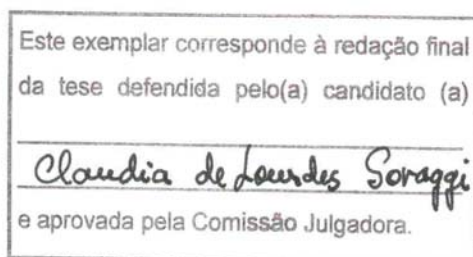


# UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

**CLÁUDIA DE LOURDES SORAGGI**



## **“ATIVIDADE BIOLÓGICA E CITOTOXICIDADE DE MATRIZ POLIMÉRICA COM DOADOR DE ÓXIDO NÍTRICO”**



Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutor em Biologia Funcional e Molecular, na área de Bioquímica.

A handwritten signature in blue ink, which appears to be "M. Edwiges Hoffmann".

Orientadora: Profa. Dra. Maria Edwiges Hoffmann

Co-Orientadora: Profa. Dra. Marta Helena Krieger

**Campinas, 2006**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

**So68a**

Soraggi, Cláudia de Lourdes  
Atividade biológica e citotoxicidade de matriz polimérica  
com doador de óxido nítrico / Cláudia de Lourdes Soraggi. –  
Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientadora: Maria Edwiges Hoffmann.  
Co-orientadora: Marta Helena Krieger.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de  
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Célula muscular lisa. 2. Citotoxicidade. 3. Óxido  
nítrico. 4. GSNO. 5. Matriz polimérica. I. Hoffmann,  
Maria Edwiges. II. Krieger, Marta Helena. III. Universidade  
Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. VI. Título.

(scs/ib)

**Título em inglês:** Biological activity and cytotoxicity of polymeric matrix with nitric oxide donor.

**Palavras-chave em inglês:** Smooth muscle cell; Cytotoxicity; Nitric oxide; GSNO; Polymeric matrix.

**Área de concentração:** Bioquímica.

**Titulação:** Doutora em Biologia Funcional e Molecular.

**Banca examinadora:** Maria Edwiges Hoffmann, Giselle Zenker Justo, José Mauro Granjeiro, Maria Regina Calil, Rodrigo Cardoso de Oliveira.

**Data da defesa:** 23/11/2006.

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 23 de novembro de 2006

**BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Maria Edwiges Hoffmann

(Orientadora)

  
Assinatura

Profa. Dra. Edi Lúcia Sartorato

Assinatura

Prof. Dr. José Mauro Granjeiro

Assinatura

Profa. Dra. Maria Regina Calil

Assinatura

Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira

Assinatura

Profa. Dra. Giselle Zenker Justo

Assinatura

Prof. Dr. Hiroshi Aoyama

Assinatura

Profa. Dra. Fernanda Ramos Gadelha

Assinatura

*“Feliz aquele que transfere o que sabe,  
e aprende o que ensina”.*

**Cora Coralina**

## *Dedicatória*

## *A Família Soraggi*

*aos meus queridos pais, 'in memoriam';*

*Dormélia Maria e José,*

*pessoas exemplares com as quais aprendi a viver e a amar,  
num ambiente de bons princípios, valores e que sempre acreditaram em mim;*

*aos meus queridos irmãos,*

*Caetano, Maria Elisa, Sandra, Rildo e Marcelo,*

*meus amigos de sempre e para sempre,*

*com os quais convivo neste ambiente de fraternidade e amor;*

*aos queridos cunhados e cunhadas,*

*Robert, Giselle, Andréa, Maria Eliete e ao Experto 'in memoriam';*

*aos meus queridos sobrinhos e sobrinhas,*

*às alegrias da minha vida:*

*Carlos, Rafael, Bruno, Victor, Rosiane, Leonardo,*

*Renan, Rengo, Maria Clara, Mateus, Marina*

*e às queridas sobrinhas netas,*

*Isabella e Emily*

*A Família Ferreira*

ao *Carlos*,

*meu amigo e companheiro,*

*pelo apoio e compreensão durante estes anos juntos;*

ao *Rômulo, Agnes, Yasmin, Juninho e Rebeca*,

*pela convivência alegre e saudável deste tempo juntos a vocês;*

ao *Juliano e Michele*,

*pela agradável surpresa e presença em nossas vidas;*

à *Dna. Ivone* e as queridas cunhadas e cunhados,

*Ivete, Ivone, Ivany, Wagner, Barney e Juan, 'in memoriam', pela companhia*

*sempre muito prazerosa e alegre,*

*e aos sobrinhos e sobrinhas,*

*Mônica, Rochete, Cristiano, Pedro Paulo, Juliana,*

*Bianca, Diego, Paulo, Raquel, Nicole, Clara, Sofia e Lucas,*

*pela recepção sempre calorosa.*

## *Agradecimientos*

***À Profa. Dra. Maria Edwiges Lemos,***

*“O professor se liga à eternidade;  
ele nunca sabe onde cessa a sua influência”*

Henry Adams

Professora Edu, agradeço pela oportunidade de realizar este trabalho sob a sua orientação, através da qual os conceitos de ensino e pesquisa foram realmente bem aplicados. Agradeço ainda pelo apoio irrestrito e pela amizade compartilhada, durante toda a execução deste projeto.

À minha querida Mestre, meu eterno respeito e carinho.

***À Profa. Dra. Marta Helena Krieger,***

pela valiosa colaboração com a co-orientação, procurando sempre desempenhar esta função da melhor forma possível, “segurando sempre a barra”, a qual não foi pequena.

***À Profa. Dra. Silvia Mika Shishido,***

pela maravilhosa colaboração e parceria estabelecidas dentro e fora deste estudo, pela convivência saudável do dia-a-dia, pelo companheirismo nas adversidades, pelo suporte técnico em inúmeras situações como na área de informática e principalmente nos estudos com o NO.

*Valeu!!!! Você foi e é demais!!!!*

***À Profa. Dra. Carmen Veríssima Ferreira,***

pela possibilidade de finalizar este projeto com total apoio e colaboração, pelas relevantes considerações como membro da banca examinadora durante o exame de qualificação e pela constante preocupação com a manutenção do laboratório, *um lugar harmonioso e saudável* para se trabalhar.

À *Profa. Dra. Dora Maria Grassi Kassisse*, pela gentileza em aceitar participar das bancas examinadoras e pelas correções e considerações de extrema relevância feitas durante o exame de qualificação, além da presença sempre muito educada, dedicada e alegre na disciplina de seminários durante a gestão *Edu e Dora*.

À *Profa. Dra. Edi Lucia Sartorato*, pela gentileza em aceitar participar das bancas examinadoras, pelos comentários e sugestões dadas durante o exame de qualificação, pela sua participação na banca examinadora da defesa e pela pessoa admirável que é.

À *Profa. Dra. Maria Regina Calil*, membro integrante da banca examinadora, pela pronta aceitação em prestigiar o nosso trabalho e também pela pessoa alegre e exemplar que é.

Ao *Prof. Dr. José Mauro Granjeiro*, pela sua importante participação neste processo, desde o início até o momento e pela pronta aceitação em prestigiar este trabalho, como membro da banca examinadora. Um colaborador nato.

Ao *Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira*, pela ótima receptividade em participar como membro integrante das bancas examinadoras, além da atenção dispensada em todas as solicitações. Uma pessoa muito cordial e atenciosa.

Aos *Profs. Dr. Hiroshi Aoyama, Dra. Giselle Z. Justo e Dra. Fernanda R. Gadelha*, pela pronta aceitação em participar da banca examinadora, além da constante colaboração sempre que necessário.

Aos *Profs. Dr. Edson Antunes, Dra. Sissi Marcondes e ao Rafael*, pela colaboração e fornecimento dos reagentes específicos para os ensaios de agregação e de adesão plaquetária.

Aos *Profs. Dr. Marcelo Ganzarolli de Oliveira e a Dra. Amedea Seabra*, pelo fornecimento do doador de NO sintetizado no Instituto de Química e dos polímeros utilizados neste trabalho.

Aos *Profs. do Depto de Bioquímica*, pelo apoio recebido durante este projeto de doutorado.

Aos *Profs. membros da SCPG-BFM (2001-2006)*, pelas colaborações, orientações, apoio e incentivo durante este trabalho.

À secretária da SCPG-BFM, *Sra. Andréia Vigilato*, pela orientação e suporte profissional durante todo o curso. Sempre muito prestativa e eficiente.

Aos funcionários da CPG-IB, pelas orientações e encaminhamentos.

À secretária do depto de Bioquímica, *Sra. Marina Andressa*, pela colaboração, atenção e consideração durante todos esses anos. Pessoa muito colaboradora e atenciosa.

Ao *Sr. Ferreira*, pela colaboração durante estes anos, na manutenção do nosso laboratório.

À *Denise Balduino Ciampi*, pelo acompanhamento de todo este projeto, sempre tão colaboradora e pelas horas de trabalho juntas no nosso laboratório. Tão importante e especial para nós.

Aos queridos *Jean-Luc, Nadja, Marlene, Paola, Karina, Luciana, Daniel, Aline, Ana Paula, Tarcísio, Ana Lúcia, Neusinha, Simone, Maria Silvia, Stela, Ana Mijares, Terezinha* e especialmente à *Dna Maria Alice*, pelos anos dourados que trabalhamos juntos.

Ao *Luiz Henrique (Kyko)* pela colaboração sempre que necessária e pelo companheirismo destes anos.

Ao *Willian Fernando Zambuzzi* pela colaboração em vários aspectos deste trabalho, além da alegria que o acompanha e que é sempre tão presente no nosso dia a dia.

À *Daisy Machado*, pela colaboração muito especial neste trabalho, boa vontade, alegria e desprendimento que são suas características próprias, além de muita competência.

Ao *Rodrigo Augusto da Silva*, pela presença marcante, séria, profissional, além do equilíbrio e segurança que transmite.

À *Ana Carolina Santos de Souza*, sempre tão séria e muito responsável, pela colaboração em momentos difíceis na preparação desta tese.

Ao *Antônio Hernandes Chaves Neto*, pelas dicas em análise estatística.

À *Marilena, Karla, Maria Augusta, Marylia, Paula Anastácia e ao Gilberto*, pessoas especiais do nosso convívio.

Às colegas do Laboratório de Enzimologia, *Roberta, Érika, Camila e Luciana*, pela presença alegre em vários momentos deste trabalho.

Aos colegas e amigos do LabCard: *Leandro, José Antônio, Amarylis, Viviane, Daniel, Thaís e Rodrigo*, pela amizade e pela colaboração, além de momentos divertidos durante as conversas, almoços e principalmente nos Congressos Científicos. *Amarylis*, obrigada pelo auxílio nos programas de estatística e *Zé Antônio*, pelo apoio recebido e pela companhia nos variados almoços comigo e com a Mika, onde muita conversa rolou....Valeu!!!

À querida *Marlene Fortunato Mendes*, sempre tão amiga e presente, companheira de todas as horas.

À *Norma Pivetta*, tão fiel e companheira, pelos laços de profunda amizade que nos unem.

À *Beth Ficher*, colega, amiga e companheira durante muitos anos. Sempre muito alegre e presente. Você fez falta nestes últimos anos.

Aos queridos amigos *Ronaldo e Gisele*, pela força, pelos momentos compartilhados e pela família alegre que sempre dividem comigo: *João Victor, Isabela, Tomaz, Priscila e Tayrine*. Além de ambas as famílias de origem.

Aos amigos *Hélio e Márcia*, pela amizade, torcida e apoio em vários momentos deste trabalho. Além de todo o suporte técnico na área da beleza.

À *Luciana Ansante*, pela amizade e pelo apoio durante estes anos.

Ao *Rocco Ansante*, pela força espiritual que transmite e pelas orientações especiais.

Ao *Luís Carlos Pires*, pela atenção e excelente atendimento na Barraca do Sr. Albino, em Souza.

A Fapesp e ao FAEP/UNICAMP, pela aprovação deste trabalho como parte integrante do projeto temático (594 /03).

À **UNICAMP** - Universidade Estadual de Campinas, pela oportunidade de desenvolver este trabalho sob seus domínios.

A todas as pessoas que de uma forma ou de outra, material ou espiritualmente colaboraram com este “projeto” e

A **Deus**, acima de tudo, pois sem a Sua energia nada disso seria possível.

## SUMÁRIO

|                                                                           |        |
|---------------------------------------------------------------------------|--------|
| Lista de Abreviações.....                                                 | xv     |
| Resumo.....                                                               | xviii  |
| Abstract.....                                                             | xx     |
| <br>I. Introdução.....                                                    | <br>1  |
| I.1. Laboratório de Bioensaios <i>in vitro</i> .....                      | 2      |
| I.2. Ensaios <i>in vitro</i> .....                                        | 3      |
| I.2.1. Proliferação Celular e Reestenose.....                             | 7      |
| I.2.2. Plaquetas e Trombose.....                                          | 11     |
| I.3. Ambiente Vascular.....                                               | 16     |
| I.4. Doadores de Óxido Nítrico.....                                       | 18     |
| I.5. Matrizes Poliméricas e suas Aplicações .....                         | 25     |
| <br>II- Objetivos .....                                                   | <br>28 |
| <br>III- Materiais e Métodos .....                                        | <br>30 |
| III.1. Linhagens Celulares e Manutenção das Culturas.....                 | 31     |
| III.1.1. Células 3T3 .....                                                | 31     |
| III.1.2. Células RASM .....                                               | 31     |
| III.2. Soluções Estoque .....                                             | 32     |
| III.2.1. Síntese de GSNO por via úmida .....                              | 33     |
| III.3. Avaliação da Citotoxicidade .....                                  | 35     |
| III.3.1. Viabilidade Celular através de Redução do MTT .....              | 35     |
| III.3.2. Viabilidade Celular através da Captação de Vermelho Neutro ..... | 36     |
| III.4. Avaliação da Atividade Antiproliferativa .....                     | 34     |
| III.4.1. Ensaio da Inibição da Proliferação Celular .....                 | 37     |
| III.5. Avaliação do Potencial Hemolítico e Anti-Trombogênico .....        | 39     |
| III.5.1. Ensaio da Hemólise .....                                         | 39     |
| III.5.2. Ensaio da Agregação Plaquetária .....                            | 40     |

|                                                               |     |
|---------------------------------------------------------------|-----|
| III.5.3. Ensaio da Adesão Plaquetária .....                   | 42  |
| III.6. Análise Estatística .....                              | 44  |
| IV- Resultados .....                                          | 45  |
| IV. 1. Avaliação da Citotoxicidade .....                      | 46  |
| IV. 1.1. Viabilidade Celular através da Redução de MTT .....  | 55  |
| IV. 1.2. Viabilidade Celular através da Captação de NR .....  | 59  |
| IV. 2 Avaliação da Atividade Anti-Proliferativa .....         | 59  |
| IV. 2.1. Ensaio da Inibição da Proliferação Celular .....     | 59  |
| IV. 3. Avaliação do Potencial Hemolítico e Trombogênico ..... | 61  |
| IV. 3.1. Ensaio da Hemólise .....                             | 61  |
| IV. 3.2. Ensaio da Agregação Plaquetária .....                | 65  |
| IV. 3.3. Ensaio da Adesão Plaquetária .....                   | 72  |
| V- Discussão .....                                            | 77  |
| VI- Conclusão .....                                           | 91  |
| VII- Referências Bibliográficas .....                         | 94  |
| VIII- Anexos .....                                            | 115 |

## LISTA DE ABREVIACÕES

$\alpha_{IIb}\beta_{IIIa}$  – receptor da glicoproteína GP IIb/IIIa

ACDC - tampão citrato de sódio, ácido cítrico e glicose

Ach - acetilcolina

ADP - adenosina difosfato

AMPc - adenosina monofosfato cíclica

AngII - angiotensina II

ANOVA - análise de variância

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APC- angioplastia percutânea coronariana

ATP- adenosina trifosfato

BSA- albumina de soro bovino

CaCl<sub>2</sub> - cloreto de cálcio

CENIC - Central Nacional de Intervenções Cardiovasculares

CiSH - cisteína

CMLs – (Smooth muscle cell) células musculares lisas

CT – Controle

DEX- dextrana

DICOP - Departamento de Cosméticos

DIMED - Departamento de Medicamentos

EC<sub>50</sub> - concentração que inibe 50% do efeito

EPM - Erro padrão da média

ET-1- Endotelina 1

F-12 - meio de cultura F-12

FDA-USA - *Federal Drug Administration - United States of America*

GC - guanilato ciclase

GMPc - Guanosina monofosfato cíclica

GP IIb/IIIa - glicoproteína

GSH - Glutathione

GSNO - S-nitrosoglutathione

GTP – Guanosina trifosfato

h - horas

HCl - ácido clorídrico

KCl - cloreto de potássio

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  - fosfato de potássio

M- molaridade

$\text{MgSO}_4$  - sulfato de magnésio

MTT - brometo de metil tetrazólio

NaCl - Cloreto de sódio

$\text{NaHCO}_3$  - bicarbonato de sódio

NaOH - hidróxido de sódio

NG - nitroglicerina

NIH - *National Institut of Health*

nm - nanômetro

NO (nitric oxide) - Óxido nítrico

NOS – óxido nítrico sintase

NOSc- óxido nítrico sintase constitutiva

NOSe óxido nítrico sintase endotelial

NPS - nitroprussiato de sódio

NR - *neutral red*

NRU- *neutral red uptake*

$\text{O}_2^-$  - Ânion superóxido

°C - graus centígrados

$\text{ONOO}^-$  - Peroxinitrito

PBS-A- (phosphate-buffered saline) - Tampão fosfato

$\text{PBS-Ca}^{+2}$  - (phosphate-buffered saline) - Tampão fosfato com cálcio

PEG - poli etileno glicol

PEI - poli (etileno imina)

PEO-PPO-PEO - poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno)-poli(óxido de etileno)

PKA - proteína quinase A

PKG - proteína quinase G.

PL- poli-L-lisina  
PPP - plasma pobre em plaquetas  
PR - proliferação relativa  
PRP - plasma rico em plaquetas  
PVA - poli (vinil álcool)  
PVP - poli (vinil pirrolidona)  
RASM - *rabbit arterial smooth muscle cells*  
RBC- (red blood cells) células sanguíneas vermelhas  
rpm - rotações por minuto  
RSH - tióis  
RSNOs (S-nitrosothiols) - S-nitrosotióis  
SDS - dodecil sulfato de sódio  
SFB- soro fetal bovino  
SNAP - S-nitroso-N-acetilpenicilamina  
SNP - nitroprussiato de sódio  
 $t_{1/2}$  - meia vida  
v/v - volume/volume  
 $\lambda$ = comprimento de onda  
%= porcentagem  
3T3- linhagem celular de fibroblastos

## RESUMO

O óxido nítrico é uma molécula multifuncional, a qual está envolvida numa extensa variedade de funções fisiológicas, estendendo-se da neurotransmissão, citotoxicidade de macrófagos e modulação das funções fisiológicas do sistema cardiovascular. Devido às ações benéficas do NO nas diversas disfunções vasculares, há um grande interesse no desenvolvimento em dispositivos que possam liberar NO de maneira controlada no sistema cardiovascular e tecido-específica. Por exemplo, ‘stents’ intracoronarianos recobertos por materiais com liberação de NO, podem reduzir a incidência da reestenose e inibir a formação da neointima após angioplastia percutânea coronariana. O objetivo deste estudo foi o de estabelecer protocolos para avaliação da citotoxicidade e do potencial anti-reestenótico e anti-trombogênico de formulações eluidoras de NO para aplicações em dispositivos intravasculares. As formulações eluidoras de NO foram avaliadas por meio de: A) citotoxicidade através dos ensaios da redução do MTT e da captação do vermelho neutro (NR) com as linhagens celulares: 3T3 e RASM, B) potencial anti-reestenótico utilizando-se o ensaio de inibição da proliferação celular com células de musculatura lisa de coelho (RASM) e C) potencial anti-trombogênico, utilizando-se plaquetas humanas em ensaios de agregação e adesão plaquetária. Foram testadas S-nitrosoglutathione (GSNO), solução polimérica contendo poli (vinil álcool) PVA e poli (vinil pirrolidona) (PVP), e formulação contendo PVA, PVP, GSNO. O ensaio da captação do vermelho neutro mostrou que a GSNO e GSNO/PVA/PVP não apresentaram citotoxicidade em concentrações até 30 mg/mL de GSNO, em ambas as linhagens celulares. Enquanto que o ensaio de redução do MTT mostrou que apenas a solução contendo GSNO apresentou citotoxicidade com  $EC_{50}=2,75\pm0,05$  mg/mL em células 3T3. A sensibilidade da linhagem 3T3 foi maior do que

para células RASM, enquanto que células RASM foram mais sensíveis à alteração de permeabilidade de membrana. A GSNO *per se* promoveu inibição da proliferação celular no ensaio da proliferação celular e este efeito foi potencializado em presença dos polímeros PVA/PVP em concentrações superiores a 22,7 mg/mL. Foi verificada inibição da agregação plaquetária para ambas as soluções, GSNO/PVA/PVP ( $EC_{50}=2,3\pm0,4$  µg/mL), e GSNO ( $EC_{50} = 2,5\pm0,3$  µg/mL). O ensaio da adesão plaquetária mostrou que a inibição superior a 50% causada pela GSNO só foi obtida em concentração acima 6,72 mg/mL, mas nesta concentração não foram encontradas plaquetas viáveis. Os resultados mostraram que a metodologia adotada foi apropriada para a avaliação do potencial anti-reestenótico e anti-trombogênico e também para estabelecer a margem de segurança de novas formulações envolvendo S-nitrosoglutathione e soluções poliméricas.

## ABSTRACT

Nitric oxide (NO) is a multifunctional molecule which is involved in a wide variety of physiological functions, ranging from neurotransmission, macrophage cytotoxicity, and modulation of physiological functions of the cardiovascular system. Due to NO beneficial action in various vascular pathological conditions, there is a great interest on development in devices that can release NO by a controlled manner and tissue-specific. For example, intracoronary stents coated with NO releasing materials, may reduce the incidence of restenosis and inhibit neo-intima formation after following percutaneous angioplasty. The aim of this study was to establish protocols for evaluation of NO eluting formulations cytotoxicity and antirestenotic and antithrombotic activities which have potential for application in intravascular devices. NO releasing formulations were evaluated regarding to following aspects: A) cytotoxicity measured by MTT reduction and Neutral Red uptake assays with 3T3 and RASM cell lines, B) antirestenotic potential by using cell proliferation assay, with rabbit smooth muscle cells (RASM), and C) antithrombogenic potential, by using a human platelet aggregation and adhesion assays. S-nitrosoglutathione (GSNO), polymer solutions containing poly(vinyl alcohol) (PVA) and poly(vinyl pyrrolidone) (PVP), and formulation containing GSNO, PVA and PVP were tested. Neutral Red uptake assays showed that GSNO and GSNO/PVA/PVP solutions presented no cytotoxicity up to 30 mg /mL GSNO, in both cell lines. While MTT reduction assays showed that only the solution of GSNO alone presented cytotoxicity with  $EC_{50}=2.75\pm0.05$  mg/mL, in 3T3 cell line. The sensitivity of 3T3 cells to cytotoxicity was higher than that of RASM cells, while RASM cells were more sensitivity to membrane permeation alterations. GSNO *per se* presented inhibition in a cell proliferation assay and this effect was potentialized with

PVA/PVP in concentrations up to 22.7 mg/mL. Concentration-dependent inhibition of platelet aggregation was verified for both GSNO/PVA/PVP ( $EC_{50}$  of  $2.3 \pm 0.4 \mu\text{g/mL}$ ), and GSNO alone ( $EC_{50}$  of  $2.5 \pm 0.3 \mu\text{g/mL}$ ) solutions. Platelet adhesion assay showed that the inhibition above 50% caused by GSNO only in concentration up to 6.72 mg/mL was found, but in this concentration range, decrease of viable platelets was presented. The results showed that the methodology adopted was suitable to evaluate antirestenotic and antithrombotic potential, and to establish security margins for the development of new formulations involving GSNO and polymers in solution.

# *Introdução*

## **I. INTRODUÇÃO**

### **I.1. LABORATÓRIO DE BIOENSAIOS *IN VITRO***

A interação com a comunidade externa, estendendo à sociedade os conhecimentos resultantes da pesquisa e do ensino, é uma função social da Universidade. O Laboratório de Bioensaios *in vitro*, do Departamento de Bioquímica, vem contribuindo com a inserção da UNICAMP na comunidade externa, através da divulgação e transferência de conhecimentos científicos e tecnológicos na área de Bioquímica e da realização de prestação de serviços especializados junto às empresas e órgãos públicos e privados. Para isso, várias atividades vem sendo desenvolvidas, compreendendo a realização de projetos em cooperação com empresas, o desenvolvimento de novos métodos *in vitro*, a prestação de serviços de consultoria e de análises bioquímicas *in vitro*, além do treinamento de pessoal abrangendo uma ampla gama de profissionais.

As técnicas *in vitro*, utilizando culturas de células e sistemas biológicos modelo, constituem-se de ferramenta de grande relevância atual em pesquisa e desenvolvimento. Tais técnicas são de grande valor e utilidade prática como alternativas aos testes *in vivo*, tendo em vista a minimização do uso de animais de experimentação. Nos últimos anos, tais técnicas vem sendo desenvolvidas por meio de ensaios biológicos *in vitro*, com isso, visando sua aplicação tecnológica. Uma das principais linhas desse laboratório consiste na aplicação de testes *in vitro* em avaliações toxicológicas de compostos e produtos químicos, farmacológicos, materiais dentários, cosméticos, entre outros. Torna-se importante ressaltar a experiência desse laboratório, pioneira nessa área em nosso País, tanto no

desenvolvimento como na aplicação de ensaios toxicológicos *in vitro*, com o apoio de grandes empresas, como a Johnson & Johnson, a Natura Ind. Com. de Cosméticos e outras. Diferentes órgãos e setores da comunidade tem sido beneficiados através dessas parcerias, como órgãos de controle sanitário (ANVISA), órgãos de controle de medicamentos (DIMED) e cosméticos (DICOP), além das empresas cosméticas, farmacêuticas e outras.

Ressalta-se ainda, a escassez de laboratórios especializados no país para a realização destes tipos de serviços e testes *in vitro*, o que tem levado o meio empresarial a procurar a assessoria de pesquisadores e de laboratórios do exterior na busca de respostas e soluções de problemas técnico-científicos. Nesse sentido, o Laboratório de Bioensaios *in vitro*, vem colaborando para o cumprimento das funções sociais da UNICAMP, suprimindo uma demanda não atendida da nossa sociedade, acompanhando uma tendência dominante nos países mais desenvolvidos nestas últimas duas décadas, de investir no desenvolvimento, validação e aplicação de testes alternativos *in vitro* em substituição aos testes com animais de laboratório.

## **I.2. ENSAIOS *IN VITRO***

A identificação dos riscos na utilização de substâncias químicas pelo homem levou a um consumo massivo de animais experimentais. Isso por sua vez, propiciou o desenvolvimento de modelos *in vitro* para avaliações toxicológicas. A disponibilidade de várias metodologias para a avaliação da toxicidade *in vitro*, como alternativas à utilização ao uso de animais (Benavides *et al*, 2004), tem estimulado a sua procura a fim de se predizer a toxicidade de novas substâncias (Dierickx, 2000).

Progressos impressionantes estão sendo realizados nas ciências biomédicas no último século, graças aos modelos experimentais *in vitro*. Entretanto, em toxicologia, somente nas últimas duas décadas os métodos *in vitro* foram desenvolvidos e aplicados (Zucco *et al*, 1998; Carere *et al*, 2002, Zucco *et al*, 2004). Adicionalmente aos interesses científicos envolvidos no desenvolvimento de métodos alternativos nos programas de avaliação de toxicidade, há também as questões éticas, as quais justificam a necessidade da redução do uso de modelos animais de experimentação (Worth e Balls, 2002; Boo e Hendriksen, 2005).

Diferentes ensaios para a avaliação da toxicidade celular tem sido desenvolvidos, baseados em uma variedade de parâmetros de susceptibilidade em relação à ação de diferentes toxinas ( Fotakis e Timbrell, 2006). Assim, tem sido demonstrado que estudos de toxicidade com o objetivo de verificação dos efeitos nas funções celulares básicas e/ou estruturas celulares tem uma boa correlação com os estudos *in vivo*, em relação à toxicidade letal em humanos (Fentem *et al*, 2001).

A maioria dos modelos celulares utilizados são as linhagens celulares, assim sendo, são na sua grande maioria linhagens estabelecidas ou imortalizadas e freqüentemente derivadas de tumor.

Atualmente, uma série de métodos *in vitro* são utilizados numa fase preliminar para acompanhar a performance de um composto de interesse farmacológico ou para avaliação da margem de segurança. Em outros casos, eles representam ferramentas suplementares para a reunião de maiores informações nos mecanismos específicos envolvidos num efeito tóxico (Carere, 2002).

As alternativas *in vitro* tem muitas vantagens sobre os testes *in vivo*, tais como: simplicidade, rapidez, diminuição dos custos efetivos e redução do número e da implicação ética enfrentada com a utilização dos animais de experimentação. Os métodos *in vitro* podem fornecer maior controle sobre as condições experimentais, permitindo assim, uma melhor reprodutibilidade experimental (Chu, 1995). Um considerável número de técnicas *in vitro* utilizando-se células de mamíferos em cultura, foram desenvolvidas para avaliações de citotoxicidade de drogas (Clemenson *et al*, 1996; Dierickx, 2000; Benavides *et al*, 2004).

A atual disponibilidade de uma grande variabilidade de linhagens celulares em bancos de células nacionais, na Universidade Federal do Rio de Janeiro e internacionais como a *American Type Cell Collection-ATCC*, tornou possível a vasta utilização de modelos *in vitro*, levando a um avanço rápido da padronização de métodos alternativos para avaliações toxicológicas. Baterias de ensaios foram propostos e programas inter-laboratoriais foram estabelecidos para se aferir a reprodutibilidade e validade dos ensaios (Balls *et al*, 1995; Zuang *et al*, 2002; Strickland *et al*, 2003).

Além das avaliações do potencial de risco, os modelos *in vitro* com culturas de células são particularmente adequados para o estudo do mecanismo de ação de drogas, de grande importância para as áreas farmacológica e médica.

Alguns programas de metodologias *in vitro* tem a finalidade do desenvolvimento e posterior validação dos ensaios que, provavelmente poderão ser utilizados para a obtenção de informações nas avaliações químicas individuais (ingredientes) ou combinações de substâncias químicas (formulações) (Gettings *et al*, 1996).

Esforços considerados vem sendo feitos nos últimos anos no sentido da validação dos métodos alternativos *in vitro*, visando sua aceitação no campo científico e a regulação

dos procedimentos, para que possam ser aceitos pelos órgãos de controle e saneamento. Isto possibilitaria uma redução considerável do números de animais de experimentação e uma excelente reprodutibilidade, reforçando assim a relevância (Clemedson *et al*, 2000; Fentem e Botham, 2002; Benavides *et al*, 2004).

Os métodos *in vitro* que foram utilizados nesse trabalho para as avaliações de citotoxicidade e de atividade biológica de matriz polimérica com doador de óxido nítrico (NO), estão descritos a seguir na **Tabela 1**.

**Tabela 1.** Métodos *in vitro*

| <b>Ensaio</b>                                  | <b>Parâmetro</b>                                          | <b>Aplicação</b>                                                                          |
|------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| Redução de Metil-Tetrazólio (MTT)              | Viabilidade Celular de fibroblastos 3T3 e células RASM    | Avaliação de citotoxicidade de matriz polimérica com doador de Óxido Nítrico              |
| Captação do corante vital Vermelho Neutro (NR) | Viabilidade Celular de fibroblastos 3T3 e células RASM    | Avaliação de citotoxicidade de matriz polimérica com doador de Óxido Nítrico              |
| Proliferação Celular (PR)                      | Inibição da taxa de crescimento de células RASM           | Atividade antiproliferativa de matriz polimérica com doador de Óxido Nítrico              |
| Liberação de Hemoglobina                       | Hemólise de eritrócitos humanos                           | Avaliação de toxicidade de matriz polimérica com doador de Óxido Nítrico                  |
| Agregação plaquetária                          | Inibição da agregação plaquetária induzida por ADP        | Avaliação da atividade anti-trombogênica de matriz polimérica com doador de Óxido Nítrico |
| Adesão de plaquetas                            | Inibição da adesão de plaquetas induzida por fibrinogênio | Avaliação da atividade anti-trombogênica de matriz polimérica com doador de Óxido Nítrico |

### **I.2.1. PROLIFERAÇÃO CELULAR E REESTENOSE**

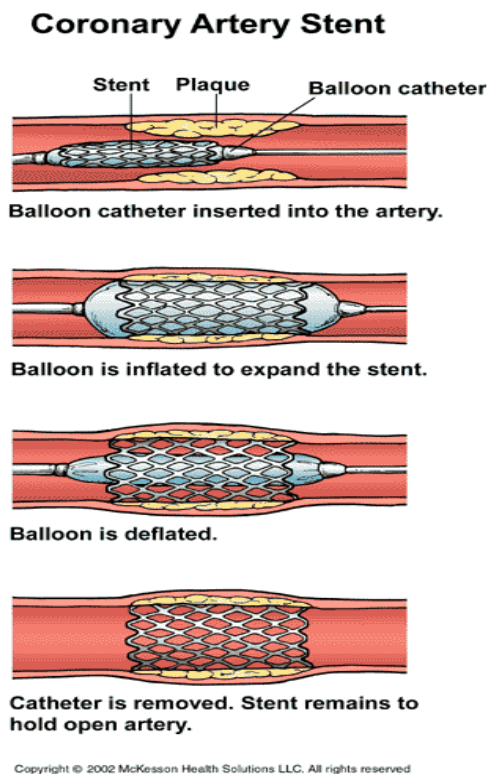
Dentre as numerosas possibilidades de linhagens celulares para o desenvolvimento de ensaios *in vitro*, a linhagem 3T3 constitui-se de fibroblastos de embrião de camundongo e tem sido largamente utilizada em ensaios de citotoxicidade (Spielmann *et al*, 1998, Carere *et al*, 2002). Dentre as características desta linhagem destacam-se a alta velocidade de proliferação, alta eficiência de clonagem, a estabilidade do cariótipo e a manutenção das características após a criopreservação.

A linhagem 3T3 tem sido largamente utilizada nesse laboratório para o desenvolvimento de estudos de citotoxicidade de diferentes compostos de interesse (Takamori, 2004; Convênio Unicamp/Natura S.A., 2000) e especificamente para o presente estudo, foi utilizada para avaliação da citotoxicidade e como referencial a ser comparado com os ensaios realizados em células musculares. Assim, a outra linhagem utilizada foi a linhagem estabelecida RASM (*rabbit arterial smooth muscle cells*), oriunda de célula muscular lisa arterial de coelhos (Buonassisi e Venter, 1976). Esta linhagem tem sido muito utilizada em estudos da biologia vascular (Young *et al*, 2000; Chen e Gardner, 2004; Janiszewski *et al*, 2005).

No presente estudo, a utilização da linhagem de células de musculatura lisa (RASM) foi devido ao objetivo de investigar a resposta de inibição na proliferação destas células, promovida pela formulação de matriz polimérica com doador de óxido nítrico (NO). Tal resposta visa a possibilidade de impedir ou diminuir o processo de reestenose, o qual é ocasionado por injúria vascular e constitui-se um dos principais inconvenientes pós implantação de ‘stent’ coronariano.

A angioplastia coronariana percutânea (APC) envolve um procedimento que visa a desobstrução de uma artéria do coração, por meio de um catéter que possui um balão inflável na sua extremidade terminal (Kiemeneij *et al*, 2001).

O ‘stent’ é uma prótese metálica que é introduzida até o local da obstrução da coronária. Quando o balão revestido com o ‘stent’ atinge a obstrução ele está vazio e tem o diâmetro reduzido; ao ser insuflado, o pequeno balão dilata a lesão e implanta a prótese na parede da artéria. Em seguida, o balão é removido, mas o ‘stent’ fica no local para manter a desobstrução e impedir o recolhimento elástico do vaso (**Figura 1**). Assim, a angioplastia coronariana percutânea com a instalação de ‘stent’ tem sido empregada em larga escala, pois pode evitar que se façam as cirurgias cardíacas para reperfusões miocárdicas.



**Figura 1. Processo de implante de ‘stent’ na artéria coronária por meio do procedimento de angioplastia coronária percutânea (APC)**

Nos Estados Unidos da América, 32 ‘stents’ são implantados a cada 10 mil habitantes, na Alemanha são 15 ‘stents’ para cada 10 mil habitantes, já no Brasil 3,4 ‘stents’ para cada 10 mil habitantes. Implantamos 10 vezes menos ‘stents’ que os EUA e 5 vezes menos que a Alemanha. A ampliação do mercado depende de um firme incremento do acesso da população ao sistema de saúde (<http://www.inovacao.unicamp.br/report/news-inovavigor.shtml>) (2006) .

Os ‘stents’ metálicos podem ser de dois tipos:

- sem recobrimento: elimina a retração elástica e o remodelamento negativo do vaso, porém não elimina a hiperplasia neointimal e diminui, mas não elimina a reestenose.
- com recobrimento: são liberadores de agentes bioativos, mantêm as características mecânicas do ‘stent’ e o complexo ‘stent-fármaco’ permite que o agente ativo seja aplicado concomitantemente à dilatação mecânica precisamente no local do tratamento, com altas concentrações teciduais. Espera-se que isto ocorra com pouco ou nenhum nível sistêmico circulante.

Atualmente, tem sido verificada grande eficácia de ‘stents’ recobertos com drogas como o *sirolimus*, um potente inibidor de inflamação, migração e proliferação de CMLs ou o *paclitaxel*, um agente antiproliferativo utilizado nos tratamentos contra o câncer. Entretanto, estes dispositivos ainda apresentam elevados índices de reestenose (van der Hoeven *et al*, 2005). E, ainda, a utilização de drogas antiproliferativas tem ocasionado o retardo no processo de re-endotelização, sendo que alguns estudos recentes mostram maior predisposição a complicações trombóticas (Kuchulakanti *et al*, 2006). Assim, as principais complicações pós-‘stenting’, tanto sem revestimento com drogas, como com recobrimento, constituem-se da reestenose e eventos trombóticos agudos ou tardios.

A reestenose está associada a uma série de interações entre mecanismos inflamatórios e trombóticos (Voestsch *et al*, 2004). Esta resposta patogênica à injúria vascular envolve o remodelamento arterial, a formação de matriz extracelular e a hiperplasia do tecido íntima devido à migração, proliferação e diferenciação das células musculares lisas ‘CMLs’ (Bult, 2002; Burt e Hunter, 2006). A reestenose pode desenvolver-se nos primeiros meses após a angioplastia, tendo o pico de incidência entre o 3º e 6º mês após a realização deste procedimento (Caramori *et al*, 1997).

A angioplastia percutânea coronariana (APC), desde a sua introdução por Andreas Gruntzig *et al* (1979), adquiriu um papel destacado no manejo das cardiopatias isquêmicas, revolucionando o tratamento de pacientes com doenças de artéria coronariana. Atualmente, a angioplastia percutânea coronária é a modalidade de revascularização miocárdica mais empregada (Alves e Souza, 2002). Segundo dados da Central Nacional de Intervenções Cardiovasculares do Brasil (CENIC) (2005), no início desta década a utilização de ‘stents’ já atingia cerca de 60 a 70% dos casos.

Atualmente, grande parte das lesões coronárias obstrutivas são passíveis de tratamento percutâneo, com alto índice de sucesso primário, caracterizado pela redução de 50% na lesão residual e ausência de complicações superiores a 90%. Embora tenha ocorrido um grande avanço tecnológico nessa área, a reestenose ou reincidência da lesão persiste como a principal limitação dos procedimentos intervencionistas. Tem sido verificado que estas ainda ocorrem de 15 a 20% em pacientes que apresentam uma lesão coronariana mais simples, enquanto que em pacientes, cujas lesões coronárias são mais complexas estes índices variam de 30 a 60% (Fattori e Piva, 2003).

Diversas opções de tratamento vêm sendo pesquisadas e empregadas, tanto para tratar esse tipo de reestenose, como para prevenir seu aparecimento. Tais opções incluem a co-administração de fármacos, como por exemplo: agentes inibidores de agregação e de adesão plaquetária, anticoagulantes, doadores de óxido nítrico (NO), antioxidantes, bloqueadores- $\beta$ . Outras estratégias também foram desenvolvidas, como a braquioterapia (irradiação intracoronariana) (Colombo *et al*, 2003) e mais recentemente, ‘stents’ eluidores de drogas (Garas *et al*, 2001). Sendo que os ‘stents’ eluidores de drogas antiproliferativas representam um dos desenvolvimentos mais inovadores dessa área (Burt e Hunter, 2006). A utilização desse tipo de dispositivo tem apresentado uma redução significativa da reestenose e na revascularização no período de 6 a 12 meses, após a sua implantação (Greenberg *et al*, 2004). Atualmente, além de drogas antiproliferativas como o *sirolimus* e o *paclitaxel*, muitos pesquisadores tem sugerido que os materiais eluidores de NO encontram enorme potencial para o recobrimento de ‘stents’, pois podem prevenir a proliferação celular e simular as funções do endotélio após a implantação deste dispositivo intravascular (Seabra e de Oliveira, 2004; Reynolds, 2004).

### **I.2.2 . PLAQUETAS E TROMBOSE**

Dentre as complicações advindas da APC , encontram-se os fenômenos trombóticos que podem ocorrer após um prazo breve (menor que 30 dias) ou mais tardio (1-18 meses) (Fleser *et al*, 2005).

A trombose coronária ocorre quando há formação de um trombo, representado pelo coágulo numa das artérias coronárias e conseqüente interrupção do fornecimento de sangue

para o músculo cardíaco. Geralmente, a trombose coronária ocorre no local da aterosclerose existente e um de seus maiores efeitos deletérios é o risco de ocasionar um “ataque cardíaco”.

A trombose aguda pode ser ocasionada durante a realização da angioplastia, uma vez que os catéteres e fios-guia podem traumatizar a parede arterial, que somadas ao processo aterosclerótico pode promover hemorragias, dissecação e trombose (Voetsch *et al*, 2004). Enquanto que a trombose mais tardia pode ocorrer após a ruptura aguda de placas instáveis, reestenose pós-angioplastia, lesão de reperfusão miocárdica e na vasculopatia do enxerto em transplantados cardíacos (Serrano Junior *et al* , 2003).

No presente estudo, a utilização de ensaios com plaquetas isoladas, foi em decorrência do objetivo de se investigar a atividade anti-trombogênica promovida pela formulação de matriz polimérica com doador de óxido nítrico, uma vez que o controle de tal resposta é de fundamental importância pós implantação de ‘stent’ intracoronário.

Nas últimas duas décadas o grande desenvolvimento tecnológico do equipamento utilizado na angioplastia (balões, fios-guia, etc) associada à introdução de ‘stents’ e drogas anti-plaquetárias potentes, ampliou a indicação desta intervenção para situações inicialmente consideradas desfavoráveis.

As plaquetas são fragmentos de células gigantes, os megacariócitos, formados na medula óssea. As plaquetas têm a forma de discos diminutos, sendo consideradas, na verdade, corpúsculos celulares e não células propriamente ditas. Esses elementos estão presentes no sangue em número aproximado de  $180-350 \times 10^3/\mu\text{L}$ , e possuem meia-vida na circulação de 8 a 10 dias, quando então são retirados da mesma, principalmente pelo baço, e fígado (Harker, 1978).

A função primordial das plaquetas é manter a hemostasia, formando tampões hemostáticos que ocluem sítios danificados do sistema vascular. Após a transecção de vasos sangüíneos, as plaquetas aderem ao tecido conectivo às margens da lesão, e depois de alguns minutos, forma-se um tampão hemostático plaquetário que oclui a lesão e detém a perda de sangue.

As plaquetas são anucleadas e o citoplasma contém numerosas organelas como mitocôndrias, sistema de Golgi, ribossomos e microtúbulos. Contém ainda três tipos de grânulos, classificados como densos, alfa e lisossomais. Os grânulos densos contêm a serotonina, ATP, ADP, cálcio e pirofosfato. Os grânulos alfa contêm o fator 4 plaquetário, a  $\beta$ -tromboglobulina, o fator de crescimento derivado de plaqueta, proteínas catiônicas, fator bactericida e fatores que participam da cascata da coagulação, como fibrinogênio, o fator V e o fator VII (von Willebrand). Nos grânulos lisossomais encontram-se algumas hidrolases ácidas, como a  $\beta$ -glucosidase e a  $\beta$ -galactosidase (Holmsen e Weiss, 1979), assim como a fosfatase ácida (Bentfeld e Bainton, 1975).

As interações adesivas são mediadas pelos receptores expressos na membrana plasmática das plaquetas (Shattil, 1994). Estes receptores de adesão são estruturalmente diversos, compreendem a família das integrinas (GP IIb/IIIa), a leucina, as imunoglobulinas e P-selectina. As integrinas formam a maior família de receptores heterodiméricos  $\alpha\beta$ -transmembrânicos que regulam a adesão plaquetária (Clark e Brugge, 1995). Este receptor, é o principal receptor plaquetário para fibrinogênio e ainda participa da agregação, adesão firme e do espalhamento plaquetário (Calvette, 1999).

Quando ativadas, as plaquetas secretam várias proteínas que facilitam sua interação com outras plaquetas, células endoteliais e leucócitos, através de proteínas como as P-selectinas, trombospondina, fibrinogênio, fibronectina e vibronectina (Ofosu, 2002).

A adesão plaquetária é um evento complexo, envolvendo uma série de componentes sub-endoteliais e plasmáticos que se ligam especificamente a diferentes glicoproteínas de membrana. Assim, à semelhança da agregação, constitui-se de uma etapa crucial na hemostasia e na prevenção da trombose (Belisario *et al*, 2000).

A ativação plaquetária, observada após danos da parede vascular, resulta no aparecimento de quatro fenômenos distintos (Ross, 1999):

- (1) '*sharpe change*': que designa a mudança da forma discóide da plaqueta para a forma esférica acompanhada de pseudópodes;
- (2) adesão: designa o processo no qual as plaquetas se ligam à superfícies que não a de outras plaquetas;
- (3) agregação: designa o processo no qual as plaquetas se ligam apenas à superfície de outras plaquetas;
- (4) secreção: designa a extrusão dos conteúdos dos grânulos  $\alpha$  e densos das plaquetas.

A ativação das plaquetas pode ocorrer na presença ou na ausência de ativadores exógenos, dependendo das condições hemodinâmicas locais e da natureza da lesão vascular.

Quando as plaquetas estão em repouso, o receptor de membrana plaquetária (glicoproteína GPIIb/IIIa) , está em estado de baixa ativação e não se liga ao fibrinogênio

solúvel. Entretanto, na vigência de lesão vascular, o fibrinogênio intacto é encontrado no local danificado. Este fibrinogênio insolúvel interage com a glicoproteína GPIIb/IIIa expressa nas plaquetas não ativadas, promovendo a adesão das mesmas ao local danificado (Shattil, 1999).

A adesão observada em plaquetas não ativadas é menor do que aquela vista em plaquetas ativadas; apesar disso, é um fenômeno de grande relevância, tanto na hemostasia fisiológica, quanto em oclusões vasculares patogênicas, uma vez que o fibrinogênio imobilizado está exposto no local do dano vascular, sendo este o primeiro evento para cessar o sangramento (Belisario *et al*, 1997). A ativação plaquetária pode aumentar o número ou a afinidade do ligante aos receptores específicos de adesão, quando expostas a seus agonistas: ADP, colágeno e trombina (Bellavite, 1994).

Dentre os agonistas plaquetários encontram-se os capazes de estimular a secreção de grânulos plaquetários na ausência (forte) ou na presença (fraco) de agregação plaquetária. O ADP, por exemplo, é considerado um agonista fraco, e tem um importante papel na potencialização da ativação mediada por outros estímulos (Fitzgerald, 2001). A trombina é um dos mais potentes ativadores plaquetários, sendo capaz de estimular a secreção plaquetária em condições nas quais não há agregação (Holmsen e Weiss, 1979).

A ativação plaquetária pode ser inibida em vários níveis, como na ligação do agonista à membrana plaquetária, na liberação de tromboxano ou na translocação de cálcio. Entretanto, de um modo geral, as respostas plaquetárias são inibidas pela elevação dos níveis intracelulares de nucleotídeos cíclicos (GMPc e AMPc). Drogas que promovem inibição plaquetária como a prostaciclina e o NO, são capazes de elevar os níveis intra-plaquetários de AMPc e GMPc, respectivamente, ativando proteínas quinases dependentes

de AMPc (PKA) ou GMPc (PKG), levando à redução na concentração de cálcio intracelular (Nolte *et al*, 1994).

O NO derivado de plaquetas tem um papel crucial na função plaquetária, regulando a atividade excessiva de plaquetas, ou seja, o NO inibe a adesão destas ao endotélio, prevenindo a formação de trombos plaquetários (Low *et al*, 2002; Cardoso, 2006).

### **I.3. AMBIENTE VASCULAR**

O endotélio saudável constituído por uma monocamada de epitélio pavimentoso localizada entre o sangue circulante e a camada média de músculo liso vascular, desempenha papel protetor do vaso sangüíneo. O papel do endotélio não está restrito apenas a controlar o tônus e a função vasomotora, mas se estende à regulação da proliferação e migração das células do músculo liso vascular e adesão de leucócitos (Carvalho *et al*, 2003). Esta proliferação das CMLs exercem um papel deletério no ambiente vascular, ocasionando o estreitamento do lúmen das artérias e arteríolas. Nesse processo, as CMLs apresentam mudanças substanciais de suas funções, preponderando o aumento dos mecanismos contráteis (Carvalho *et al*, 2003). Dentre os principais fatores endoteliais responsáveis pelo controle da proliferação da parede muscular, encontram-se o óxido nítrico (NO), endotelina 1 (ET-1) e a angiotensina II (Ang II). O NO apresenta ação inibitória na proliferação do músculo liso vascular, e isso é válido tanto para o NO secretado pelo endotélio (Sessa, 1994), quanto para o gerado pelos doadores de NO (Nakashima *et al*, 1993).

A integridade do endotélio é importante na manutenção do ambiente vascular, enquanto que a disfunção endotelial encontra-se presente no tabagismo, dislipidemia, senilidade, doenças cardiovasculares, como hipertensão arterial, aterosclerose, inflamação, hipóxia e diabetes (Fachini *et al*, 2000)

A perda da integridade celular está associada à disfunção da célula endotelial e expõe as CMLs à ação direta dos fatores endoteliais que provocam a proliferação das CMLs, as quais são responsáveis pela formação da neoíntima. Assim, as células musculares que compõem este tecido e encontram-se nas obstruções reestenóticas apresentam um aumento de duas a três vezes na atividade proliferativa e migratória, quando comparadas a células das lesões ateroscleróticas primárias (Caramori *et al*, 1997).

A célula muscular lisa desempenha um papel central na formação do tecido da neoíntima. Dependendo do estímulo que recebe, a CML pode assumir dois diferentes fenótipos. O fenótipo contrátil, é o aspecto normal da CML da camada média arterial. Caracteriza-se pela presença de proteínas contráteis com filamentos bem desenvolvidos, contração em resposta a estímulos químicos ou mecânicos e baixa capacidade de multiplicação. O fenótipo ativado ou proliferativo-sintético é a forma predominantemente encontrada em obstruções reestenóticas (Caramori *et al*, 1997). Caracteriza-se pelo aspecto poliédrico, com grandes núcleos, abundante citoplasma e pela capacidade grandemente aumentada de migração, proliferação e síntese protéica, associada à perda da contractilidade (Cambpell *et al*, 1988). Importante estudo foi realizado por Ohara *et al* (1991), o qual verificou que após vários meses após a angioplastia, as células musculares são capazes de reverter do fenótipo proliferativo-sintético para o contrátil. A proliferação celular continuada das CMLs e o aparecimento da reestenose por meio do remodelamento

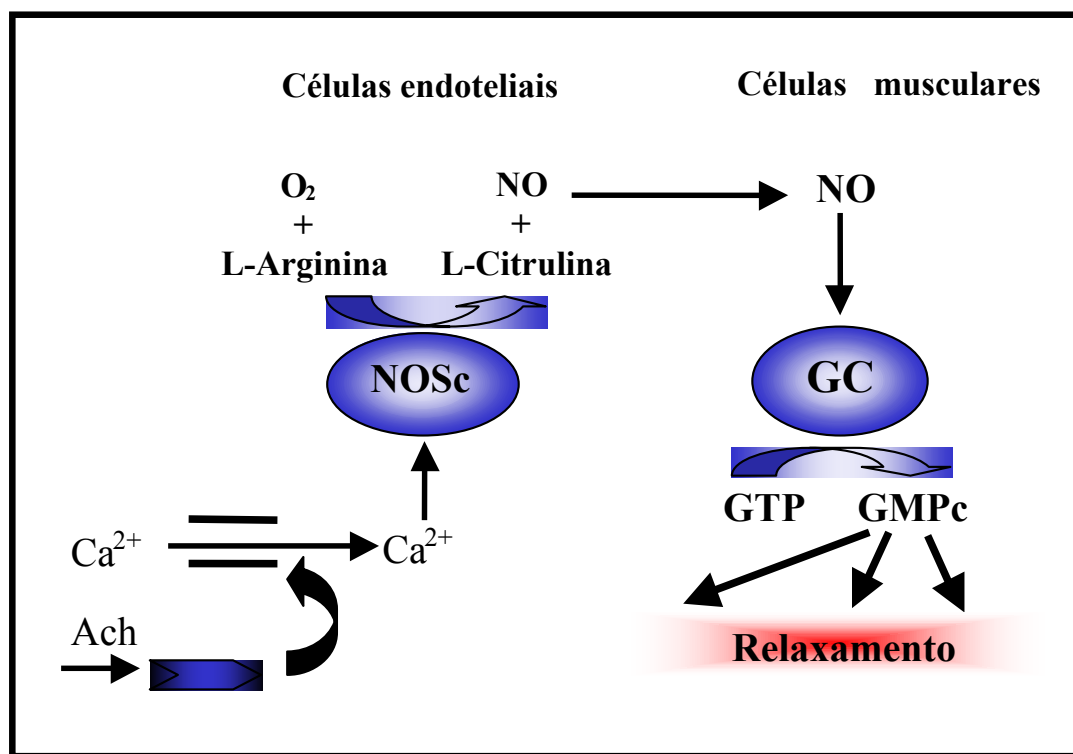
arterial e formação da neoíntima, pode ser evitado por meio de drogas que atuam na gênese desta cascata de respostas, a qual constitui-se de um dos principais problemas ‘pos-stenting’.

#### **I.4. DOADORES DE ÓXIDO NÍTRICO**

A redução na biodisponibilidade da molécula de óxido nítrico (NO) tem sido considerada um importante componente na iniciação e/ou progressão das patologias vasculares e estas podem ser minimizadas pela administração de doadores de NO. A maioria das doenças cardiovasculares apresentam como denominador comum um “estado de insuficiência de NO” caracterizado pelo decréscimo de sua síntese, de sua biodisponibilidade e um aumento dos processos de sua inativação. A utilização de nitrovasodilatadores ou doadores de NO respalda-se na relocação exógena ou no aumento do ‘pool’ de NO endógeno – responsável pela modulação de uma série de sinais que modulam os processos normais ou desencadeiam as disfunções.

O NO é um produto endógeno do endotélio normal que exerce papel protetor na reparação da injúria local após angioplastia. O NO regula a função plaquetária e leucocitária, modula a migração, proliferação e síntese de proteínas para as células musculares lisas do vaso (Nisoli *et al*, 2003). O conjunto destas ações faz do NO um agente promissor para o recobrimento de ‘stents’ coronários, com potencial tanto para reduzir o risco de trombose ‘pos-stenting’, quanto para inibir a proliferação neointimal e a reestenose. A natureza difusiva do NO, um radical livre em estado gasoso, permite que ele tenha uma capacidade única de participação na comunicação transcelular. A meia vida do

NO em meio biológico é de aproximadamente 1 s. Mesmo durante este curto tempo, o NO pode se difundir a distâncias que correspondem a vários diâmetros celulares, assim, ele exerce funções parácrinas e autócrinas de mensageiro (Koppenol, 1998). O NO liberado localmente no endotélio vascular pode se difundir rapidamente com as células adjacentes que contenham guanilato ciclase, levando-as atuar em conjunto em respostas fisiológicas. O NO difunde-se para as células da musculatura lisa onde ativa a guanilato ciclase (GC), que produz guanosina mono-fosfato cíclica (GMPc) a partir de guanosina tri-fosfato (GTP), promovendo a vasodilatação (Fricker, 1995; Butler e Rhodes, 1997; Mateo e Artiñano, 2000) (**Figura 2**).



**Figura 2. Representação esquemática da vasodilatação causada pelo NO endógeno**  
(Shishido, 2003)

Deste clássico mecanismo que envolve a ativação da NOSe sabe-se que, importantes reações de nitração e nitrosilação de receptores e proteínas regulatórios ocorrem para os diferentes efeitos promovidos pelo NO sintetizado pela NOSe (Sessa, 2004).

As pesquisas dos últimos 20 anos mostraram que o NO está envolvido em muitos processos fisiológicos importantes além da vasodilatação, como a modulação de neurotransmissão, a toxicidade mediada pelos macrófagos, a inibição da agregação plaquetária, a neurodegeneração (Marín, 1997; Janero, 2000; Ford e Lorkovic, 2002; Stewart e Heales, 2003).

O NO é sintetizado pela NOS induzível nos macrófagos ativados e neutrófilos e parece ser responsável pelas ações citotóxicas destas células. Neste caso, a citotoxicidade se deve a uma concentração alta e localizada de NO (2 a 3 ordens de magnitude mais alta que a concentração gerada pelas células endoteliais) (Koppenol, 1998). Em concentrações altas, o NO também pode reagir com o ânion superóxido levando à formação do ânion peroxinitrito (OONO-) e de outras espécies radiculares citotóxicas (Hensley *et al*, 1997).

As reações do NO e, conseqüentemente, seus efeitos estão relacionados com a sua concentração, localização e o meio no qual ele é produzido. O NO ou os produtos de sua reação com  $O_2$  e  $O_2^{\bullet}$  podem modificar diferentes macromoléculas, incluindo proteínas, lipídios e ácidos nucléicos, que podem constituir-se de efeitos deletérios e que caracterizam a citotoxicidade (Miranda *et al*, 2000; Davis *et al*, 2001).

As ações bioquímicas de NO são muitas, a vasodilatação é talvez a sua ação melhor estudada. Este mecanismo de ação mediada pelo NO permitiu compreender em parte a ação de drogas vasodilatadoras já utilizadas há muito tempo, como os nitratos, a nitroglicerina

(NG) e o nitroprussiato de sódio (SNP). Estes compostos são utilizados em larga escala no tratamento de pacientes que sofrem de angina e hipertensão. A ação dos nitratos e nitrocompostos se baseia na sua redução com produção de NO, que atua então diretamente na musculatura dos vasos sanguíneos (Willians, 1996; Ignarro *et al*, 2002; Chen *et al*, 2002).

Os doadores de NO, largamente utilizados na clínica há um século, tem sido continuamente remodelados na procura de se obter efeitos seletivos, meia-vida prolongada e baixa indução de tolerância. Recentemente, o mecanismo de ação envolvido em tais inconveniências inerentes ao uso de nitratos orgânicos, foi elucidado (Chen *et al*, 2002).

As drogas mais utilizadas como doadores de NO em sistemas biológicos são a nitroglicerina (NG), o nitroprussiato de sódio (NPS) e a S-nitroso-N-acetil-penicilamina (SNAP) (Shaffer,1992). Além destes compostos, existem muitos outros doadores de NO como os nitritos orgânicos, derivados de floxanos, complexos NO-amino (NOCs), S-nitrosotióis (RSNOs), complexos ferro-nitrosila e rutênio-nitrosila (Katayama, 1995). Os floxanos, nitratos e nitritos orgânicos reagem com tióis endógenos para formar intermediários RSNOs que são responsáveis pela liberação de NO. A ação desta classes de doadores de NO depende da presença de tióis (RSH). Quando estes são consumidos em grandes quantidades, sua disponibilidade diminui, causando tolerância a estes medicamentos.

A modelagem destas moléculas tem sido desenvolvida com o enfoque na reatividade química ou na cinética de liberação do NO. Estas moléculas no sistema cardiovascular liberam formas redox, conhecidas como  $\text{NO}^-$ , NO ou  $\text{NO}^+$ . Segundo Napoli e Ignarro (2003), os doadores podem ser classificados como diretos ou indiretos e ainda, os

primeiros como os de liberação espontânea (RSNO), ou metabolizados a NO (SNP) ou aos seus congêneres redox (nitratos orgânicos).

Os estudos com os doadores de NO para o sistema cardiovascular tem se direcionado para atingir a modulação cinética de liberação do radical e para a especificação, ou seja, o alvo de ação da droga. Neste sentido, alguns ‘stents’ associados ao NO e ativados por fibrina, heparina ou confeccionados com polímeros múltiplos tem sido desenvolvidos (Napoli e Ignarro, 2002). Microesferas de poli(etileno imina), contendo NO, tem sido propostas para implantes vasculares. Enquanto que a incorporação de NO em matrizes poliméricas tem sido propostas para a utilização de enxertos e balões vasculares. Neste sentido, doadores incorporados em veículos de liberação controlada, tais como matrizes de polímeros e de géis, tem sido desenvolvidos com a finalidade de administração direta ou de recobrimento de dispositivos de uso biomédico (Keffer, 2003).

O alvo primário de ação dos doadores de NO é a via de aumento de GMPc, a qual desencadeará a inibição da proliferação de CML, migração de CML, a síntese de colágeno e sobretudo, sua propriedade de inibir a agregação e adesão plaquetária (Channon *et al*, 2000). Essencialmente, na inibição das respostas trombogênicas e de remodelamento vascular.

Sabe-se que no meio celular e no plasma existem muitas espécies que podem desativar o NO, como o oxigênio, ânion superóxido e o ferro de grupos heme. Assim o NO *in vivo* apresenta uma meia vida ( $t_{1/2}$ ) de aproximadamente 1s. O NO pode ser estabilizado por uma molécula carregadora que prolongue seu tempo de vida mantendo sua atividade biológica (Stamler *et al*, 1992) (a). Uma classe de moléculas biológicas importantes que pode exercer esta função são os tióis de baixo peso molecular, que são abundantes no

plasma humano (Gaston, 1999). Estes compostos são facilmente nitrosados, gerando os S-nitrosotióis (RSNOs) que são significativamente mais estáveis que o NO. Os RSNOs também apresentam propriedades vasodilatadoras e são capazes de inibir a agregação plaquetária (Stamler *et al*, 1992 (b); Ricardo *et al*, 2002). Assim, os RSNOs além do seu potencial de uso como drogas liberadoras de NO, podem também atuar no armazenamento e transporte de NO *in vivo*.

Os RSNOs são espécies endógenas e têm sido detectados em fluídos do revestimento das vias aéreas, nas plaquetas e em neutrófilos. Eles podem assim, atuar como carregadores de NO na forma de tióis livres ou proteínas contendo cisteína em sistemas biológicos (Stammler *et al*, 1992 (b), Zhang e Hogg, 2005). Os RSNOs podem ser então, utilizados no tratamento de doenças que envolvem disfunções na disponibilidade de NO (Eiserich *et al*, 1998). Tióis de baixo peso molecular como a cisteína (CiSH) e a glutathiona (GSH) estão envolvidos em vários processos bioquímicos. A CiSH é o tiól de baixo peso molecular mais abundante no plasma humano. A N-acetil cisteína é um produto endógeno do metabolismo da CiSH e é precursor e estimulador da síntese endógena de glutathiona (GSH), um potente agente anti-oxidante. A GSH é um tripeptídeo contendo cisteína e participa de várias reações enzimáticas como o transporte de aminoácidos, defesa contra radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio e algumas substâncias químicas tóxicas. A estrutura da GSNO (S-nitrosoglutationa), utilizadas neste trabalho está apresentada na **Figura 3**.



**Figura 3. Estrutura da GSNO (S-nitrosoglutationa)**

Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa conduzidos por Krieger e Shishido (Shishido, 2003) demonstraram que os S-nitrosotióis (RSNOs), apresentam importante ação vasodilatadora (Ricardo *et al*, 2002) e anti-aterogênica (Krieger *et al*, 2006), demonstrando claramente o efeito antiproliferativo que este específico doador de NO pode desempenhar *in vivo*. Porém, os RSNOs são termicamente instáveis e uma alternativa para aumentar a sua estabilidade é sua incorporação em matrizes poliméricas.

Nesse trabalho foi utilizada a S-nitrosoglutationa (GSNO), como doador de NO, incorporada em matriz polimérica (PVA/PVP). Tal incorporação se deve a necessidade de revestimento do ‘stent’ e, ainda, ao papel que estas matrizes podem desempenhar na taxa de liberação do NO.

Os doadores de NO tem mostrado grande eficácia na inibição da migração e proliferação de células da musculatura lisa (Villalobo, 2006), bem como na produção de colágeno *in vitro*. Estes estudos suportam a hipótese de que o aumento da biodisponibilidade de NO *in vivo* inibe a formação da neointima após a lesão vascular (Wang *et al*, 2003). Assim, um ‘stent’ eluidor de NO poderia reduzir a probabilidade de ocorrer a reestenose, devido a inibição da proliferação de CML e da adesão/agregação de plaquetas (Groves *et al*, 1995; Channon *et al*, 2000).

## I.5. MATRIZES POLIMÉRICAS E SUAS APLICAÇÕES

A utilização terapêutica do NO torna-se limitada devido à sua baixa meia-vida e à sua alta reatividade e instabilidade química. A incorporação em compostos capazes de controlar a liberação de NO, seja em matrizes poliméricas ou aderidas à superfície metálica do ‘stent’, constitui-se de uma estratégia bastante promissora para contornar essas limitações. A grande dificuldade no desenvolvimento de novos dispositivos contendo doadores de NO é a modulação da estabilidade e da liberação de NO. Essa modulação pode ser obtida através da incorporação desses doadores em matrizes poliméricas.

A liberação local de NO através de reações térmicas ou fotoquímicas em células alvo ou órgãos, possui um grande potencial em várias aplicações biomédicas, em particular se os doadores de NO estiverem incorporados em matrizes poliméricas atóxicas (Shishido *et al*, 2003). Matrizes poliméricas utilizadas como veículos em medicamentos podem causar um efeito estabilizador da droga. Isto é, podem levar a um aumento da meia-vida, da eficiência e do tempo de permanência da droga no organismo mantendo sua atividade biológica (Shishido e de Oliveira, 2000; Shishido *et al*, 2003).

Estudos mostraram que as matrizes poliméricas atóxicas como as de poli(etileno glicol) (PEG) e de hidrogéis de copolímero em bloco de poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno)-poli(óxido de etileno) (PEO-PPO-PEO) apresentaram propriedades estabilizadoras dos RSNOs conduzidos por Shishido e de Oliveira, (2000), Shishido *et al* (2003) e Seabra *et al* (2004). E, ainda, matrizes poliméricas também têm sido utilizadas no revestimento de ‘stents’, possibilitando a incorporação de drogas inibidoras da reestenose (Souza *et al*, 2001, Reynolds *et al*, 2004).

Recentemente, as pesquisas envolvendo sistemas de liberação controlada de drogas e outros agentes bioativos a partir de sistemas contendo polímeros, tem atraído a atenção de pesquisadores do mundo inteiro. As aplicações de sistemas de liberação controlada de drogas incluem liberação contínua durante dias/semanas/meses/anos e liberação localizada, como as utilizadas no tratamento de tumores (Huang e Brazel, 2001). Os veículos que prolongam a liberação de drogas são de grande interesse, pois eles possibilitam uma maior seletividade farmacológica (Kim e Fassihi, 1997) e podem aumentar a absorção da substância ativa, permitindo a redução de sua concentração.

Na área farmacêutica os polímeros podem ser utilizados em um grande número de aplicações terapêuticas, como: evitar a adsorção de proteínas, proteger proteínas e células, estabilizar partículas coloidais, prolongar seu tempo de circulação *in vivo*, transportar drogas na forma de micelas, géis e emulsões conjugando moléculas biologicamente ativas. Por exemplo, sabe-se que o NO apresenta grande potencial como agente antimicrobial, atuando na defesa do organismo frente a infecções causadas por protozoários, como a *Leishmania* (Brunet, 2001; Arevalo *et al*, 2002). Doadores de NO já vem sendo incorporados em matrizes poliméricas e utilizados no tratamento da Leishmaniose cutânea em humanos (de Souza *et al*, 2006).

Os polímeros sintéticos como o poli-vinil álcool (PVA) e poli-vinil pirrolidone (PVP), utilizados neste trabalho, tem sido utilizados numa enorme variedade de aplicações, tais como: nas áreas industriais, comerciais, médicas e de alimentação (DeMerlis e Schoneker, 2003). Essas matrizes foram escolhidas por proporcionarem excelente estabilização na decomposição térmica da S-nitrosoglutationa (GSNO). A formulação de matriz polimérica contendo PVA/PVP + GSNO, libera 90% do estoque de NO, durante um

período de 24 minutos. Com estas propriedades, aliada à boa compatibilidade conhecida entre PVA e PVP, faz da mistura PVA/PVP/GSNO uma boa candidata à liberação controlada de NO nas áreas de interesse (Seabra e de Oliveira, 2004).

Assim, segundo recomendações de órgãos nacionais (ANVISA) e internacionais (*FDA-USA*), os testes *in vitro* de biocompatibilidade devem ser os primeiros testes a serem feitos no desenvolvimento de materiais de uso biomédico (ISO 10993-1, 1993).

Portanto, é de grande importância verificar os efeitos *in vitro* das matrizes poliméricas com doadores de NO, devido à possibilidade de propiciar uma liberação controlada de NO e pelo seu potencial em aplicações na área de dispositivos intra-vasculares.

*Objetivos*

## II . OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi o de estabelecer bioensaios *in vitro* com a finalidade de determinar a biocompatibilidade e as atividades anti-reestenótica e anti-trombogênica de biomateriais constituídos de matriz polimérica com doador de óxido nítrico (NO) para utilizações intravasculares.

Os objetivos específicos constituíram-se da análise da formulação de poli(vinil álcool) e poli(vinil pirrolidona) (PVA/PVP), associada a S-nitrosoglutathione (GSNO) nos seguintes aspectos:

- Avaliar a citotoxicidade por meio de ensaios de redução do MTT e captação de vermelho neutro em células da linhagem 3T3 e RASM em cultura;
- Avaliar a potencial reestenótica por meio da inibição da proliferação de células da linhagem RASM em cultura;
- Avaliar o potencial hemolítico por meio de ensaios com células vermelhas sangüíneas humanas (RBC) e
- Avaliar o potencial trombogênico por meio de ensaios na agregação e adesão de plaquetas humanas isoladas.

## *Materiais e Métodos*

### **III. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **III.1. LINHAGENS CELULARES E MANUTENÇÃO DAS CULTURAS**

Foram utilizadas neste trabalho as seguintes linhagens celulares:

##### **III.1.1. CÉLULAS 3T3**

Foram utilizadas células BALB/c 3T3, uma linhagem estabelecida de fibroblastos de embrião de camundongo, oriundas do '*National Institute of Health Baltimore*' - USA (NIH). Essas células foram cultivadas em garrafas de vidro estéreis, em meio de cultura de *Eagle* modificado por *Dulbecco* (DMEM) contendo 15% de soro fetal bovino e antibióticos (100 UI mL<sup>-1</sup> de penicilina e 100 µg mL<sup>-1</sup> de estreptomicina). As células foram cultivadas em estufa a 37 °C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. A manutenção da linhagem foi realizada através de repiques periódicos e a semeadura foi feita em garrafas estoque ou placas experimentais. As culturas experimentais foram preparadas por inoculação das células em placas descartáveis de 96 cavidades da *Corning* (10.000 células/cavidade), seguido de cultivo em estufa de CO<sub>2</sub> a 37 °C por 44 horas.

##### **III.1.2. CÉLULAS RASM**

As células RASM (células de musculatura lisa vascular - *Rabbit Artery Smooth Muscle*), foram adquiridas do Laboratório da Profa. Helena Nader da USP/SP, as quais foram mantidas em meio de cultura F-12 modificado por Coon (Sigma) contendo 10% soro fetal bovino (SFB) e antibióticos ( $100 \text{ UI mL}^{-1}$  de penicilina e  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  de estreptomicina), a  $37^\circ\text{C}$  em atmosfera umidificada contendo 5% de  $\text{CO}_2$ . A manutenção da linhagem foi realizada através de repiques periódicos e a semeadura foi feita em garrafas estoque ou placas experimentais. As culturas experimentais foram preparadas por inoculação das células em placas descartáveis de 96 cavidades da *Corning* (10.000 células/cavidade), seguido de cultivo em estufa de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$  por 44 horas. As células foram utilizadas durante as passagens 5 a 20.

### III.2. SOLUÇÕES ESTOQUE

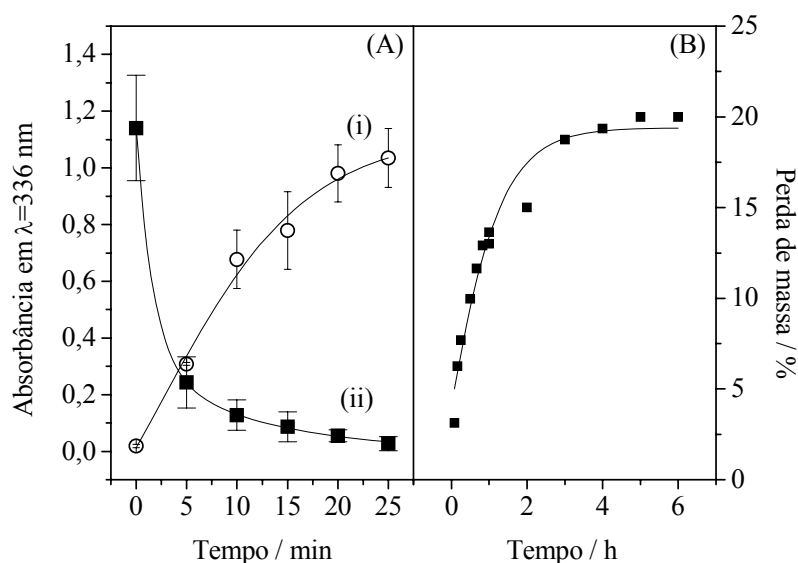
Os ensaios foram padronizados com poli-L-lisina ( $\text{MM}=30.000\text{-}70.000 \text{ g mol}^{-1}$  - *Sigma*) e dextrana ( $\text{MM}=15.000 \text{ g mol}^{-1}$  - *Sigma*) para os ensaios de NR e MTT e com poli(etileno imina) ( $\text{MM}=750.000 \text{ g mol}^{-1}$  - *Sigma*) e dextrana para o ensaio de hemólise. Todas as soluções foram preparadas através da dissolução dos polímeros em tampão fosfato contendo  $\text{CaCl}_2$  (PBS- $\text{Ca}^{2+}$ ) ou somente tampão fosfato (PBS-A). A partir de soluções estoque foram feitas diluições sucessivas em PBS (com ou sem  $\text{Ca}^{2+}$ ) para as concentrações finais especificadas nos experimentos. As concentrações das soluções das amostras de GSNO, GSNO/PVA/PVP e PVA/PVP foram calculadas mantendo-se a proporção de 9,3% de GSNO, 69,8% de PVA e 20,9% de PVP. Assim, foi possível manter a mesma porcentagem (%) em massa tanto para as soluções aquosas como para a blenda PVA/PVP contendo GSNO. Foi utilizado também, SDS (dodecil-sulfato de sódio - *Sigma*) a 1 mg

$\text{mL}^{-1}$ , em PBS estéril. A solução de Vermelho Neutro ( $5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) utilizada nos experimentos foi preparada na véspera, diluindo-se a solução estoque 1/100 em meio completo (concentração final de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e incubada por 18-24 horas, no escuro a  $37^\circ\text{C}$ .

### III.2.1. SÍNTESE DE GSNO POR VIA ÚMIDA

A GSNO, que pode ser precipitada e armazenada na forma sólida, foi sintetizada por via úmida, de acordo com o procedimento descrito por Hart (1985), no Laboratório I -114, do Departamento de Físico-Química, Instituto de Química, UNICAMP (Shishido, 2003).

Cerca de 1,5 g de glutathiona (GSH) foram dissolvidas em 8 mL de HCl 0,9 N. Foram adicionados 0,3 g  $\text{NaNO}_2$  e a solução foi colocada em banho de gelo ( $T \sim 4^\circ\text{C}$ ) sob agitação magnética durante 40 min. Ainda sob agitação e em banho de gelo, foram adicionados 10 mL de acetona mantendo-se a agitação por mais 10 min, onde ocorre a precipitação da GSNO. O sólido foi filtrado e lavado 5 vezes com  $\text{H}_2\text{O}$  resfriada, 5 vezes com 5 mL de acetona e 3 vezes com 1 mL de éter etílico. Finalmente, o sólido foi seco utilizando-se um liofilizador (*FTS Systems*, modelo VP 50R) por um período de 24 horas. A GSNO obtida foi guardada em um frasco protegido da luz, colocado dentro de outro recipiente hermeticamente fechado contendo agente secante, num refrigerador (Shishido, 2003). Na **Figura 4** podemos observar a cinética de liberação da GSNO do filme de PVA/PVP.



**Figura 4: Dissolução do filme sólido de PVA/PVP/GSNO em solução e a difusão da GSNO do filme para a solução (PBS)**

A **Figura 4A** mostra a imersão do filme sólido de PVA/PVP-GSNO (na mesma proporção de PVA/PVP e 9,3% em massa de GSNO) em um solução de PBS a 37° C.

(i) absorbância medida em 336 nm do filme (portanto a saída da GSNO do filme)  
(ii) absorbância medida em 336 nm da solução de PBS. A GSNO apresenta uma banda característica em 336 nm o que permite o acompanhamento espectroscópico de sua liberação em soluções.

A **Figura 4B** mostra o revestimento de placas retangulares metálicas com a blenda de PVA/PVP contendo GSNO, quando mergulhadas em solução de PBS a 37°C. A **Figura 4** mostra a perda de massa em função do tempo da placa revestida com a blenda contendo GSNO. Pode-se observar que em 6 h a dissolução do filme torna-se praticamente constante havendo apenas a liberação de 20 % em massa do filme para a solução.

### III.3. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

Para a avaliação da citotoxicidade, foram padronizados os seguintes ensaios:

#### III.3.1. VIABILIDADE CELULAR ATRAVÉS DE REDUÇÃO DO MTT

Esse ensaio inicialmente, foi padronizado para dodecil sulfato de sódio (SDS) e isopropanol em células BALB/c 3T3, no Laboratório de Bioensaios *in vitro*, baseado no método descrito por Mosmann (1983). O parâmetro indicador da potência citotóxica do composto é o EC<sub>50</sub>, que é a concentração do composto que causa uma inibição de 50% da redução de MTT pelas células em relação às culturas controle (não expostas às substâncias testes). Neste projeto, esse ensaio foi padronizado para a avaliação da citotoxicidade, utilizando-se as duas linhagens celulares: **3T3** e **RASM**, para a avaliação de materiais poliméricos associados a drogas doadoras de NO. Para tanto, foi utilizado a poli-L-lisina como padrão positivo e a dextrana como padrão negativo.

Nesse ensaio, a viabilidade celular é avaliada por meio da medida da capacidade das células de reduzir o MTT (3-brometo de (4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-tetrazólio - *Sigma*) a formazan azul. O formazan azul é um pigmento insolúvel que é extraído das células e quantificado espectrofotometricamente. A redução do MTT é catalisada pela enzima desidrogenase succínica, presente na membrana mitocondrial. Então, a atividade dessa enzima reflete a 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, de forma dependente da dose.

Após 44 horas de cultivo das células nas placas descartáveis, as células foram incubadas com os padrões ou amostras em 8 replicatas por dose durante 30 minutos a 37 °C. Ao final do tratamento, a solução contendo os reagentes foi removida e as células foram incubadas com 100 µL de solução de MTT (1 mg mL<sup>-1</sup>), em meio de cultura completo (DMEM + 15% SFB) por 4 horas a 37 °C. Após a remoção do corante, o pigmento reduzido intracelularmente foi extraído com 100 µL de isopropanol em meio ácido (30 mL de isopropanol - *EM Science* e 100 µL de HCl concentrado - Ecibra) sob agitação suave por 20 min. A quantificação foi feita utilizando-se um leitor de microplaca modelo Versa Max (*Molecular Devices Co.*) com leitura em  $\lambda = 570$  nm. Os ensaios foram feitos no mínimo em triplicatas.

### **III.3.2. VIABILIDADE CELULAR ATRAVÉS DA CAPTAÇÃO DE VERMELHO NEUTRO**

Esta metodologia é baseada na habilidade das células viáveis em incorporarem o corante vermelho neutro (*neutral red* - NR), nos lisossomos. O ensaio, segundo Borenfreund e Puerner (1985), consiste na determinação da perda da viabilidade celular por meio da medida da inibição da captação do corante.

Nesse ensaio, foram utilizadas as duas linhagens celulares descritas anteriormente (células **3T3** e **RASM**) para que pudéssemos avaliar a viabilidade celular. As células foram semeadas (10.000 cels/cavidade) em microplacas de cultura com 96 cavidades em DMEM + 15% SFB. A microplaca foi incubada em estufa de CO<sub>2</sub> à 37°C por 44 horas. Após este período retirou-se o meio de cultura das cavidades e adicionou-se a solução de tratamento

(com os padrões e as amostras diluídas em PBS- $\text{Ca}^{+2}$ ) em estufa de  $\text{CO}_2$ , a  $37^\circ\text{C}$ , por 30 min. Ao final do tratamento, a solução de tratamento contendo os reagentes foi removida, e as células foram incubadas com o corante vermelho neutro em meio de cultura completo em estufa de  $\text{CO}_2$ , a  $37^\circ\text{C}$ , por 3 horas. Após a remoção do corante as células foram fixadas (formol 4% +  $\text{CaCl}_2$ , 2 min à temperatura ambiente). O pigmento intracelular foi extraído em 100  $\mu\text{L}$  de solução de extração (1% de ácido acético em etanol 50%), sob agitação suave em agitador orbital por 15 minutos. A viabilidade celular foi expressa pela porcentagem de corante vermelho neutro captado pelas células viáveis, quantificado pela medida da absorbância dos extratos em  $\lambda=540\text{ nm}$  em leitor de microplaca modelo Versa Max (*Molecular Devices Co.*). Calculou-se a média dos valores de absorbância a 540nm para cada condição do ensaio. As porcentagens de captação do corante foram calculadas, considerando o valor médio obtido para o controle negativo como 100 % de viabilidade celular.

### **III.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA**

Para a avaliação da atividade antiproliferativa de Células de Musculatura Lisa, foi padronizado o seguinte método:

#### **III.4.1. ENSAIO DA INIBIÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR**

Neste ensaio foram utilizadas células RASM na fase de crescimento exponencial, baseado na metodologia desenvolvida no laboratório de Bioensaios *in vitro* (Souza-Pinto *et*

*al*, 1996; Souza-Pinto, 1997; Soraggi, 1997). A taxa de proliferação das células foi medida pelo aumento da população celular em um período de 24 h após sua exposição aos agentes teste. As células foram semeadas na concentração de  $3,0 \times 10^4$  céls/cavidade em placas de cultura com 24 cavidades em F-12 + 10% SFB. A placa foi incubada em estufa de CO<sub>2</sub> (5%) a 37°C por 44 horas. Após este período retirou-se o meio de cultura das cavidades, as células foram lavadas com PBS-A. Então, as células foram expostas às soluções de tratamento, tanto padrões como amostras diluídas em PBS-Ca<sup>+2</sup> e incubadas em estufa de CO<sub>2</sub>, a 37°C, por 30 minutos. Ao final do tratamento, a solução teste foi removida e as células foram cultivadas novamente em meio completo, nas mesmas condições anteriores por 24 h. Ao final, as células foram lavadas com tampão PBS-Ca<sup>2+</sup> gelado, fixadas em ácido tricloroacético 5% e lisadas com NaOH 0,5 N. A massa celular foi estimada através da leitura da absorbância (espectrofotômetro Beckman - DU 70) dos lisados em  $\lambda=260$  nm. Esse parâmetro é um indicador da população celular, uma vez que a relação entre os valores de A<sub>260</sub> e o número de células em um lisado descrevem uma função linear (Gesztési, 1990). A proliferação relativa da população celular no período de 24 h, foi calculada em função da diferença entre os valores de absorbância dos lisados celulares ao início e ao final do período de crescimento. A variação obtida para as células controle foi considerada 100 % de proliferação no período. A proliferação relativa às células tratadas foi expressa como percentual de proliferação em relação às células controle.

### **III.5. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL HEMOLÍTICO E ANTI-TROMBOGÊNICO**

O presente trabalho, apresentado a seguir, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas da Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP (Parecer nº 116/2006).

#### **III.5.1. ENSAIO DA HEMÓLISE**

Esse ensaio foi padronizado para tensoativos utilizando-se hemáceas humanas, no Laboratório de Bioensaios *in vitro*, baseado no método descrito por Pape *et al* (1987). O protocolo desse ensaio foi modificado com base na metodologia descrita por Tomlinson *et al* (2002). O parâmetro indicador de potencial hemolítico do composto é o EC<sub>50</sub> que é a concentração do efeito que causa uma inibição de 50% de lise da membrana das hemáceas em relação ao controle (hemáceas não expostas às substâncias testes). Neste projeto, esse ensaio foi padronizado para a avaliação do potencial hemolítico de materiais poliméricos associados a drogas doadoras de NO. Para tanto, foi utilizada a poli(etileno imina) como padrão positivo e a dextrana como padrão negativo.

Nesse ensaio, a atividade hemolítica de um composto é determinada através da quantificação espectrofotométrica da hemoglobina liberada das hemáceas. Assim, a lise de membrana causada pela substância a ser analisada leva a um aumento da quantidade de hemoglobina, de forma dependente da dose.

O sangue humano de voluntários sadios que não receberam qualquer medicação durante 10 dias anteriores ao experimento foi coletado em citrato trisódico 3,8 % (9:1 v/v).

As hemáceas foram separadas por centrifugação a 4°C (em centrífuga refrigerada *Sorval RT6000B – Du Pont*) com rotação de 3500 rpm durante 3 minutos e o plasma foi removido por sucção. As hemáceas foram ressuspensas em PBS-A e então, novamente centrifugadas, sendo o sobrenadante descartado. Esse processo foi repetido por três vezes. Ao final, foram preparadas soluções de PBS-A contendo 50 % v/v do concentrado de hemáceas. Essas soluções foram utilizadas no período máximo de uma semana.

Os ensaios foram feitos em tubos de microcentrifuga (*eppendorfs*) de 1,5 mL, em triplicatas. As soluções de hemáceas foram incubadas com os controles de 0% (PBS-A) e 100% (condição hipotônica, em H<sub>2</sub>O) de hemólise e amostras (PEI, dextrana e GSNO/PVA/PVP) durante 24 horas a 37°C. Ao final os tubos foram centrifugados (*Bioanalytical Scientific Instruments – mod. SPIN I*) durante 2 min. à temperatura ambiente. O sobrenadante (200 µL) de cada tubo foi transferido para uma cavidade de uma placa de 96 cavidades e a leitura foi feita no leitor de microplaca modelo Versa Max (*Molecular Devices Co.*) com  $\lambda = 540$  nm.

O valor da porcentagem (%) de hemoglobina liberada foi calculado considerando-se o valor de absorbância obtido para o controle de 100% de hemólise na condição hipotônica.

### **III.5.2. ENSAIO DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA**

Os ensaios de agregação e de adesão plaquetária foram padronizados para as plaquetas humanas no Laboratório de Farmacologia da Inflamação, Departamento de Farmacologia, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP. O parâmetro porcentagem de agregação é medido no agregômetro através da transmissão da luz comparando-se a

amostra (plasma rico em plaquetas, substância a ser analisada e ADP) e o branco (plasma pobre em plaquetas). O parâmetro indicador do potencial de inibição da agregação plaquetária do composto é o  $EC_{50}$ , que é a concentração da substância que leva a uma inibição de 50% da agregação causada pelo ADP. Neste projeto, essa metodologia foi utilizada para a avaliação do potencial trombogênico de materiais poliméricos associados a drogas doadoras de NO. Para tanto, foi feita uma comparação entre os efeitos de inibição da agregação plaquetária promovida pelo doador de NO, a S-nitrosoglutationa (GSNO), a blenda de poli(álcool vinílico)/poli(vinil pirrolidona) e a blenda contendo GSNO (GSNO/PVA/PVP).

Nesse ensaio, a atividade anti-trombogênica de uma substância é avaliada através da redução da agregação induzida por adenosina di-fosfato (ADP).

O sangue humano de voluntários sadios que não receberam qualquer medicação durante 10 dias anteriores ao experimento foi coletado em citrato trisódico 3,8 % (9:1 v/v). O plasma rico em plaquetas (PRP) foi obtido através de centrifugação do sangue total a 200 g, a 23 °C durante 12 min. O sobrenadante (PRP) foi removido por sucção e utilizado em seguida. A porção com as células vermelhas foi centrifugada a 2000 g, a 23°C durante 15 min para a obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP). As medidas de agregação de plaquetas foram feitas utilizando-se o agregômetro (*Chrono-log Corp. modelo 560 CA*). Nesse equipamento, a passagem de luz pela solução é medida em termos de % considerando-se 100 % de agregação o PPP e 0 % o PRP (calibração do equipamento). As amostras foram incubadas no PRP durante 3 min. e em seguida foi adicionado ADP (5 ou 10  $\mu$ M) para induzir a agregação. O padrão utilizado foi o nitroprussiato de sódio (NPS) onde foi obtido um valor de  $EC_{50/NPS} = 2,0 \mu$ M baseado na literatura (Sogo *et al*, 2000).

Para o cálculo das porcentagens de agregação, mostrados nos gráficos dos resultados, foi considerado 100 % de agregação o valor obtido para o PRP na presença de 5  $\mu$ M e 10  $\mu$ M de ADP.

### III.5.3. ENSAIO DA ADESÃO PLAQUETÁRIA

Neste ensaio, a atividade anti-trombogênica de uma substância é avaliada por meio da inibição da adesão plaquetária que ocorre naturalmente sobre a placa recoberta por fibrinogênio. Essa metodologia foi descrita por Bellavite *et al* (1994) e se baseia na determinação da atividade da fosfatase ácida de plaquetas.

As plaquetas lavadas foram obtidas coletando-se o sangue na presença de tampão ACDC (citrato de sódio 12,4 mM, ácido cítrico 13 mM e glicose 11 mM) na proporção 9:1 v/v. Inicialmente foi preparado o plasma rico em plaquetas (PRP) através da centrifugação do sangue total a 1100 rpm, a 23 °C durante 12 min. O PRP foi diluído em tampão de lavagem (NaCl 140 mM, KCl 0,5 mM, citrato trisódico 12 mM, glicose 10 mM e sacarose 12,5 mM, pH 6) e centrifugado por 10 min. a 2300 rpm. Após esse procedimento, o sobrenadante foi descartado e as plaquetas foram ressuspensas em solução de Krebs-Ringer desprovida de  $\text{Ca}^{2+}$  (NaCl 118 mM,  $\text{NaHCO}_3$  25 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,2 mM,  $\text{MgSO}_4$  1,7 mM e glicose 5,6 mM, PH 7,4). O número de plaquetas foi ajustado para uma solução estoque de  $2 \times 10^8$  plaquetas/mL, através da contagem manual, utilizando-se solução de oxalato de amônio 1% m/v e a câmara de *Neubauer* espelhada. A essa suspensão de plaquetas foi adicionado  $\text{CaCl}_2$  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 hs. 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 h com solução de BSA (albumina de soro bovino). O BSA se liga a sítios não específicos como por exemplo 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 novamente e então, as plaquetas com as amostras foram incubadas na própria placa durante 30 ou 60 min. dependendo do experimento. Após o tempo de incubação, as placas foram lavadas com Krebs-Ringer para a remoção das plaquetas não aderidas. As plaquetas aderidas às cavidades foram quantificadas através da determinação da atividade da fosfatase ácida. As cavidades contendo as plaquetas foram incubadas por 1 h em estufa a 37°C com solução de p-nitrofenil fosfato (5 mM) em tampão citrato 0,1 M, pH 5,4, contendo 0,1 % m/v 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-se um leitor de microplaca modelo Spectra Max (*Molecular Devices Co.*) com leitura em  $\lambda = 405$  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 0-10 x 10<sup>6</sup> plaquetas/cavidade) a poços não revestidos com fibrinogênio. Os ensaios foram feitos no mínimo em duplicatas. O plasma pobre em plaquetas (PPP) utilizado nos experimentos foi obtido através da centrifugação da porção com as células vermelhas a 11.000 rpm, a 23 °C durante 15 min.

### III.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram expressos como média  $\pm$  erro padrão das médias de  $n$  experimentos. Diferenças estatísticas significativas foram determinadas pela análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de *Tukey*. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos.

## *Resultados*

## **IV. RESULTADOS**

### **IV.1. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE**

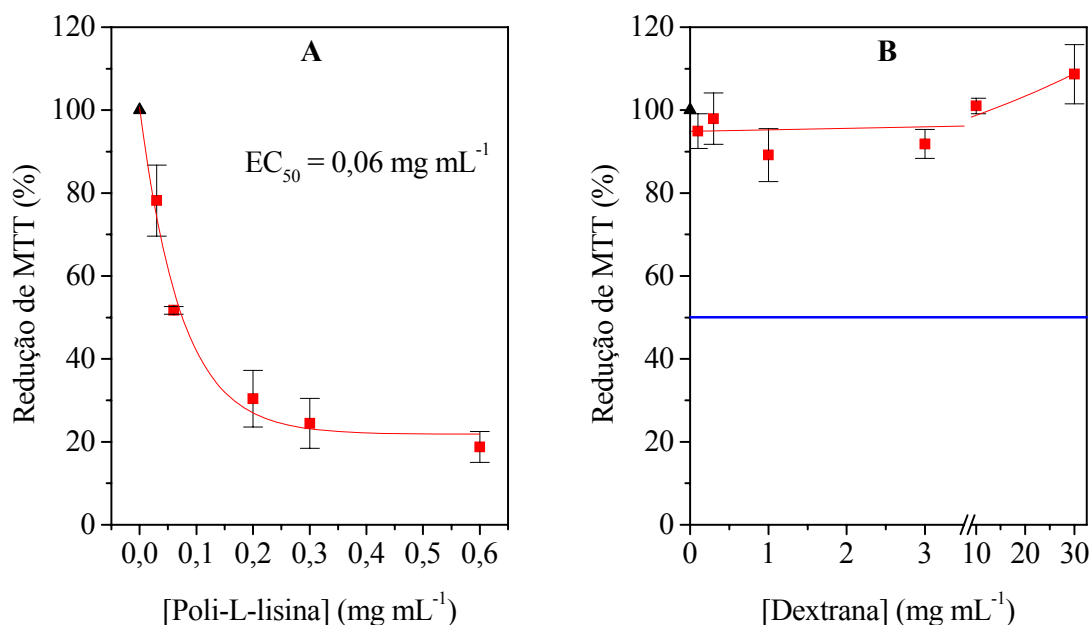
#### **IV.1.1. A) VIABILIDADE CELULAR POR MEIO DA REDUÇÃO DO MTT COM CÉLULAS 3T3**

Em vista da praticidade e precisão deste método, o teste do MTT tem sido amplamente utilizado na determinação da citotoxicidade de uma variedade de agentes, como linfotoxinas, quimioterápicos, pesticidas, radiação, cosméticos e drogas de interesse farmacológico (Eisenbrand *et al*, 2002). O ensaio se baseia na determinação da viabilidade celular através da medida da capacidade das células de reduzir o MTT a formazan azul, um pigmento insolúvel, que é extraído das células e quantificado espectrofotometricamente em  $\lambda=570$  nm. A redução do MTT é catalizada pela enzima desidrogenase succínica, presente na membrana mitocondrial, cuja atividade reflete a funcionalidade metabólica das mitocôndrias e viabilidade celular. Assim, a inibição da atividade enzimática pela toxina acarreta uma diminuição da quantidade de MTT reduzido pelas células.

O ensaio foi padronizado no laboratório de Bioensaios *in vitro* com fibroblastos 3T3, de acordo com Mosmann (1983) e foi realizado também com as células RASM, utilizando-se os controles positivo e negativo a saber, poli-L-lisina e dextrana e a matriz polimérica PVA/PVP na presença e na ausência do doador de NO (GSNO).

A **Figura 5A** mostra uma curva representativa de inibição da redução do MTT promovida pela poli-L-lisina. Nesse gráfico pode-se observar que a poli-L-lisina promoveu a inibição da redução do MTT de forma dependente da concentração e que ocorreu uma queda brusca da viabilidade celular na faixa de concentração : 0,06 mg mL<sup>-1</sup> a 0,6 mg mL<sup>-1</sup>, toxicidade apresentada na faixa de tóxicos severos como o SDS, conforme estudos anteriores de padronização de nosso laboratório. O valor de EC<sub>50</sub> encontra-se na **Tabela 2**. Tais resultados evidenciaram que o polímero poli-L-lisina apresentou citotoxicidade semelhante ao do surfactante SDS. Tal surfactante é considerado um padrão de toxicidade severa (Shopsis *et al*, 1985; Harbel *et al* (1997). Assim, a poli-L-lisina pode ser utilizada como padrão positivo na avaliação da citotoxicidade de materiais poliméricos por meio do ensaio de redução de MTT.

A **Figura 5B** mostra uma curva representativa do efeito da dextrana na redução do MTT. Nesse gráfico observa-se que em toda a faixa de concentração analisada de 0,1 a 30 mg mL<sup>-1</sup>, a dextrana não promoveu uma redução significativa da viabilidade celular. Considerando que a faixa de concentração testada é adequada para a detecção de efeitos tóxicos de baixa a alta intensidade, esse polímero se configura como um agente atóxico. Tais resultados mostraram que a dextrana pode ser utilizada como padrão negativo na avaliação da citotoxicidade de materiais poliméricos, por meio do ensaio de redução de MTT.

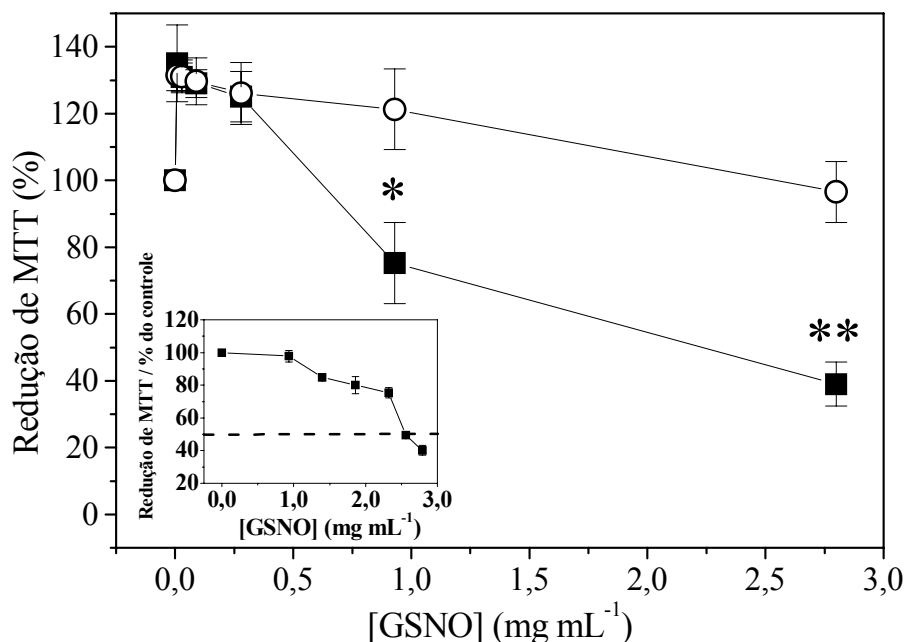


**Figura 5. Avaliação da citotoxicidade de Poli-L-lisina e Dextrana por meio da redução de MTT em células 3T3**

Fibroblastos 3T3 em fase exponencial de crescimento foram expostos aos padrões: poli-L-lisina (**A**) e dextrana (**B**), durante 30 min, em PBS- $\text{Ca}^{2+}$  e ao final, incubados com MTT. O corante foi extraído das células e quantificado em  $\lambda = 570 \text{ nm}$ . Os valores foram expressos em porcentagens de redução de MTT em relação ao ensaio controle (100 %). Os dados representam os valores médios de 8 ensaios.

A **Figura 6** mostra as curvas representativas do efeito da GSNO na presença ou na ausência dos polímeros PVA/PVP, no ensaio da redução do MTT. Nesse gráfico pode-se observar que a GSNO induz um decréscimo da viabilidade celular, de maneira dependente de concentração na condição em PBS- $\text{Ca}^{2+}$ , onde observa-se a inibição da redução do MTT abaixo de 50% acima de  $2,75 \text{ mg mL}^{-1}$ . No detalhe está apresentada a curva dose-resposta,

cujo o valor de  $EC_{50}$  corresponde a  $2,75 \pm 0,05$  mg/mL ou  $8,18 \pm 0,13$  mM. A GSNO em presença dos polímeros não promoveu perda da viabilidade celular.



**Figura 6. Avaliação da citotoxicidade de GSNO na presença ou ausência da matriz de PVA/PVP por meio da redução do MTT.**

A redução do MTT pelas células 3T3, em fase exponencial de crescimento, tratadas com: GSNO/PVA/PVP (○) e GSNO (■), na faixa de concentração de 0,1 a 3,0 mg mL<sup>-1</sup>, foi determinada após 30 min em PBS-Ca<sup>2+</sup> com posterior período incubação com MTT (4 hs). O corante foi extraído e quantificado em  $\lambda = 570$  nm. Os valores foram expressos em porcentagens de redução de MTT em relação ao ensaio controle (100 %). Os dados representam os valores médios de 8 replicatas de 4 ensaios independentes. \*  $P < 0,001$  comparado ao controle, \*\*  $P < 0,001$  relacionado ao controle e GSNO 0,9 mg mL<sup>-1</sup>

**Tabela 2. Avaliação da citotoxicidade de padrões, PVA/PVP, GSNO pela redução do MTT em células 3T3**

| substância     | EC <sub>50</sub> ± EPM* (mg mL <sup>-1</sup> ) | nº de experimentos |
|----------------|------------------------------------------------|--------------------|
| poli-L-lisina  | 0,06 ± 0,01                                    | 6                  |
| dextrana       | -                                              | 2                  |
| GSNO/PVA/PVP   | -                                              | 3                  |
| blenda PVA/PVP | -                                              | 2                  |
| GSNO           | 2,75 ± 0,05                                    | 3                  |
| SDS**          | 0,10 ± 0,02                                    | 3                  |

\* Os valores de EC<sub>50</sub> correspondem à concentração do agente que inibiu 50 % a redução de MTT. Estão apresentados valores médios e o desvio padrão da média de experimentos independentes.

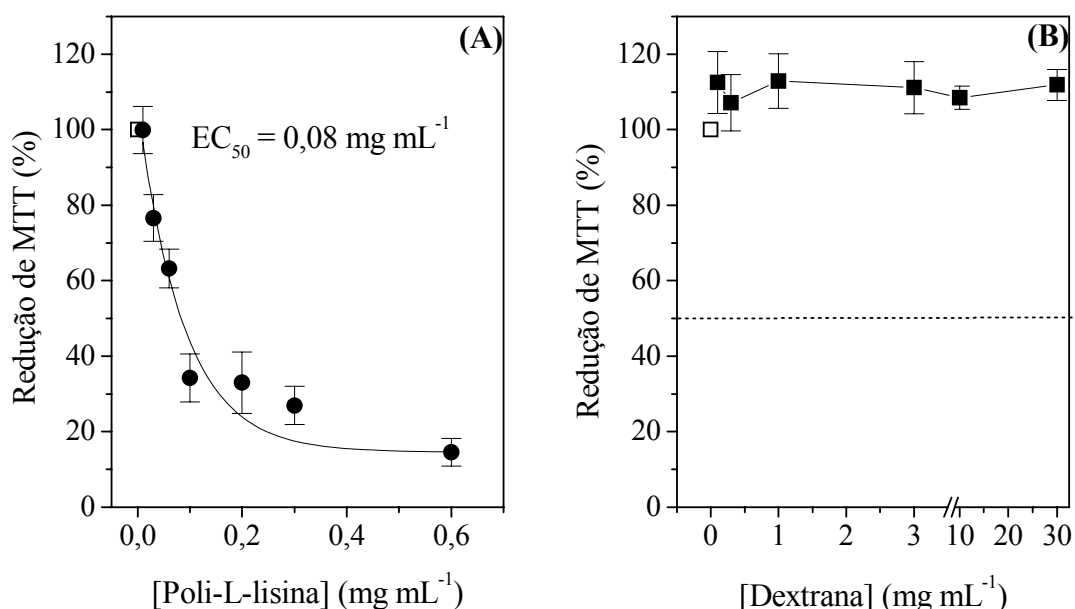
\*\* Padrão positivo para citotoxicidade estabelecido em trabalhos anteriores no laboratório de Bioensaios *in vitro*.

#### IV.1.1. B) AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE POR MEIO DA REDUÇÃO DO MTT COM CML

A **Figura 7A** mostra a curva de inibição da redução do MTT promovida pela poli-L-lisina em células RASM. Nesse gráfico pode-se observar que a poli-L-lisina promoveu a inibição da redução do MTT de maneira dependente da concentração e que ocorreu uma queda brusca da viabilidade celular em concentrações de poli-L-lisina superiores a 0,06 mg mL<sup>-1</sup>. Tais resultados evidenciaram que o polímero poli-L-lisina pode ser utilizado como padrão positivo na avaliação da citotoxicidade de materiais poliméricos por meio do ensaio de redução de MTT.

Comparando-se os valores de EC<sub>50</sub> para as células 3T3 e para RASM, os quais foram 0,06±0,01 mg mL<sup>-1</sup> e 0,08±0,02 mg mL<sup>-1</sup> respectivamente, podemos observar que as células 3T3 apresentam resposta máxima à citotoxicidade causada pela poli-L-lisina.

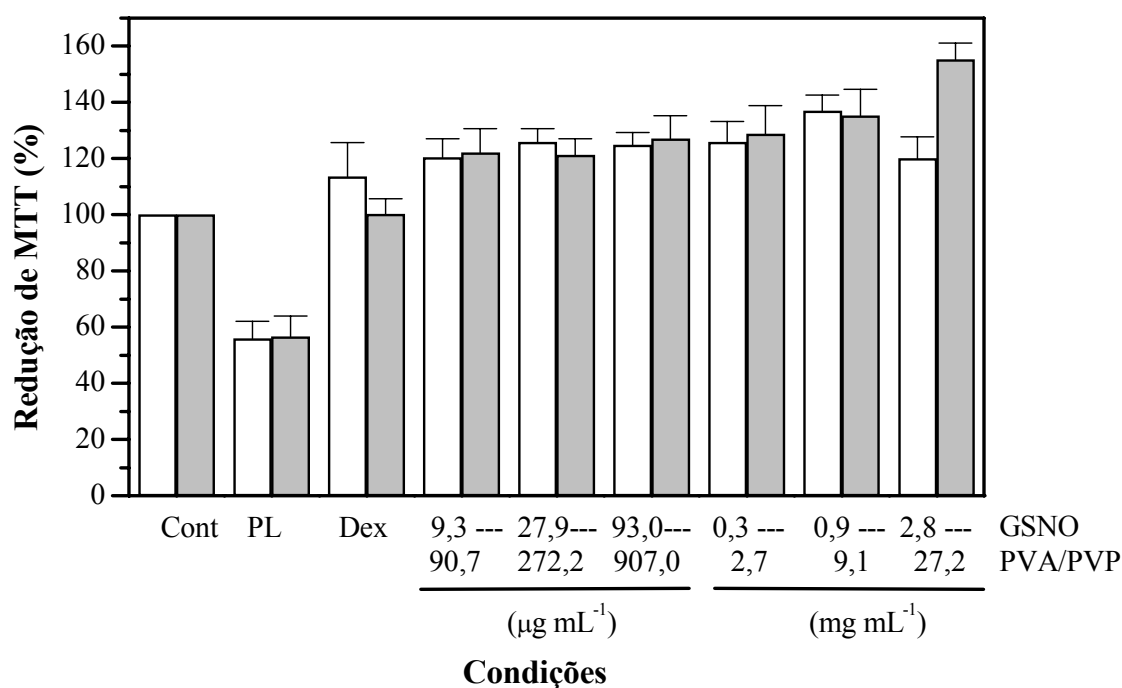
A **Figura 7B** mostra a curva do efeito da dextrana na redução do MTT. Nesse gráfico observa-se que em toda a faixa de concentração analisada de 0,1 a 30 mg mL<sup>-1</sup>, a dextrana não promoveu a redução da viabilidade celular. Tais resultados mostraram que a dextrana pode ser utilizada como padrão negativo na avaliação da citotoxicidade de materiais poliméricos, por meio do ensaio de redução de MTT, também em células de musculatura lisa.



**Figura 7. Avaliação da citotoxicidade de células RASM por meio da redução de MTT**

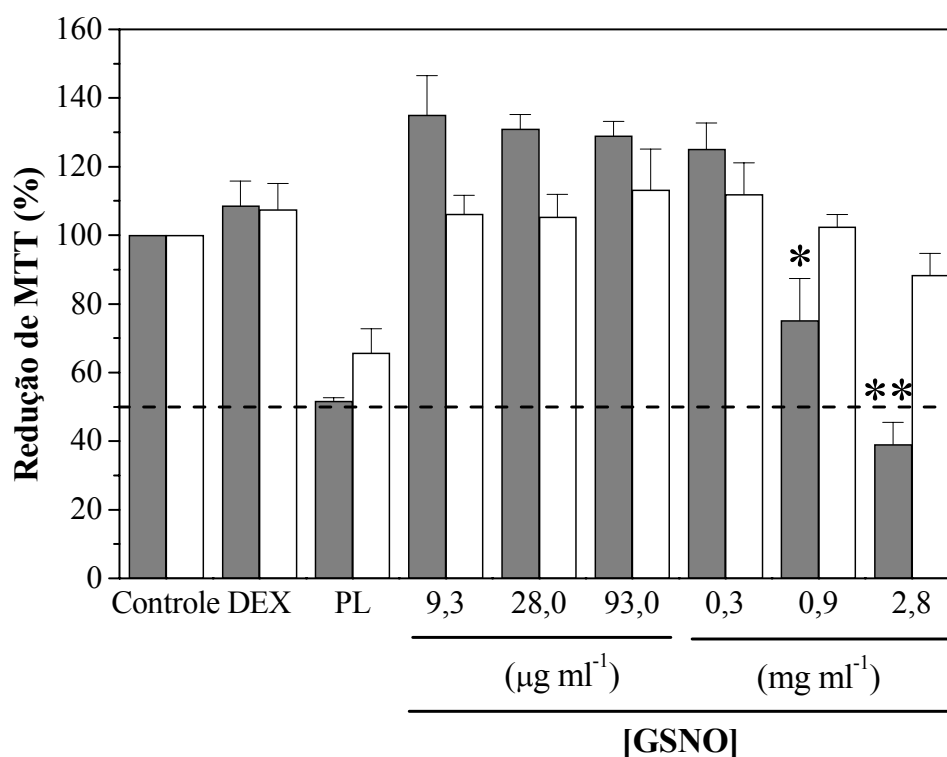
Células RASM foram expostas aos padrões poli-L-lisina (A) e dextrana (B), (30 min, em PBS- $\text{Ca}^{2+}$ , 37°C). O corante foi extraído das células e quantificado em  $\lambda = 570 \text{ nm}$ . Os valores foram expressos em porcentagens de redução de MTT em relação ao ensaio controle (100 %). Os dados representam os valores médios de 4 ensaios independentes com pelo menos 6 replicatas por experimento. O símbolo  $\square$  representa o controle.

A **Figura 8** mostra o efeito da solução contendo a matriz polimérica com o doador de NO (GSNO/PVA/PVP) em comparação com a solução contendo apenas a matriz polimérica (PVA/PVP), na redução do MTT em células RASM. Nesse gráfico pode-se observar que em toda a faixa de concentração analisada, de 0,1 a 30  $\text{mg mL}^{-1}$ , estas soluções não promoveram a redução da viabilidade celular.



**Figura 8. Avaliação da citotoxicidade células RASM por meio da redução de MTT**  
Células RASM foram expostas a: solução contendo GSNO/PVA/PVP (□), solução contendo PVA/PVP (■) (0,1 a 30 mg mL<sup>-1</sup>) e aos padrões PL (0,06 mg mL<sup>-1</sup>) e Dextrana (30 mg mL<sup>-1</sup>), (30 min, em PBS-Ca<sup>2+</sup>, 37°C). O corante foi extraído das células e quantificado  $\lambda = 570$  nm. Os valores foram expressos em porcentagens de redução de MTT, em relação à resposta obtida no ensaio controle (100 %). Os dados representam os valores médios de 4 experimentos independentes com pelo menos 6 replicatas em cada experimento.

A **Figura 9** mostra o efeito da solução de GSNO na redução do MTT, comparando-se as células 3T3 com as células RASM. Nesse gráfico pode-se observar que a GSNO promoveu a inibição na redução de MTT em concentrações a partir de 0,9 mg mL<sup>-1</sup> no caso da linhagem 3T3 ( $EC_{50}=2,75$  mg mL<sup>-1</sup>), enquanto nas células RASM o valor de 50% de redução na viabilidade celular não foi atingida.



**Figura 9. Avaliação da citotoxicidade de fibroblastos 3T3 e células RASM por meio da redução do MTT**

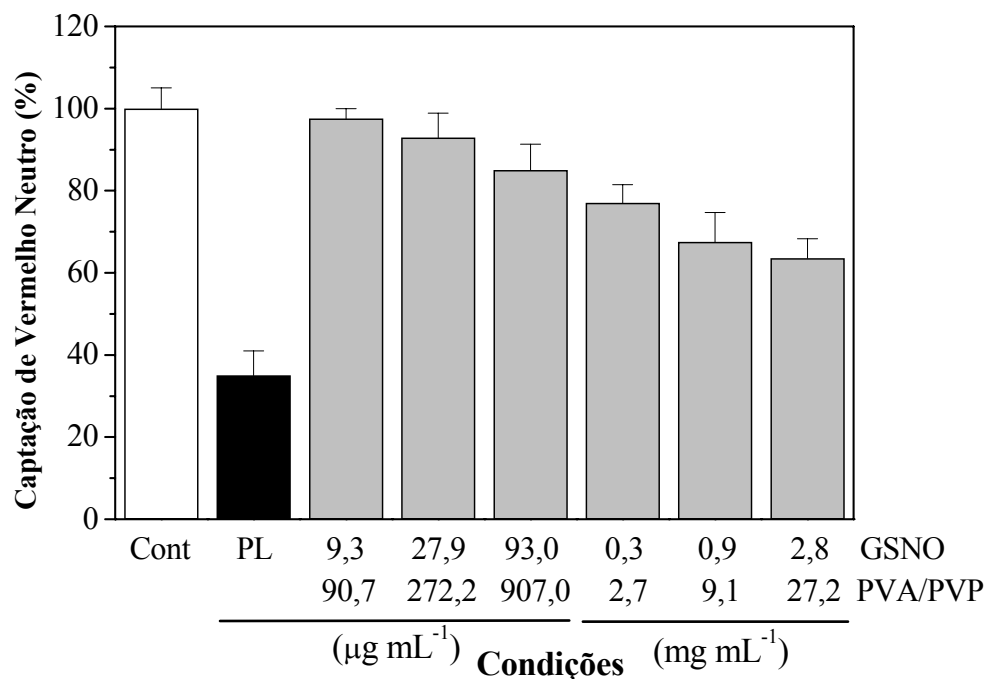
Fibroblastos 3T3 (■) e células RASM (□) foram expostos a: GSNO ( $9,3 \mu\text{g mL}^{-1}$  a  $2,8 \text{ mg mL}^{-1}$ ) e aos padrões PL ( $0,06 \text{ mg mL}^{-1}$ ), dextrana (DEX) ( $30 \text{ mg mL}^{-1}$ ), (30 min, em PBS- $\text{Ca}^{2+}$ ,  $37^\circ\text{C}$ ). O corante foi extraído das células e quantificado  $\lambda = 570 \text{ nm}$ . Os valores foram expressos em porcentagens de redução de MTT em relação ao ensaio controle (100%). Os dados representam os valores médios de 4 experimentos independentes com pelo menos 6 ensaios cada e as barras de erros correspondem ao EPM. \* $P < 0,05$  comparado ao controle, \*\* $P < 0,001$  relacionado ao controle e a GSNO  $0,9 \text{ mg mL}^{-1}$ .

#### IV.1.2. VIABILIDADE CELULAR POR MEIO DA CAPTAÇÃO DO VERMELHO NEUTRO

O ensaio NRU (*neutral red uptake*) foi inicialmente padronizado de acordo com o procedimento descrito por Borenfreund e Puerner (1984, 1985). Esse procedimento mede a captação do corante vital vermelho neutro pelos lisossomos das células viáveis. Esta técnica tem sido atualmente muito utilizada para análise de citotoxicidade de toxinas diversas, como indicador da integridade da membrana celular e da atividade funcional de organelas (Spielmann, 1998). A citotoxicidade foi avaliada pela medida da quantidade de vermelho neutro captado pelas células, detectada pela medida da absorbância no comprimento de onda de 540 nm ( $A_{540}$ ).

O ensaio que já havia sido padronizado no laboratório de Bioensaios *in vitro* com as células 3T3, foi realizado também com as células RASM, utilizando-se os mesmos controles positivo e negativo usados nos experimentos com MTT, a saber, poli-L-lisina e dextrana (resultados não mostrados). A análise dos efeitos da matriz polimérica na presença de GSNO em fibroblastos 3T3, é apresentada na **Figura 10**.

Nas concentrações mais baixas de GSNO/PVA/PVP observou-se que não houve inibição da captação de vermelho neutro; já na concentração de 30 mg GSNO/PVA/PVP foi observado uma diminuição na taxa de incorporação de vermelho neutro em torno de 30 %.

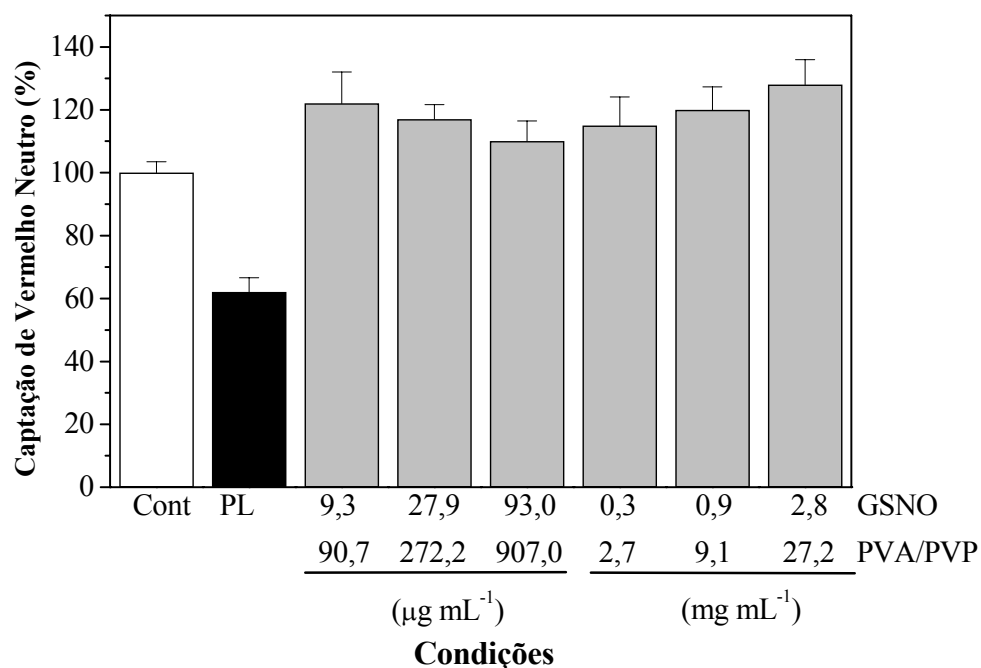


**Figura 10. Avaliação da citotoxicidade da matriz polimérica (PVA/PVP) + GSNO por meio da captação do vermelho neutro**

A captação de vermelho neutro pelos lisossomos de células **3T3** tratadas com: Poli-L-lisina (PL: 60 mg mL<sup>-1</sup>) (■) e a blenda contendo GSNO (GSNO/PVA/PVP) (0,1 a 30 mg mL<sup>-1</sup>) (■) foi determinada após 30 min de tratamento em PBS-Ca<sup>2+</sup> a 37°C, com posterior período de exposição ao corante (3 hs). O corante foi extraído das células e quantificado em  $\lambda=540$  nm. O gráfico representa valores médios de 3 experimentos de 8 ensaios cada, em porcentagens de captação, em relação ao ensaio controle (100%).

A **Figura 11** mostra a exposição das células RASM aos compostos de interesse: a matriz polimérica na presença de GSNO. A poli-L-lisina causou um efeito inibitório sobre a captação de vermelho neutro, como esperado, porém as células 3T3 (**Figura 9**) mostraram-

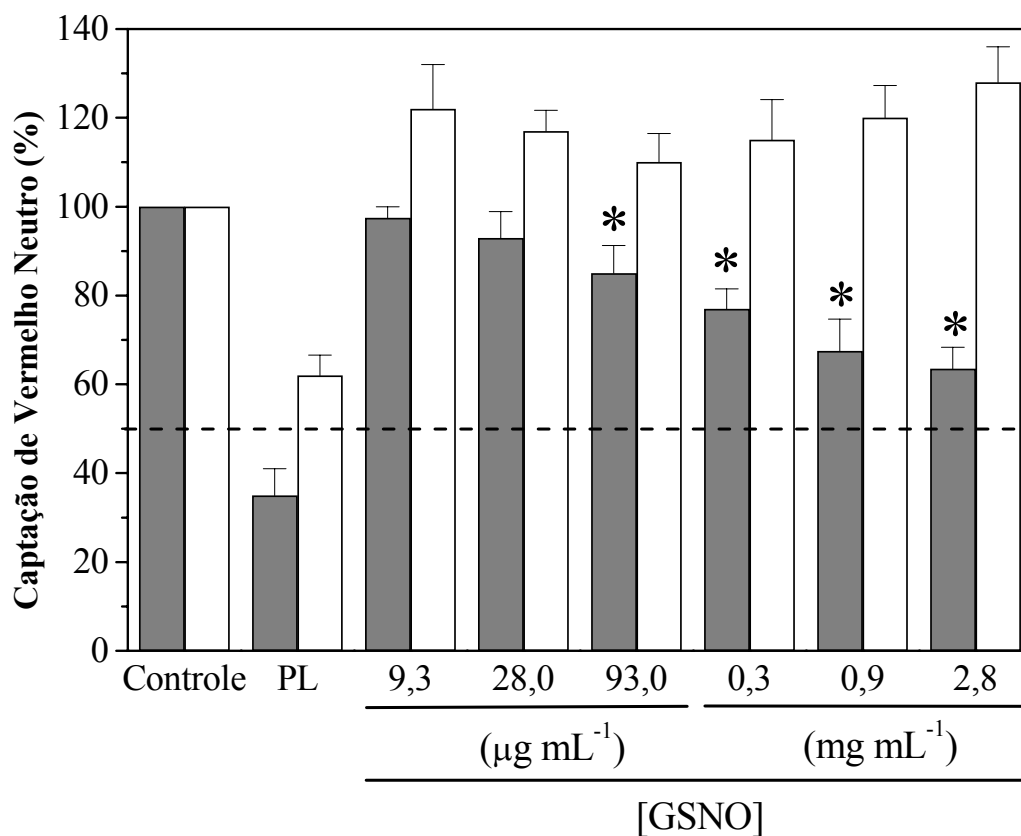
se mais sensíveis a esta toxina do que as células RASM. Não foi detectada qualquer redução da viabilidade celular nas células RASM expostas a blenda contendo GSNO. Ao contrário, verificamos um aumento de 10 a 20% mostrando que o tratamento promoveu estímulo da incorporação de vermelho neutro nesta linhagem celular.



**Figura 11. Avaliação da citotoxicidade de PVA/PVP/GSNO por meio da captação de vermelho neutro**

Células RASM em fase exponencial de crescimento foram tratadas com: PL (0,06  $\text{mg mL}^{-1}$ ) (●), e a blenda PVA/PVP + GSNO (0,01 a 30  $\text{mg mL}^{-1}$ ) (●), por 30 min em PBS- $\text{Ca}^{2+}$ , 37°C, e ao final incubadas com vermelho neutro (3 hs). O corante foi extraído e quantificado em  $\lambda = 540 \text{ nm}$ . O gráfico representa os valores médios de 3 experimentos de 8 ensaios cada, em porcentagens de captação, em relação ao ensaio controle (100%).

A fim de analisar as duas linhagens celulares, a **Figura 12** apresenta a comparação da captação do vermelho neutro obtida pelas células 3T3 (**Figura 10**) e pelas células RASM (**Figura 11**).



**Figura 12. Avaliação da citotoxicidade de GSNO/PVA/PVP por meio da captação de vermelho neutro em células 3T3 e em células RASM**

Células 3T3 (■) e células RASM (□) foram expostas a (GSNO/PVP/PVA), como descrito nas figuras 11 e 12 respectivamente. O gráfico representa os valores médios de 3 experimentos de 8 ensaios cada, em porcentagens de captação, em relação ao ensaio controle (100%). \* $P < 0,001$  comparado ao controle.

## IV. 2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-PROLIFERATIVA

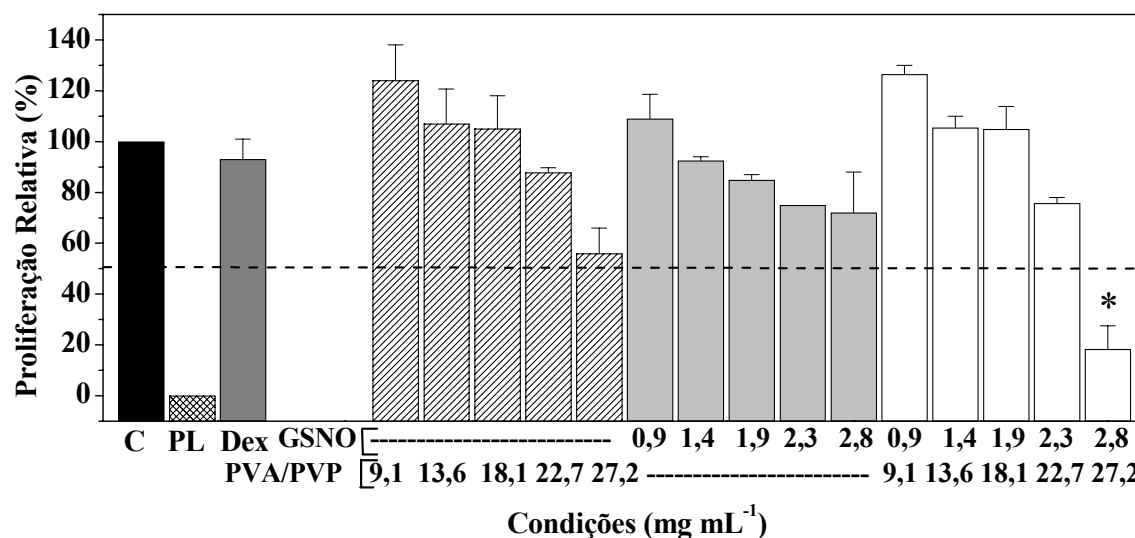
### IV.2.1. ENSAIO DA INIBIÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR EM CML

A medida da taxa de inibição da proliferação celular tem sido utilizada como um indicador eficiente de citotoxicidade por este grupo de pesquisa coordenado por Hoffmann M.E. e também por outros pesquisadores (Shaw, 1994; Growth *et al*, 1995; Arévalo *et al*, 1996; Souza-Pinto *et al*, 1996; Souza-Pinto, 1997; Chen e Gardner, 2004).

Inicialmente, analisou-se a taxa da proliferação celular de células RASM submetidas a diferentes concentrações dos controles, a saber: poli-L-lisina e dextrana (resultados não mostrados). O efeito inibitório da matriz polimérica PVA/PVP na presença e na ausência do doador de NO (GSNO) sobre a proliferação de células RASM foi medido 24 horas após a exposição (30 min), como a variação da população celular neste período. O aumento da população nesse período foi medido através do aumento da absorbância dos lisados celulares a 260 nm, uma função do conteúdo de ácidos nucleicos, diretamente correlacionada com o número de células (Gesztési, 1990; Souza-Pinto *et al*, 1996; Souza-Pinto, 1997; Soraggi, 1997).

A **Figura 13** mostra a inibição da proliferação relativa, que foi quantificada em termos de porcentagem (%) do controle, condição na qual as células não foram expostas às amostras teste. Foi possível observar que o tratamento com a matriz PVA/PVP causou um efeito bifásico: uma pequena estimulação da proliferação na dose mais baixa (9,1 mg mL<sup>-1</sup>) e uma inibição expressiva da proliferação nas doses mais elevadas. A exposição das células a GSNO causou uma pequena inibição da proliferação celular (da ordem de 20 a 30 %) nas

doses mais elevadas. A adição de GSNO à matriz de PVA/PVP intensificou o efeito inibitório verificado na concentração mais alta da matriz.



**Figura 13. Efeito de GSNO/PVA/PVP sobre a proliferação celular**

Células RASM em fase exponencial de crescimento foram expostas às soluções contendo: (▨) poli-L-lisina  $0,06 \text{ mg mL}^{-1}$ , (■) dextrana  $30 \text{ mg mL}^{-1}$ , (▤) os polímeros PVA e PVP, (▩) GSNO e (□) os polímeros PVA, PVP + GSNO ( $10 \text{ a } 30 \text{ mg mL}^{-1}$ ) (30 min, PBS- $\text{Ca}^{2+}$ ,  $37^\circ\text{C}$ ). Ao final do tratamento as células foram reincubadas em DMEM+SFB (10%) por 24 hs e em seguida fixadas e lisadas em NaOH  $0,5\text{N}$ , para medida da  $A_{260}$  dos lisados. A proliferação relativa foi expressa como percentuais da variação da  $A_{260}$  em relação às placas controle. O gráfico representa valores médios de 5 experimentos em triplicatas e as barras de erros correspondem ao EPM. \* $P < 0,05$  comparado ao controle.

### IV. 3. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL HEMOLÍTICO E TROMBOGÊNICO

#### IV.3.1. ENSAIO DA HEMÓLISE

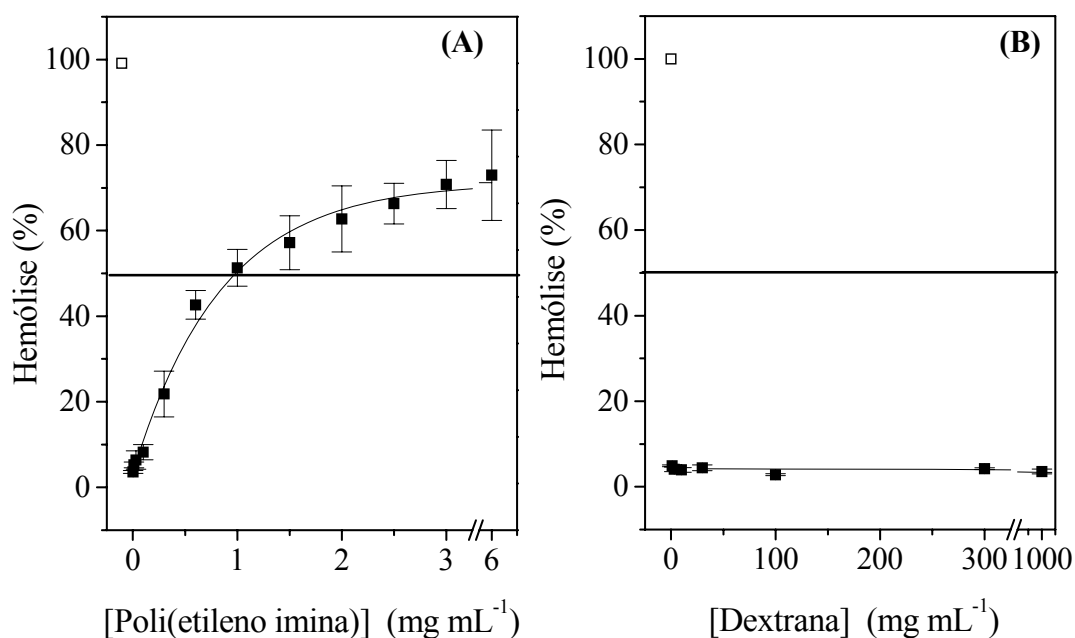
O ensaio de determinação da atividade hemolítica de uma substância pela quantificação da hemoglobina liberada das células vermelhas do sangue foi padronizado no laboratório de Bioensaios *in vitro*, segundo o método de Pape *et al* (1987), com as modificações descritas em Materiais e Métodos. A utilização das hemáceas humanas se justifica pela disponibilidade de amostras de sangue de doadores voluntários e saudáveis, evitando o sacrifício de animais de experimentação.

O ensaio de hemólise é um indicador da extensão de danos causados na membrana das células vermelhas do sangue (eritrócitos) também conhecido como teste do RBC: *Red Blood Cells*, pelo tensoativo, ao nível dos lipídeos ou das proteínas de membrana. O potencial hemolítico do produto é expresso pela dose que causa a liberação de 50% do conteúdo de hemoglobina das hemáceas. A aplicação dos ensaios com RBC é recomendada pelos órgãos internacionais como os melhores indicadores de avaliação do potencial hemolítico de determinadas substâncias. O interesse neste ensaio, foi o de analisar o possível potencial hemolítico da matriz polimérica PVA/PVP na presença e na ausência do doador de NO (GSNO) em eritócitos humanos.

Foram utilizadas nesse ensaio as substâncias: poli(etileno imina) (PEI) e a dextrana, a fim de se obter comparações com os produtos de interesse.

A **Figura 14 A** mostra a curva concentração-efeito que representa a hemólise promovida pela substância poli(etileno imina) (PEI). Pode-se observar que a atividade hemolítica da poli(etileno imina) variou de forma dependente da concentração utilizada e apresentou potencial hemolítico máximo ao redor de 70% em relação ao controle. Tal resultado mostrou que o polímero poli(etileno imina) pode ser utilizado como padrão positivo na avaliação do potencial hemolítico de materiais poliméricos por meio do ensaio da hemólise em sangue humano e foi obtido o valor de  $EC_{50} = 0,96 \pm 0,28 \text{ mg mL}^{-1}$ .

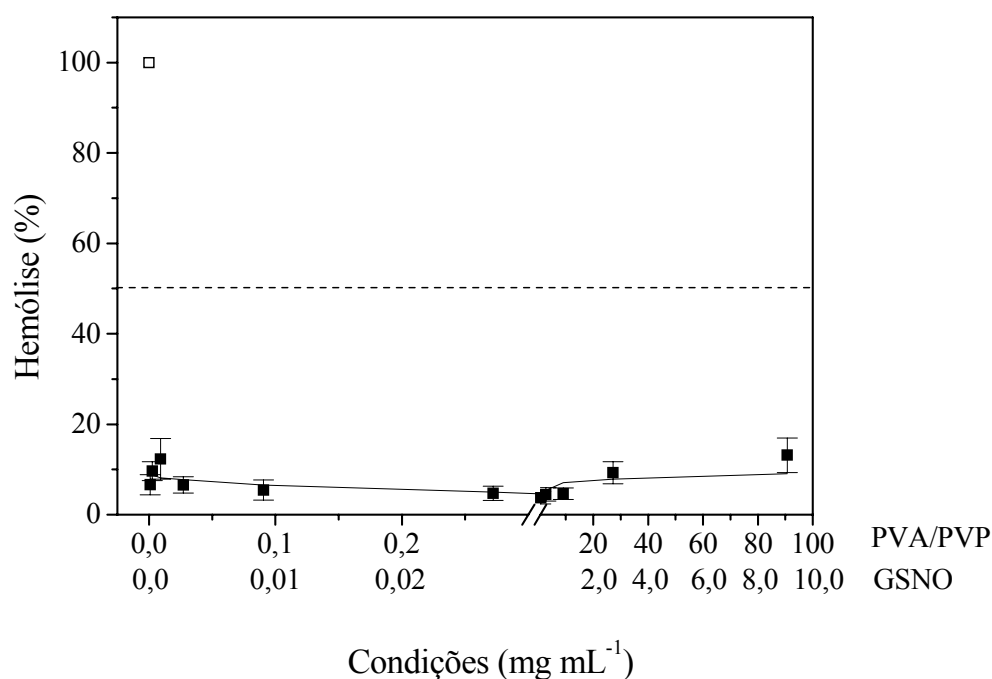
A **Figura 14 B** mostra a curva concentração-efeito que representa a atividade hemolítica promovida pela dextrana. Pode-se observar, que em toda a faixa de concentração analisada, de  $1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  a  $100 \text{ mg mL}^{-1}$ , a dextrana não promoveu hemólise. Assim, este polímero não apresenta potencial hemolítico. Tal resultado mostrou que a dextrana pode ser utilizada como padrão negativo na avaliação da atividade hemolítica de materiais poliméricos, por meio do ensaio da hemólise em sangue humano.



**Figura 14. Efeitos dos padrões poli(etileno imina) (A) e da dextrana (B) sobre a hemólise de eritrócitos humanos.**

Os dados representam os valores médios de 3 ensaios e as barras de erros correspondem ao EPM. Os valores foram expressos em porcentagens de hemólise em relação ao ensaio controle ( $\square$ ) (100 % de hemólise), no qual as hemáceas foram submetidas à condição hipotônica (em água destilada).

A **Figura 15** mostra a curva do efeito da GSNO/PVA/PVP na hemólise. Pode-se observar que esse material não apresentou atividade hemolítica em toda a faixa de concentração analisada (de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  a  $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ).



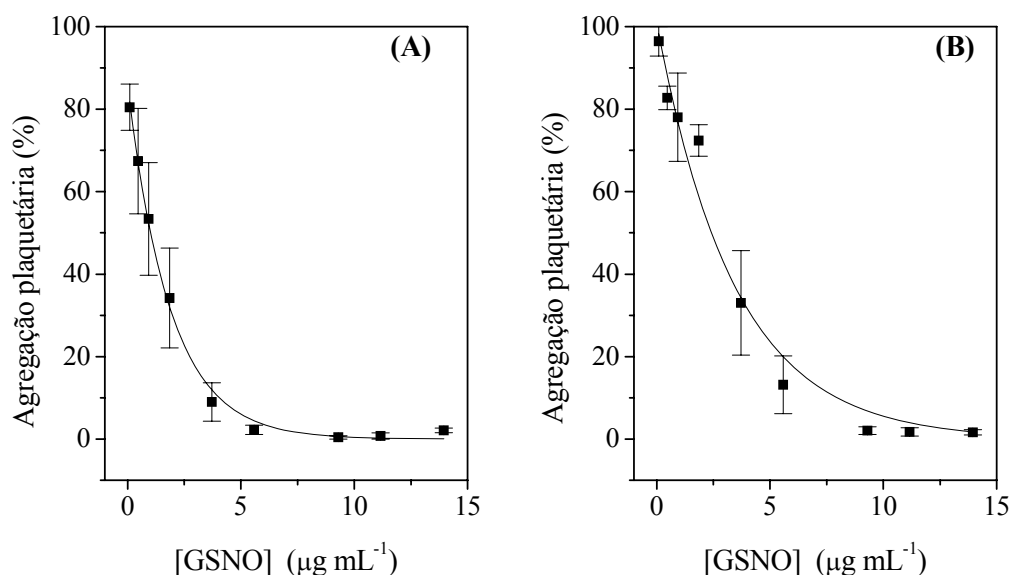
**Figura 15. Efeito da GSNO/PVA/PVP sobre a hemólise de eritrócitos humanos.**

Os dados representam os valores médios de 3 ensaios e as barras de erros correspondem ao EPM. Os valores foram expressos em porcentagens de hemólise em relação ao ensaio controle ( $\square$ ) (100 % de hemólise), no qual as hemáceas foram submetidas à condição hipotônica (em água destilada).

Para as avaliações do potencial anti-trombogênico da formulação contendo a matriz polimérica (PVA/PVP) com o doador de NO, a GSNO, foram desenvolvidos os ensaios de agregação e adesão plaquetária. Estes ensaios têm sido utilizados para a avaliação do potencial anti-trombogênico de novos materiais (Radomski, 1992; Marcondes *et al*, 2006).

### IV.3.2. ENSAIO DA AGREGAÇÃO DE PLAQUETAS

Inicialmente foi quantificada a inibição da agregação plaquetária humana induzida por duas concentrações de ADP, promovida pela GSNO. A **Figura 16** mostra as curvas de inibição na porcentagem de agregação induzida por ADP (5 $\mu$ M e 10  $\mu$ M), em função da concentração de GSNO.



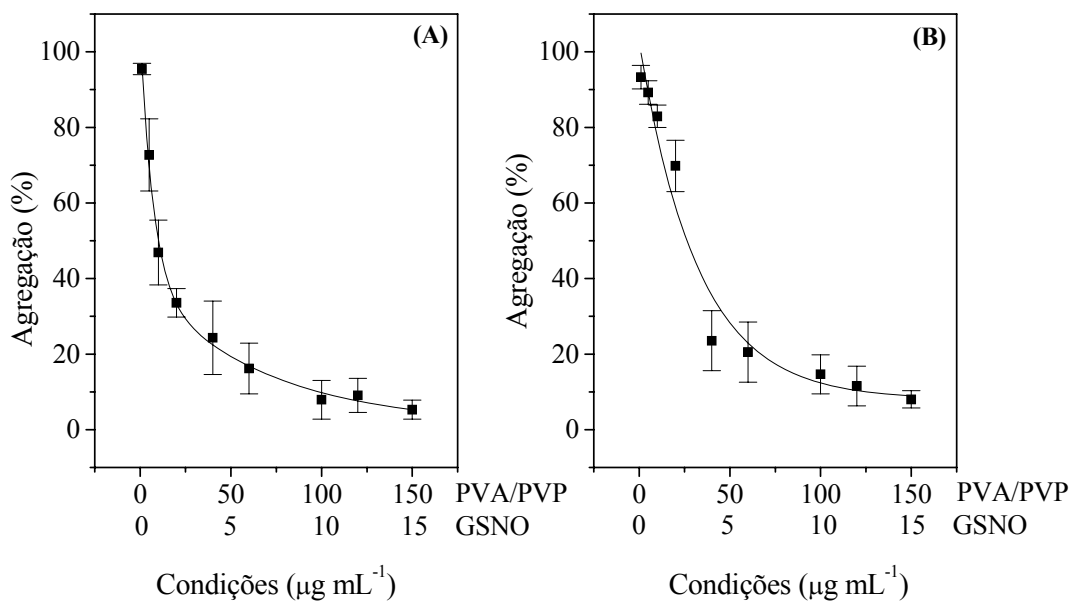
**Figura 16. Inibição da agregação plaquetária promovida pela GSNO**

A agregação foi induzida por ADP nas concentrações de (A) 5  $\mu\text{M}$  e (B) 10  $\mu\text{M}$ . Os dados representam os valores médios de 3 ensaios para ADP=5  $\mu\text{M}$ , 4 ensaios para ADP=10  $\mu\text{M}$  e as barras de erros correspondem ao EPM. Os valores foram expressos em porcentagens de agregação, onde foram aferidos 100% de agregação, na qual as plaquetas foram incubadas apenas com ADP.

Na **Figura 16** pode-se observar que a agregação foi inibida de maneira dependente da concentração e que os valores obtidos de  $EC_{50}$  foram:  $1,0 \pm 0,4 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $2,5 \pm 0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  respectivamente para concentrações de ADP de  $5 \mu\text{M}$  e  $10 \mu\text{M}$  (**Tabela 3**). Assim, foi verificado que o aumento na concentração do agonista (ADP) leva a um aumento do valor de  $EC_{50}$  (correlação positiva), mostrando que a resposta das plaquetas frente ao agonista ocorreu como o previsto.

A **Figura 17** mostra as curvas de inibição na porcentagem de agregação de plaquetas induzidas por ADP e promovidas pelas diferentes concentrações de GSNO/PVA/PVP. Pode-se observar que a agregação foi inibida pela GSNO/PVA/PVP de forma dependente da concentração e os valores obtidos de  $EC_{50}$  foram:  $1,3 \pm 0,4$  e  $2,5 \pm 0,6 \mu\text{g mL}^{-1}$  respectivamente para concentrações de ADP  $5 \mu\text{M}$  e  $10 \mu\text{M}$  (**Tabela 3**). De forma análoga à **Figura 16**, foi verificado que o aumento na concentração do agonista (ADP) leva a um aumento do valor de  $EC_{50}$  (correlação positiva). Assim, pode-se observar que não houve diferença nas respostas obtidas na presença ou ausência das soluções poliméricas.

O comportamento observado na **Figura 17** foi similar ao obtido para a GSNO, evidenciando que o efeito de inibição da agregação plaquetária promovida pela GSNO/PVA/PVP, pode ser atribuído a GSNO *per se*.



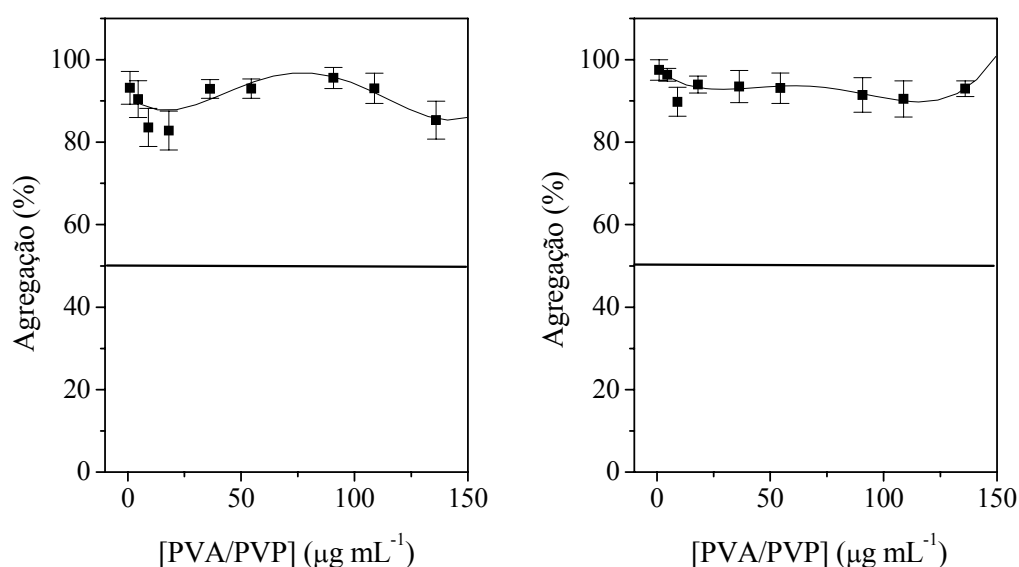
**Figura 17. Inibição da agregação plaquetária promovida pela GSNO/PVA/PVP**

A agregação foi induzida por ADP nas concentrações de 5 µM (A) e 10 µM (B). Os dados representam os valores médios de 7 ensaios para ADP 5 µM, 5 ensaios para 10 µM e as barras de erros correspondem ao EPM. Os valores foram expressos em porcentagens de agregação, em relação a 100% de agregação, onde as plaquetas foram incubadas apenas com ADP.

Foram realizados experimentos apenas com a presença da matriz polimérica de PVA/PVP para verificar a participação destes compostos nos efeitos relacionados à inibição da agregação observada na presença da solução de GSNO/PVA/PVP.

A **Figura 18** mostra as curvas de porcentagem de agregação em função da concentração de blenda PVA/PVP, para a agregação induzida por ADP, respectivamente 5 e 10 µM. Pode-se observar que a blenda não promoveu efeito na inibição da agregação

plaquetária. Assim, tais resultados mostram que o efeito de inibição da agregação plaquetária foi exclusivamente devido à presença da GSNO (**Figura 17**). A associação da GSNO com a blenda de PVA/PVP não modificou o perfil das curvas e nem os valores de  $EC_{50}$ . Mais uma vez, observamos que a variação da concentração do agonista (ADP) leva a um aumento dos valores de  $EC_{50}$ .



**Figura 18. Inibição da agregação plaquetária promovida pela blenda de PVA/PVP**

A agregação foi induzida por ADP nas concentrações de (A) 5:μM e (B) 10 μM. Os dados representam os valores médios de 4 ensaios para ADP=5 μM, 5 ensaios para ADP=10 μM e as barras de erros correspondem ao EPM. Os valores foram expressos em porcentagens de agregação, em relação a 100% de agregação, na qual as plaquetas foram incubadas apenas com ADP.

A **Tabela 3** mostra a comparação dos valores de  $EC_{50}$  obtidos nos ensaios de inibição da agregação plaquetária. Pode-se observar que os valores de  $EC_{50}$  para a

GSNO/PVA/PVP e GSNO não apresentam diferença significativa. Tais índices foram comparados aos obtidos ao doador de NO clássico, nitroprussiato de sódio (NPS) em concentrações de 2 :M a 5  $\mu$ M (Zamora *et al*, 1997) .

**Tabela 3.** Valores de EC<sub>50</sub> para a inibição da agregação de plaquetas induzida por ADP.

| substância   | EC <sub>50</sub> $\pm$ SEM* ( $\mu$ g mL <sup>-1</sup> ) |                       | nº de ensaios     |                    |
|--------------|----------------------------------------------------------|-----------------------|-------------------|--------------------|
|              | ADP=5 $\mu$ M                                            | ADP=10 $\mu$ M        | ADP=<br>5 $\mu$ M | ADP=<br>10 $\mu$ M |
| GSNO/PVA/PVP | 1,3 $\pm$ 0,4                                            | 2,5 $\pm$ 0,6         | 7                 | 5                  |
| PVA/PVP      | -                                                        | -                     | 4                 | 5                  |
| GSNO         | 1,0 $\pm$ 0,4                                            | 2,5 $\pm$ 0,5         | 3                 | 4                  |
| NPS          | 4,4 $\pm$ 1,6 $\mu$ M                                    | 3,4 $\pm$ 0,1 $\mu$ M | 4                 | 3                  |

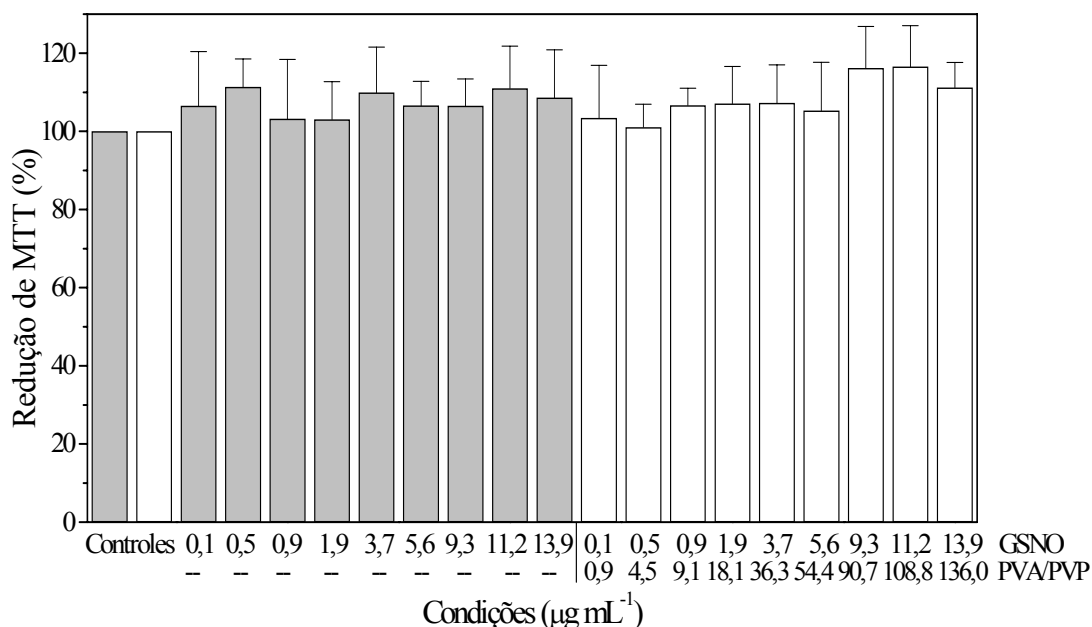
\* Os valores de EC<sub>50</sub> correspondem à concentração do agente que inibiu 50% a agregação induzida por ADP. Estão apresentados valores médios e o erro padrão da média de experimentos independentes.

A representação em molaridade (M) de GSNO utilizada e os seus respectivos valores de  $EC_{50}$  encontram-se apresentados na **Tabela 4**. Pode-se verificar que os valores obtidos foram próximos aos descritos na literatura (Zamora *et al*, 1997), confirmando a validade e a qualidade dos dados obtidos experimentalmente.

**Tabela 4.** Comparação dos valores de  $EC_{50}$  em  $\text{mol L}^{-1}$ .

| Substância | experimental          |                        | (Zamora <i>et al</i> , 1997) |
|------------|-----------------------|------------------------|------------------------------|
|            | ADP = 5 $\mu\text{M}$ | ADP = 10 $\mu\text{M}$ | ADP = 8 $\mu\text{M}$        |
| GSNO       | 3,1 $\mu\text{M}$     | 7,4 $\mu\text{M}$      | 5,25 $\mu\text{M}$           |
| NPS        | 4,4 $\mu\text{M}$     | 3,4 $\mu\text{M}$      | 2,18 $\mu\text{M}$           |

Com o intuito de confirmar que a resposta encontrada nestes ensaios ocorreu devido à inibição da agregação e não da redução da viabilidade plaquetária, foi realizada a avaliação da viabilidade das plaquetas por meio da redução do MTT (**Figura 19**).



**Figura 19: Avaliação da citotoxicidade de GSNO/PVA/PVP por meio da redução do MTT em plaquetas**

Suspensão de plaquetas: foram expostas a GSNO e GSNO/PVA/PVP durante 1 h, em tampão Krebs-Ringer e ao final, incubados com MTT (3 h). O corante foi extraído das plaquetas (SDS 10% em HCl 0,01M) e quantificado em  $\lambda = 570$  nm. Os valores foram expressos em porcentagens de redução de MTT em relação ao ensaio controle (100%). Os dados representam os valores médios de 3 ensaios e as barras de erros correspondem ao EPM.

A **Figura 19** mostra que não houve redução na viabilidade das plaquetas, mostrando que a GSNO não é tóxica para as plaquetas humanas isoladas em nenhuma das concentrações utilizadas. A GSNO na presença da matriz de PVA/PVP também não apresentou nenhuma alteração na viabilidade das plaquetas.

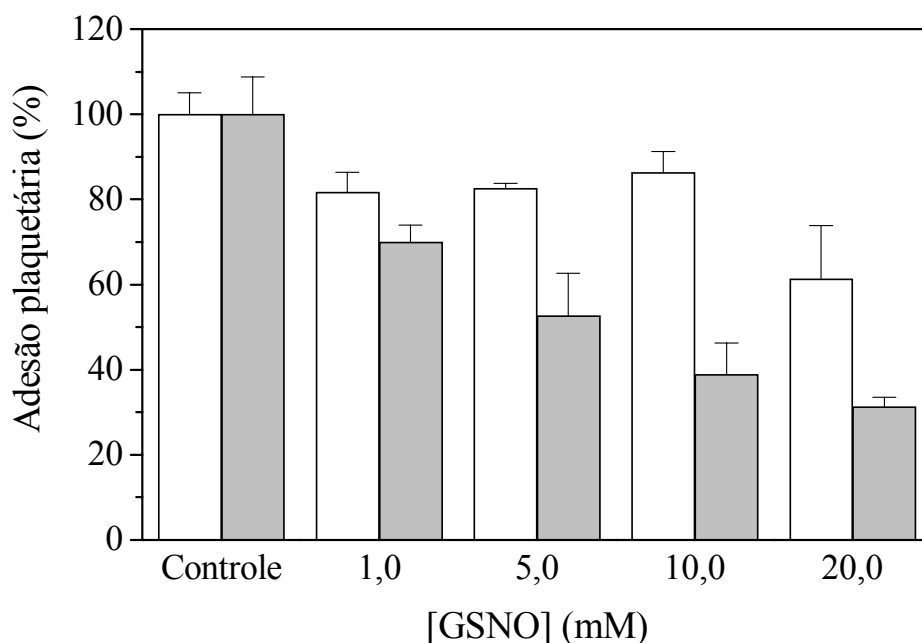
### IV.3.3. ENSAIO DA ADESÃO DE PLAQUETAS

No primeiro grupo de ensaios foram utilizadas concentrações de GSNO iguais às utilizadas nos testes de agregação plaquetária, ou seja, na faixa de 3  $\mu$ M a 41  $\mu$ M. Contudo, não obtivemos inibição da adesão neste intervalo de concentração.

Assim, foram utilizadas concentrações de GSNO da ordem de 1 mM a 20 mM. Nestas condições, a inibição foi verificada, como podemos observar na **Figura 20**. Contudo, uma inibição menor que 50% em relação ao controle não foram detectadas em nenhuma das concentrações utilizadas.

Após várias adaptações metodológicas, como a alteração no tempo de incubação de 15 min para 30 min, foi verificada a necessidade da presença de algum componente do plasma para que ocorresse a inibição.

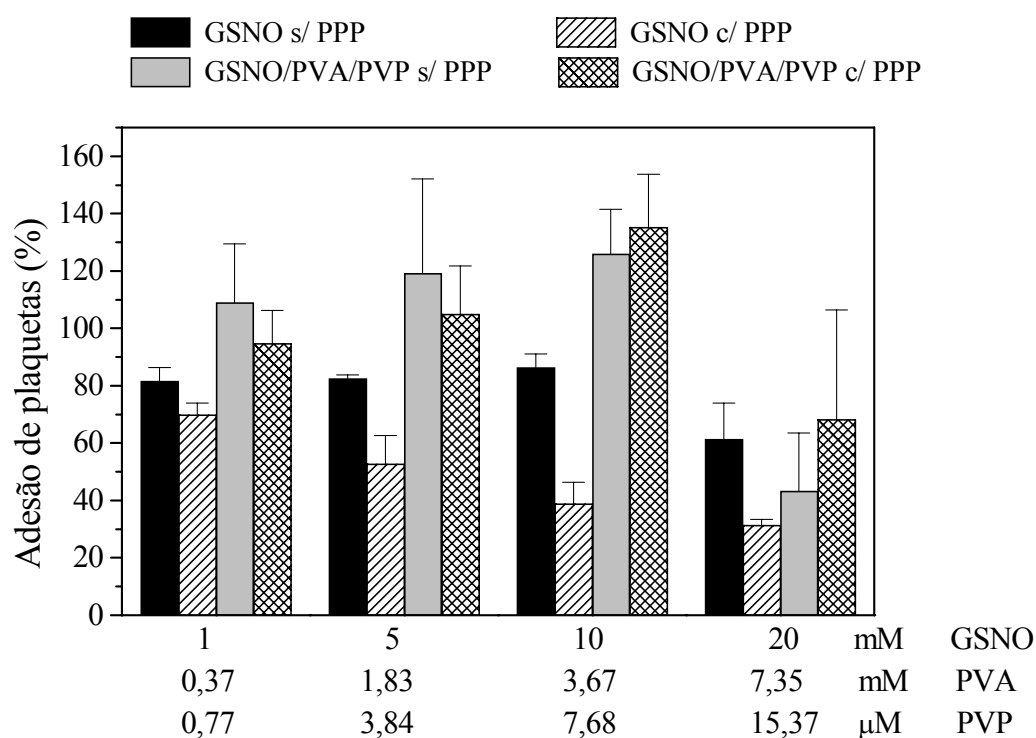
A **Figura 20** mostra a comparação da inibição da adesão plaquetária em porcentagem do controle, induzida pela GSNO na presença e na ausência de plasma pobre em plaquetas. O controle foi obtido através da adesão espontânea das plaquetas ao revestimento de fibrinogênio. Como pode ser observada nesta figura, a presença do plasma produz um aumento significativo na inibição da adesão plaquetária, obtendo-se desta forma um índice maior que 50%.



**Figura 20. Inibição da adesão de plaquetas humanas induzida pela GSNO**

Inibição da adesão de plaquetas ao fibrinogênio: na ausência (□) e na presença (■) de plasma pobre em plaquetas. Os valores foram expressos em porcentagens de adesão em relação ao ensaio controle, que corresponde à adesão espontânea das plaquetas. Os dados representam os valores médios de triplicatas e as barras de erros correspondem ao EPM.

A **Figura 21** mostra a comparação da inibição da adesão plaquetária em porcentagem do controle, induzida pela GSNO/PVA/PVP na presença ou ausência de plasma pobre em plaquetas. O controle foi obtido a partir da adesão espontânea das plaquetas ao revestimento de fibrinogênio.

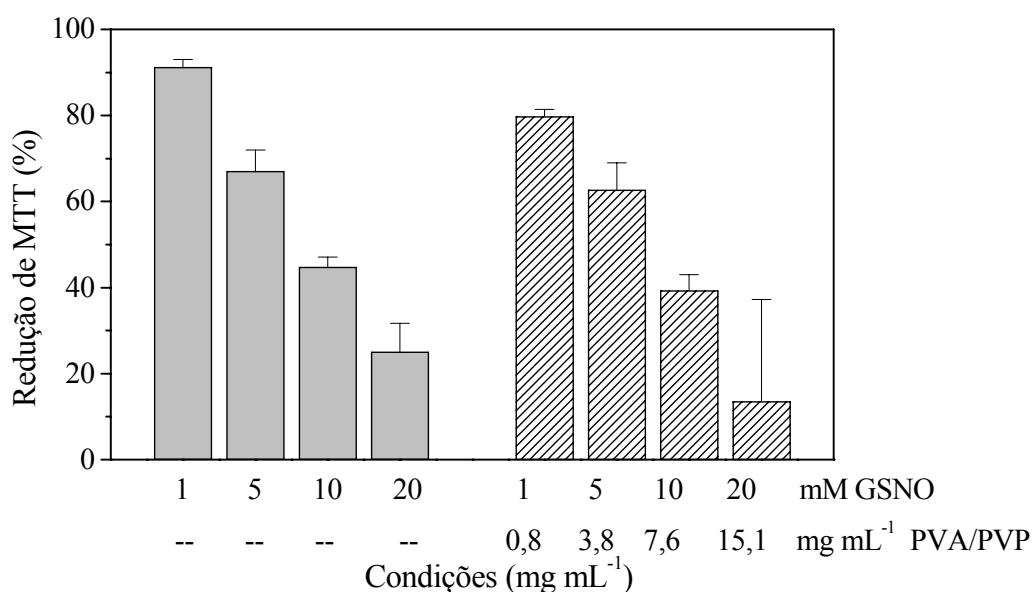


**Figura 21. Inibição da adesão plaquetária induzida por PVA/PVP + GSNO**

Inibição da adesão de plaquetas lavadas na presença e na ausência de plasma pobre em plaquetas (PPP). Os valores foram expressos em porcentagens de adesão em relação ao ensaio controle, que corresponde à adesão espontânea das plaquetas na cavidade revestida com fibrinogênio. Os dados representam os valores médios de triplicatas e as barras de erros correspondem ao EPM.

Nos ensaios realizados em presença ou ausência de PPP, verificou-se que tanto a GSNO como a sua associação com a blenda GSNO/PVA/PVP promovem inibição na adesão plaquetária nas duas maiores doses utilizadas. Sendo que a presença de PPP parece não interferir neste efeito.

Apesar da inibição da adesão verificada nas condições acima descritas, foi necessário verificar a viabilidade das plaquetas nas concentrações da GSNO utilizadas para obtenção de uma inibição da adesão plaquetária significativa. A avaliação da citotoxicidade foi realizada por meio do ensaio da redução do MTT (**Figura 22**).



**Figura 22. Avaliação da citotoxicidade GSNO/PVA/PVP por meio da redução do MTT em plaquetas**

Suspensão de plaquetas: foram expostas a GSNO/PVA/PVP durante 30 min, em tampão Krebs-Ringer e ao final, incubados com MTT (3 h). O corante foi extraído das plaquetas (SDS 10% em HCl 0,01M) e quantificado em  $\lambda=570$  nm. Os valores foram expressos em porcentagens de redução de MTT em relação ao ensaio controle (100%). Os dados representam os valores médios de 3 ensaios e as barras de erros correspondem ao EPM.

A **Figura 22** mostra a redução da viabilidade das plaquetas de maneira dependente da concentração, mostrando que a GSNO foi tóxica para as plaquetas nas concentrações

acima de 1 mM e, ainda, que a presença da blenda PVA/PVP não interferiu nesta resposta. Assim, nesta faixa de concentração, as substâncias apresentaram citotoxicidade máxima em torno de 90% nos ensaios de redução do MTT.

*Discussão*

## VI. DISCUSSÃO

Um número crescente de doadores de óxido nítrico (NO) incorporados ou não em matrizes poliméricas tem sido desenvolvido nos últimos anos (Gasco *et al*, 2005, Seabra *et al*, 2005), e isto demanda que protocolos para avaliação da margem de segurança sejam realizados antes das utilizações clínicas destes produtos. Há vários estudos enfocados na citotoxicidade dos doadores de NO e uma grande escala de valores de EC<sub>50</sub> pode ser encontrada na literatura (Babich e Zuckerbraun, 1998; Hou *et al*, 2001). Estes valores parecem ser dependentes do tipo de matriz, estrutura e reatividade dos doadores de NO, tipo celular e os métodos adotados para os testes de citotoxicidade.

Neste trabalho realizamos estudos de citotoxicidade e de avaliação dos potenciais reestenótico, hemolítico e trombogênico de matriz polimérica (PVA/PVP) com doador de óxido nítrico (GSNO), utilizando como ferramenta básica de trabalho, linhagens celulares estabelecidas, células vermelhas sangüíneas humanas e plaquetas humanas.

Foram adotados dois métodos para as avaliações de citotoxicidade na intenção de investigar possíveis efeitos tóxicos da matriz polimérica (PVA/PVP) com doador de óxido nítrico (GSNO).

### REDUÇÃO DO MTT

O primeiro ensaio utilizado para avaliação de citotoxicidade, foi o teste de redução do brometo de tetrazólio (MTT), onde a citotoxicidade apresentada pela GSNO pode ser

considerada moderada, uma vez que o valor médio da  $EC_{50}$  está situado na faixa de toxicidade moderada conforme a padronização feita no laboratório, sendo mais de 100 vezes maior que o da poli-L-lisina. Esse efeito deve estar relacionado à ação citotóxica do NO em altas concentrações (da ordem de mM) (Wink e Mitchel, 1998). Como a GSNO é uma molécula doadora de NO, em altas concentrações, ou seja, valores da ordem da  $EC_{50}$  estimado ( $2,75 \text{ mg mL}^{-1} \approx 8,17 \text{ mM}$  de GSNO), tal molécula pode também apresentar efeitos citotóxicos. Porém, essa citotoxicidade não foi observada na mistura GSNO/PVA/PVP em toda a faixa de concentração de 0,1 a  $30 \text{ mg mL}^{-1}$  que corresponde respectivamente a seguinte faixa de concentração de  $27,7 \text{ }\mu\text{M}$  a  $8,3 \text{ mM}$  de GSNO.

Alguns autores como Brüne *et al* (1995), Zamora *et al* (1997), Hou *et al* (2001), Babich e Zuckerbraun (2001) e Stewart (2003) estudaram a citotoxicidade de S-nitrosotiois e alguns adutos baseados nessas moléculas, em diferentes linhagens celulares e tempos de exposição. Todos esses autores atribuíram a citotoxicidade de tais compostos ao NO liberado no meio celular.

Considerando-se que a citotoxicidade da GSNO está relacionada à velocidade de liberação de NO, possivelmente no caso da GSNO/PVA/PVP, a toxicidade é reduzida devido ao aumento de estabilidade da GSNO (redução da velocidade de liberação de NO) em matrizes poliméricas, como já foi observado em trabalhos anteriores (Shishido e de Oliveira, 2000; Shishido *et al*, 2003).

Uma vez definida as concentrações dos padrões (PL e Dextrana), para todos os experimentos foram utilizados além dos respectivos controles, os padrões. Para efeito de comparação entre as células foi estipulada apenas a concentração de  $0,06 \text{ mg mL}^{-1}$  de PL e de  $30 \text{ mg mL}^{-1}$  para a Dextrana. O uso dos padrões permite o monitoramento do

comportamento das células em cada experimento, onde a PL deve reduzir aproximadamente em 50 % a viabilidade celular, enquanto a dextrana não deve apresentar citotoxicidade.

Comparando-se com os resultados obtidos pelas células 3T3, foi possível concluir que a poli-L-lisina apresentou citotoxicidade semelhante ao do surfactante SDS ( $EC_{50}=0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ ), considerado padrão de toxicidade severa (Harbel *et al*, 1997).

Ressalta-se aqui, que em dados da literatura, os valores de  $EC_{50}$  em relação à citotoxicidade de soluções contendo doadores de NO são bastante variáveis, mostrando-se dependente da matriz, do doador de NO e da linhagem celular (Brüne *et al*, 1995; Zamora *et al*, 1997; Babich e Zuckerbraun, 2001; Hou *et al*, 2001), sendo que foram observadas variações de até 10 vezes nos valores de  $EC_{50}$  dependendo das condições dos experimentos. Estas variações também foram observadas nesse estudo. As soluções contendo GSNO não causaram redução da viabilidade celular superior a 20% nas células RASM, enquanto para as células 3T3 foi calculado  $EC_{50}=2,6 \text{ mg mL}^{-1}$  de GSNO. Este resultado indica que as células 3T3 são mais sensíveis frente aos agentes tóxicos, fazendo com que essa linhagem celular seja a mais indicada para tais testes de viabilidade celular.

#### **CAPTAÇÃO DE VERMELHO NEUTRO**

Como segundo método de avaliação de citotoxicidade da matriz polimérica (PVA/PVP) com doador de óxido nítrico (GSNO), foi utilizado o ensaio da captação do corante vital vermelho neutro, um método muito empregado pela sua simplicidade,

sensibilidade, reprodutibilidade e baixo custo. Além disso, apresenta correlação positiva com alguns dados *in vivo* (Strickland *et al*, 2003) .

A captação relativa de vermelho neutro é um método conveniente para a detecção de alterações específicas dos lisossomos. Este corante é fracamente catiônico, difundindo-se rapidamente através da membrana plasmática e concentrando-se nos lisossomos das células viáveis, ligando-se com os sítios aniônicos da matriz lisossomal. Alterações da superfície celular ou da membrana lisossomal ocasionadas pela ação de xenobióticos resultam na diminuição da captação e ligação do corante, tornando possível distinguir células lesadas ou mortas (Borenfreund e Puerner, 1985).

Neste trabalho analisou-se a resposta das duas linhagens celulares: 3T3 e RASM, em relação à avaliação de citotoxicidade utilizando-se o ensaio da captação de vermelho neutro. Foi possível observar a nítida diferença entre as linhagens. A linhagem 3T3 apresentou citotoxicidade de maneira dependente da concentração em relação à GSNO, resultando na diminuição da captação do corante. De outra forma, as células RASM apresentaram um aumento significativo da captação do corante, indicando algumas alterações de permeabilidade de membrana desta linhagem. Nenhum dos dois tipos celulares estudados neste trabalho apresentou redução da viabilidade celular acima de 50%, assim como, não foi possível detectar os respectivos  $EC_{50}$ . Além disso, não foi observado efeito citotóxico da formulação GSNO/PVA/PVP, por meio da avaliação da citotoxicidade pelo método da captação do vermelho neutro na faixa de concentração de 0,1 a 30 mg/mL. Este é um importante resultado, pois significa que concentrações maiores da formulação aqui estudada (PVA/PVP/GSNO) poderia ser administradas em aplicações

cardiovasculares, como por exemplo, em ‘stents’ intracoronários, os quais estarão em contato com as células do vaso lesado.

Entretanto, o estímulo da captação de NR observado pelas células RASM, após exposição à matriz polimérica em presença do doador de NO, acima de 100% indica que a GSNO pode ter induzido este aumento da incorporação do corante, provavelmente relacionada à alteração na permeabilidade da membrana das células RASM, mostrando com isso que as células RASM são mais susceptíveis às alterações de membrana, quando comparadas às células 3T3, enquanto que esta linhagem apresentou-se mais adequada para se predizer a toxicidade de compostos pela maior sensibilidade verificada na avaliação da citotoxicidade através do ensaio da captação de NR. Os testes efetuados em células 3T3 e validados na literatura (Babich e Borenfreund, 1992; Clemedson *et al*, 2000) tem a finalidade de avaliar a toxicidade promovida por uma série de produtos, mediada pela integridade celular.

O aumento observado na taxa de incorporação do corante pelas células RASM pode ser atribuído à presença de NO na solução. O efeito do NO em membranas celulares foi descrito por Liang e Knox (1999) em células renais de gambá e em células Caco-2 (Jia *et al*, 2003), embora seu mecanismo de ação ainda não esteja esclarecido.

A comparação entre os dois métodos para avaliações de citotoxicidade usados neste trabalho, mostra-nos que o ensaio da redução de MTT pode ser o mais indicado para a avaliação de citotoxicidade envolvendo os doadores de NO, do que o ensaio da captação de vermelho neutro. Ambos os métodos permitem investigar se a interferência detectada é com a função lisosomal ou mitocondrial, a qual se constitui do primeiro ataque nas células (Dierickx, 2000). Isto pode ser atribuído ao fato de que o metabolismo das mitocôndrias foi

afetado, o que não aconteceu ao dos lisossomos, o que pode ser atribuído ao fato da mitocôndria se apresentar como o primeiro alvo da lesão mediada pelo NO (Bell *et al*, 2003).

### **PROLIFERAÇÃO CELULAR**

Um dos objetivos do presente estudo foi o de avaliar a resposta da linhagem celular RASM, específica para estudos de biologia vascular, devido principalmente a inexistência de tais testes cardiovasculares *in vitro*, uma vez que, os poucos trabalhos na literatura relacionam-se às vias intracelulares mediadas por um receptor específico, como por exemplo, AT para angiotensinas ou ET (endotelinas) na resposta proliferativa (Chen e Gardner, 2004; Mukhin *et al*, 2004).

O efeito observado no ensaio da proliferação celular indica que a GSNO foi capaz de inibir a proliferação celular, contudo, tal inibição foi potencializada pela presença dos polímeros. O uso de polímeros para aumento de permeabilidade de vários tipos de drogas já vem sendo estudada por vários pesquisadores (Thanou *et al*, 2001; Yaraslov *et al*, 2003). Rapoport *et al* (1999) observaram um aumento na captação de doxorubicina (um agente quimioterapêutico) com a presença de um copolímero (Pluronic P105) em concentrações relativamente baixas (<0,1% m/m). Além disso, Jagannath *et al* (2000) verificaram que o copolímero em bloco CRL-1072 aumenta a quantidade de droga enviada para dentro das células causando assim, um maior efeito do antibiótico contra o complexo *Mycobacterium avium-intracellulare*, comuns em infecções e que são naturalmente resistentes à maior parte dos antibióticos.

De forma análoga, nossos resultados indicam que a presença dos polímeros na solução aumenta a permeabilidade da GSNO para o meio intracelular, potencializando seu efeito de inibição da proliferação celular. Estes resultados corroboram com os dados de captação de vermelho neutro, onde foi observado que as células RASM são de fato mais sensíveis às alterações de permeabilidade de membrana induzida pela presença dos polímeros.

O efeito de inibição da proliferação celular causado pela GSNO pode ser atribuído à liberação do NO. Entretanto, o mecanismo de ação do NO para este efeito ainda não foi totalmente esclarecido. Tal efeito tem sido atribuído ao aumento da guanosina-3'-5'-monofosfato cíclica (GMPc) causada pela ativação da guanilato ciclase (Sudano *et al*, 2006). A GMPc ativa a proteína quinase dependente de GMPc que leva então, à inibição da proliferação celular (Garg e Hassid, 1993). Recentemente, Costa e Assreuy (2005) mostraram que o mecanismo pelo qual o NO atua na inibição da proliferação celular de células de musculatura lisa vascular, envolve a GMPc e alguns sub-tipos de canais de potássio. O NO pode também, inibir o crescimento de células de musculatura lisa, através da alteração na expressão e atividade de proteínas regulatórias do ciclo celular, ou via inibição da ornitina descarboxilase, que é uma enzima envolvida na síntese de poliaminas, moléculas que são necessárias no crescimento de células de mamíferos (Wedgwood e Black, 2003).

Sabe-se que o NO pode induzir apoptose, que poderia resultar na redução da proliferação celular, porém no presente estudo foi observado que tanto a avaliação da função mitocondrial (através da redução do MTT), como da função do lisossomo (através da captação de NR), não foram alteradas de forma significativa (redução da viabilidade

superior a 50%) nas amostras de solução contendo GSNO/PVA/PVP. Assim, podemos descartar a hipótese de indução de apoptose, confirmando que de fato esse doador de NO, atua através de inibição da proliferação e não da morte celular.

## HEMÓLISE

A determinação da atividade hemolítica de um agente pela medida de liberação da hemoglobina das células vermelhas sanguíneas é um método prático e sensível para a avaliação do potencial hemolítico de uma substância. O método previamente padronizado no laboratório de Bioensaios *in vitro* apresentou boa reprodutibilidade experimental.

O ensaio de RBC '*red blood cells*' foi utilizado neste estudo por ser considerado um ensaio que apresenta correlação positiva entre a escala de toxicidade *in vitro* e a escala do teste de irritação ocular (*in vivo*), segundo Draize *et al* (1944) e Pape *et al* (1999). O mecanismo pelos quais os agentes hemolíticos danificam as células (eritrócitos) *in vitro* envolve a ruptura da membrana, resultando no influxo de íons e água. As células reagem a esse desequilíbrio por meio do incremento no transporte ativo de íons. Porém, com o aumento da concentração do agente hemolítico, a capacidade da célula de manter o balanço iônico e a integridade da membrana é superada, resultando na ruptura da membrana. Assim, a lise de membrana é dependente da concentração do agente hemolítico. O mecanismo da irritação ocular também está baseado na perturbação da membrana, assim, o ensaio de hemólise (*in vitro*) pode ser correlacionado com o teste de irritação ocular (*in vivo*) (Harbell *et al*, 1997).

Fischer *et al* (2003) mostraram o potencial hemolítico de polications solúveis em água, incluindo a poli(etileno imina) (PEI). Tais autores obtiveram 100% de lise em concentração de PEI  $\geq 1 \text{ mg mL}^{-1}$ , após 60 min de incubação dos eritrócitos com PEI. Tem sido demonstrado que o potencial hemolítico se relaciona com o grau de interação entre o agente hemolítico e a membrana celular, sendo que a interação inicial entre a macromolécula catiônica e a membrana celular que é carregada negativamente, é mediada por interações eletrostáticas. Tais interações parecem perturbar a estrutura e as funções da membrana.

O PEI é um polímero catiônico que possui um grande número de cargas e apresenta um grande volume molecular devido ao seu alto grau de ramificação. Portanto o seu elevado potencial hemolítico se deve a sua grande interação com a membrana celular.

A biocompatibilidade de polímeros é influenciada pela:

- (i) Densidade de carga,
- (ii) Massa molar,
- (iii) Estrutura e ramificação da cadeia polimérica e
- (iv) Da flexibilidade conformacional (Fischer *et al*, 2003).

Características como densidade de carga positiva, massa molar grande, estrutura ramificada e alta flexibilidade conformacional favorecem a interação polímero-membrana celular. Tais características promovem a hemólise, uma vez que há uma correlação positiva entre o grau de interação entre o agente hemolítico e a membrana celular.

Em nosso trabalho, os polímeros presentes na solução GSNO/PVA/PVP não apresentam densidade de carga positiva e conseqüentemente reduzem a possibilidade de

interação entre os polímeros e a membrana celular e isto pode ter sido o responsável pelo seu reduzido potencial hemolítico.

### **AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA**

A inibição da agregação plaquetária tem tornado um passo crítico na prevenção de eventos trombóticos associados à insuficiência cardíaca, trombose cerebral e trombose arterial periférica (Kalinowski *et al*, 2002). Assim, o controle dessa complicação e a verificação do potencial anti-trombogênico de doadores de NO tem sido estudado por vários pesquisadores por meio de ensaios de inibição da agregação (Gordge et al, 1998; Vilahur, 2004).

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 da plaqueta é por meio da ativação da guanilato ciclase plaquetária, a qual resulta no aumento intracelular nos níveis de guanosina mono fosfato cíclica (GMPc) e redução do fluxo de cálcio intracelular o que resultará na inibição da expressão de P-selectina e da conformação ativa de GP IIb/IIIa. Entretanto, outros mecanismos de ação do NO tem sido descritos, os quais podem ser independentes da produção de GMPc. Tais mecanismos mediados pelo NO, que ainda se encontram em estudo, incluem a ribosilação do ADP (adenosina difostato) e a inibição da desidrogenase gliceraldeído-3-fosfato (Ridden e Owen, 1999).

Segundo Vilahur *et al* (2004) a GSNO parece induzir um efeito maior na agregação e adesão plaquetária do que no tônus muscular.

Os resultados obtidos nesses ensaios se mostraram coerentes aos dados da literatura (vide valores da **tabela 4**). E, ainda, foi observado que a inibição da agregação induzida pela GSNO não é alterada pela presença dos polímeros PVA/PVP. Sobretudo, foi observado que a redução na porcentagem de agregação foi devida exclusivamente ao seu efeito inibitório, uma vez que a viabilidade das plaquetas não se mostrou alterada.

Os ensaios padronizados e os índices de inibição demonstrados neste trabalho se mostraram reprodutíveis e eficientes para a avaliação do efeito trombogênico promovido pela formulação estudada.

#### **ADESÃO PLAQUETÁRIA**

Apesar da inibição da agregação plaquetária promovida por doadores de NO ter sido estudada por vários grupos de pesquisa, o mesmo não tem sido verificado em relação a inibição da adesão plaquetária.

Nesse estudo, foi efetuada uma série de testes, tanto no tempo como na faixa de concentração da GSNO nos ensaios de inibição da adesão plaquetária. Contudo, não foi possível verificar um efeito na inibição da adesão plaquetária, pois a redução na porcentagem de adesão ocorreu somente em condições associadas à toxicidade promovida por altas concentrações da GSNO, a qual foi comprovada pela redução da viabilidade das plaquetas (**Figura 22**). Dentre as hipóteses levantadas para a perda de tal efeito, pode se

destacar o possível efeito potencializador dos componentes plasmáticos tanto na produção de efeito como na redução da viabilidade das plaquetas. Entretanto, estudos adicionais necessitam ser realizados para que esta participação possa ser considerada.

Embora Radomski *et al* (1992) e Kalinowski *et al* (2002) tenham observado redução na adesão plaquetária induzida pela GSNO, este efeito não foi observado neste modelo de ensaio. Essa discrepância nos resultados pode ser devido à diferença metodológica em relação ao recobrimento das placas utilizadas de substrato, uma vez que neste estudo recobrimos as mesmas com fibrinogênio, com objetivo de mimetizar uma situação de lesão vascular, enquanto que os demais estudos utilizaram colágeno.

Nas plaquetas em repouso, a GP IIb/IIIa encontra-se em estado de baixa ativação e não se liga ao fibrinogênio solúvel. Entretanto, na vigência da lesão vascular, o fibrinogênio intacto é encontrado no local danificado. Este fibrinogênio insolúvel interage com a glicoproteína GP IIb/IIIa expressa nas plaquetas não ativadas, promovendo a adesão das mesmas ao local danificado (Shattil, 1999).

Assim, a adesão observada em plaquetas não ativadas é menor do que aquela vista em plaquetas ativadas. A ativação plaquetária produz o aumento do número ou da afinidade do ligante aos receptores específicos da adesão, uma vez que plaquetas expostas aos seus agonistas (ADP, colágeno, trombina) apresentam rapidamente o aumento da afinidade/atividade do  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Mediante tais considerações, o mecanismo de ativação reveste-se de grande relevância, tanto na hemostasia fisiológica, quanto em oclusões vasculares patogênicas, uma vez que o fibrinogênio encontra-se imobilizado no local do dano vascular, sendo este o primeiro evento para cessar o sangramento (Savage *et al*, 1992; Belisario *et al*, 1997).

Estes estudos mostraram que a GSNO não promoveu inibição na adesão ao fibrinogênio. Porém, esse resultado ainda poderia ser verificado em função do recobrimento de colágeno, conforme Radomski *et al* (1992). Assim, protocolos alternativos na avaliação da inibição da adesão deverão ser conduzidos para que tenhamos uma melhor adequação aos doadores de NO, como no caso da GSNO.

*Conclusão*

## VII. CONCLUSÃO

O presente estudo determinou a padronização de bioensaios para avaliação de biocompatibilidade de formulação com matrizes poliméricas e doador de óxido nítrico, por meio de ensaios de MTT, NR, proliferação celular, hemólise, adesão e agregação plaquetária. As conclusões obtidas foram as seguintes:

- Os padrões selecionados, Poli-L-lisina e Dextrana, demonstraram que foram adequados para os ensaios de citotoxicidade.
- A linhagem celular **3T3** apresentou maior sensibilidade em relação à citotoxicidade.
- GSNO/PVP/PVP não apresentou citotoxicidade em nenhuma das linhagens utilizadas e nem atividade hemolítica em eritrócitos humanos: comprovando a biocompatibilidade da formulação.
- GSNO e PVA/PVP *per se* apresentaram inibição da proliferação das células musculares lisas. A formulação potencializou este efeito ( $> EC_{50}$ ): comprovando o seu potencial anti-reestenótico.
- GSNO/PVA/PVP não mostrou efeito inibitório da adesão plaquetária em concentrações não tóxicas.

- GSNO/PVP/PVA promoveu inibição da agregação plaquetária: comprovando o potencial anti-trombogênico

Os ensaios desenvolvidos e padronizados permitirão a análise rotineira da eficácia e da citotoxicidade de formulações contendo matrizes poliméricas e doadores de NO para utilizações intravasculares, com objetivo de se obter efeitos anti-reestenóticos e anti-trombogênicos.

## *Referências Bibliográficas*

## VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves CMR, Souza JAM. Procedimentos percutâneos atuais na insuficiência coronária e suas indicações. **Rev Soc Cardiol Est São Paulo** 12: 137-148, 2002.
- Arévalo AM, Souza-Pinto NC, Costa ADT, Hoffmann ME. Mechanism of tetrahydroxy-1,4-benzoquinone toxicity to V79 cells: Involvement of free radicals produced by its autoxidation. **Cien Cult** 48: 103-108, 1996.
- Arevalo I, Ward B, Matlashewski G. Detection of iNOS gene expression in cutaneous leishmaniasis biopsy tissue. **Mol Biochem Parasitol** 121: 145-147, 2002.
- Babich H, Borenfreund E. Neutral red assay toxicology in vitro. In: **In vitro methods of toxicology**, Watson, R.R. (Ed.), Boca Raton, Fla, CRC Press, p.237-251, 1992.
- Babich H, Zuckerbraun HL, Ricklis AS, Blau L. In vitro toxicity of sodium nitroprusside to human endothelial ECV304 cells. **Environ Toxicol Pharmacol** 5: 135-144, 1998.
- Babich H, Zuckerbraun HL. In vitro cytotoxicity of glyco-S-nitrosothiols: A novel class of nitric oxide donors. **Toxicol in vitro** 15:181-190, 2001.
- Balls M, Blaauboer BJ, Fetem JH, Bruner L, Combes RD, Ekwall B, Fielder RJ, Guillouzo A, Lewis RW, Lovell DP, Reinhardt DA, Repetto G, Sladowski D,

- Spielmann H, Zucco F. Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. **ATLA** 23: 129-147, 1995.
- Belisario MA, Di Domenico C, Pelagalli A , Della Morte R, Staiano N. Metal-ion catalysed oxidation affects fibrinogen activity on platelet aggregation and adhesion. **Biochimie** 79: 449-455, 1997.
- Belisario MA, Tafuri S, Di Domenico C, Squillacioti C, Morte R, Lucisano A, Staiano NH. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> activity on platelet adhesion to fibrinogen and protein tyrosine phosphorylation. **Biochem Biophys Acta** 1495: 183-194, 2000.
- Bell RM, Maddock HL, Yellon DM. The cardioprotective and mitochondrial depolarising properties of exogenous nitric oxide in mouse heart. **Cardiovasc Res** 57: 405-415, 2003.
- Bellavite P, Andriolo G, Guzzo P, Arigliano, P Chirumbolo S, Manzato F, Santonastaso CA. A colorimetric method for the measurement of platelet adhesion in microtiter plates. **Anal Biochem** 216: 444-450, 1994.
- Benavides T, Martínez V, Mitjans M, Infante MR, Moran C, Clapés P, Clothier R, Vinardell MP. Assessment of the potencial irritation and photoirritation of novelamino acid-based surfactants by in vitro methods as alternative to the animal tests. **Toxicology** 201: 87-93, 2004.
- Bentfeld ME, Bainton DF. Cytochemical localization of lysosomal enzymes in rat megakaryocytes and platelets. **J Clin Invest** 56: 1635-1649, 1975.

- Boo J de, Hendriksen C. Reduction strategies in animal research: A review of scientific approaches at the intra-experimental, supra-experimental and extra-experimental levels. **ATLA** 33: 369-377, 2005
- Borenfreund E, Puerner JA. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. **Toxicol Lett** 24: 119-124, 1985.
- Brüne B, Messmer UK, Sandau K. The role of nitric oxide in cell injury. **Toxicol Lett** 82/83: 233-237, 1995.
- Brunet LR. Nitric oxide in parasitic infections. **Int Immunopharmacol** 1: 1457-1467, 2001.
- Bult H. Restenosis: A challenge for pharmacology. **TIPS** 102: 993-1017, 2002.
- Buonassisi V, Venter JC. Hormone and neurotransmitter receptors in a established vascular endothelial cell line. **Proc Natl Acad Sci USA** 73: 1612-1616, 1976.
- Burt HM, Hunter WL. Drug-eluting stents: A multidisciplinary success story. **Adv Drug Deliver Ver** 58: 350-357, 2006.
- Butler AR, Rhodes P. Review – Chemistry, analysis, and biological roles for S-nitrosothiols. **Anal Biochem** 249: 1-9, 1997.
- Calvete JJ. Platelet integrin GPIIb/IIIa: structure-function correlations. An update and lessons from other integrins. **Proc Soc Exp Biol Med** 222: 29-38, 1999.
- Campbell GR, Campbell JH, Manderson JA, Horrigan S, Rennick RE. Arterial smooth muscle: a multifunctional mesenchymal cell. **Arch Pathol Lab Med** 112: 977-986, 1988.

- Caramori PRA, Yamamoto GI, Zago AJ. Reestenose Pós-Angioplastia. Fisiopatogenia. **Arq Bras Cardiol** 69(2): 141-150, 1997.
- Cardoso, MHM. “Efeito inibitório do óxido nítrico na adesão plaquetária: mecanismos dependentes e independentes de GMP cíclico”. Tese de Doutorado-Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP, 98 p., 2006.
- Carere A, Stammati A, Zucco F. In vitro toxicology methods: impact on regulation from technical and scientific advancements. **Toxicol Lett** 127: 153-160, 2002.
- Carvalho MHC, Fortes ZB, Passaglia RCAT, Nigro D. Funções Normais do Endotélio – Uma visão geral. In: **Endotélio & Doenças Cardiovasculares**, Cap. 2, 17-32, 2003.
- Channon KM, Qian HS, George SE. Nitric oxide synthase in atherosclerosis and vascular injury. Insights from experimental gene therapy. **Arteriocler Thromb Vas Biol** 20: 1873-1881, 2000.
- Chen S, Gardner G. Suppression of WEE1 and stimulation of CDC25A correlates with Endothelin-dependent proliferation of rat aortic smooth muscle cells. **J Biol Chem** 279: 13755-13763, 2004.
- Chen Z, Zhang J, Stamler JS. Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. **Proc Natl Acad Sci USA** 99: 8306-8311, 2002.
- Chu I. Alternative methods to animal testing: A canadian health protection branch perspective. **ATLA** 23: 257-261, 1995.

- Clark EA, Brugge JS. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. **Science** 268: 233-239, 1995.
- Clemmedson C, Barile FA, McFarlane-Abdulla E, Ekwall B. Meic of acute systemic toxicity. Part III. Prediction of human toxicity by results from testing of the first 30 reference chemiclas with 27 further in vitro assays. **ATLA** 28: 161-200, 2000.
- Colombo A, Srzewiecki J, Banning A, Grube E, Hauptmann K, Silber S, Dudek D, Fort S, Russel M. Randomizes study to acess the effectiveness of slow-and moderate-release polymer-based practlitoxil-eluting stents for coronary artery lesions. **Circulation** 108: 788-794, 2003.
- Convênio Funcamp/Unicamp/ Natura S.A. “ Natura/IB/Padronização de Ensaiois” n° 2147, 2000.
- Costa RSA, Assreuy J. Multiple potassium channels mediate nitric oxide-induced inhibition of rat vascular smooth muscle cell proliferation. **Nitric Oxide** 13: 145-151, 2005.
- Davis K, Martin E, Turko IV, Murad F. Novel effects of nitric oxide. **Annu Rev Pharmacol Toxicol** 41: 203-236, 2001.
- de Souza GF, Yokoyama-Yasunaka JK, Seabra AB, Miguel DC, de Oliveira MG, Uliana SR. Leishmanicidal activity of primary S-nitrosothiols against *Leishmania major* and *Leishmania amazonensis*: Implications for the treatment of cutaneous leishmaniasis. **Nitric Oxide** 15: 209-216, 2006.
- DeMerlis CC, Schoneker DR. Review of the oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA). **Food Chem Toxicol** 41: 319-326, 2003.

- Dierickx PJ. Cytotoxicity of the MEIC reference chemical in rat hepatoma-derived Fa32 cells. **Toxicology** 150: 159-169, 2000.
- Draize JH, Woodard G, Calvery HO. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *J Pharmacol Exp Ther* 39: 377-390, 1944.
- Eisenbrand G, Pool-Zobel B, Baker V, Balls M, Blaauboer BJ, Boobis A, Carere A, Kevekordes, Lhungenot JC, Pieters R, Kleiner J. Methods of in vitro toxicology. **Food Cheml Toxicol** 40: 193-236, 2002.
- Eiserich JP, Patel RP, O'Donnell VB. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. **Mol Aspects Med** 19: 221-357, 1998.
- Fachini FS, Humphreys MH, Do Nascimento CA. Relation between insulin resistance and plasma concentrations of lipid hydroperoxides, carotenoids and tocopherols. *Am J Clin Nutr* 72: 776-779, 2000.
- Fattori R, Piva T. Drug eluting stents in vascular intervention. **Lancet** 361: 247-249, 2003.
- Fentem JH, Botham PA. ECVAM's activities in validating alternative tests for skin corrosion and irritation. **ATLA Altern Lab Anim** 30: 61-67, 2002.
- Fentem JH, Briggs D, Chesné C, Elliot GR, Harbell JW, Heylings JR, Portes P, Roguet R, van de Sandt JJM, Botham PA. A prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: results and evaluation by the management team. **Toxicol in vitro** 13: 665-673, 2001.

- Fisher D, Li Y, Ahlemeyer B, Krieglstein J, Kissel T. In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. **Biomaterials** 24: 1121-1131, 2003.
- Fitzgerald DJ. Vascular biology of thrombosis: the role of platelet-vessel wall adhesion. **Neurology** 57: 1-4, 2001.
- Fleser PS, Nuthakki VK, Malinzak LE, Callahan RE, Seymour ML, Reynolds MM, Merz SI, Meyerhoff ME, Bendick PJ, Zelenock GB, Shanley CJ. Nitric oxide-releasing biopolymers inhibit thrombus formation in a sheep model of arteriovenous bridge grafts. **J Vasc Surgery** 40: 803-811, 2005.
- Ford PC, Lorkovic IM. Mechanistic aspects of the reactions of nitric oxide with transition-metal complexes. **Chem Rev** 102: 993-1017, 2002.
- Fotakis G, Timbrell JA. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicol Lett** 160: 171-177, 2006.
- Fricker SP. Ruthenium, nitric oxide and disease – A novel inorganic chemistry approach to drug desing. **Platinum Metals Rev** 39: 150-159, 1995.
- Furchgott R, Zawadzki JVB. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature** 288: 373-376, 1980.
- Gappa-Fahlenkamp H, Lewis RS. Improved hemocompatibility of poly(ethylene terephthalate) modified with various thiol-conatining groups. **Biomaterials** 26: 3479-3485, 2005.

- Garas SM, Huber P, Scott NA. Overview of therapies for prevention of restenosis after coronary interventions. **Pharmacol Ther** 92: 165-178, 2001.
- Garg UC, Hassid A. Mechanisms of nitrothiol-induced anti-mitogenesis in aortic smooth muscle cells. **Eur. J. Pharmacol** 237: 243-249, 1993.
- Gaston B. Nitric oxide and thiol groups. **Biochem Biophys Acta** 141: 323-333, 1999.
- Gesztesi, JL . “Ação de ésteres de sacarose em cultura de tecido”. Dissertação de Mestrado - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, 139 p., 1990.
- Gettings SD, Lordo RA, Hintze KL, Bagley DM, Casterton PL, Chudkowsky M, Curren RD, Demetrulias JL, Dipasquales LC, Earl LK, Feder PI, Galli CL, Glaza SM, Gordon VC, Janus J, Kurtz PJ, Marenus KD, Moral J, Pape WJW, Renskers HJ, Rheins LA, Roddy MT, Rozen MG, Tedeschi JP, Zyrachi J. The CTFA evaluation of alternatives program: an evaluation of *in vitro* alternatives to the Draize primary eye irritation test. (phase III) surfactant-based formulations. **Food Chem Toxicol** 34: 79-117, 1996.
- Gordge MP, Hothersall JS, Noronha-Dutra AA. Evidence for a cyclic GMP-independent mechanism in the anti-platelet action of S-nitrosoglutathione. **Br J Pharmacol** 124: 141-148, 1998.
- Greenberg D, Bakhai A, Cohen DJ. Can we afford to eliminate restenosis? Can we afford not to? **J Col Cadiol** 43: 513-518, 2004.
- Groth T, Falck P, Miethke R-R. Cytotoxicity of biomaterials - Basic mechanisms and *in vitro* test methods. **ATLA** 23: 790-799, 1995.

- Groves PH, Banning AP, Penny WJ, Newby AC, Cheadle HÁ, Lewis MJ. The effects of exogenous nitric oxide on smooth muscle cell proliferation following porcine carotid angioplasty. **Cardiol Res** 30: 87-96, 1995.
- Gruntzig AR. Nonoperative dilatation of coronary stenosis: PTCA. **N Engl J Med** 301: 61-68, 1979.
- Harbell JW, Koontz SW, Lewis RW, Lovell D, Acosta D. IRAG working group 4 - Cell cytotoxicity assays. **Food Chem Toxicol** 35: 79-126, 1997.
- Harbell JW, Koontz SW, Lewis RW, Lovell D, Acosta D. IRAG working group 4 - Cell cytotoxicity assays. **Food Chem Toxicol** 35: 79-126, 1997.
- Harker LA. Platelet survival time: its measurement and use. **Prog Hemost Thromb** 4: 321-347, 1978.
- Hart TW. Some observations concerning the S-nitroso and S-phenylsulphonyl derivatives of L- cysteine and glutathione. **Tetrahedron Lett** (26): 2013-2016, 1985.
- Hensley K, Tabatabaie T, Stewart CA, Pye Q, Floyd RA. Nitric oxide and derived species as toxic agents in chronic neurodegenerative disorders. **Chem Res Toxicol** 10: 527-532, 1997.
- Holmsen H, Weiss HJ. Secretable storage pools in platelets. **Annu Rev Med** 30: 119-134, 1979.
- Hou Y, Wu X, Xie W, Braunschweiger PG, Wang PG. The synthesis and cytotoxicity of fructose-1-SNAP, a novel fructose conjugated S-nitroso nitric oxide donor. **Tetrahedron Let** 42: 825-829, 2001.

- Huang X, Brazel CS. On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. **J Controlled Release** 73: 121-136, 2001.
- Ignarro LJ, Napoli C, Loscalzo J. Nitric Oxide donors and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide – An overview. **Cir Res** 90: 21-28, 2002.
- ISO-10993-1. Biological evolution of medical devices. Part 5. Test for cytotoxicity in vitro methods. **Intern Organ Standart** Geneva, 1993.
- Jagannath C, Sepulveda E, Actor JK, Luxem F, Emanuele MR, Hunter RL. Effect of poloxamer CRL-1072 on drug uptake and nitric-oxide-mediated killing of *Mycobacterium avium* by macrophages. **Immunopharmacology** 48: 185-197, 2000.
- Janero DR. Nitric oxide (NO)-related pharmaceuticals: Contemporary approaches to therapeutic NO modulation. **Free Rad Biol Chem** 28: 1495-1506, 2000.
- Janiszewski M, Lopes LR, Carmo AO, Pedro MA, Brandes, RP, Santos CXC, Laurindo FRM. Regulation of NAD(P)H oxidase by associated protein disulfide isomerase in vascular smooth muscle cells. **J Biol Chem** 280: 40808-40813, 2005.
- Jia L, Schweizer J, Wang Y, Cerna C, Wong H, Revilla M. Effect of nitric oxide on cytotoxicity of Taxol: enhanced Taxol transcellular permeability. **Biochem Pharmacol** 66: 2193-2199, 2003.
- Katayama Y. Nitric Oxide: Misterious Messenger. Dojindo Newsletter, n°1, <http://www.dojindo.co.jp/letter/199501/review.htm>, 1-24, 1995.

- Kalinowski L, Matys T, Chabielska E, Buczek W, Malinski T. Angiotensin II AT<sub>1</sub> receptor antagonists inhibit platelet adhesion and aggregation by nitric oxide release. **Hypertension** 40: 521-527, 2002.
- Keffer LK. Progress toward clinical application of the nitric oxide- releasing drazenuimdiolates. **Ann Ver Pharmacol** 43: 585-607, 2003.
- Kiemeneij F, Serruys PW, Macaya C, Rutsch W, Heindrickx G, Albertsoon P. Continued benefit of coronary stenting versus balloon angioplasty: five year clinical follow-up of Bene stent trial. **J Am Coll Cardiol** 37(6): 1598-1603, 2001.
- Kim H, Fassihi R. Application of a binary polymer system in drug release rate modulation. Characterization of release mechanism. **J Pharm Sci** 86: 316-328, 1997.
- Koppenol WH. The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxynitrite. **Free Rad Biol Chem** 25: 385-391, 1998.
- Krieger MH, Shishido SM, Laurindo FRM, Wanschel ABCA, Estrela HF, Dos Santos L, De Oliveira MG, Franchini KG, Spadari-Bratfisch RC, Santos KFR. Antiatherogenic effects of S-nitroso-N-acetylcysteine in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice. **Nitric Oxide** 14: 12-20, 2006.
- Kuchulakanti PK, Chu WW, Torguson R, Ohlmann P, Rha SW, Clavijo LC, Kim SW, Bui A, Gevorkian N, Xue Z, Smith K, Fournadjieva J, Suddath WO, Satler LF, Pichard AD, Kent KM, Waksman R. Correlates and long-term outcomes of

- angiographically proven stent thrombosis with sirolimus- and paclitaxel- eluting stents. **Circulation** 113: 1108-1113, 2006.
- Liang M, Knox FG. Nitric Oxide enhances paracellular permeability of opossum kidney cells. **Kidney Int** 55, 2215-2223, 1999.
- Low SY, Sabetkar M, Bruckdorfer R, Naseen KM. The role of protein nitration in the inhibition of platelet activation by peroxynitrite. **FEBS Letters** 511: 59-64, 2002.
- Marcondes S, Cardoso MHM, Morganti, RP, Thomazzi SM, Lilla S, Murad F, De Nucci G, Antunes E. Cyclic GMP-independent mechanisms contribute to the inhibition of platelet adhesion by nitric oxide donor: A role for  $\alpha$ -actinin nitration. **Proc Nat Acad Sci** 103(9): 3434-3439, 2006.
- Marín J, Martinez RA. Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions. **Pharmacol Ther** 25: 111-134, 1997.
- Mateo AO, Artiñano AA. Nitric oxide reactivity and mechanism involved in its biological effects. **Pharmacol Res** 42: 421-427, 2000.
- Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A discussion of the chemistry of oxidative and nitrosative stress in cytotoxicity. **J Inorg Biochem** 79: 237-240, 2000.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immun Meth** 65: 55-63, 1983.
- Mukhin YV, Garnovskaya MN, Ullian ME, Raymond JR. ERK is regulated by sodium-proton exchanger in rat aortic vascular smooth muscle cells. **J Biol Chem** 279: 1845-1852, 2004.

- Nakashima M, Mombouli JV, Taylor AA, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization caused by bradykinin in human coronary arteries. **J Clin Invest** 92: 2867-2871, 1993.
- Napoli C, Ignarro LJ. Nitric Oxide-releasing drugs. **Annu Rev Pharmacol Toxicol** 43: 97-123, 2003.
- Nisoli E, Clementi E, Paolucci C, Cozzi V, Tonello C, Sciorati R, Bracale R, Valerio A, Francolini M, Moncada M, Carruba MO. Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. **Science** 299: 869-899, 2003.
- Nolte C, Eigentaler M, Horstrup K, Honig-Liedl P, Walter U. Synergistic phosphorylation of the local adhesion associated vasodilator-stimulated phosphoprotein in intact human platelet in response to cGMP and cAMP elevating platelet inhibitors. **Biochem Pharmacol** 48: 1569-1575, 1994.
- Ofori FA. The blood platelet as a model for regulating blood coagulation on cell surfaces and its consequences. **Biochemistry** 67: 47-55, 2002.
- Ohara T, Nanto S, Hirayama A, Asada S, Mishima M, Kodama K. Ultrastructural study of proliferating and migrating smooth muscle cells at the site of PTCA as an explanation for restenosis. **J Am Coll Cardiol** 17: 8198-8198, 1991.
- Pape WJW, Pfannenbecker U, Argenbeaux H, Bracher M, Esdaile DJ, Kasai Y, Lewis RW. Colipa validation project on *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients and finished products (Phase I): the red blood cell test for the estimation of acute eye irritation potentials. Present status. **Toxicol in vitro** 13: 343-354, 1999.

- Pape WJW, Pfannenbecker U, Hoppe U. Validation of the red blood cell test system as in vitro for the rapid screening of irritation potential of surfactants. **Molecular Toxicology** 1: 525-536, 1987.
- Radomski MW, Rees DD, Dutra A, Moncada S. S-nitroso-glutathione inhibits platelet activation *in vitro* and *in vivo*. **Br J Pharmacol** 107: 745-749, 1992.
- Rapoport NY, Herron JN, Pitt WG, Pitina L. Micellar delivery of doxorubicin and its paramagnetic analog, ruboxyl, to HL-60 cells: effect of micelle structure and ultrasound on the intracellular drug uptake. **J Control Release** 58: 153-162, 1999.
- Reynolds MM, Frost MC, Meyerhoff ME. Nitric oxide releasing hydrophobic polymers: preparation, characterization, and potential biomedical applications. **Free Rad Biol Med** 37: 926-936, 2004.
- Ricardo KFS, Shishido SM, de Oliveira MG, Krieger MH. Characterization of the hypotensive effect of S-Nitroso-N-Acetyl-L-Cysteine (SNAC) in normotensive and hypertensive conscious rats. **Nitric Oxide** 7: 57-66, 2002.
- Riden DR, Owen JS. Nitric oxide and platelet aggregation. **Vitamins Hormones** 57: 25-48, 1999.
- Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. **N Engl J Med** 340: 115-126, 1999.
- Santos LC. em “Caracterização das reações do nitroprussiato de sódio com tióis e oxihemoglobina”. Dissertação de Mestrado - Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, 2003.

- Seabra AB, da Silva R, de Oliveira MG. Polynitrosated polyesters: Preparation, characterization, and potential use for topical nitric oxide release. **Biomacromolecules** 6: 2512-2520, 2005.
- Seabra AB, de Oliveira MG. Poly(vinyl alcohol) and poly(vinyl pyrrolidone) blended films for local nitric oxide release. **Biomaterials** 25: 3773-3782, 2004.
- Seabra AB, Souza GFP, Rocha LL, Eberlin MN, de Oliveira MG. S-Nitrosoglutathione incorporated in poly(ethylene glycol) matrix: potential use for topical nitric oxide delivery. **Nitric Oxide** 11: 263-267, 2004.
- Serrano Junior CV, Fernandes JL, Luz PL. Moléculas de adesão, inflamação e endotélio. In: **Endotélio & doenças cardiovasculares**. Cap.8, 97-113, 2003.
- Sessa WC. eNOS at a glance. **J Cell Sci** 117: 2427-2429, 2004.
- Sessa WC. The nitric oxide synthase family of proteins. **J Vasc Res** 31: 131-143, 1994.
- Shaffer JE, Han BJ, Cluerm WH, Lee FW. Lack of tolerance to a 24 hour infusion of S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP) in conscious rabbits. **J Pharmacol Exp Ther** 260: 286-293, 1992.
- Shattil SJ, Ginsberg MH, Brugge JS. Adhesive signaling in platelets. **Curr Op Cell Biol** 6: 695-704, 1994.
- Shattil SJ. Signalling through platelet integrin: inside-out, outside-in, and sideways. **Thrombosis and Haemostasis** 82: 318-325, 1999.
- Shaw AJ. Defining cell viability and cytotoxicity. **ATLA Altern Lab Anim** 22: 124-126, 1994.

- Shishido SM, de Oliveira MG. Polyethylene glycol matrix reduces the rates of photochemical and thermal release of nitric oxide from S-nitroso-N-acetylcysteine. **Photochem Photobiol** 71: 273-280, 2000.
- Shishido SM, Seabra AB, Loh W, de Oliveira MG. Thermal and photochemical nitric oxide release from S-nitrosothiols incorporated in Pluronic F127 gel: potential uses for local and controlled nitric oxide release. **Biomaterials** 24: 3543-3553, 2003.
- Shishido SM. “Liberação térmica e fotoquímica de óxido nítrico a partir de S-nitrosotióis incorporados em matriz de PEG e hidrogel de copolímero em bloco PEO-PPO-PEO”. Tese de doutorado- Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas- UNICAMP, 117 p., 2003.
- Shopsis C, Borenfreund E, Walberg J, Stark DM. A battery of potential alternatives to the Draize test: uridine uptake inhibition, morphological cytotoxicity, macrophage chemotaxis and exfoliative cytology. **Food Chem Toxicol** 23: 259-266, 1985.
- Sogo N, Magid KS, Shaw CA, Webb DJ, Megson IL. Inhibition of human platelet aggregation by nitric oxide donor drugs: Relative contribution of cGMP-independent mechanisms. **Biochem Biophys Res Comm** 279: 412-419, 2000.
- Soraggi CL. em “Citotoxicidade de derivados de  $\beta$ -enaminocetonas em células de mamíferos.” Dissertação de Mestrado- Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas- UNICAMP, 81 p., 1997.

- Souza JE, Costa MA, Abizaid A. Sustained suppression of neointimal proliferation by sirolimus-eluting stents: one-year angiographic and intravascular ultrasound follow-up. **Circulation** 104: 1007-1011, 2001 .
- Souza-Pinto NC, Vercesi AE, Hoffmann ME. Mechanism of tetrahydroxyl-1,4-quinone cytotoxicity: Involvement of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$  in the impairment of DNA replication and mitochondrial function. **Free Rad Biol Med** 20: 657-666, 1996.
- Souza-Pinto NC. “Mecanismo de ação letal da tetrahidroxiquinona em fibroblastos V79.” Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Paulo– UNIFESP- Escola Paulista de Medicina- Departamento de Bioquímica, 150 p., 1997.
- Spielmann H, Balls M, Dupuis J, Pape WJ, Pechovitch G, de Silva O, Holzhütter, H-G, Desolle P, Gerberick F, Liebsh M, Lovell WW, Maurer T, Pfannenbecker U, Pouhast JM, Csato M, Sladowiski D, Steiling W, Brantom, P. The international EU/COLIPA in vitro phototoxicity validation study results of phase II (blind trial). Part I: the 3T3 NRU phototoxicity test. **Toxicol in vitro** 12: 305-327, 1998.
- Stamler JS, Simon DI, Osborne JA, Mullins ME, Jaraki O, Michel T, Singel DJ, Loscalzo J. S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: Synthesis and characterization of biologically active compounds. **Proc Natl Acad Sci USA** 98: 444-448, 1992. (b)
- Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox activated forms. **Science** 258: 1898-1902, 1992 .(a)
- Steffen M, Sarkela TM, Gubina AA, Steele TW, Trasseth NJ, Kuehl D, Giulivi C. Metabolism of S-nitrosoglutathione in intact mitochondria. **Biochem J** 356: 395-402, 2001.

- Stewart VC, Heales SJR. Nitric oxide induced mitochondrial dysfunction: Implications for neurodegeneration. **Free Rad Biol Chem** 34: 287-303, 2003.
- Strickland JA, Stokes WS, Casati S, Paris MW, Worth AP, Raabe H, Cao C, Curren R, Haseman J, Tice RR. Design of a validation study to evaluate in vitro cytotoxicity assays for predicting rodent and human acute systemic toxicity. **Toxicology** 72: 157, 2003.
- Sudano I, Spieker LE, Hermann F, Flammer A, Corti R, Noll G, Luscher TF. Protection of endothelial function: targets for nutritional and pharmacological interventions. **J Cardiovasc Pharmacol** 47: 136-150, 2006.
- Takamori ER. “Estudo in vitro da citotoxicidade do osso bovino misto testado.” Dissertação Mestrado- Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas- UNICAMP, 69 p., 2004.
- Thanou M, Verhoef JC, Junginger HE. Oral drug absorption enhancement by chitosan and its derivatives. **Adv Drug Delivery Rev** 52: 117-126, 2001.
- Tomlinson R, Klee M, Garrett S, Heller J, Duncan R, Broncchini S. Pendent chain functionalized polyacetals that display pH-dependent degradation: a platform for the development of novel polymer therapeutics. **Macromolecules** 35: 473-480, 2002.
- van der Hoeven BL, Pires NMM, Warda HM, Oemrawsingh PV, van Vlijmen BJM, Quax PHA, Schalij MJ, van der Wall EE, Jukema W. Drug-eluting stents: results, promises and problems. **Int J Cardiol** 99: 9-17, 2005.

- Vilahur G, Baldellou MI, Segalés E, Salas E, Badimon L. Inhibition of thrombosis by a novel platelet selective S-nitrosothiol compound without hemodynamic side effects. **Cardiovasc Res** 61: 806-816, 2004.
- Villalobo A. Nitric oxide and cell proliferation. **FEBS J** 273: 2329-2344, 2006.
- Voetsch B, Jin RC, Loscalzo J. Nitric oxide insufficiency and atherothrombosis. **Histochem Cell Biol** 122: 353-367, 2004.
- Wang YB, Lou Y, Luo, ZF, Zhang DF, Wang YZ. Induction of apoptosis and cell cycle arrest by polyvinylpyrrolidone K-30 and protective effect of  $\alpha$ -tocopherol. **Biochem Biophys Res Commun** 308: 878-884, 2003.
- Wedgwood S, Black SM. Molecular mechanisms of nitric oxide-induced growth arrest and apoptosis in fetal pulmonary arterial smooth muscle cells. **Nitric Oxide** 9: 201-210, 2003.
- Willians DLH. Literature highlights – 38\* Nitric oxide release from S-nitrosothiols (RSNO) – the role of copper ions. **Transition Met Chem** 21: 189-191, 1996.
- Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. **Free Rad Biol Med** 25: 434-456, 1998.
- Worth AP, Balls M. Alternative (non-animal) methods for chemical testing: current status and future purposes. **ATLA Altern Lab Anim** 30(suppl 1): 1-124, 2002.
- Yaroslavov AA, Kuchenkova OYE, Okuneva IB, Melik-Nubarov NS, Kozlova NO, Lobyshev VI, Menger FM, Kabanov A. Effect of polylysine on transformation and permeability of negative vesicular membranes. **Biochim Biophys Acta** 1611: 44-54, 2003.

- Young DV, Serebryanik D, Janero DR, Tam SW. Suppression of proliferation of human coronary artery smooth muscle cells by the nitric oxide donor S-nitroglutathione is cGMP-independent. **Mol Cell Biol Res Commun** 4: 32-36, 2000.
- Zamora R, Matthys KE, Herman AG. The protective role of thiols against nitric oxide-mediated cytotoxicity in murine macrophage J774 cells. **Eur J Pharmacol** 321: 87-96, 1997.
- Zhang Y, Hogg N. S-nitrosothiols: cellular formation and transport. **Free Rad Biol Med** 38: 831-838, 2005.
- Zuang V, Balls M, Botham PA, Coquette A, Corsini E, Curren RD, Elliot GR, Fentem JH, Heylings JR, Liebsch M, Medina J, Roguet R, van de Sandt JJ, Wiemann C, Worth AP. Follow-up to the ECVAM prevalidation study on in vitro tests for acute skin irritation. The European Centre for the Validation of Alternatives Methods Skin Irritation Task report 2. **ATLA Altern Lab Anim** 30: 109-129, 2002.
- Zucco F, De Angelis I, Stamatii A. Cellular models for in vitro toxicity testing. In Clynes M (Ed), **Animal Cell Culture Techniques**, Springer Lab Manual, Springer-Verlag, Berlin, 395-422, 1998.
- Zucco F, de Angelis I, Testai I, Stamatii A. Toxicology investigations with cell culture systems: 20 years after. **Toxicol In Vitro** 18: 153-163, 2004.

*Aneros*



CEP, 28/04/06.  
(Grupo III)

**PARECER PROJETO:** N° 116/2006 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)  
**CAAE:** 0079.0.146.000-06

## **I-IDENTIFICAÇÃO:**

**PROJETO:** “ATIVIDADE BIOLÓGICA E CITOTOXICIDADE DE MATRIZ POLIMÉRICA COM DOADOR DE ÓXIDO NÍTRICO”

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Silvia Mika Shishido

**INSTITUIÇÃO:** UNICAMP/ Faculdade de Ciências Médicas

**APRESENTAÇÃO AO CEP:** 10/03/2006

**APRESENTAR RELATÓRIO EM:** 28/03/07 (O formulário encontra-se no *site* acima)

## **II - OBJETIVOS**

O desenvolvimento e a padronização de métodos para avaliação da citotoxicidade e das atividades trombogênica e hemolítica de materiais eluidores de óxido nítrico.

## **III - SUMÁRIO**

Os resultados obtidos serão utilizados para a seleção de melhores formulações para o desenvolvimento de dispositivos intravasculares carregados com estes materiais. A avaliação da citotoxicidade *in vitro* será feita utilizando-se cultura de células de linhagem estabelecida de fibroblastos de embrião de camundongo BALB/c 3T3, oriundas do National Institute of Health Baltimore - USA (NIH). Tais experimentos serão desenvolvidos no Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da Unicamp. A viabilidade celular será avaliada através de ensaios de captação de vermelho neutro e de redução de MTT. A avaliação dos potenciais hemolítico e trombogênico será feita utilizando-se plaquetas e células vermelhas (hemácias) humanas. O sangue venoso será coletado de voluntários saudáveis de ambos os sexos. O sangue será colhido na presença de anticoagulante, citrato de sódio (0,109 M) para os experimentos de agregação ou solução de glicose e citrato (ACD-C) para os experimentos de adesão plaquetária. O sangue será centrifugado, (20 mm; 200xg; 20°C) e separado em plasma rico em plaquetas (PRP) (sobrenadante) e o concentrado de hemáceas. O PRP será utilizado para os experimentos com plaquetas, enquanto as hemácias serão utilizadas para o teste de hemólise. O ensaio de hemólise é um indicador da extensão dos possíveis danos causados na membrana dos eritrócitos. A adesão de plaquetas será medida em placas de cultura recobertas com fibrinogênio. As plaquetas aderidas serão medidas através do ensaio de fosfatase ácida. A porcentagem de células aderidas será calculada utilizando-se uma curva padrão obtida por um número de conhecido de plaquetas. A agregação será induzida por adenosina difosfato (ADP) e será quantificada através da medida de luz transmitida. Antes da adição do ADP, a suspensão de plaquetas será exposta às



soluções das amostras. Os resultados serão expressos como média  $\pm$  erro padrão das médias (EPM) de n experimentos.

#### **IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES**

O projeto cumpre as determinações éticas, atualmente, em vigor no país

#### **V - PARECER DO CEP**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

#### **VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES**

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

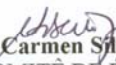


**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**  
**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

[www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html](http://www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html)

## **VII - DATA DA REUNIÃO**

Homologado na III Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 28 de março de 2006.

  
**Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo**  
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP

---

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP  
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126  
Caixa Postal 6111  
13084-971 Campinas - SP

FONE (019) 3788-8936  
FAX (019) 3788-7187  
[cep@fcm.unicamp.br](mailto:cep@fcm.unicamp.br)