que caracterizam as células endoteliais, como NOSe e VE-caderina.

HUVEC cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% SFB, não apresentaram expressão das proteínas NOSe e VE-caderina (FIG. 3). Porém, quando estas células foram cultivadas em meio M200 suplementado com os fatores específicos para células endoteliais (1 ug/ml de hidrocortisona, 10 ng/ml de EGF, 10 ng/ml de heparina, 3 ng/ml de bFGF, gentamicina/anfoterecina e 20% SFB), a expressão das proteínas testadas foram verificadas. Comprovando assim, a importância da presença dos fatores corretos e essenciais para a manutenção da cultura celular endotelial durante um período inicial de passagens celulares.

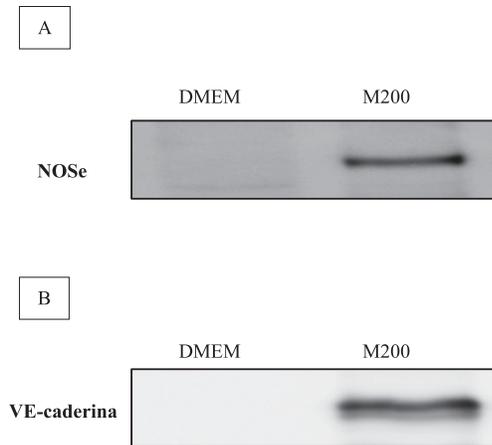


Figura 3. Expressão das proteínas NOSe e VE-caderina, em HUVEC cultivadas em meio DMEM, e em HUVEC cultivadas em M200 completo. As células foram cultivadas até a confluência, carenciadas por 18 horas, e então, obtidos os lisados celulares. *Western Blotting* da análise da expressão qualitativa das proteínas NOSe total e VE-caderina. (A) Expressão da proteína NOSe em HUVEC cultivadas em meio DMEM com 10% SFB e HUVEC cultivadas em meio M200 suplementado com 1 μ g/ml de hidrocortisona, 10 ng/ml de EGF, 10 ng/ml de heparina, 3 ng/ml de bFGF, gentamicina/anfotericina e 20% SFB. (B) Expressão da proteína VE-caderina em HUVEC cultivadas em meio DMEM com 10% SFB e HUVEC cultivadas em meio M200 suplementado com 1 μ g/ml de hidrocortisona, 10 ng/ml de EGF, 10 ng/ml de heparina, 3ng/ml de bFGF, gentamicina/anfotericina e 20% SFB.

As HUVEC cultivadas em meio M200 suplementado com os fatores específicos, conforme citado acima se mantiveram, durante todo o cultivo, justapostas, achatadas e em camada única, conservando assim suas características morfológicas. (FIG. 4)

Diante disso, o meio de cultura utilizado para todos os experimentos a partir deste, foi o M200 suplementado com 1 μ g/ml de hidrocortisona, 10 ng/ml de EGF, 10 ng/ml de heparina, 3 ng/ml de bFGF, gentamicina/anfotericina e 20% SFB, e as células utilizadas foram entre a segunda e oitava passagens.

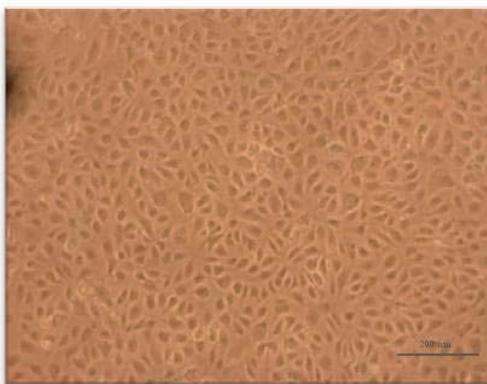


Figura 4. Fotomicrografia de células endoteliais umbilicais humanas (HUVEC). HUVEC confluentes, na passagem 02, mantidas sob cultivo em meio M200 suplementado 1 ug/ml de hidrocortisona, 10 ng/ml de fator de crescimento epidérmico humano (EGF), 10 ng/ml de heparina, 3 ng/ml de fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF), gentamicina/anfotericina e 20% de soro fetal bovino (SFB) em estufa à 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

4.2. Avaliação da viabilidade celular: ensaio de redução de MTT

O MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), um tetrazólio amarelo, após redução por desidrogenases presentes no meio celular, gera cristais de formazan de cor púrpura. A quantidade de formazan gerada pela atividade dessas desidrogenases é diretamente proporcional ao número de células viáveis. (Denizot e Lang, 1986; Hatai *et al.*, 2000)

O teste de redução de MTT tem sido amplamente utilizado em vista de sua praticidade e precisão na determinação da citotoxicidade de uma variedade de agentes como linfotoxinas, quimioterápicos, pesticidas, radiação, cosméticos e drogas de interesse farmacológico (Sorrage *et al.*, 2011).

As HUVEC cultivadas e expostas aos doadores de NO, Ru(cyclam)NO e SNP durante 24 horas, mostraram uma perda gradativa da viabilidade celular de maneira dose-dependente. Na fase inicial deste estudo, foram avaliadas concentrações mais

baixas de Ru(cyclam)NO, respectivamente com valores que expressam a porcentagem de células viáveis em média de 0,008 mM de 98%, de 0,028mM 98%, de 0,089mM 97% e de 0,268mM 96%. Assim, não foi verificada redução maior que 20% na viabilidade celular após exposição ao complexo durante 24 horas nestas concentrações testadas.

Após estes experimentos piloto, foi determinada a faixa de concentração de 0,5 a 2,0 mM para o complexo e para o SNP. A exposição das células ao SNP produziu redução da viabilidade celular de forma significativa, com valores em média de 67% após exposição de 24 horas na maior concentração avaliada, ou seja, de 2,0 mM(TAB. 2). A citotoxicidade induzida pelo complexo Ru(cyclam)NO apresentou uma diminuição, porém, significativamente menor quando relacionada ao SNP, com valores reduzidos em média 41% após exposição de 24 horas na maior concentração avaliada (2,0mM).

Tabela 2. Citotoxicidade do complexo Ru(cyclam)NO e SNP, expressa como a porcentagem de células viáveis em relação ao controle, avaliada pelo método de redução de MTT, após exposição durante 24 h.

	Ru(cyclam)NO	SNP
Concentração	24h	24h
0,5mM	94,7± 3,55	67,8 ± 4,65*
1,0mM	85,8 ± 6,36	34,8 ± 0,36*
1,5mM	80,3 ± 2,58	33,2 ± 1,67*
2,0mM	59,0 ± 4,42	32,6 ± 2,07*

Dados representam média ± E.P.M de três experimentos independentes. *, p < 0,05 vs SNP.

4.3. Avaliação da proliferação celular em resposta ao Ru(cyclam)NO em HUVEC estimuladas pelo EGF

A determinação da proliferação celular em resposta a diferentes tratamentos foi avaliada por meio do ensaio de incorporação de timidina triçada.

As HUVEC tratadas apenas com o composto Ru(cyclam)NO apresentaram a manutenção dos valores similares ao controle na proliferação celular, enquanto que, as células tratadas com o EGF apresentaram um aumento significativo na proliferação celular, o qual foi em média de 39%. O tratamento com Ru(cyclam)NO na presença do EGF produziu redução significativa na proliferação celular, o qual foi em média 48%, apresentando valores similares aos obtidos no controle (FIG. 5).

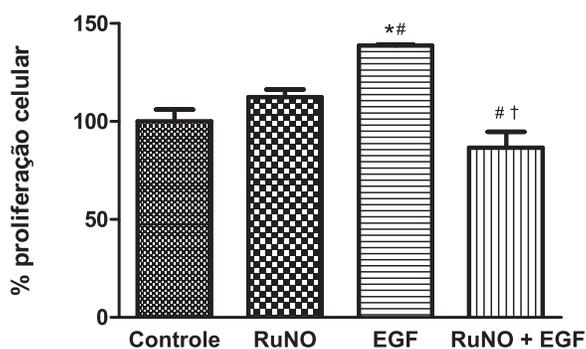


Figura 5. Resposta proliferativa de HUVEC na presença ou não de EGF após 24 horas de tratamento, mensurada através de ensaio de incorporação de timidina triçada. Análise da proliferação pela incorporação de nucleotídeo marcado ($[^3\text{H}]$ -timidina - $1\mu\text{Ci/ml}$) ao DNA durante a replicação, em células tratadas com o complexo Ru(cyclam)NO ($0,5\text{mM}$), na presença ou ausência de EGF (25 ng/mL). Dados representam média \pm E.P.M de três experimentos independentes. Controle, HUVECs sem estímulo. *, $p < 0,05$ vs Controle; #, $p < 0,05$ vs RuNO, †, $p < 0,05$ vs RuNO + EGF. ANOVA Bonferroni.

4.4. Avaliação da migração celular em resposta ao Ru(cyclam)NO em HUVEC estimuladas pelo EGF

A resposta na migração celular ao tratamento com o complexo Ru(cyclam)NO na presença do EGF foi avaliada pelo ensaio de quimioatração, denominado *transwell*.

As HUVEC tratadas apenas com o complexo Ru(cyclam)NO apresentaram um aumento na migração celular em média de 24%, em relação ao controle, enquanto que, as células tratadas apenas com o EGF apresentaram um aumento na migração celular em média de 108%, assim as células que receberam o tratamento com Ru(cyclam)NO na presença de EGF apresentaram um aumento na migração em média 37%, quando comparadas com controle. Quando foram comparadas as células tratadas apenas com EGF e as tratadas com Ru(cyclam)NO na presença do EGF foi observado que houve uma redução no estímulo do EGF na migração celular, com valores em média 71%, na migração celular (FIG. 6A).

A fotomiografia das HUVEC durante o ensaio de migração *transwell* comprovaram os resultados quantitativos analisados acima. O número de células que migraram quando tratadas apenas com Ru(cyclam)NO foi semelhante ao controle, as que foram tratadas apenas com EGF apresentaram um maior aumento no número de células que migraram, enquanto que, as que foram tratadas com Ru(cyclam)NO na presença de EGF tiveram o número de células reduzidos e similares ao controle (FIG. 6).

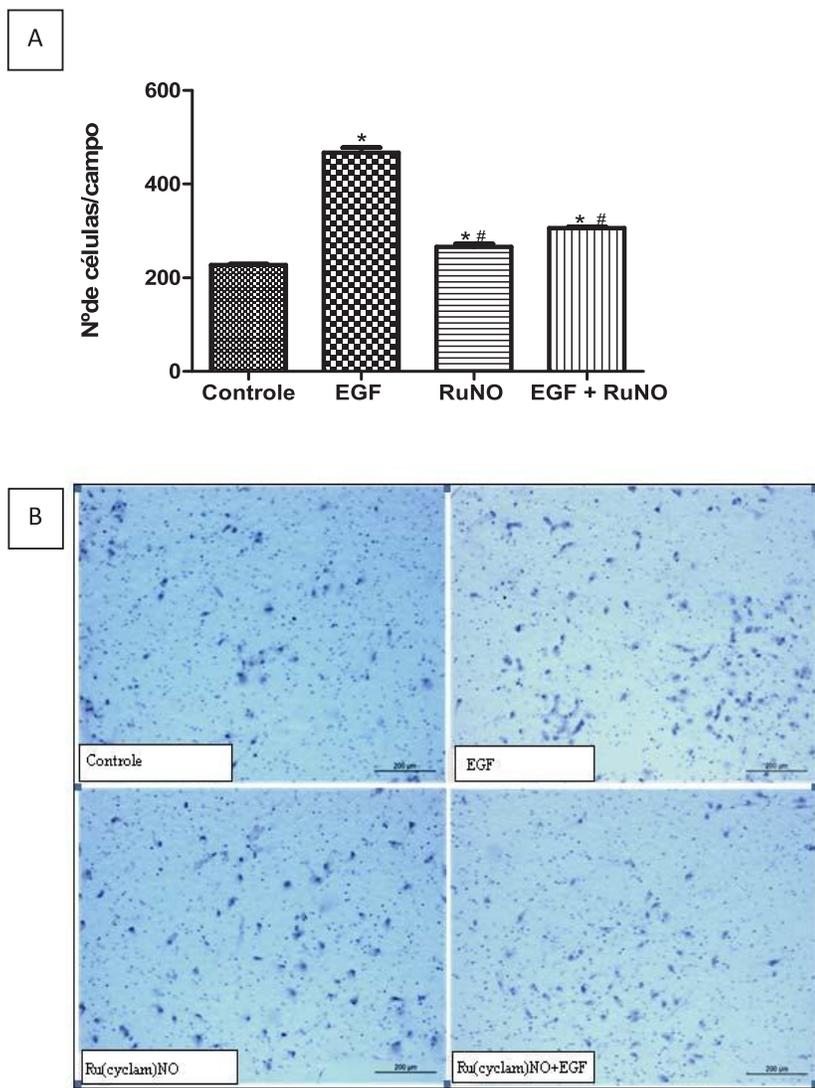


Figura 6. Resposta migratória de HUVEC na presença ou não de EGF após 6 horas de tratamento, mensurada através de ensaio de migração *transwell*. Células foram ressuspensas e adicionadas à câmara superior de insertos com membranas porosas (8µm), na presença do complexo RuNO 0,5mM e induzidas à migração durante 6 horas pela adição ou não de EGF 25ng/mL à câmara inferior do inserto. Células transmembrana foram fixadas e coradas com HE e eosina. (A) Contagem direta das células transmembrana, em quatro campos aleatórios por amostra e (B) Fotomicrografia representativa da migração após 6h de exposição ao Ru(cyclam)NO na ausência ou presença de EGF (x200). Controle, HUVECs sem estímulo. *, $p < 0,05$ vs Controle; #, $p < 0,05$ vs EGF.. ANOVA Bonferroni.

4.5. Avaliação da adesão plaquetária em resposta ao Ru(cyclam)NO

Sabe-se que o NO exerce um efeito inibitório na função plaquetária, assim, esta molécula quando liberada previne a adesão e agregação de plaquetas a parede vascular (Kroll *et al.*, 1996). Previamente ao estabelecimento deste experimento foram comparados os agonistas ADP, colágeno e trombina para verificar o estímulo mais eficaz na ativação da adesão de plaquetas humanas. A análise comparativa dos agonistas mostrou um aumento na ativação de aproximadamente 57%, 26% e 18% para trombina, colágeno e ADP, respectivamente (resultados não apresentados).

No presente estudo, a capacidade de inibição da adesão plaquetária, em plaquetas ativadas ou não pela trombina foram incubadas com os compostos, nas seguintes concentrações, SNP (1 mM e 10 mM) por 10 minutos e Ru(cyclam)NO (0,01 mM, 0,1 mM, 1 mM e 10 mM) por 40 minutos. Foi utilizado o modelo de adesão de plaquetas em placas revestidas com fibrinogênio, o qual é usado para simular a adesão de plaquetas em matrizes vasculares. (Bellavite *et al.*, 1994; Belisario *et al.*, 2000).

A incubação das plaquetas não ativadas com SNP por 10 minutos e com Ru(cyclam)NO por 40 minutos reduziu significativamente a adesão plaquetária. Foi verificada a redução da adesão das plaquetas não ativadas para o SNP na concentração e respectivamente o percentual de 1 mM (35 %), 10 mM (46%) e para o Ru(cyclam)NO nas concentrações de: 0,01mM (26%), 0,1 mM (25 %), 1 mM (26%) e na concentração de 10 mM (33%). Quando as plaquetas foram ativadas com 50 mM/ml de trombina por 30 minutos foi observado um aumento na adesão plaquetária de aproximadamente 57% comparado ao controle basal. Isto ocorre devido à capacidade da trombina em promover a conversão de fibrinogênio em fibrina, papel fundamental no processo de coagulação. Tanto o SNP quanto o Ru(cyclam)NO demonstraram ser eficazes na redução da adesão de

plaquetas humanas sendo que a resposta do Ru(cyclam)NO foi 50% maior que o SNP (FIG. 7).

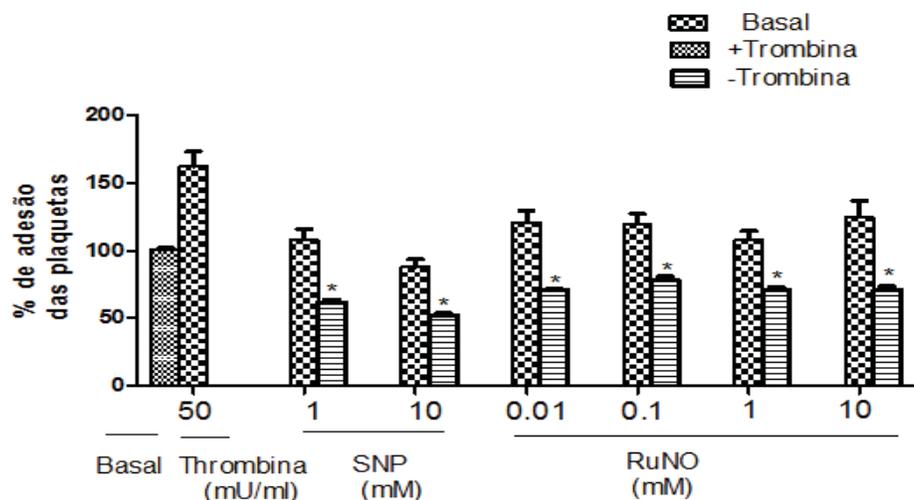


Figura 7. Resposta da adesão de plaquetas ao fibrinogênio humano expostas ao complexo Ru(cyclam)NO e ao SNP. As plaquetas (1×10^6 plaquetas por poço), na ausência ou na presença de trombina (50 mU/ml), foram incubadas com SNP (1 e 10 mM) durante 10 min e Ru(cyclam)NO (0.01 mM a 10 mM) durante 40 min. Os resultados representam média \pm SEM de seis experiências, em triplicata. *, $p < 0,05$ vs trombina. ANOVA Bonferroni

4.6. Avaliação de biocompatibilidade de plataformas incorporadas com Ru(cyclam)NO

4.6.1. Avaliação da viabilidade celular em HUVEC e RASM: Ensaio de redução de MTT

Os estudos para verificar a viabilidade celular das plataformas contendo os filmes fornecem dados para um critério de avaliação de biocompatibilidade geral, no que se refere à estimativa biológica de respostas celulares e insultos externos. Sendo um resultado importante para a análise do efeito de possíveis artefatos, como lixiviação e craqueamento do filme sobre a superfície do stent.

A avaliação da viabilidade das células HUVEC e RASM em plataformas de inox (SS), matriz de siloxano ($T_{70}P_{30}$) e matriz de siloxano incorporado com Ru(cyclam)NO ($T_{70}P_{30}Ru(cyclam)NO$) não apresentaram perda da viabilidade celular em relação aos filmes testados, bem como ao filme incorporado com o doador de NO, Ru(cyclam)NO (FIG.8), sendo encontrados valores similares aos do controle no período de 24 horas.

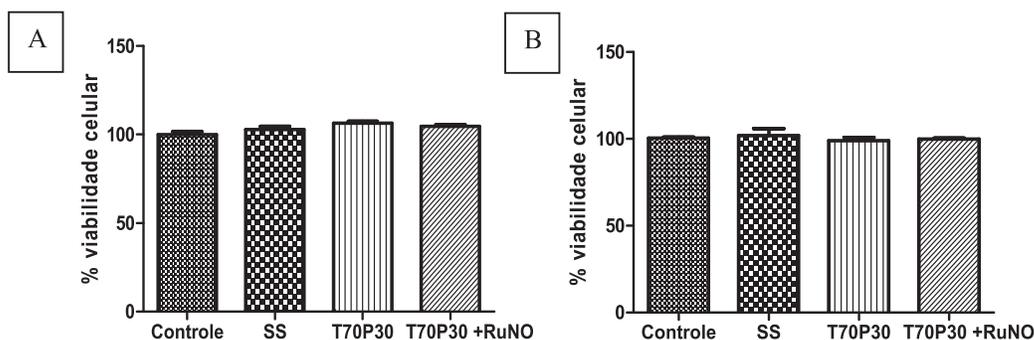


Figura 8. Citotoxicidade induzida após 24 horas de exposição às plataformas de imobilização do complexo Ru(cyclam)NO. Avaliação da citotoxicidade pelo método de redução de MTT. (A) Viabilidade celular em HUVEC expostas 24 horas as plataformas SS, $T_{70}P_{30}$ e $T_{70}P_{30}RuNO$ e, (B) viabilidade celular em RASM expostas 24 horas as plataformas SS, $T_{70}P_{30}$ e $T_{70}P_{30}RuNO$. Dados representam média \pm E.P.M de três experimentos independentes. Controle, HUVEC/RASM sem estímulo. *, $p < 0,05$ vs controle. ANOVA Bonferroni

4.6.2. Análise da migração celular em HUVEC e RASM expostas às plataformas de imobilização do Ru(cyclam)NO

A análise da migração celular em células HUVEC e RASM expostas às plataformas de imobilização, foi realizada pelo ensaio *transwell*. Após adição do MTT, as células que permaneceram na parte superior do *transwell* (células residuais) foram removidas e eluídas em DMSO, e as que migraram, ou seja, as presentes na parte inferior do *transwell* foram adicionadas em outra placa contendo o mesmo reagente, e então as absorbâncias foram obtidas em 570 nm.

A porcentagem da atividade migratória foi calculada pela seguinte fórmula:

$\%migração = A/[A+B] \times 100$, onde, A é a absorbância das células que migraram e B a absorbância das células residuais.

As células HUVEC e RASM incorporadas em plataformas de inox (SS), matriz de siloxano ($T_{70}P_{30}$) e matriz de siloxano incorporado com $Ru(cyclam)NO$ ($T_{70}P_{30}Ru(cyclam)NO$) não apresentaram alteração significativa na migração celular em relação aos filmes testados, bem como ao filme incorporado com $Ru(cyclam)NO$, com valores similares aos encontrados no controle no período de 24 horas (FIG. 9).

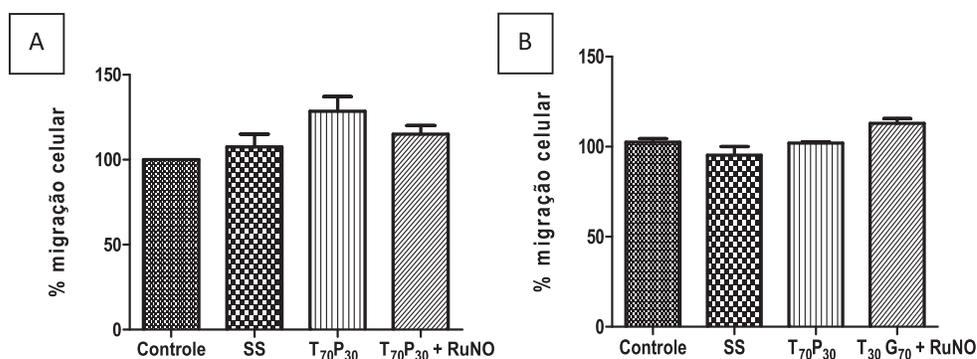


Figura 9. Migração celular induzida após 24 horas de exposição às plataformas de imobilização do complexo $Ru(cyclam)NO$. Avaliação da migração celular pelo método transwell. As células foram contadas pelo método de MTT. (A) Migração celular em HUVEC expostas 24 horas as plataformas SS, $T_{70}P_{30}$ e $T_{70}P_{30}Ru(cyclam)NO$ e, (B) migração celular em RASM expostas 24 horas as plataformas SS, $T_{70}P_{30}$ e $T_{70}P_{30}Ru(cyclam)NO$. Dados representam média \pm E.P.M de três experimentos independentes. Controle, HUVEC/RASM sem estímulo. $p < 0,05$..ANOVA Bonferroni.

5. DISCUSSÃO

Os estudos apresentados mostraram a margem de segurança do composto Ru(cyclam)NO, bem como das plataformas de aço e incorporadas ao composto por meio dos ensaios de citotoxicidade em células HUVEC e RASM sob cultivo. Uma vez estabelecida às concentrações ótimas para os ensaios a serem avaliados e o fenótipo endotelial “saudável”, foram determinadas as respostas de proliferação e migração das HUVEC. Tais respostas foram caracterizadas pela ação do composto em reduzir as ações estimuladas pelo EGF. A capacidade anti-trombogênica foi avaliada por meio de ensaios com plaquetas humanas, os quais demonstraram que o composto foi capaz de inibir a resposta de adesão plaquetária. A biocompatibilidade das plataformas de imobilização do composto foi demonstrada pelos ensaios de toxicidade e migração das HUVEC e RASM.

O NO é uma molécula livre e estável que tem sido eficaz em diversos processos fisiológicos e patológicos. Como algumas doenças têm sido associadas à deficiência do NO, há um grande interesse em doadores de NO exógenos capazes de entregar o NO em alvos específicos.

Considerando as características multifuncionais do NO, esta molécula tem sido alvo de muitos estudos na atualidade. Doadores de NO exógenos que exercem a mesma função da molécula endógena tem sido desenvolvidos nos últimos tempos. Destacamos neste presente estudo, os nitrosilos complexos de rutênio.

Os complexos metálicos são singulares, pois o óxido nítrico reage facilmente com alguns metais, produzindo compostos estáveis. Entre alguns exemplos de complexos metálicos já utilizados na medicina, podem-se citar os compostos de platina, utilizados no tratamento do câncer, os compostos de ouro no tratamento da artrite

reumatóide e os compostos de prata utilizados como agentes antimicrobianos (Allardyce e Dyson, 2001).

Complexos metálicos de rutênio podem ter aplicações como imunossupressor (Bastos *et al.*, 1998), antibiótico (Navarro *et al.*, 1997), anticancerígeno (Sava *et al.*, 1995), antifúngico (De Lima *et al.*, 2003) e como agente antiparasitário (Silva *et al.*, 2010). Dentre os estudos de aplicação de complexos metálicos, os estudos de complexos liberadores de NO como os complexos de rutênio, tem sido o alvo da pesquisa do grupo de Tfouni e em uma parceria com nosso laboratório, estudos têm sido realizados a fim de caracterizar as atividades biológicas e verificar as possíveis aplicações destes complexos no sistema cardiovascular. No presente estudo, avaliamos a capacidade de um nitrosilo complexo de rutênio, Ru(cyclam)NO, de promover a reendotelização almejada após as injúrias vasculares por meio da avaliação da proliferação e migração de HUVEC.

Protocolos realizados em cultura de células são atrativos por diversos motivos, especialmente pelo fácil acesso à observação detalhada, diferentemente do estudo em animais. Porém algumas desvantagens estão presentes no método: a) a senescência celular limita o número de expansões das células originadas de tecidos normais; b) algumas células podem escapar da senescência e se dividir continuamente de modo similar ao de uma linhagem celular, e c) existe o alto risco de contaminação celular, já que os tecidos consistem de uma mistura de tipos celulares que precisam ser removidos (Cedar, 2006).

A expressão de biomarcadores protéicos sintetizados nas células endoteliais é uma forma de avaliação da manutenção adequada da cultura e de seu fenótipo celular. Em nossos estudos, as HUVEC quando cultivadas em DMEM 10% SFB, meio

largamente utilizado para estas células, não mantiveram seu fenótipo endotelial, visto que não expressaram duas proteínas características das células endoteliais “sadias” como a NOSe e VE-caderina. Contudo, uma vez cultivadas em meio contendo os suplementos essenciais para células endoteliais foi observado de forma bem nítida a expressão destas proteínas. Assim, as células endoteliais necessitam de suplementação com fatores específicos em seu meio de cultura para manter suas características endoteliais. Nos estudos em apresentação o meio de cultura padronizado foi o M200 contendo 1 ug/ml de hidrocortisona, 10 ng/ml de EGF, 10 ng/ml de heparina, 3 ng/ml de bFGF, gentamicina/anfotericina e 20% SFB. Outro fator importante a ser observado é a passagem das células, segundo Hoffman e colaboradores (2001) o envelhecimento das células endoteliais leva ao aumento da apoptose devido a perda da funcionalidade da NOSe, diante disso, neste estudo as HUVEC foram utilizadas até a oitava passagem, visto que à partir desta as células não se apresentaram “saudáveis”.

Para que uma droga tenha uso clínico, além de verificar o seu potencial terapêutico este uso deve estar condicionado à análise de sua toxicidade. Assim, o presente estudo foi iniciado pela realização de protocolos experimentais para definir o potencial citotóxico do Ru(cyclam)NO nas HUVEC.

A avaliação da citotoxicidade de um possível agente terapêutico pode ser verificada por diferentes métodos, como: a) nível de integridade da membrana. b) nível de síntese de macromoléculas; c) nível de crescimento celular e d) nível da atividade funcional de organelas (Cook e Mitchell 1989). Dentre estes métodos citados acima, neste estudo foi realizado ensaio que avalia a atividade mitocondrial através da redução do MTT, após a exposição ao composto.

O resultado obtido no ensaio realizado, sumarizado na tabela 2, indicou uma baixa toxicidade do Ru(cyclam)NO quando comparado ao SNP. A exposição das células ao SNP teve um efeito intenso na perda da viabilidade celular, produzindo um decréscimo de 80%. Isto se deve ao fato de que o SNP é um doador que precisa ser metabolizado para a liberação do NO. Esta metabolização é catalisada por enzimas presentes na membrana plasmática e é acompanhada pela liberação de íons cianeto como produto de biotransformação deste doador, sendo que o acúmulo deste íon é considerado altamente tóxico (Bates *et al.*, 1991). Já o Ru(cyclam)NO para a liberação do NO requer a presença de redutores no meio, como por exemplo o ácido ascórbico encontrado no meio utilizado. Ao comparar a ação deste composto na viabilidade celular com a condição controle, ou seja, aquelas que não foram expostas ao composto, notou-se uma redução na maior concentração utilizada a qual não ultrapassou 42% em 24 horas de exposição. Assim, não foi observado o valor de IC₅₀ na faixa da concentração utilizada do composto Ru(cyclam)NO nas HUVEC.

Outros estudos com nitrosilos complexos de rutênio também têm demonstrado baixa toxicidade. Em cultura de células V79 (fibroblastos de pulmão de hamster chinês) foi demonstrado que a toxicidade deste mesmo complexo se apresenta em torno de 3,0mM (Torsoni *et al.*, 2002), em células de melanoma murino (Melan-a) a IC₅₀ deste complexo foi de 9,8mM (Gomes *et al.*, 2007) e, ainda, em estudo com camundongos tratados com [Ru(II)(Hedta)NO(+)], outro nitrosilo complexo de rutênio, foi demonstrado que o tratamento até a dose 9×10^{-5} mol/Kg não levou a morte de nenhum animal experimental (Zanichelli *et al.*, 2007).

Uma vez padronizado o meio de cultura e a margem de segurança do composto foram realizadas as análises dos efeitos deste complexo na proliferação e migração de HUVEC.

Sabe-se que a integridade do endotélio é essencial para a manutenção da homeostase vascular e que o resultado da desnudação endotelial constitui-se do espessamento neointimal, como observado após injúria vascular (Fishman *et al.*, 1975; Clowes e Karnovsky, 1977). Esta neointima sofre um processo denominado de reestenose, o qual é a resposta da parede arterial a lesões mecânicas e compreende em dois processos, a hiperplasia neointimal (migração e proliferação das células musculares lisas e a deposição de matriz extracelular) e o remodelamento vascular. Agregação plaquetária, infiltração de células inflamatórias, liberação de fatores de crescimento, modulação e proliferação de células musculares lisas, deposição de proteoglicanos e remodelamento da matriz extracelular foram identificados como os principais marcos na seqüência temporal da resposta a reestenose (Forrester *et al.*, 1991).

Uma série de estudos têm buscado estratégias para limitar a lesão endotelial no processo de reestenose, bem como acelerar a regeneração das células endoteliais e suplementar os produtos dessas células para reduzir o espessamento neointimal. Promover a reendotelização ao invés de bloquear a cicatrização parece ser a abordagem mais natural para evitar a reestenose (Costa e Simon, 2005).

A reendotelização se caracteriza pela formação de uma nova camada endotelial funcional. Considerando-se que o NO é um importante fator na promoção da resposta proliferativa e migratória das células endoteliais, este é o candidato adequado.

A elaboração de um stent eluidor do composto estudado torna-se interessante para a análise de suas propriedades biológicas *in vivo*, principalmente para a análise da

prevenção da reestenose intra-stent. Apesar da importância dos ensaios *in vivo*, o grande número de animais utilizados e a diferença das espécies específicas vêm sendo cada vez mais criticado. A fim de evitar este problema, várias estratégias de estudo *in vitro* estão sendo analisadas, de uma forma especial para estudos pré-clínicos a cultura de células tem sido uma ferramenta atrativa (Cazarin *et al.*, 2004).

A utilização de sistemas “*in vitro*” permite a utilização de fármacos/moléculas que atuam como agonistas/antagonistas das respostas desejadas. Assim, utilizamos o EGF ciente de que o EGF é um fator de crescimento e um importante mitógeno que participa na função endotelial. O mesmo foi utilizado no presente estudo como um fator ativador mimetizando o seu envolvimento após injúria vascular, comum pós-implantação de stents.

A família do receptor de EGF (EGFR) e seus ligantes serve como um painel de comando na regulação de múltiplos processamentos celulares. Enquanto é claro que a atividade do EGFR é essencial do desenvolvimento normal cardíaco, sua função na vasculatura e seu papel na doença cardiovascular tem sido elucidado somente nos últimos anos (Makki *et al.*, 2013).

A ativação do receptor de EGF (EGFR) tem sido implicada na regulação da pressão arterial, disfunção endotelial, hiperplasia neointimal, aterogênese e remodelamento cardíaco. Além disso, o aumento de ligantes similares ao EGF na circulação, podem mediar a doença vascular acelerada relacionada à inflamação crônica. Este receptor atua em muitos processos celulares envolvidos na doença vascular, tais como a proliferação e a migração, e os seus ligantes são expressos em células endoteliais e musculares lisas, bem como em células inflamatórias.

Após a lesão vascular ocasionada pela implantação do stent, geralmente, ocorre a liberação de citocinas inflamatórias que promovem a ativação e adesão de plaquetas e leucócitos, assim como a liberação de múltiplos fatores de crescimento, que ao se ligarem em seus receptores na membrana plasmática desencadeiam uma série de sinais intracelulares que resultam na expressão de proteínas necessárias para a divisão e proliferação celular (Hansson, 1993; Libby *et al*, 1992; Caramori *et al.*, 1997).

Uma das formas de se identificar a capacidade de um agente de estimular ou inibir a síntese de DNA de células em cultura, ou seja, a proliferação celular, é obtida por meio da análise da incorporação do nucleotídeo timidina, marcado radioativamente com o trício ([methyl-³H]-timidina) durante a replicação do DNA (Rathbone *et al.*, 1992; Dixon *et al.*, 1997).

A proliferação das HUVEC foi estimulada pelo fator de crescimento EGF, porém o tratamento apenas com o doador de NO, Ru(cyclam)NO, não mostrou alteração. O aumento da proliferação das HUVEC pelo EGF se deve ao fato de que, o EGF é considerado um fator de crescimento geral que regula várias funções celulares que envolvem a proliferação de células e diferenciação (Carpenter e Cohen 1979; Wells 1999). O EGF se liga ao EGFR levando a dimerização deste receptor, em seguida, os domínios plasmáticos de tirosina-quinase deste receptor podem ser autofosforilados, e então mediar sinais intracelulares para várias proteínas de sinalização. A sinalização celular resultante desta autofosforilação é a ativação da fosfolipase Cy (PLCy), a cascata mediada pela proteína quinase C (PKC), os mitógenos ativado por proteína quinase (MAPKs), como as quinases reguladas extracelularmente (Erk), as quinases c-Jun N-terminal (JNK), e MAPK p38 e pequenas GTPases como a Rho e Rac (Wells 1999).

O resultado obtido na proliferação celular das HUVEC tratadas com o composto doador de NO, Ru(cyclam)NO e ativadas pelo EGF, foi uma redução de cerca de 50% na resposta obtida pelo EGF “per se”. O efeito anti-proliferativo do NO observado pode ser devido à sua interação com o EGFR na inibição da autofosforilação do receptor ou por sofrer um processo de S-nitrosilação na presença de um doador de NO, segundo estudos de Murillo-Carretero *et al* (2002). Entretanto o conhecimento das vias de sinalização que são ativadas neste processo, bem como a utilização de fármacos inibitórios ou mesmo RNA de interferência (RNAi) são necessários para a compreensão deste efeito.

A migração celular pode ser definida por uma variedade de métodos *in vitro*. A maioria utiliza métodos microscópicos para registrar mudanças de posições e formatos celulares ou a utilização da câmara de Boyden (*transwell*) para análise do movimento celular através de uma membrana porosa a partir de um estímulo quimiotático (Gerthoffer, 2007)

Realizamos ensaios *traswell*, um ensaio de migração direcional, para avaliação da migração frente ao estímulo quimiotático do EGF e a resposta de estímulo a migração celular do composto Ru(cyclam)NO nesta condição. O aumento da migração das células tratadas com EGF foi muito acentuado, sendo o número de células transmembrana mais que o dobro do que o observado no grupo controle. As células tratadas com o Ru(cyclam)NO exibiram um discreto aumento no número de células transmembrana, porém, as células tratadas com Ru(cyclam)NO na presença do EGF exibiram uma diminuição de aproximadamente 71% da resposta obtida pelo estímulo *per se* do EGF. Sabemos que o NO endógeno desempenha um papel fundamental favorecendo a migração das células endoteliais, sendo um regulador chave para migração destas

células (Bulotta *et al.*, 2009). Semelhante ao efeito visto na proliferação celular, devido a ação direta do NO no EGFR, provavelmente constitui-se do fato que explica o efeito anti-migratório do doador de NO nas células HUVEC quando estimuladas pelo EGF. Estudos similares não foram encontrados na literatura sendo necessários estudos adicionais referentes à proliferação e migração das HUVEC.

A ativação de processos de coagulação sanguínea devido ao sangue entrar em contato com a superfície de dispositivos biomédicos, como catéteres, tubos, oxigenador, membranas de hemodiálise, stents vasculares ou enxertos têm sido um problema constante na cardiologia intervencionista (Yang *et al.*, 2012).

Sabe-se que o óxido nítrico exerce efeito inibitório na função plaquetária através da ativação de GMPc/ PKG e consequente redução na concentração de cálcio prevenindo assim a adesão e agregação de plaquetas à parede vascular (Kroll *et al.*, 1996). A disfunção do endotélio presente em algumas condições patológicas é caracterizada pela diminuição da biodisponibilidade do NO que leva a ativação anormal das plaquetas e a formação de trombos (Schafer e Bauersachs 2008; Rivera *et al.*, 2009).

Segundo o padrão europeu ENSO 10993-4 aplicado a avaliação de dispositivos médicos em contato com o sangue, os testes devem incluir a avaliação da ativação de plaquetas *in vitro*, análise quantitativa, adesão, agregação e a meia vida das plaquetas.

Em nossos estudos foi utilizado o modelo de adesão de plaquetas humanas em poços revestidos com fibrinogênio, o qual simula a adesão de plaquetas em matrizes vasculares (Belavite *et al.*, 2004; Belisario *et al.*, 2000).

Neste estudo demonstramos a capacidade do composto Ru(cyclam)NO na inibição da adesão de plaquetas humanas ativadas ou não. Foi verificado uma menor

inibição da adesão de plaquetas ativadas pela trombina promovida pelo composto Ru(cyclam)NO em comparação ao SNP, isto ocorreu possivelmente devido a velocidade de liberação do NO ser maior neste último. Tal resposta também foi verificada por Marcondes e colaboradores (2006) os quais demonstraram similar efeito do SNP relacionado a utilização de nitrosídeos na inibição da adesão plaquetária em fibrinogênio tanto em plaquetas ativadas ou não ativadas pela trombina. O mecanismo de ação do SNP na inibição da adesão plaquetária é amplamente relatada. Sua ação tem sido relacionada à estimulação da GCs, a qual aumenta a concentração de GMPc e inibe a ativação de plaquetas dependente de cálcio (Gibbins, 2004). Assim, necessitamos verificar se o mesmo mecanismo de ação ocorre em doadores de NO nitrosil complexo de rutênio.

Um dos aspectos mais trabalhados na otimização do uso terapêutico dos nitrosilos complexos de rutênio como agentes liberadores de NO está relacionado à estabilidade dos compostos. Sua natureza lábil e reativa são as suas principais limitações. Assim, o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada e que ofereçam estabilidade aos complexos $Ru^{II} \rightarrow NO^+$ são de grande interesse para o sucesso terapêutico de novas espécies químicas (Tfouni *et al.*, 2012).

Uma maneira interessante para a utilização destes compostos foi sua incorporação em sistemas carreadores de drogas, aumentando o tempo de circulação da droga e favorecendo sua incorporação em membranas biológicas.

Superfícies de biomateriais é um pré-requisito importante para o sucesso de vários dispositivos biomédicos, bem como materiais poliméricos. Vias de exposição biológica, assim como materiais de propriedades químicas e físicas devem ser cuidadosamente consideradas através de testes de biocompatibilidade. No presente

estudo os ensaios realizados para determinação da biocompatibilidade demonstraram 100% de compatibilidade das plataformas, destas incorporadas aos recobrimentos e ao Ru(cyclam)NO. As plataformas de aço e incorporadas com diferentes matrizes de siloxanos foram utilizadas para incorporação do complexo ao aço sendo que exibiram baixa citotoxicidade. As soluções de siloxanos são preparadas para formar finos filmes para recobrimento do aço, e são consideradas de baixa toxicidade e descritas com baixos índices de hipersensibilidade, sendo utilizados em diversas aplicações médicas (Dewil *et al.*, 2006). Outros estudos relatam redução da viabilidade celular em presença de plataformas de aço inox sendo que estes mostram que tal efeito pode ser devido à presença de resíduos do processo de preparo do metal ou à liberação de íons níquel (Ren *et al.*, 2006). O uso do aço inox 316L para fins biomédicos deve-se a sua elevada resistência mecânica e biocompatibilidade. Entretanto, atualmente há tendência de se utilizar ligas metálicas titânio-molibdênio (β -titânio) e cromo-cobalto utilizadas na confecção de stents, pois estas são mais flexíveis, duráveis e de extensa biocompatibilidade (Yeung *et al.*, 2007).

O teste funcional de exposição às plataformas analisadas foi realizado nas células HUVEC e RASM pelo ensaio de migração celular *transwell*. Nenhuma alteração funcional na resposta migratória foi verificada após 24hs de exposição.

O presente estudo colaborou na caracterização da margem de segurança do complexo testado, da sua capacidade de liberação e promoção de respostas objetivadas na reendotelização e na atividade anti-trombogênica. Além de verificar a biocompatibilidade das plataformas e processos utilizados para futuro desenvolvimento dos DES. A melhor combinação desses fatores, que são dependentes uns dos outros, é fundamental para o desempenho geral do stent e vai determinar o seu sucesso entre o crescente número de alternativas no campo.

6. SUMÁRIO E CONCLUSÃO

A atividade do nitrosil complexo de rutênio doador de óxido nítrico *trans*-[Ru(NO)Cl(cyclam)](PF₆)₂, nomeado neste estudo como Ru(cyclam)NO foi caracterizada por meio de estudos *in vitro* em células vasculares, os quais mostraram as seguintes respostas:

1. O composto demonstrou citotoxicidade reduzida em relação ao SNP mediante ensaio realizado em HUVEC;
2. A proliferação das HUVEC foi mantida pela presença do composto, porém o mesmo reduziu o efeito estimulatório do fator de crescimento EGF;
3. A migração *transwell* das HUVEC foi estimulada pela presença do composto, porém o mesmo reduziu o efeito estimulatório do fator de crescimento EGF;
4. A adesão de plaquetas ativadas pela trombina ou não foi reduzida pela ação do composto;
5. Foi demonstrada a biocompatibilidade das plataformas de inox, matriz de siloxano e matriz de siloxano incorporado com Ru(cyclam);

A margem de segurança do Ru(cyclam)NO e de suas respectivas plataformas de imobilização foram caracterizadas como baixa e ausente citotoxicidade. As avaliações funcionais evidenciaram que o Ru(cyclam)NO manteve a proliferação celular, estimulou a migração das HUVEC e inibiu a adesão de plaquetas humanas. Estas evidências constituem-se de pontos fundamentais para se obter a reendotelização.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allardyce CS, Dyson PJ. (2001) *Ruthenium in medicine: current clinical uses and future prospects*. **Platinum Metals Rev.** 45: 62-69.
- Avelar SOS, Kelles SMB, Carvalho LMA, Silva CM, Mendonça ICA, Bretas CG. (2008) *Stents farmacológicos: existe lugar para seu uso?* **Rev Med Minas Gerais.** 18: 197-203.
- Bastos CM, Gordon KA, Ocain TD. (1998) *Synthesis and immunosuppressive activity of ruthenium complexes*. **Bioorg. Med. Chem. Let.** 8: 147-155.
- Basudhar D, Bharadwaj G, Cheng RY, Jain S, Shi S, Heinecke JL, Holland RJ, Ridnour LA, Caceres VM, Spadari-Bratfisch RC, Paolucci N, Velázquez-Martínez CA, Wink DA, Miranda KM. (2013) *Synthesis and chemical and biological comparison of nitroxyl- and nitric oxide-releasing diazeniumdiolate-based aspirin derivatives*. **J. Med. Chem.** 56(20):7804-20.
- Bates JN, Bake MT, Guerra R, Harrison DG. (1991) *Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue. Evidence that reduction of the nitroprusside anion and cyanide loss are required*. **Biochem Pharmacol.** 42:157-165.
- Becher MU, Nickenig G, Werner N. (2010) *Regeneration of the vascular compartment*. **Herz.** 35(5):342-51.
- Belisario MA, Tafuri S, Domenico C, Squillacioti C, Morte RD, Lucisano A, Staiano N. (2000) *Immobilised echistatin promotes platelet adhesion and protein tyrosine phosphorylation*. **Biochim. Biophys. Acta** 20; 183–193.
- Bellavite P, Andrioli G, Guzzo P, Arigliano P, Chirumbolo S, Manzato, Santonastaso C. (1994) *A colorimetric method for the measurement of platelet adhesion in microtiter plates*. **Anal. Biochem.** 2; 444-50.
- Britten, MB, Zeiher, AM, Schachinger V. (1999) *Clinical importance of coronary endothelial vasodilator dysfunction and therapeutic options*. **Journal of Internal Medicine.** v. 245, p. 315-27.
- Brüne B. (2005) *The intimate relation between nitric oxide and superoxide in apoptosis and cell survival*. **Antioxid Redox Signal.** 7(3-4):497-507.
- Bulotta S, Lerardi MV, Maiuolo J, Cattaneo MG, Cerullo A, Vicentini LM, Borgese N. (2009) *Basal nitric oxide release attenuates cell migration of HeLa and endothelial cells*. **Biochem Biophys Res Commun.** 386(4):744-9.

- Cai H. (2005) *NAD(P)H oxidase-dependent self-propagation of hydrogen peroxide and vascular disease. **Circ Res.** 96:818–822.*
- Caramori PRA, Yamamoto GI, Zago AJ. (1997) *Reestenose após angioplastia: fisiopatogenia. **Arq Bras Cardiol.** 69: 141-150.*
- Cardoso CO, Quadros AS, Matos LA, Gottschall CA, Sarmiento-Leite RE, Marin-Neto JA. (2007) *Perfil do uso dos stents farmacológicos no Brasil: dados da Central Nacional de Intervenções Cardiovasculares (CENIC). **Arq Bras Cardiol.** 89: 356-361.*
- Carpenter G and Cohen S. (1990) *Epidermal growth factor. **J BiolChem.** 265, 7709-12.*
- Cazarin KCC, Corrêa CL, Zambrone FAD. (2004) *Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Rev Bras Cienc Farm.** 40(3):57-59.*
- Cedar SH. (2006) *The function of stem cells and their future role in health care. **Br J Nurs.** 15 (2): 104-107.*
- Clowes AW, Karnovsky MJ. (1977) *Suppression by heparin of smooth muscle cell proliferation in injured arteries. **Nature (London)** 265: 625–626.*
- Costa MA, Simon DI. (2005) *Molecular basis of restenosis and drug-eluting stents. **Circulation.** 111(17): 2257-73.*
- Culotta E, Koshland-Junior DE. (1992) *NO news is good news. **Science.** 258: 1862-1865.*
- Daemen J, Wenaweser P, Tsuchida K, Abrecht L, Vaina S, Morger C. (2007) *Early and late coronary stent thrombosis of sirolimus-eluting and paclitaxel-eluting stents in routine clinical practice: data from a large two-institutional cohort study. **Lancet.** 369: 667-678.*
- De Gennaro Colonna V, Bianchi M, Pascale V, Ferrario P, Morelli F, Pascale W, Tomasoni L, Turiel M. (2009) *Asymmetric dimethylarginine (ADMA): an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase and a novel cardiovascular risk molecule. **Med Sci Monit.** 15(4):RA91-101.*
- De Lima RG, Lever AB, Ito IY, da Silva RS. (2003) *Antifungal activity of novel catecholamine ruthenium (III) complexes. **Trans Metal Chem.** 28: 272-275.*
- Dixon CJ, Bowler WB, Fleetwood P, Ginty AF, Gallagher JA, Carron JA. (1997) *Extracellular nucleotides stimulate proliferation in MCF-7 breast cancer cells via P2-purinoreceptors. **Br. J. Cancer.** 75: 34-39.*

- Doro FG, Ramos AP, Schneider JF, Filho UPR, da Veiga MAMS, Yano CL, Negreti AL, Krieger MH, Tfouni E.(2014) *Deposition of Organic-Inorganic Hybrid Coatings over the 316L Surgical Stainless Steel and Evaluation on Vascular Cells. Can J Chem.* 10.1139/cjc-2014-0034.
- Estrada C, Gomez C, Martin-Nieto J, De Frutos T, Jimenez A, Villalobo A. (1997) *Nitric oxide reversibility inhibits the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. Biochem. J.* 326:369-376.
- Feelisch M. (1998) *The use of nitric oxide donors in pharmacological studies. Pharmacol.* 358: 113-122.
- Feldman PL, Griffith OW, Stuehr DJ. (1993) *The surprising life of nitric oxide. Chem Eng News.* 20: 26-38.
- Fishman JA, Ryan GB, Karnovsky MJ. (1993) *Endothelial regeneration in the rat carotid artery and the significance of endothelial denudation in the pathogenesis of myointimal thickening. Lab Invest.* 1975; 32: 339–351.
- Ford PC, Wink DA, Stanbury DM. (1993) *Autoxidation kinetics of aqueous nitric oxide. FEBS Lett.* 326: 1-3.
- Forrester JS, Fishbein M, R Helfant, Fagin J. (1991) *Um paradigma de reestenose com base na biologia celular: pistas para o desenvolvimento de novas terapias preventivas. J Am Coll Cardiol.* 17 : 758 -769.
- Förstermann U, Li H. (2011) *Therapeutic effect of enhancing endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression and preventing eNOS uncoupling. Br J Pharmacol.* 164(2):213-23.
- Förstermann U, Sessa WC. (2012) *Nitric oxide synthases: regulation and function. Eur Heart J.* 33(7):829-37, 837a-837d.
- Friederich JA, Butterworth JF. (1995) *Sodium nitroprusside: Twenty years and counting. Anesth Analg.* 81: 152-162.
- Furchgott RF, Zawadzki JV. (1980) *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature* 288:373-6.
- Furchgott RF, Vanhoutte PM. (1989) *Endothelium-derived relaxing and contracting factors. FASEB J.* 3:2007-17.
- Garg, UC, Hassid, H. (1989) *Nitric oxide-generation vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. J Clin Invest.* 83: 1774-1777.

- Giaid A, Saleh D. (1995) *Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. N Engl J Med.* 333(4):214-21.
- Gibbins, J.M. (2004) *Platelet adhesion signaling and the regulation of thrombus formation. J Cell Sci* 117:3415–3425.
- González-Fernández O, Jiménez A, Villalobo A. (2008) *Differential p38 mitogen-activated protein kinase-controlled hypophosphorylation of the retinoblastoma protein induced by nitric oxide in neuroblastoma cells. Free Radic. Biol. Med* 44:353-366.
- Gordge MP, Hothersall J S, Noronha-Dutra AA. (1998) Evidence for a cyclic GMP-independent mechanism in the anti-platelet action of S-nitrosoglutathione. *Br. J. Pharmacol.* 124; 141–148.
- Gruetter CA, Barry BK, McNamara DB, Gruetter DY Kadowitz PJ, Ignarro L. (1979) *Relaxation of bovine coronary and activation of coronary arterial guanylatecyclase by nitric oxide, nitroprusside and a carcinogenic nitrosoamine. J Cyclic Nucleotide Res.* 5: 211-224.
- Gryglewski RJ, Palmer RMJ, Moncada S. (1986) *Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. Nature.* 320:454-6.
- Guérios EE. (1998) *Stents: uma revisão da literatura. Arq Bras Cardiol.* 71: 77-87.
- Gurjar MV, De Leon J, Sharma RV, Bhalla RC. (2001) *Mechanism of inhibition of matrix metalloproteinase-9 induction by NO in vascular smooth muscle cells. J Appl Physiol.* 91(3):1380-6.
- Hafizah AH, Zaiton Z, Zulkhairi A, Mohd Ilham A, Nor Anita MM, Zaleha AM. (2010) *Piper sarmmentosum as an antioxidant on oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells induced by hydrogen peroxide. J Zhejiang Univ Sci B.* 11(5):357-65.
- Hansson GK. (1993) *Immune and inflammatory mechanism in the development of atherosclerosis. Br Heart J.* 69:S38-S41.
- Herbst RS. (2004) *Review of epidermal growth factor receptor biology. Int J Radiat Oncol Biol Phys* 59, 21-6.
- Htay T, Liu MW. (2005) *Drug-eluting stent: a review and update. Vasc Health Risk Manag.* 4: 263-276.
- Hutchings SR, Song D, Fricker SP, Pang CC. (2005) *The ruthenium-based nitric oxide scavenger, AMD6221, augments cardiovascular responsiveness to noradrenaline in rats with streptozotocin-induced diabetes. Eur J Pharmacol* 528: 132-136.

- Ignarro LJ, Cirino G, Casini A, Napoli C. (1999) *Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview.* **J CardiovascPharmacol** 34: 879-886.
- Ignarro LJ, Harbison RG, Wood KS, Kadowitz PJ. (1986) *Activation of purified soluble guanylatecyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein: stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid.* **J Pharmacol Exp Ther.**237:893-900.
- Ignarro, L. (2000) *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology.* **San Diego, California, USA, 1.Ed., Academic Press.** p30-63.
- ISO 10993-4. *Biological evaluation of medical devices. Part 4: selection of testes for interaction eith bood.*
- Janero DR. (2000) *Nitric oxide (NO)-related pharmaceuticals: contemporary approaches to therapeutic NO modulation.* **Free Radical Biol Med.** 28: 1495-1506.
- Junqueira LCU, Carneiro J. (1995) *Histologia básica.* 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 433.
- Kawasaki K, Smith RSJr, Hsieh CM, Sun J, Chao J, Liao JK. (2003) *Activation of the phosphatidylinositol 3kinase/protein kinase Akt pathway mediatesnitric oxide-induced endothelial cell migration and angiogenesis.***Mol Cell Biol.** 23(16):5726-37.
- Khan W, Farah S, Domb AJ. (2012) *Drug-eluting stents: developments and current status.***J Control Release.** 161: 703-712.
- Kipshidze N, Dangas G, Tsapenko M, Moses J, Leon MB, Kutryk M, Serruys P. (2004) *Role of the endothelium in modulating neointimal formation: Vasculoprotetive approaches to attenuate restenosis after percutâneos coronary interventions.* **J Am Coll Cardiol.** 44: 733-739.
- Kodja G, Feelisch M, Noack E. (1995) *Sulfhydryl-containing nitrate esters: a new class of nitric oxide donors.* **Cardiovasc Drug Rev.** 13: 275-288.
- Krieger MH, Consolin-Colombo FM. (2013) *Endotélio e hipertensão arterial.*(cap 10). 219-232.
- Kroll, MH, Hellums JD, McIntire LV, Schafer AI, Moake JL. (1991) *Platelets and shear stress.* **Blood.** 88(5): 1525-41.
- Lagerqvist B, James SK, Stenestrand U, Lindbäck J, Nilson T, Wallentin L. (2007) *Long-term outcomes with drug eluting stents versus bare metal stents in Sweden.* **N Engl J Med.** 356: 1009-1019.

- Lehmann J. (2000) *Nitric oxide donors: current trends in therapeutic applications*. **Exp Opin Ther Pat**. 10: 579-594.
- Lemman A, Burnett Jr. JC. (1992) *Intact And Altered endothelium en regulation of vasomotion*. **Circulation**. 86 - Suppl. III III-12 - III – 19.
- Li C, Wernig F, Leitges M, Hu Y, Xu Q. (2003) *Mechanical stress-activated PKCdelta regulates smooth muscle cell migration*. **FASEB J**.17: 2106-08.
- Libby P, Schwartz D, Brogi E, Tanaka H, Clinton SK. (1992) *A cascade model for restenosis. a special case of atherosclerosis progression*. **Circulation**. 86: 47-52.
- Łuczak K, Balcerczyk A, Soszyński M, Bartosz G. (2004) *Low concentration of oxidant and nitric oxide donors stimulate proliferation of human endothelial cells in vitro*. **Cell. Biol. Int**. 28(6):483-6.
- Lunardi CN, da Silva RS, Bendhack LM. (2009) *New nitric oxide donor based on ruthenium complexes*. **Braz J Med Biol Res**. 42(1):87-93.
- Lüscher TF, Vanhoutte PM. (1986) *Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat*. **Hypertension**. 8:344-8.
- Luz PL, Solimene MC. (1997) *Reestenose após angioplastia transluminal coronária: o problema clínico*. **Rev Assoc Med Bras**. 43: 357-366.
- Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. (2005) *Oxidative stress and vascular disease*. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 25:29–38.
- Makki N, Thiel KW, Miller FJ Jr. (2013) *The epidermal growth factor receptor and its ligands in cardiovascular disease*. **Int J Mol Sci**. 15;14(10):20597-613.
- Marcondes FG, Ferro AA, Souza-Torsoni A, Sumitani M, Clarke MJ, Franco DW, Tfouni E, Krieger MH. (2002) *In vivo effects of the controlled NO donor/scavenger ruthenium cyclam complexes on blood pressure*. **Life Sci**. 70(23):2735-52.
- Marcondes S, Cardoso MHM, Morganti RP, Thomazzi SM, Lilla S, Murad F, De Nucci G, Antunes E. (2006) *Cyclic GMP-independent mechanism contribute to the inhibition pf platelet adhesion by nitric oxide donor: a role for alpha-actinin nitration*. **PNAS**. 103(9): 3434-9.
- Megson IL. (2000) *Nitric oxide donors drugs*. **Drugs Future**. 25: 701-715.

- Michel T, Vanhoutte PM. (2010) *Cellular signaling and NO production. Pflugers Arch.*;459(6):807-16.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. (1989) *The biological significance of nitric oxide formation from L-arginine. Biochem Soc Trans.* 17:642-4.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. (1991) *Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. Pharmacol Ver.* 43: 109-142.
- Mooradian DL, Hustell TC, Keefer LK. (1995) *Nitric oxide donor molecules: effect of NO release rate on vascular smooth muscle cell proliferation in vitro. J Cardiovasc Pharmacol.* 25: 674-678.
- Mosmann T. (1983) *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods.* 65(1-2):55-63.
- Muhlestein JB. (2008) *Endothelial dysfunction associated with drug-eluting stents what, where, when, and how? J Am. Coll. Cardiol.* 2139-40.
- Murillo-Carretero M, Ruano MJ, Matarredona ER, Villalobo A, Estrada C. (2003) *Antiproliferative effect of nitric oxide on epidermal growth factor-responsive human neuroblastoma cells. J. Neurochem.*83:119.
- Murthy MM. (2001) *Restenosis: A challenge to angioplasty. Resonance.* 6: 52-61.
- Muto A, Fitzgerald TN, Pimiento JM, Maloney SP, Teso D, Paszkowiak JJ, Westvik TS, Kudo FA, Nishibe T, Dardik A. (2007) *Smooth muscle cell signal transduction: implications of vascular biology for vascular surgeons. J Vasc Surg. Suppl A:*A15-24.
- Muto A, Fitzgerald TN, Pimiento JM, Maloney SP, Teso D, Paszkowiak JJ, Westvik TS, Kudo FA, Nishibe T, Dardik A. (2007) *Smooth muscle cell signal transduction: implications of vascular biology for vascular surgeons. J Vasc Surg. Suppl A:*A15-24.
- Nascimento CA, Patriarca G, Heimann JC. (2003) *Estrutura orgânica do endotélio vascular. Endotélio e doenças cardiovasculares. São Paulo: Editora Atheneu.* P 01.
- Navarro M, Perez H, Sanches-Delgado RA. (1997) *Sintesis and antimalarial activity in vitro and in vivo of the gold-chlorouine complex. J Med Chem.* 40:1937-1997.
- Noble MA, Munro AW, Rivers SL, Robledo L, Daff SN, Yellowlees LJ, Shimizu T, Sagami I, Guillemette JG, Chapman SK. (1999) *Potentiometric analysis of the*

- flavin cofactors of neuronal nitric oxide synthase. Biochemistry.* 38:16413–16418.
- Osti RZ, Franco DW. (2007) *Aspects of nitrite association with trans-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃H₂O]²⁺. Polyhedron.* 26: 4746-4750.
- Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. (1987) *Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature.* 327:524-6.
- Pepine CJ. (2009) *The impact of nitric oxide in cardiovascular medicine: untapped potential utility. Am J Med.* 122:S10-5.
- Pereira AC, Paulo M, Araújo AV, Rodrigues GJ, Bendhack LM. (2011) *Nitric oxide synthesis and biological functions of nitric oxide released from ruthenium compounds. Braz J Med Biol Res.* 44 (9): 947-957.
- Pescatore LA, Bonatto D, Forti FL, Sadok A, Kovacic H, Laurindo FR. (2012) *Protein Disulfide Isomerase Is Required for Platelet-derived Growth Factor-induced Vascular Smooth Muscle Cell Migration, Nox1 NADPH Oxidase Expression, and RhoGTPase Activation. J. Biol. Chem.* 287: 29290-29300.
- Pollman MJ, Yamada T, Horiuchi M. (1996) *Vasoactive substances regulate vascular smooth muscle cell apoptosis. Counter vailing influences of nitric oxide and angiotensin II. Circ Res.* 79: 748-756.
- Rathbone MP, Deforge S, Deluca B , Gabel, B, Laurensen C, Middlemiss P, Parkinson S. (1992) *Purinergic stimulation of cell division and differentiation: mechanisms and pharmacological implications. Med. Hypotheses.* 37: 213-119.
- Rivera J, Lozano ML, Navarro-Núñez L, Vicente V. (2009) *Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation. Haematologia.* 94(5); 700-11.
- Roy S Herbst. (2004) *Review of epidermal factor receptor biology. Lung câncer.* 59 (2) S21-S26.
- Ruano MJ, Hernandez-Hernando S, Jimenez A, Estrada C, Villalobo A. (2003) *Nitric oxide-induced epidermal growth factor-dependent phosphorylations in A431 tumour cells. Eur. J. Biochem.* 270:1828-1837.
- Sava G, Bergano A. (1995) *Ruthenium-based compounds and tumor growth control. Int J Onc.* 17(2):353-564.
- Schäfer A, Bauersachs. (2008) *Endothelial dysfunction, impaired endogenous platelet inhibition and platelet activation in diabetes and atherosclerosis. J.Curr.Vasc Pharmacol* 6(1): 52-60.

- Schilling, WP, Elliot SJ. (1992) *Calcium signaling mechanisms of vascular endothelial cells and their role in oxidant-induced endothelial cell dysfunction.* **Am J Physiol.** 262:HI617-HI630.
- Sessa WC. (2004) *eNOS at a glance.* **J Cell Sci.** 117:2427-9.
- Shane R, Thomas, Paul K, Witting and Grant R, Drummond. (2008) *Redox control of endothelial function and dysfunction: Molecular mechanism and therapeutic opportunities.* **Antiox & Redox sign,** 10 (10).
- Shao Y, Hu D and Chen J. (2008) *A study on effect of bFGF, EGF and NGF on growth of cultured human corneal endothelial cells.* **Yan KeXueBao** 24, 9-12.
- Silva JJN, Guedes PMM, Zottis A, Balliano TL, Silva FON, Lopes LGF, Ellena J, Oliva G, Andricopulo AD, Franco DW, Silva JS. (2010) *Novel ruthenium complexes as potential drugs for Chagas's disease: enzyme inhibition and in vitro/in vivo trypanocidal activity.* **Br J Pharmacol.** 160:260-269.
- Sokolowska M, Rokita H, Wlodek L. (2003) *Activation of DNA synthesis in human hepatoblastoma HEPG2 cells by the nitric oxide donor, sodium nitroprusside.* **Fund Clin Pharmacol.** 17: 599-607.
- Sorragei C de L, Shishido SM, Lemos ME, Marcondes S, Antunes E, Krieger MH. (2011) *In vitro evaluation of the safe margin, antithrombotic and antiproliferative actions for the treatment of restenosis: Nitric oxide donor and polymers.* **Cell Biochem Funct.** 29(3):207-14.
- Stefanini GG, Holmes DR. (2013) *Drug-eluting coronary-artery stents.* **New Engl J Med.** 368: 254-265.
- Stehr D, Pou S, Rosen GM. (2001) *Oxygen reduction by nitric-oxide synthases.* **J Biol Chem.** 276:14533–14536.
- Tfouni E, Krieger MH, McGarvey BR, Franco DW. (2003) *Structure, chemical and photochemical reactivity and biological activity of some rutheniumaminonitrosyl complexes.* **Coord Chem Rev.** 236: 57-69.
- Tfouni E, Truzzi DR, Tavares A, Gomes AJ, Figueiredo LE, Franco DW. (2012) *Biological activity of ruthenium nitrosyl complexes.* **Nitric Oxide.** 26: 38-53.
- Tfouni E, Doro FG, Figueiredo LE, Pereira JC, Metzker G, Franco DW. (2010) *Tailoring NO donors metallo pharmaceuticals: ruthenium nitrosyl amines and aliphatic tetraazamacrocycles.* **Curr Med Chem.** 17(31):3643-57.

- Torsoni AS, de Barros BF, Toledo JC, Haun M, Krieger MH, Franco DW. (2002) *Hypotensive properties and acute toxicity of trans-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃(NO)](PF₆)₃, a new nitric oxide donor. **Nitric oxide.** 6(3):247-254.*
- Villalobo A. (2006) *Nitric oxide and cell proliferation.* **FEBS J.** 273(11):2329-44.
- Ward MR, Tsao PS, Agrotis A, Dilley RJ, Jennings GL, Bobik A. (2001) *Low blood flow after angioplasty augments mechanisms of restenosis: inward vessel remodeling, cell migration, and activity of genes regulate migration.* **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 21: 208-213.
- Wells A. (1999) *Receptor de EGF.* **Int J Biochem celular Biol** 6:637-643.
- Wink DA, Grisham MB, Mitchell JB, Ford PC. (1996) *Direct and indirect effects of nitric oxide in chemical reactions relevant to biology.* **Methods Enzymol.** 268: 12-31.
- Yan Z, Yokota T, Zhang W, Hansson GK. (1996) *Expression of inducible nitric oxide synthase inhibits platelet adhesion and restores blood flow in the injured artery.* **Circulation.** 79: 38-44.
- Yang Z, Tu Q, Maitz M F, Zhou S, Wang J, Huang N. (2012) *Direct thrombin inhibitor-bivalirudin functionalized plasma polymerized allylamine coating for improved biocompatibility of vascular devices.* **Biomaterial** 33(32); 7959-71.
- Yasunari K, Maeda K, Minami M, Yoshikawa J. (2001) *HMG-CoA reductase inhibitors prevent migration of human coronary smooth muscle cells through suppression of increase in oxidative stress.* **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 21(6):937-42.
- Yetik-Anacak G, Catravas JD. (2006) *Nitric oxide and the endothelium: history and impact on cardiovascular disease.* **Vasc Pharmacol.** 45: 268-276.
- Zanichelli PG, Sernaglia RL, Franco DW. (2006) *Immobilization of the [RuII(edta)NO⁺] Ion on the surface of functionalized silica gel.* **Langmuir.** 22(1):203-8.
- Zhang QH, Yin HC, Zhang JH, Liu PM, Zhang H, Ela MPZ. (2006) *The effect of serum high-density lipoprotein on the growth rate of an endothelial progenitor cells.* **Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi.** 35 (11):672-6.
- Ziche L, Morbidelli R, Choudhuri HT, Zhang S, Donnini HJ, Granger HJ. (1997) *Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis.* **J Clin Invest.** 99 (11); 2625-2634.