

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

MARIANA GONÇALVES DE OLIVEIRA

**“O COMPLEXO DE RUTÊNIO DOADOR DE ÓXIDO NÍTRICO
trans-[Ru(NO)Cl(cyclam)](PF₆)₂ INIBE A PROLIFERAÇÃO E
MIGRAÇÃO DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS
VASCULARES INDUZIDA PELO FATOR DE CRESCIMENTO
DERIVADO DE PLAQUETAS”**

**CAMPINAS,
2013**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

MARIANA GONÇALVES DE OLIVEIRA

**“O COMPLEXO DE RUTÊNIO DOADOR DE ÓXIDO NÍTRICO
trans-[Ru(NO)Cl(cyclam)](PF₆)₂ INIBE A PROLIFERAÇÃO E
MIGRAÇÃO DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS VASCULARES
INDUZIDA PELO FATOR DE CRESCIMENTO DERIVADO DE
PLAQUETAS”**

Este exemplar corresponde à redação final
da DISSERTAÇÃO defendida pela
candidata

**MARIANA GONÇALVES DE
OLIVEIRA**

e aprovada pela Comissão Examinadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da UNICAMP para obtenção do
título de Mestra em Biologia Funcional e
Molecular, na área de Fisiologia.



Orientadora: Profa. Dra. Marta Helena Krieger

CAMPINAS,
2013

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

OL4c Oliveira, Mariana Gonçalves de, 1987-
O complexo de rutênio doador de óxido nítrico *trans*-[ru(NO)Cl(cyclam)](PF₆)₂ inibe a proliferação e migração de células musculares lisas vasculares induzida pelo fator de crescimento derivado de plaquetas / Mariana Gonçalves de Oliveira. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

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

1. Doadores de óxido nítrico. 2. Miócitos de músculo liso. 3. Proliferação de células. 4. Movimento celular. 5. Fator de crescimento derivado de plaquetas. I. Krieger, Marta Helena, 1958-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: The ruthenium complex nitric oxide donor *trans* -[ru(NO)Cl(cyclam)](PF₆)₂ inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and migration induced by platelet derived growth factor

Palavras-chave em inglês:

Nitric oxide donors

Smooth muscle myocytes

Cell proliferation

Cell movement

Platelet-derived growth factor

Área de concentração: Biologia Funcional e Molecular

Titulação: Mestra em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Marta Helena Krieger [Orientador]

Auyumi Aurea Miyakawa

Dora Maria Grassi Kassis

Data de defesa: 05-08-2013

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 05 de agosto de 2013

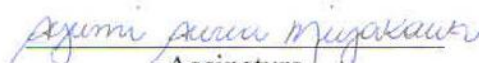
BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Marta Helena Krieger (orientadora)



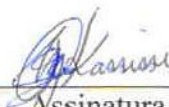
Assinatura

Dra. Ayumi Aurea Miyakawa



Assinatura

Profa. Dra. Dora Maria Grassi Kassis



Assinatura

Profa. Dra. Carmen Verissima Ferreira Halder

Assinatura

Profa. Dra. Sisi Marcondes

Assinatura

*Aos meus pais, Doraci e Fátima, pelo apoio e dedicação
para que eu conseguisse realizar este sonho.
Ao Leonardo, pela presença constante, pelo amor
e dedicação em todos os momentos.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me deu forças e luz para realizar este trabalho e que nas horas de desânimo e medo do fracasso, me deu consolo e serenidade, mesmo que muitas vezes não tenha percebido que era dele que vinham.

Agradeço aos meus pais e minha irmã Aline, pelo apoio e compreensão nos momentos de ausência, estresse ou nervosismo. Amo vocês!

Ao Leonardo, meu grande amigo e companheiro, que sempre me traz muita alegria, amor, paz e momentos maravilhosos... amor, sem você tudo ficaria mais difícil, obrigada! Amo você!

A minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Marta Helena Krieger, pela confiança, apoio e por toda infraestrutura oferecida.

Às minhas queridas companheiras de laboratório, Amanda, Daniele e Miriam. Juntas compartilhamos resultados, angústias e alegrias... obrigada por toda amizade, pelo carinho, por todos os conselhos, animadas conversas, e por me aguentarem mesmo nos meus dias difíceis! E ao meu querido amigo Leandro, que, embora nem sempre presente, sempre esteve à disposição. Agradeço pela amizade, pelo ouvido amigo... pela simpatia de sempre!

Aos queridos amigos, professores e funcionários do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, em especial ao Luiz Alberto, Rodolfo, Aline e Jad, pela amizade, disposição constante, pelos muitos cafézinhos e momentos de descontração.

Agradeço muito a Silvia Pimentel e Danilo Damas, pela amizade e por contribuições tão valiosas.

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

laboratórios, e a Prof^a. Dr^a. Ana Paula Davel, por toda ajuda durante o desenvolvimento deste estudo.

À todos que muitas vezes perturbei, fiz várias perguntas, fui persistente demais... obrigada! Com certeza contribuíram muito no meu aprendizado.

À todos aqueles que talvez possa ter esquecido nesse momento, mas estão presentes em meu coração.

A CAPES e a FAPESP pelo auxílio financeiro.

RESUMO

O óxido nítrico (NO) é um multifuncional agente biológico que nas últimas décadas tem sido alvo de uma infinidade de estudos e constitui hoje um dos mais importantes mediadores de processos intra e extracelulares. Diversos estudos demonstram sua capacidade de prevenção da ativação e adesão plaquetária ou leucocitária e inibição da proliferação e migração de células musculares lisas vasculares (VSMCs), entretanto, em condições de baixa disponibilidade do NO esses processos são prejudicados. Atualmente há o grande interesse no desenvolvimento de compostos capazes de liberar NO de forma modulada e estável, e, nesse sentido, os complexos nitrosilos de rutênio têm se destacado por suas características excepcionais. É amplamente reconhecido que a modulação fenotípica de VSMCs tem papel crítico na progressão de diversas doenças vasculares proeminentes. Sabe-se que o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF-BB) é um dos principais estimulantes desse processo. Este estudo se propôs a caracterizar os efeitos inibitórios do complexo de rutênio *trans*-[Ru(NO)Cl(cyclam)](PF₆)₂, nomeado Ru(cyclam)NO, na modulação fenotípica, resposta proliferativa e migratória de VSMCs induzidas por PDGF-BB. VSMCs foram obtidas por técnica de cultura primária. A citotoxicidade do complexo, na faixa de concentração de 100 µM a 1500 µM, foi determinada em ensaios de redução do MTT e incorporação *neutral red* (NR), e comparadas a do nitroprussiato de sódio (SNP). A concentração 100 µM foi definida para os demais protocolos experimentais. *Western blotting*, ensaios *transwell* e *wound healing*, e incorporação de timidina triciada foram utilizados para determinação da modulação fenotípica, migração e proliferação celular, respectivamente, e níveis de nitrato no meio foram determinados por quimiluminescência para avaliação do perfil de liberação de NO. O complexo demonstrou baixa citotoxicidade, mesmo na maior concentração e após 48 horas de exposição, reduzindo ao máximo em 30% a porcentagem de células viáveis em ambos os ensaios, demonstrando ser menos tóxico que o SNP. Níveis de nitrato no meio atingiram a concentração máxima após 30 minutos (11 µM ± 4,8), de maneira mais lenta em relação ao SNP, cuja concentração máxima foi após 5 minutos (13 µM ± 3,7). A proliferação das VSMCs induzida por PDGF-BB foi inibida, reduzindo à metade a radioatividade incorporada, bem como a expressão do marcador de proliferação PCNA. Observou-se redução de 45% na migração induzida por PDGF-BB nos ensaios *transwell*, e no *wound-healing*, embora qualitativo, a redução é notável. A modulação fenotípica da VSMC foi observada pela redução em 60% da expressão da proteína alfa-actina, característica do fenótipo maduro, e foi quase totalmente prevenida pelo tratamento com o complexo. Tal prevenção pode ser mediada pelo fator de transcrição ELK-1, que favorece a expressão de genes de diferenciação, e cuja fosforilação foi estimulada pelo PDGF-BB, porém inibida em quase 50% pelo pré-tratamento com Ru(cyclam)NO. As respostas observadas nos tratamentos com Ru(cyclam)NO foram promissoras, e, embora seu mecanismo de ação

ainda não esteja completamente esclarecido, este complexo demonstrou atividade biológica singular, e sua aplicação em condições clínicas onde há descontrole de processos de proliferação e migração de VSMCs, como a reestenose, apresenta-se como uma proposta interessante.

Palavras chave: óxido nítrico, nitrosilos complexos de rutênio, célula muscular lisa vascular, proliferação, migração.

ABSTRACT

Nitric oxide (NO) is a multifunctional biological agent that in the recent decades has been the subject of a plethora of studies and today is one of the most important intracellular and extracellular processes mediators. Several studies have demonstrated its ability to prevent leukocyte or platelet adhesion and activation, and inhibition of vascular smooth muscle cells (VSMCs) proliferation and migration. However, low availability of NO conditions determines impairment of these processes. There is a keen interest in the development of compounds capable of releasing NO modulated so stable, and the nitrosyl ruthenium complexes have gained prominence for its exceptional features. It is widely recognized that the phenotypic modulation of VSMCs, and its uncontrolled proliferation and migration, plays a critical role in the progression of several prominent vascular diseases. It is known that the platelet-derived growth factor (PDGF) is a primary stimulant of the process. This study aimed to determine the inhibitory effects of the ruthenium complex NO donor trans-[Ru(NO)Cl(cyclam)](PF₆)₂, named Ru(cyclam)NO, in the phenotypic switching, on migratory and proliferative responses of VSMCs induced by PDGF-BB, and its biological response. VSMCs were obtained from primary culture methodology. The complex cytotoxicity were determined by MTT reduction and incorporation of neutral red (NR) assays, in the range of concentration from 100 μM to 1500 μM, and compared to sodium nitroprusside (SNP). For the following experimental protocols the concentration of the 100 μM was set. Western blotting, transwell and wound healing assays, and incorporation of tritiated thymidine were used for determination of phenotypic switching, cell migration and proliferation, respectively. Evaluation of the NO profile release was determined as nitrate levels in the culture medium by chemiluminescence. The complex Ru(cyclam)NO showed low cytotoxicity even at the highest concentration evaluated and after 48 hours of exposition, reducing only 30% the percentage of viable cells in both trials, showing be less toxic than the SNP. Medium nitrate levels exhibited the highest concentration after 30 min (11 μM ± 4.8), slower when compared to SNP, which reached the maximum concentration after 5 minutes (13 μM ± 3.7). The proliferation of VSMCs induced by PDGF-BB was inhibited by half of the radioactivity incorporated counting, as well as the reduction on the expression of the proliferation marker PCNA. Observed a reduction by 45% in the migration induced by PDGF-BB determined in transwell assays, and on the wound-healing, although a qualitative result, the reduction of migration induced by PDGF-BB. The 60% reduction by PDGF-BB treatment of the contractile protein expression α-SMA, characteristic of mature phenotype, revealed the modulation of VSMCs phenotype, and it was almost completely prevented by treatment with the complex. Such prevention was associated with inhibition by almost 50% of phosphorylation of the transcription factor ELK-1 stimulated by PDGF-BB. The responses determined with complex treatments revealed promising for future development of cardiovascular devices. Although its

mechanism of action is not completely understood, this complex showed singular biological activity, and its application in some clinical conditions where there is uncontrolled proliferation and migration of VSMCs presents as a substantial proposal.

Keywords: nitric oxide, nitrosyl ruthenium complexes, vascular smooth muscle cell, proliferation, migration.

ÍNDICE DE FIGURAS

	<i>Pág.</i>
Fig.1 Biosíntese do NO a partir da L-arginina.	02
Fig.2 Estrutura química do complexo de rutênio doador de NO, <i>trans</i> - [Ru(NO)Cl(cyclam)](PF ₆) ₂ .	09
Fig.3 Fatores que controlam a modulação do fenótipo da VSMC.	11
Fig.4 Representação esquemática do desenho experimental realizado para determinação da concentração de nitrato no meio.	24
Fig.5 Representação esquemática do protocolo experimental utilizado para análise de migração quimiotática.	29
Fig.6 Imagem de microscopia de fluorescência de VSCMs por imunocitoquímica para a proteína α -SMA, em células nas passagens 01 (superior) e 03 (inferior).	32
Fig.7 Imagem de microscopia de fluorescência de VSCMs por imunocitoquímica para proteína SM-MHC, em células nas passagens 01 (superior) e 03 (inferior).	32
Fig.8 Curva dose-temporal da concentração de nitrato no meio de cultura de VSMCs tratadas, avaliada pelo método de quimioluminescência.	35
Fig.9 Inibição da resposta proliferativa de VSMCs induzida pelo PDGF-BB após 48 horas de tratamento, avaliada pela incorporação de timidina triciada.	36
Fig.10 Inibição da resposta proliferativa induzida por PDGF-BB em VSMCs após 48 horas de tratamento, avaliada pela expressão do marcador de proliferação PCNA.	37

Fig.11	Inibição da resposta migratória induzida por PDGF-BB em VSMCs, avaliada por ensaio de migração <i>transwell</i> .	38
Fig.12	Inibição da resposta migratória induzida por PDGF-BB em VSMCs, avaliada através de ensaio de migração <i>wound healing</i> .	39
Fig.13	Expressão da proteína contrátil α -SMA, marcadora do fenótipo maduro/diferenciado, em VSMCs tratadas, avaliada pela técnica de <i>western blotting</i> .	40
Fig.14	Expressão do fator de transcrição ELK-1 em resposta ao tratamento com o complexo Ru(cyclam)NO, na presença ou ausência de PDGF-BB.	41
Fig.15	Resumo das características do complexo Ru(cyclam)NO e exemplo de possível aplicação.	53

ÍNDICE DE TABELAS

	<i>Pág.</i>
Tab.1 Algumas classes de doadores de NO.	06
Tab.2 Citotoxicidade do complexo Ru(cyclam)NO e SNP, avaliada pelo método de redução de MTT.	33
Tab.3 Citotoxicidade do complexo Ru(cyclam)NO e SNP, avaliada pelo método de incorporação do corante NR.	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α-SMA	<i>Alpha <u>S</u>mooth <u>M</u>uscle <u>A</u>ctin</i> (alfa actina de músculo liso)
AMPc	<i><u>C</u>yclic <u>A</u>denosine <u>M</u>onophosphate</i> (monofosfato cíclico de adenosina)
BH₄	Tetra <u>h</u> idro <u>b</u> iopterina
BSA	<i><u>B</u>ovine <u>S</u>erum <u>A</u>lbumin</i> (albumina do soro bovino)
CML	Célula muscular lisa
cPTIO	Carboxy-PTIO
DMEM	<i><u>D</u>ulbecco's <u>M</u>odified <u>E</u>agle <u>M</u>edium</i> (meio Eagle modificado por Dulbecco)
EBSS	<i><u>E</u>arl's <u>B</u>alanced <u>S</u>alt <u>S</u>olution</i> (solução salina balanceada de Earl's)
ERK	<i><u>E</u>xtracellular <u>R</u>egulated <u>K</u>inase</i> (proteína quinase regulada por sinal extracelular)
GAPDH	<i><u>G</u>lyceraldehyde 3-<u>p</u>hosphate <u>d</u>e<u>h</u>ydrogenase</i>
GCs	<u>G</u> uanilato <u>C</u> iclase <u>S</u> olúvel
GMPc	<i><u>C</u>yclic <u>G</u>uanosine <u>M</u>onophosphate</i> (monofosfato cíclico de guanosina)
GTP	<i><u>G</u>uanosine <u>T</u>riphosphate</i> (trifosfato de guanosina)
L-NAME	N ^G -nitro- <u>L</u> -arginina- <u>m</u> etil-ester
MAPK	<i><u>M</u>itogen <u>A</u>ctivated <u>P</u>rotein <u>K</u>inase</i> (proteína quinase ativada por mitógenos)
NO	Óxido <u>N</u> ítrico
NOS	<i><u>N</u>itric <u>O</u>xide <u>S</u>intase</i> (óxido nítrico sintase)
NR	<i><u>N</u>eutral <u>R</u>ed</i> (vermelho neutro)
PBS	<i><u>P</u>hosphate <u>B</u>uffered <u>S</u>aline</i> (tampão fosfato salino)
PCNA	<i><u>P</u>roliferation <u>c</u>ell <u>n</u>uclear <u>a</u>ntigen</i> (antígeno nuclear de proliferação celular)
PDGF	<i><u>P</u>latelet-<u>d</u>erived <u>G</u>rowth <u>F</u>actor</i> (fator de crescimento derivado de plaquetas)
DS	<u>D</u> ocecil <u>S</u> ulfato de <u>S</u> ódio

SFB	<u>S</u> oro <u>F</u> etal <u>B</u> ovino
SM-MHC	Miosina de cadeia pesada de músculo liso
SNP	<u>S</u> odium <u>n</u> itro <u>p</u> russide (nitroprussiato de sódio)
SRF	<u>S</u> erum <u>r</u> esponse <u>f</u> actor (fator sérico de resposta)
VSMC	<u>V</u> ascular <u>S</u> mooth <u>M</u> uscle <u>C</u> ell (célula muscular lisa vascular)

SUMÁRIO

1. Introdução	01
2. Objetivos	16
2.1 Objetivo geral	17
2.2 Objetivos específicos	17
3. Métodos	18
3.1 Obtenção do composto trans-[Ru(NO)Cl(cyclam)](PF ₆) ₂	19
3.2 Linhagem celular e condições de cultivo	20
3.3 Ensaio de viabilidade celular	22
3.3.1 Ensaio de redução de MTT	22
3.3.2 Ensaio de incorporação de <i>Neutral Red</i> (NR)	23
3.4 Determinação de nitrato por quimioluminescência	23
3.5 <i>Western Blotting</i>	25
3.6 Ensaio de proliferação celular	27
3.6.1 Incorporação de timidina triciada	27
3.6.2 Expressão de PCNA	28
3.7 Ensaio de migração celular	28
3.7.1. <i>Transwell</i>	28
3.7.2 <i>Wound-healing</i>	30
3.8 Análise estatística	30
4. Resultados	31
4.1 Caracterização das VSMCs obtidas por cultura primária	32
4.2 Avaliação da citotoxicidade do complexo	33
4.3 Determinação de nitrato no meio	34

4.4 Avaliação da resposta do complexo na proliferação de VSMCs induzida por PDGF-F-BB	36
4.5 Avaliação da resposta do complexo na migração de VSMCs induzida por PDGF-BB	37
4.6 Avaliação da resposta do complexo na modulação do fenótipo de VSMCs induzida por PDGF-BB	40
5. Discussão	42
6. Conclusão	54
7. Referências	56
8. Anexos	69

1.Introdução

O óxido nítrico (NO) é um radical livre, com meia vida de depuração muito curta (3 a 5 segundos), inorgânico, incolor, gasoso e altamente difusível, devido as suas características lipofílicas e baixo peso molecular. Nas últimas décadas o NO tem sido alvo de uma infinidade de estudos e hoje constitui um dos mais importantes mediadores de processos intra e extracelulares. De modo geral, o NO é a única molécula que reúne as propriedades de neurotransmissor, de mediador constitutivo e indutível, ou mesmo de agente citotóxico, podendo atuar na regulação da pressão arterial, no sistema imunológico e nas atividades do cérebro, fígado, pâncreas, útero e pulmões (Culotta, Koshland Junior, 1992; Richter-Addo, Legzdins, 1992; Stamler, 1992; Feldman *et al.*, 1993; Ainscough, Brodie, 1995; Wink *et al.*, 1996; Ignarro, 2000).

BIOSSÍNTESE E MECANISMOS DE AÇÃO DO NO

O NO endógeno resulta da hidroxilação de um dos nitrogênios guanidina da molécula de L-arginina, que é convertida em L-citrulina, e a reação é catalisada por NO-sintases (NOS), como é demonstrado na figura 1.

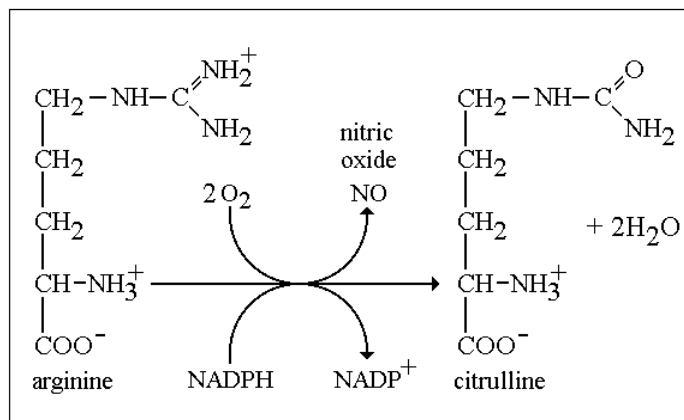


Figura 1. Biosíntese do NO a partir da L-arginina (Owens, 1995).

Essas enzimas foram identificadas como NOS endotelial, uma enzima constitutiva que gera NO no endotélio dos vasos sanguíneos, NOS induzível, expressa após estimulação de macrófagos durante a resposta imunológica, produzindo quantidades elevadas de NO (~mmol.l⁻¹), e a neuronal, que está presente nos neurônios, onde o NO atua como neurotransmissor (Queiroz, Batista, 1999; Williams, 2003). Todas as isoformas da NOS

podem ser inibidas por análogos da arginina N-substituídos, como o N^G-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME). Esses análogos competem com a L-arginina e agem como inibidores estereoespecíficos da NOS (Dusse *et al.*, 2003). O sucesso da reação de formação de NO também depende da presença de fosfato de nicotinamida-adenina dinucleotídeo (NADPH) e oxigênio molecular (O₂), além de alguns cofatores, como o tetrahidrobiopterina (BH₄) (Stuehr, Griffith, 1992). Em situações onde a quantidade de alguma de essas substâncias necessárias à produção for insuficiente, por exemplo, em situações de hipóxia ou estresse oxidativo, o processo fica comprometido. Nesses casos, para manter a demanda de NO o organismo usa alternativas como a ação da enzima nitrato redutase, que promove a redução de íons nitrato a nitrito, e posterior redução de nitrito à NO, ou então pela ação de xantinas oxidases (Li *et al.*, 2001; Bryan, 2006).

O NO produzido pelas células endoteliais tem um papel essencial no processo de relaxamento dos vasos sanguíneos. Em condições fisiológicas, o relaxamento vascular ocorre quando receptores da membrana das células endoteliais são ativados por estímulos químicos ou quando há um aumento da força física exercida pelo sangue sobre a camada endotelial (estresse de cisalhamento), levando a ativação da NO sintase endotelial nestas células, com consequente produção de NO. A fosforilação da enzima ocorre em resposta à ação de vários agonistas (bradicinina, serotonina, adenosina, ADP/ATP, histamina, trombina, entre outros), determinando sua translocação para o citosol. O NO produzido difunde-se rapidamente para as camadas de células musculares lisas (CMLs) e para o lúmen vascular (Moncada *et al.*, 1991).

No citosol das CMLs, o NO interage com o ferro do grupo heme da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), causando uma alteração conformacional na enzima e tornando-a ativa. A GCs ativa catalisa a saída de dois grupamentos fosfato da molécula de guanosina trifosfato (GTP), resultando na formação de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), cujo acúmulo na célula muscular promove o relaxamento, através da inibição da entrada de Ca²⁺, da liberação de Ca²⁺ do retículo endoplasmático e do aumento do sequestro de Ca²⁺ pelo mesmo (Moncada *et al.*, 1991; Dusse *et al.*, 2003).

Sendo bem estabelecidas as propriedades vasoativas do NO, tem sido investigada, em diversos estudos, a capacidade do NO de ser empregado como uma alternativa terapêutica em condições patológicas como a aterosclerose, infecções e o câncer.

Há alguns anos, o NO foi identificado como o principal fator responsável pelas propriedades antiateroscleróticas do endotélio, sendo capaz de prevenir a adesão e agregação plaquetária (Yan *et al.*, 1996; Giustarini *et al.*, 2003). Esta atividade antiplaquetária é devido, em grande parte, a interação do NO com as GPs, que resulta em aumento de GMPc nas plaquetas. O acúmulo de GMPc resulta na inibição da expressão de proteínas de adesão com as p-selectinas, integrinas e glicoproteína IIb/IIIa (Kubes *et al.*, 1991; Napoli, Ignarro, 2001).

A inibição da síntese de NO resulta em marcante aumento da adesão de leucócitos ao endotélio vascular (Kubes *et al.*, 1991), enquanto esta adesão, em resposta à fatores quimiotáticos, pode ser altamente reprimida por doadores de NO (Wallace *et al.*, 1997). Além disso, o NO é capaz de modular a produção de matriz extracelular, regulando a produção de colágeno tipo IV e fibronectina (Myers, Tanner, 1998; Jeremy *et al.*, 1999).

Outra importante atividade biológica do NO é sua capacidade de interferir na proliferação das CMLs, por mecanismos dependentes ou não de GMPc, podendo limitar a progressão do ciclo celular. Em um estudo conduzido por Sakar e colaboradores (1997), utilizando CMLs de aorta de ratos, tratadas com os doadores de NO S-nitroso-DL-penicilamina e S-nitroso-glutationa, apresentaram uma redução de 50% nas fases G₂/M do ciclo celular que correspondeu a um aumento da fase G₀/G₁ e foi mediada por GMPc. Estudos com o análogo do GMPc referem que o NO inibe a proliferação da CMLs através da ativação da proteína quinase G (Costa, Assreuy, 2005), e da proteína quinase dependente de AMPc (Ferri, 2012), um potente inibidor da proliferação das CMLs.

O NO pode interferir na sinalização molecular que controla a progressão do ciclo celular através do aumento da expressão e atividade da proteína p21, um inibidor da cdk2. A p21 se liga ao complexo cdk2/ciclina-A inativando-o e prevenindo a fosforilação da

proteína retinoblastoma, um evento celular importante na transição para a fase S (Cornwell *et al.*, 1994; Ishida *et al.*, 1997; Gewaltig, Kojda, 2002).

A nitrosilação de diversas proteínas relevantes para a proliferação celular parece ser um dos mecanismos que medeiam as ações do NO independente do GMPc, como, por exemplo, a ornitina descarboxilase e a arginase, que é capaz de reduzir a disponibilidade de L-arginina (Blachier *et al.*, 1996; Buga *et al.*, 1998).

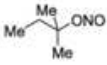

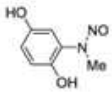
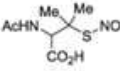
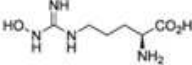
Em vista dessas propriedades, uma grande variedade de compostos doadores de NO tem emergido como potenciais agentes terapêuticos, capazes de explorar as diversas funções biológicas do NO, e seus aspectos farmacológicos tem sido constantemente revisados (Feelish, 1998; Janero, 2000; Lehmann J, 2000; Megson, 2000).

DOADORES DE ÓXIDO NÍTRICO

Há na literatura o conhecimento estabelecido de que doadores de NO produzem uma atividade relacionada à do NO quando aplicada a sistemas biológicos. As vias pelas quais se tem a formação do NO diferem significativamente de composto para composto, bem como sua reatividade. Vários compostos requerem uma catálise enzimática, enquanto outros, não-enzimáticos, liberam NO de forma espontânea. Outros, no entanto, necessitam de interação com grupos tióis, alguns são reduzidos, outros oxidados, mas todos são dependentes do tempo de exposição (Murgia *et al.*, 2004).

Os nitratos orgânicos, descobertos há mais de um século, são os doadores de NO mais conhecidos. O gliceril-trinitrato, mais conhecido como nitroglicerina, é usado principalmente para o alívio da dor aguda associada à angina, enquanto o mononitrato de isossorbida é usado para o tratamento de angina crônica. Outro relevante doador de NO é o nitroprussiato de sódio (SNP), um complexo inorgânico utilizado, desde 1928, como vasodilatador em crises hipertensivas (Kodja *et al.*, 1995; Friederich, Butterworth, 1995; Feelish, 1998).

Tabela 1. Algumas classes de doadores de NO.

Nome	Composto representativo	Via de geração de NO	
		Não-enzimática	Enzimática
Nitratos orgânicos		Hidrólise, nitrosação, tióis, luz e aquecimento	Enzimas citossólicas e xantina oxidase
Nitritos orgânicos		Tióis	Cit-P450, GST e enzimas ligadas à membrana
Complexos NO-metálicos	$\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Tióis, luz, redutores e nucleófilos	Enzimas ligadas à membrana
N-nitrosaminas		OH e luz	Cit-P450
S-nitrosotióis		Espontâneo, tióis, luz e íons metálicos	Enzima desconhecida
N-hidroxi guanidinas		Oxidantes	NOS, Cit-P450

Barreto *et al.*, 2005.

Nitrosilos complexos metálicos têm se destacado nos últimos anos como complexos liberadores de NO. Como o NO reage rapidamente com alguns metais de transição, incluindo níquel, cobalto, cromo, ferro e rutênio, há formação de nitrosilo complexos, que liberam NO após redução monoelétrica do íon nitrosônio ou por irradiação com luz (Wang *et al.*, 2002; Tfouni *et al.*, 2003, 2010, 2012).

NITROSILOS COMPLEXOS DE RUTÊNIO

Historicamente, complexos metálicos são utilizados há séculos na prática médica (Abrams, Murrer, 1993). Entre alguns exemplos podem-se citar os compostos de platina, utilizados no tratamento do câncer, assim como os compostos de ouro no tratamento da artrite reumatóide e os compostos de prata utilizados como agentes antimicrobianos (Allardyce, Dyson, 2001). Entretanto, apesar de amplamente utilizadas, os mecanismos de ação dessas metalo-drogas são complexos, e é importante que sejam bem esclarecidos para que sua eficácia seja máxima e com mínimos efeitos indesejáveis.

Complexos nitrosilos têm aplicação médica desde o século XIX, porém o uso desses compostos encontra-se, muitas vezes, limitado, devido à falta de controle da liberação de NO.

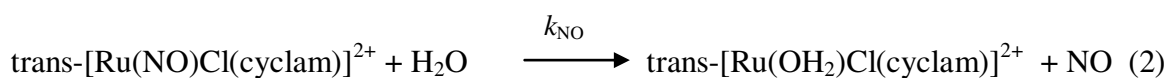
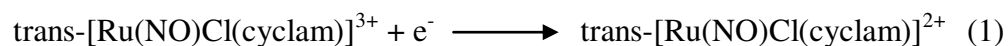
O rutênio é o elemento metálico que mais forma complexos nitrosilos (Zanichelli *et al.*, 2004; Tfouni *et al.*, 2005), e, nas últimas décadas, esses complexos têm recebido considerável atenção, mas suas atividades biológicas tem sido reportadas desde a década de 1950 (Dwyer *et al.*, 1965). Existem três propriedades principais que fazem dos complexos de rutênio adequados para aplicações biomédicas: 1) versatilidade de ligantes; 2) uma série de estados de oxidação: Ru (II), Ru(III) e Ru(IV) e 3) capacidade de mimetizar a ligação do ferro em certas moléculas biológicas, como a albumina e a proteína transportadora de ferro transferrina, o que lhe confere baixa toxicidade (Allardyce, Dyson, 2001).

Complexos de rutênio são de grande interesse na atualidade, especialmente por seu comportamento cinético: seu potencial em liberar NO de forma controlada e em uma taxa constante, o que favorece o uso na clínica (Tfouni *et al.*, 2012).

Os nitrosilos de rutênio, tais como os complexos *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄(L)]³⁺ (L = piridinas; pirazina) e *trans*-[Ru(NO)Cl(cyclam)]²⁺ (cyclam = 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano), se mostraram promissores doadores de NO com atividade biológica. Eles são solúveis em água, estáveis no estado sólido ou em solução no escuro, mesmo em pH fisiológico, e liberam NO após redução e/ou por irradiação com luz, com apenas o solvato complexo além do NO, HNO e cloreto no caso do *trans*-[Ru(NO)Cl(cyclam)]²⁺. Eles podem ser projetados para terem as propriedades desejadas pela escolha adequada dos ligantes, e podem também ser incorporados em matrizes tais como *drug delivery systems* (Tfouni *et al.*, 2005; Tfouni *et al.*, 2010ab).

A redução do óxido nítrico (equação 1) é uma etapa importante para liberação de NO nesta classe de complexos, e o complexo resultante após a dissociação de NO é seu correspondente aquo (equação 2). Este aquo complexo pode, por outro lado, atuar como sequestrador de nitrito (NO₂⁻), formando o nitro complexo que, em pH fisiológico, se

transforma em nitrosilo, regenerando o complexo original, o que transforma o nitrito em uma fonte de NO e eleva o potencial desses complexos (Osti, Franco, 2007).



Em vista do conhecimento dessas propriedades, diversos complexos tem sido o foco do grupo de pesquisa do Prof. Dr. Elia Tfouni e do Prof. Dr. Douglas W. Franco, que por mais de uma década tem sintetizado, caracterizado e estudado propriedades de complexos nitrosilos de rutênio, resultando em projetos temáticos financiados pela FAPESP e uma série de trabalhos e revisões publicadas em importantes revistas internacionais especializadas.

Vários complexos têm sido estudados por diferentes grupos e apresentado resultados promissores. Quando administrado via endovenosa em ratos normotensos ou hipertensos, complexos de rutênio como *trans*-[Ru(NH₃)₄(L)(NO)]³⁺ (L=isocotinaamida (isn), piridina (py), ácido isonicotínico (inaH), etc) ou [Ru(terpy)(bdq)NO] e induzem decréscimo da pressão arterial, especialmente nos ratos hipertensos (Torsoni *et al.*, 2002; Barros *et al.*, 2002; Tfouni *et al.*, 2012; Rodrigues *et al.*, 2012). Alguns complexos como *trans*-[Ru(Cl)NO(cyclam)]²⁺ sustentam a duração desses efeitos por período muito mais prolongados, em média por 15 minutos, quase 20 vezes a duração dos efeitos apresentados pelo SNP (Marcondes *et al.*, 2002; Zanichelli *et al.*, 2007). Demonstrou-se também que o complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(caffeine)(NO)]C13 apresenta potente efeito vasodilatador no corpo cavernoso de coelhos (Cerqueira *et al.*, 2010), no músculo liso de vias aéreas (Rocha *et al.*, 2011), .

O complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(L)(NO)]³⁺ também exibiu capacidade de sequestrar NO, sendo particularmente útil no tratamento de condições onde há excessiva liberação de

NO, como no choque séptico (Tfouni *et al.*, 2003; Zanichelli *et al.*, 2007; Tfouni *et al.*, 2010).

O presente estudo foi desenvolvido utilizando o complexo de rutênio *trans*-[Ru(NO)Cl(cyclam)](PF₆)₂ (cyclam= 1,4,8,11-tetraazacyclotetradecano), cuja estrutura pode ser verificada na figura 2, e que foi nomeado neste estudo apenas como Ru(cyclam)NO. Trata-se de um complexo capaz de liberar NO, *in vivo*, por redução química (equações 1 e 2), e que apresenta as características comuns aos outros nitrosilos de rutênio, sendo potente agente vasodilatador (Marcondes *et al.*, 2002). Entretanto, este complexo possui o diferencial de apresentar menor velocidade de liberação de NO ($k_{NO} \sim 6,1 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$) em relação ao SNP ($k_{NO} \sim 1 \text{ s}^{-1}$), além da possibilidade de imobilização em matrizes, o que tem grande impacto em suas aplicações biológicas. Nesse caso, sistemas de imobilização podem aumentar o tempo de permanência do complexo *in vivo*, além de evitar reações indesejáveis, como um ataque nucleofílico ao nitrosilo, o que poderia coibir a ação do complexo (Tfouni *et al.*, 2012). Estudos do grupo demonstraram que sua incorporação em matrizes de sílica, através do processo de sol-gel, mantém suas características moleculares e mantém a liberação de NO de forma modulada (Ferreira *et al.*, 2006).

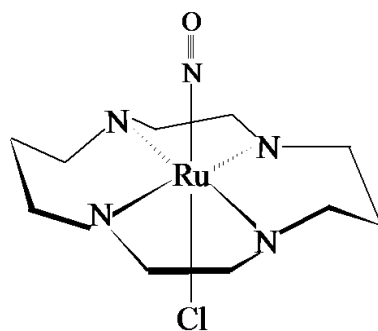


Figura 2. Estrutura química do complexo de rutênio doador de NO, *trans*-[Ru(NO)Cl(cyclam)](PF₆)₂.

Dessa forma, com o objetivo de ampliar o alcance de aplicações biológicas deste complexo no âmbito cardiovascular, complementando os estudos desenvolvidos no grupo de pesquisa, nossa proposta foi a de investigar as respostas do tratamento com o complexo Ru(cyclam)NO em VSMCs.

CÉLULAS MUSCULARES LISAS VASCULARES

As VSMCs são altamente especializadas e apresentam capacidade de contração e relaxamento, regulando assim o tônus vascular, a pressão arterial e a distribuição do fluxo sanguíneo. Essas células possuem um alto volume citoplasmático de miofilamentos (Mosse *et al.*, 1985), baixa taxa de proliferação (Campbell *et al.*, 1988) e sintetizam apenas pequenas quantidades de matriz extracelular (Ang *et al.*, 1990), e tem sua origem, fenótipo e funções variados, sendo grande parte delas derivada de células mesenquimais (Hungerford, Little, 1999), porém alguns estudos demonstraram que algumas populações de CMLs tem sua origem em um processo de transdiferenciação das células endoteliais (DeRuiter *et al.*, 1997).

Na camada neoíntima, segundo Hillebrands e colaboradores (2001), existem três origens básicas para essas células: 1) desdiferenciação e migração de células musculares lisas contráteis da camada média, 2) migração e multiplicação de células oriundas da camada média, adventícia ou da própria íntima e 3) fixação, multiplicação e diferenciação de células pluripotentes circulantes no sangue periférico, como por exemplo, células progenitoras hematopoiéticas.

VSMCs diferenciadas exibem grande diversidade fenotípica e plasticidade durante o desenvolvimento, durante o reparo de lesões vasculares e em estados patológicos, como a aterosclerose (Owens, 2007). Esta plasticidade celular confere à célula a modulação entre um fenótipo contrátil, ou diferenciado/quiescente, e um fenótipo sintético, ou desdiferenciado/proliferativo (figura 3). O fenótipo sintético, apresentado normalmente durante o desenvolvimento, é caracterizado pelo aumento de síntese proteica e baixa capacidade de contração decorrente da regulação negativa de proteínas contráteis. Já o fenótipo contrátil, presente nas CMLs maduras é caracterizado por reduzida capacidade de síntese protéica, um aumento de miofilamentos contráteis e aumento da expressão de α -actina (Gharios *et al.*, 2004). O processo de diferenciação é, ao contrário das células musculares cardíacas e esqueléticas, reversível, caracterizado pela modulação da expressão de proteínas contráteis e canais iônicos, de acordo com diferentes condições fisiológicas e patológicas (Owens *et al.*, 2003). Ainda é amplamente reconhecido que a modulação

fenotípica da CML vascular tem papel crítico na progressão de diversas doenças vasculares proeminentes (Schwartz, 1997; Owens *et al.*, 2003).

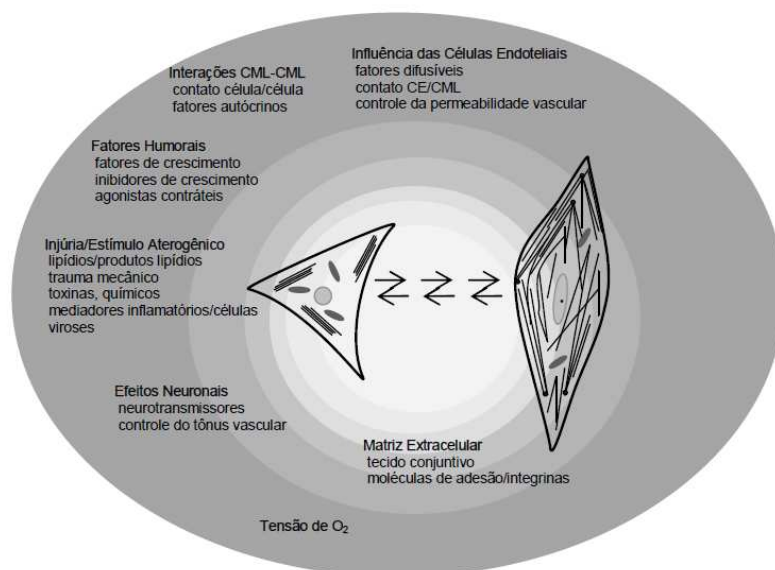


Figura 3. Fatores que controlam a modulação do fenótipo da VSMC (Modificado de Owens, 1995).

MODULAÇÃO FENOTÍPICA DA VSMC

O padrão de expressão de proteínas marcadoras tem sido utilizado para a caracterização do estado fenotípico da CML. Os marcadores apropriados incluem uma variedade de proteínas contráteis importantes para a função das CMLs diferenciadas, incluindo α -actina (Gabbiani *et al.*, 1981; Owens, Thompson, 1986), miosina de cadeia pesada (Rovner *et al.*, 1986; Miano *et al.*, 1994) e miosina de cadeia leve (Hasegawa, Morita, 1992). CMLs diferenciadas também expressam proteínas as quais, além de envolvidas na contração, constituem o citoesqueleto, como a calponina, SM-22 (Winder *et al.*, 1991), caldesmona (Sobue, Sellers, 1991) e vinculina (Geiger *et al.*, 1980). A expressão dos genes que codificam essas proteínas é dependente da ligação de fatores de transcrição, como o fator sérico de resposta (SRF) ao elemento sérico de resposta, encontrado nos promotores da maioria dos genes marcadores do fenótipo diferenciado já identificados (Miano, 2003; Owens *et al.*, 2003). A sinalização do SRF ocorre principalmente através de vias como a *Mitogen Activated Protein Kinase* (proteína quinase ativada por mitógenos,

MAPK), que convergem ao núcleo para estimular a expressão gênica (Miano, 2003). Foi reportado que o SRF pode ativar diversos genes CML-específicos, através do recrutamento de uma série de cofatores, sendo a miocardina o mais importante deles (Camoretti-Mercado *et al.*, 2003).

Kawai-Kowase e Owens (2007) revisaram uma série de vias de sinalização envolvidas na modulação do fenótipo da CML que favorecem o fenótipo proliferativo/sintético. Algumas dessas vias incluem o fator de transcrição KLF-4, ELK-1 fosforilada, HERP1, FOXO4, YY1, e FHL2.

ELK-1 é um fator de transcrição que interage com o SRF para modular a transcrição. É um membro da família de complexos ternários de fatores de transcrição, que compete com a miocardina pelos sítios de ligação no SRF e controla a expressão de genes como *c-fos* (Du *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004). A expressão de ELK-1 mostrou-se aumentada após lesão vascular (Beamish *et al.*, 2010), e sua ativação ocorre após a ativação das MAPKs, que promove a fosforilação da proteína quinase regulada por sinais extracelulares (ERK 1/2), que por sua vez fosforila e ativa ELK-1. A inibição das MAPKs, pelo inibidor específico U0126, bloqueia essa resposta e suprime seus efeitos na expressão gênica, evidenciando que a ativação das MAPKs é crítica para a regulação da expressão de genes de diferenciação, bem como de proliferação e migração (Wang *et al.*, 2004).

PROLIFERAÇÃO E MIGRAÇÃO DE VSMCs

A cascata de sinalização MAPK / ERK 1/2 é uma das principais vias de sinalização que induzem a proliferação de CMLs e a secreção adicional de fatores de crescimento (Seger, Krebs, 1995; Fernandes *et al.*, 2004). Membros da família das MAPKs participam da cascata de sinalização intracelular que traduz estímulos extracelulares em uma resposta celular, através da ativação de proteínas efetoras, tanto nucleares quanto citoplasmáticas, e consequentemente modificando a transcrição gênica (Yu *et al.*, 2007).

Quando o receptor de tirosina quinase é ativado, por exemplo, por fatores de crescimento, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o resultado é a

autofosforilação em resíduos de tirosina do domínio citoplasmático do receptor. O sinal é transferido para a oncoproteína p21Ras, que é associada ao receptor através de duas proteínas adaptadoras, Grb2 e SoS. A Grb2 através de seus domínios SH3, recruta o SoS que promove a troca GDP-GTP, formando um complexo ternário p21Ras associado a GTP, e assim a p21Ras liga-se a moléculas efetoras com a Raf quinase, que sofre autofosforilação e induz uma série de fosforilações de proteínas da via MAPK. Dentre as MAPKs destacam-se a ERK1/2, *c-Jun NH₂-terminal Kinase* (JNK1/2/3), e p38 *mitogen-activated protein kinase* (p38^{MAPK}). Essas três proteínas desempenham papel importante na regulação da expressão de vários genes, em particular *c-fos* e *c-jun*, envolvidos em respostas mitogênicas (Seger, Krebs, 1995; Chang, Karin, 2001).

A migração celular tem início a partir da estimulação de receptores na membrana celular que traduzem o sinal extracelular em uma série coordenada de eventos de remodelamento que alteram a estrutura do citoesqueleto de actina. Pode-se considerar que a migração ocorre em uma série de pelo menos quatro passos: 1) o citoesqueleto de actina sofre deformações, as quais lamelipódios, num processo conhecido como protusão; 2) adesões focais são promovidas pelos lamelipódios para criarem as conexões necessárias de matriz-celular-citoesqueleto para que a migração prossiga; 3) os filamentos de actina devem se engajar a miosina para promover uma contração ativa; e 4) a contração ocorre e as adesões na parte traseira e posterior da célula se dissipam para permitir a propulsão celular na direção do lamelipódio. Cada um desses passos envolve uma ação complexa entre a matriz extracelular e o citoesqueleto de actina (Alberts *et al.*, 2002).

O citoesqueleto de actina é regulado por múltiplas vias de sinalização, incluindo as MAPK, fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e Rho quinases. A grande maioria dos estímulos pró-migratórios conhecidos, incluindo fatores de crescimento e citocinas, ativam a via canônica da MAPK / ERK 1/2 nas CMLs. Ainda não foi completamente esclarecido o mecanismo que promove a migração celular, entretanto, sua modulação sobre fatores de transcrição efetua o controle sobre a expressão de fatores de crescimento pró-migratórios, proteínas de matriz extracelular e metaloproteinases, essenciais à migração celular (Cho *et al.*, 2000; Sharony *et al.*, 2006).

FATOR DE CRESCIMENTO DERIVADO DE PLAQUETAS

A denudação endotelial é o evento inicial da lesão vascular e ativação de VSMCs. O papel do endotélio no controle parácrino da estrutura e função vascular é muito bem estabelecido. Além de funcionar como uma barreira semipermeável, as células endoteliais produzem diversas substâncias vasoativas como endotelina-1 e angiotensina II, além de fatores de relaxamento do endotélio, dentre eles a prostaciclina e o NO, que atuam nos tecidos adjacentes. A desendotelização promove a suspensão da síntese dessas substâncias, causando prejuízos a homeostasia vascular, associada à significativa deposição de plaquetas e células do sistema imune sob o segmento dilatado (Caramori *et al.*, 1997).

Normalmente, após a lesão vascular, há intensa liberação de citocinas inflamatórias, como a interleucina-1 e fator de necrose tumoral, que estimulam a proliferação e síntese de matriz extracelular pelas VSMCs (Libby *et al.*, 1992; Hansson, 1993), além de múltiplos de fatores de crescimento, liberados devido tanto à ruptura celular quanto pela infiltração de células inflamatórias como monócitos e linfócitos T através da camada de plaquetas e fibrina, e que atuam como mitógenos para a célula (Forrester *et al.*, 1991).

O PDGF-BB é um fator de crescimento liberado extensivamente durante lesão endotelial, e desempenha um importante papel no desenvolvimento da lesão, atuando como agente mitótico e quimiotático (Wilcox, 1993). A presença de PDGF-BB em concentrações elevadas em regiões de placas ateroscleróticas e de lesões induzidas mecanicamente, e sua relação na expressão de proteínas de vias de sinalização, como MAPK / ERK1/2 e AKT, caracterizam o PDGF-BB como um dos mais importantes indutores da proliferação das CMLs (Silvestre-Roig *et al.*, 2013).

A administração de PDGF-BB aumenta a espessura intimal após desendotelização carotídea em ratos (Jawien *et al.*, 1992), e estimula a proliferação e migração celular logo após a lesão vascular, modulando o fenótipo celular para um estado pró-remodelamento, e, em menor extensão, estimulando à proliferação tardia, através de sua liberação a partir de plaquetas ativadas continuamente em áreas cronicamente desendotelizadas (Caramori *et al.*, 1997).

Foi demonstrado que o uso de antagonistas dos receptores de PDGF-BB bloqueiam a proliferação *in vitro* de VSMCs e o desenvolvimento de aterosclerose em modelos animais (Myllarniemi *et al.*, 1999; Andrae *et al.*, 2008).

Desta forma, como este fator de crescimento está intimamente ligado ao desenvolvimento de lesões vaso-proliferativas, estudos relacionados à inibição de seus efeitos são fundamentais.

2.Objetivos

2.1 OBJETIVO GERAL

Este estudo se propôs avaliar a atividade do complexo de rutênio doador de óxido nítrico *trans*-[Ru(NO)Cl(cyclam)](PF₆)₂, nomeado Ru(cyclam)NO, na inibição da resposta proliferativa e migratória de células musculares lisas vasculares (VSMCs) induzida pelo fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF-BB).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i. Avaliar a citotoxicidade do complexo para as VSMCs tratadas com os doadores de NO, Ru(cyclam)NO e nitroprussiato de sódio (SNP), por meio da avaliação da atividade funcional de organelas: mitocôndrias e lisossomos;
- ii. Avaliar por quimioluminescência a concentração de nitrato do meio de cultura de VSMCs tratadas com o Ru(cyclam)NO e SNP;
- iii. Determinar a atividade do complexo na proliferação de VSMCs induzida pelo PDGF-BB, por ensaios de incorporação de timidina triciada e pela expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA);
- iv. Determinar a atividade do complexo na migração de VSMCs induzida pelo PDGF-BB, por ensaios de migração *transwell* e *wound-healing*;
- v. Avaliar a ação do complexo sob a modulação fenotípica da célula muscular lisa induzida pelo PDGF-BB, por meio da análise da expressão da proteína contrátil α -SMA, marcadora do estado diferenciado/maduro da CML, e do fator de transcrição ELK1.

3. Métodos

3.1 OBTENÇÃO DO COMPOSTO *trans*-[Ru(NO)Cl(cyclam)](PF₆)₂

O composto de rutênio doador de óxido nítrico *trans*-[Ru(NO)Cl(cyclam)](PF₆)₂ (PM: 656,78g/mol), nomeado nos experimentos como por **Ru(cyclam)NO**, foi produzido e gentilmente cedido pelo grupo de Química Inorgânica e Analítica do Departamento de Química, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo – USP, sob coordenação do Prof. Dr. Elia Tfouni, e pelo Prof. Dr. Fábio Gorzoni Doro, do Departamento de Química Geral e Inorgânica da Universidade Federal da Bahia. Detalhes referentes à confecção do complexo foram descritas por Clark e colaboradores, no ano 2000, e por Tfouni e colaboradores, em 2006.

Experimentos iniciais foram realizados com o complexo nas concentrações 8 µM, 28 µM, 89 µM, considerando que as concentrações normalmente eluidas por sistemas de liberação de drogas são muito baixas, além de concentrações mais altas, como 260 µM e 800 µM. A citotoxicidade do complexo nessas concentrações demonstrou ser muito baixa, reduzindo em ao máximo 30% a porcentagem de células viáveis expostas ao complexo por 24 horas nos ensaios realizados. Entretanto, análises do potencial antiproliferativo do complexo nas concentrações mais baixas não foram muito positivas. As concentrações 8 µM e 28 µM reduziram em apenas 10% a proliferação celular após 24 horas de exposição, já a concentração 89 µM reduziu em 15% a proliferação, enquanto as concentrações 260 µM e 800 µM reduziram em média 30% a proliferação celular. Nesse sentido, como apenas as concentrações mais elevadas produziram melhores respostas, alteramos a faixa de concentração utilizada.

Adotamos as concentrações 100 µM, 500 µM, 1.000 µM e 1.500 µM, para ensaios de citotoxicidade, e para os demais experimentos foi utilizada apenas a concentração 100 µM, similar a de outros estudos *in vitro* com complexos nitrosilos (Mooradian *et al.*, 1995; Pollman *et al.*, 1996; Sokolowska *et al.*, 2003). Para dissolução de ambos o veículo utilizado foi meio completo DMEM com alta concentração de glicose (Sigma, St Louis, MO, USA), sem adição de soro fetal bovino (SFB). As soluções eram preparadas imediatamente antes do uso, filtradas em membrana Millipore 0,22µm, e mantidas sempre ao abrigo da luz.

3.2 LINHAGEM CELULAR E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Para obtenção de células musculares lisas vasculares (VSMCs), foram utilizados coelhos Nova Zelândia machos, com três meses de idade, e em média 2,0-2,5kg, eutanaziados por aprofundamento de anestesia com pentobarbital sódico por via intraperitoneal, na dose 100mg/kg. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEAA-IB/UNICAMP), protocolo nº 2916-1 (anexo). O segmento torácico da aorta foi dissecado e abundantemente lavado em solução estéril de EBSS (NaCl 17,1 mM; KCl 0,7 mM; KH₂PO₄ 0,05 mM; NaH₂PO₄ 0,04 mM; D-glicose 0,7 mM; pH 7,4). O tecido foi colocado em uma placa de petri para remoção do tecido conjuntivo e abertos longitudinalmente com uma tesoura, para a remoção das camadas endotelial, através da leve raspagem da parte interna da aorta com um bisturi. O tecido foi transferido para uma nova placa de petri e fragmentado extensivamente. Esses fragmentos foram então transferidos para um tubo plástico contendo 1 mL de solução de colagenase (Sigma) na concentração 1mg/mL, diluída em DMEM alta glicose, sem SBF, suplementado com penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL), glutamina (2 mM) e HEPES (10 mM), e incubadas durante quatro horas em estufa a 37°C, com atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após este período de digestão enzimática do tecido, os tubos foram centrifugados a 2.000 rpm, por 10 minutos, em temperatura ambiente, os sobrenadantes foram descartados e o pellet ressuspense em PBS estéril para remoção de resíduos de colagenase. O tubo foi novamente centrifugado e o procedimento de lavagem das células com EBSS foi repetido mais duas vezes, a fim de garantir a completa remoção da colagenase. O precipitado foi ressuspense em solução de tripsina-EDTA 0,25% (Sigma), e após 10 minutos de incubação a 37°C, foi adicionado 10 mL meio DMEM alta glicose suplementado com 10% de SFB (Cultilab, Campinas, Brasil) e, em seguida, o tubo foi novamente centrifugado a 2.000 rpm. Finalmente, o precipitado foi ressuspense e mantido em garrafas ou placas de cultura estéreis (TPP, Trasadingen, Switzerland), contendo meio completo de crescimento DMEM alta glicose, acrescido de 10% de SFB, 100U/ml de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, e então incubadas em atmosfera umedecida contendo 5% de CO₂, à temperatura constante de 37°C. A composição completa do meio de cultura utilizado pode ser verificada nos anexos.

A realização de ensaios imunocitoquímicos é importante para a caracterização das células obtidas em cultura, permitindo a identificação da expressão de proteínas específicas marcadoras do tipo celular. As células obtidas por cultura primária foram cultivadas em uma densidade baixa, 2.10^4 células/mL, sob lamínulas redondas estéreis (13 mm de diâmetro) e incubadas durante 24 horas nas condições ideais. Após este período o meio foi removido, as células foram lavadas em EBSS e fixadas em solução de paraformaldeído 4%, em temperatura ambiente, durante 10 minutos. As células foram então lavadas com EBSS e então permeabilizadas com solução de Triton-X 100 0,2%, por 5 minutos, e depois incubadas com BSA 5% por 1 hora para bloqueio de sítios inespecíficos. Em seguida, foi adicionado sob a lamínula 50 µl de anticorpo primário anti- α -SMA (coelho, policlonal, Abcam, Cambridge, MA, USA) ou anti-SM-MHC (camundongo, monoclonal, Abcam) diluído em BSA 1%, na proporção 1:200, e a lamínula incubada à 4°C, durante 12-16 horas. Após este período foram realizadas lavagens consecutivas com PBS para remoção de resíduos do anticorpo primário, e, em seguida, foi adicionado sob a lamínula 50 µl do anticorpo secundário fluorescente de cabra anti-IgG de coelho (Alexa Fluor 546) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), e a lamínula incubada em temperatura ambiente por 1 hora. Após lavagens das lamínulas para remoção do excesso do anticorpo, foi adicionado 50 µl de solução do corante Hoechst 33342 (2 µg/mL em PBS - Sigma), para marcação dos núcleos celulares, e as lamínulas incubadas por mais 1 hora a temperatura ambiente. Após novas lavagens, as lamínulas foram montadas sob lâminas de vidro, com o lado das células voltado para baixo e sob 20 µl de meio de montagem (glicerol 80% em PBS), e depois suas extremidades foram fixadas com esmalte. Como controle do ensaio, foram preparadas lamínulas onde se omitiu a incubação com o anticorpo primário. As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência Leica DM2000 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) (λ_{ex} 556 nm e 359 nm para Alexa Fluor 546 e Hoechst, respectivamente).

Confirmada a eficácia do procedimento de isolamento das CMLs, procedeu-se com a manutenção da cultura, contudo, a imunocitoquímica era realizada periodicamente, a fim de garantir a utilização apenas de CMLs diferenciadas. A troca do meio foi realizada a cada dois dias e no caso de subcultivo, o meio foi removido, as células foram lavadas com EBSS e tripsinizadas. Quando as células se soltavam, eram suspensas em meio DMEM com 10%

de SFB para neutralização da ação da tripsina, e, em seguida, centrifugadas a 2.000 rpm por 5 minutos, ressuspensas novamente em meio DMEM com 10% de SFB e antibióticos, e então contadas e distribuídas em várias placas ou garrafas.

Antes de todos os experimentos as células eram carenciadas por 24 horas. Para tal, o meio era removido, as células lavadas em EBSS, e em seguida adicionava-se meio DMEM suplementado com apenas 0,5% de SBF e antibióticos, e as células eram incubadas a 37°C e 5%CO₂.

Nos experimentos foram utilizadas células das passagens de 01 a 04.

3.3 ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR

Para análise da citotoxicidade induzida pelo composto Ru(cyclam)NO foram aplicadas os ensaios colorimétricos de incorporação do corante *neutral red* (NR) e da redução do MTT. A técnica de incorporação do NR fornece dados sobre a função metabólica celular, uma vez que determina a integridade lisossomal. Agentes citotóxicos que prejudicam as membranas, celular e lisossomal, inibem a captação e ligação do corante no interior dos lisossomos. A quantidade de NR incorporada é, portanto, proporcional à quantidade de células viáveis (Borenfreund, Puerner, 1984). Já a redução do sal de tetrazólio MTT para formazan pela enzima succinato desidrogenase (Slater, Sawyer, Straulli, 1963) é muito utilizada para ensaios de proliferação e sobrevivência celular, pois somente células viáveis são capazes de reduzir o MTT para o formazan (Mosmann, 1983).

3.3.1 ENSAIO DE REDUÇÃO DE MTT

As células foram plaqueadas em placas de cultura de 96 poços, 1.10⁴ células/poço, e incubadas por 24 horas. Após carenciamento, as células foram expostas aos doadores Ru(cyclam)NO e SNP, nas concentrações estabelecidas, por até 48 horas, sendo o meio repostado por meio fresco a cada 24 horas. Ao final do tratamento, o meio foi removido e foi adicionado novo meio contendo MTT 0,5 mg/mL (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide - Sigma). O MTT foi pré-incubado em meio DMEM a 37°C e filtrado em membrana Millipore (0,22 µm) antes do uso. A placa foi gentilmente agitada, e

incubada a 37°C e 5%CO₂ durante 4 horas. Após remoção do meio, e os critais de formazan foram resuspenso em DMSO, e a placa foi gentilmente agitada a 37°C. A absorbância da solução formada em cada poço foi aferida em um leitor de placas Biotek Microplate Reader (Biotek Instruments, Winooski, VT, USA), utilizando um filtro de 570 nm (Hatai *et al.*, 2000). Foram realizados três experimentos independentes, em pelo menos três replicatas.

3.3.2 ENSAIO DE INCORPORAÇÃO DO CORANTE NR

Para a determinação da viabilidade celular por método de quantificação da incorporação do corante NR, as células foram plaqueadas em placas de cultura de 96 poços, 1.10⁴ células/poço, e incubadas por 24 horas. Após carenciamento, as células foram expostas aos doadores Ru(cylam)NO e SNP, nas concentrações estabelecidas, por até 48 horas, sendo o meio repostado por meio fresco a cada 24 horas. Ao final do tratamento, o meio foi trocado por novo meio contendo 50 µg/mL de NR (Sigma). O corante foi pré-incubado em meio DMEM a 37°C, centrifugado a 1.500 rpm por 2 minutos, e filtrado em membrana Millipore (0,22 µm) antes do uso. Após 3 horas de incubação a 37°C, o meio foi removido, as células rapidamente lavadas em tampão PBS-Ca⁺² (NaCl 137 mM, KCl 26,8 mM, Na₂HPO₄ 8,1 mM, KH₂PO₄ 1,47 mM, CaCl₂ 1 mM, pH 7.4), para retirada do corante não incorporado, e a cada poço da placa foi adicionado 100 µl de solução fixadora (ácido acético glacial 1% em etanol 50%), para extração do corante incorporado. As placas foram agitadas suavemente durante 20 minutos e a absorbância da solução formada em cada poço foi aferida em um leitor de placas Biotek Microplate Reader (Biotek Instruments, Winooski, VT, USA), utilizando um filtro de 540 nm (Riddel *et al.*, 1986).

3.4 DETERMINAÇÃO DE NITRATO POR QUIMIOLUMINESCÊNCIA

A determinação de nitrato no meio de cultura foi realizada pela técnica de quimioluminescência NO/ozônio. Neste experimento, excepcionalmente, foi utilizado no cultivo celular o meio de cultura F-12 modificado por Coon (Sigma), já que o meio DMEM normalmente utilizado possui nitrato de ferro em sua formulação, que também seria detectado pelo método, gerando resultados errôneos. As células foram plaqueadas em

placas de cultura de 24 poços, 3.10^4 células/poço, em meio F-12 acrescido de 10% de SFB, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, e incubadas por 24 horas à 37°C e 5% CO₂. Após este período as células foram carenciadas por 24 horas, e então foram pré-tratadas, por 15 minutos, com o inibidor da enzima óxido nítrico sintase, L-NAME (250 µM - Sigma), para inibir a síntese de NO (Mabrouk *et al.*, 2000). Após o pré-tratamento, as células foram tratadas ou não com o complexo Ru(cyclam)NO e SNP, ambos na concentração 100 µM, na presença ou ausência do captador de NO Carboxy-PTIO (cPTIO, 50 µM - Sigma). A concentração de nitrato foi monitorada, através da remoção de uma alíquota do meio de cultura nos tempos indicados (figura 4). As amostras dos meios de culturas eram recolhidas e centrifugadas a 2.000 rpm, durante 15 minutos, à 4°C, e apenas o sobrenadante utilizado. As amostras foram injetadas em um vaso de reação contendo um agente redutor (0,8% de cloreto de vanádio em HCl 1N à 95°C) que converte o nitrato em NO, em quantidades equimolares. O NO é aspirado, utilizando gás hélio, para a câmara de quimioluminescência do Sievers Nitric Oxide Analyzer (GE Analytics, CO, USA). A detecção do NO decorre de sua ligação com o ozônio, emitindo fótons que se chocam contra uma superfície de uma célula fotomultiplicadora, que detecta o fóton e o converte em sinal elétrico. A corrente gerada é convertida por um conversor analógico-digital e analisada no software do equipamento. A área sob a curva gerada pela corrente elétrica corresponde à concentração de nitrato na amostra. A curva padrão foi preparada com solução de nitrato de sódio nas concentrações 5, 10, 25 e 50 µmol/L. Os valores de concentração de nitrato foram expressos em µmol/L. Foram realizados três experimentos independentes em duplicatas.

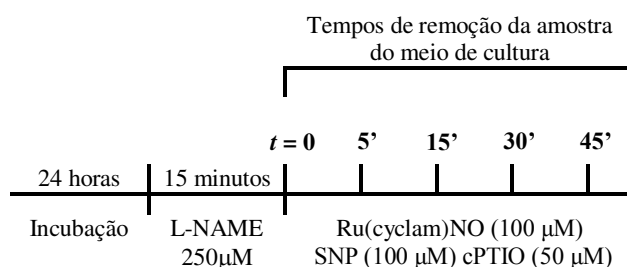


Figura 4. Representação esquemática do desenho experimental realizado para determinação da concentração de nitrato no meio. Após pré-tratamento, as células foram tratadas com Ru(cyclam)NO (100 µM), SNP (100 µM) e/ou cPTIO (50 µM), e alíquotas do meio de cultura foram recolhidas nos tempos zero, 5, 15, 30 e 45 minutos.

3.5 WESTERN BLOTTING

Para avaliação da expressão de proteínas específicas foi realizada a técnica de *western blotting*. Para obtenção das amostras, as células foram cultivadas em garrafas para cultura de 25 cm², e quando atingiram cerca de 80% de confluência foram carenciadas utilizando meio DMEM com 0,5% de SFB, durante 24 horas, e então tratadas. Para a análise de proteínas contrátil α -SMA, as células foram tratadas ou não com o complexo Ru(cyclam)NO (100 μ M) na presença ou ausência de PDGF-BB (20 η g/mL), durante 48 horas, sendo o meio repostado por meio fresco a cada 24 horas. Para análise da expressão do fator de transcrição ELK-1, as células foram pré-tratadas complexo Ru(cyclam)NO na concentração 100 μ M, e então tratadas ou não com PDGF-BB (20 η g/mL).

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

As amostras foram então incubadas a 100°C por 5 minutos juntamente com tampão de Laemmli 2x (azul de bromofenol 0.1%, fosfato de sódio 1 M, glicerol 50%; SDS 4%, 2-mercaptoetanol 10%) na proporção 1:1, e então submetidas à eletroforese em gel bifásico de poliacrilamida, que consiste em um gel de empilhamento (tris 0,5 M pH6.8, acrilamida/bis-acrilamida (30/0,8) 5%, SDS 0,1%) e um gel de resolução (tris 1,5 M pH8.8, acrilamida/bis-acrilamida (30/0,8) 8%, SDS 0,1%), polimerizados pela adição de TEMED e persulfato de amônio. A corrida foi efetuada entre 90 à 100V, por aproximadamente 3 horas, em meio à tampão de corrida (tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,4%), e em cada

gel foi adicionado 5 µl de um padrão de peso molecular (#1610373 Precision Plus Protein - Bio-Rad Laboratories). As amostras foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad Laboratories) durante 2 horas à 120V, em gelo, em meio à tampão de transferência (tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%). Após a transferência, a membrana foi bloqueada com solução de 5% de BSA em TBS-T (NaCl 1,6 M, tris 0,2 M, tween-20 0,1%), durante 40 minutos, em temperatura ambiente e sob agitação suave. Com este procedimento era prevenida a ligação de anticorpos a sítios inespecíficos na membrana de nitrocelulose.

A membranas foram incubadas com o anticorpo primário por 12-16 horas a 4°C, sob agitação suave, e após este período, a membrana foi lavada três vezes por cinco minutos em solução de TBS-T, e então incubada com o anticorpo secundário anti-IgG conjugado com HRP de camundongo (#1721011 - Bio-Rad Laboratories) ou coelho (#G21234 - Invitrogen Corporation, Camarillo, CA, USA), ambos na diluição 1:5000, durante 2 horas, à 4°C e sob agitação suave.

Nestes ensaios, foram utilizados os anticorpos primários específicos:

- Abcam #5694 (coelho, policlonal) contra α -SMA, na diluição 1:1000.
- Santa Cruz #SC355 (coelho, policlonal) contra ELK-1 (I-20), na diluição 1:1000.
- Santa Cruz #SC7979 (coelho, policlonal) contra phospho-ELK-1 (Ser 383), na diluição 1:1000.
- Santa Cruz #25778 (coelho, policlonal) contra GAPDH (FL-335), na diluição 1:5000.

As membranas eram novamente lavadas em TBS-T, por três vezes de 5 minutos, e então incubadas por 5 minutos com os reagentes de quimiluminescência (ácido p-coumárico 201 µM, luminol 1,24 mM, tris 1,5 M pH8.8, H₂O₂ 0,018%) e expostas por 3 minutos em um fotodocumentador Gbox iChemi XR (Syngene International Ltd, Bangalore, India). A intensidade das bandas imunorreativas foi avaliada por densitometria (ImageJ Software, NIH), sendo os valores de densitometria das bandas normalizados pelos

valores de densitometria do controle interno GAPDH. Para análise da fosforilação protéica, os valores de densitometria das proteínas fosforiladas foram normalizados pela expressão das proteínas totais.

A reutilização das membranas para ressonagem com outro anticorpo, para efeito de controle, era realizada utilizando solução de *stripping* (glicina 0,2 M, SDS 0,1%, tween-20 1%, pH 2.2). A membrana era submersa nessa solução e incubada em temperatura ambiente por 5 a 10 minutos, sob agitação suave, e então a solução era descartada e uma nova alíquota adicionada. Após mais 5 a 10 minutos, a membrana era lavada por duas vezes de 10 minutos em PBS, depois duas vezes de 5 minutos em TBS-T. A membrana era novamente incubada com os reagentes de quimiluminescência, para confirmar a completa remoção dos anticorpos primário e secundário, depois novamente lavada, por duas vezes de 5 minutos em TBS-T, e seguia-se o protocolo de hibridização com os anticorpos partindo da etapa de bloqueio.

Para todas as proteínas analisadas foram realizados três experimentos individuais em duplicatas.

3.6 ENSAIOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

3.6.1 INCORPORÇÃO DE TIMIDINA TRICIADA

Células foram plaqueadas em placas de cultura de 24 poços, $3 \cdot 10^4$ células/poço, e incubadas por 24 horas, à 37°C e 5% CO₂, depois foram carenciadas de SFB por 24 horas para sincronização do ciclo celular. Após o carenciamento, as células foram tratadas com o complexo Ru(cyclam)NO e na presença ou ausência de PDGF-BB (20 ng/mL), e incubadas por até 48 horas, sendo o meio repostado por meio fresco a cada 24 horas. Nas quatro horas finais de tratamento, foi adicionado ao meio 1 µCi/mL de timidina triciada ([³H]-timidina ou 3HT - Amersham Biosciences Inc, Buckinghamshire, UK), para incorporação ao DNA durante a síntese. As células foram então lavadas em PBS gelado, fixadas em metanol gelado por 5 minutos, em ácido tricloroacético 5% gelado por mais 10 minutos, e depois novamente em metanol por 5 minutos. Após a secagem das placas de cultura ao ar, foi realizada a lise celular utilizando 100 µl de solução de NaOH 0,5 M, durante 40 minutos,

em temperatura ambiente. As amostras de cada lisado celular foram adicionadas à vials de cintilação e submetidos à contagem da radioatividade em 3,0 mL de líquido de cintilação aquoso (Amersham), utilizando um contador de cintilação Beckman LS 6000 (Beckman Coulter Inc, Fullerton, CA, USA). Os resultados foram expressos em contagens por minuto (cpm). Foram realizados três experimentos independentes, em pelo menos três replicatas.

3.6.2 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PCNA

A proliferação também foi avaliada através da expressão antígeno nuclear de proliferação celular (*proliferation cell nuclear antigen* - PCNA), conforme descrito por Ning e colaboradores (2013). Após 24 horas de exposição ao complexo Ru(cyclam)NO na presença ou ausência de PDGF-BB (20 ng/mL), foi realizada a técnica de *western blotting*, conforme descrita anteriormente, utilizando o anticorpo primário contra PCNA (#Abcam29, camundongo, monoclonal) na diluição 1:1000, e anticorpo secundário anti-IgG conjugado com HRP de camundongo (#1721011 - Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), na diluição 1:5000. Após incubação com os reagentes de quimiluminescência, a intensidade das bandas imunorreativas foi avaliada por densitometria (ImageJ *Software*, NIH), sendo os valores de densitometria das bandas normalizados pelos valores de densitometria do controle interno GAPDH.

3.7 ENSAIOS DE MIGRAÇÃO CELULAR

A avaliação da migração celular foi realizada de acordo com técnicas descritas por Pescatore e colaboradores (2012), envolvendo dois ensaios, o de migração *transwell* e *wound healing*.

3.7.1 TRANSWELL

Para o ensaio de migração *transwell*, as células foram carenciadas por 24 horas e, após este período, tripsinizadas e ressuspensas em meio DMEM com 10% de SFB, apenas para inativação da tripsina. Após centrifugação a 2.000 rpm durante 5 minutos, as células foram novamente ressuspensas em meio DMEM, porém com apenas 0,5% de SFB. As células foram então contadas, e então foi adicionado à parte superior do inserto 5.10^4

células num volume final de 200 μ l, em meio DMEM 0,5% de SFB acrescido ou não do complexo Ru(cyclam)NO na concentração 100 μ M. À parte inferior do inserto, foram adicionados 500 μ l de DMEM 0,5% de SFB acrescido ou não do quimioatratador PDGF-BB (20 η g/mL), como demonstra a figura 5. As células foram incubadas em estufa a 37°C e 5% CO₂ durante 4 horas.

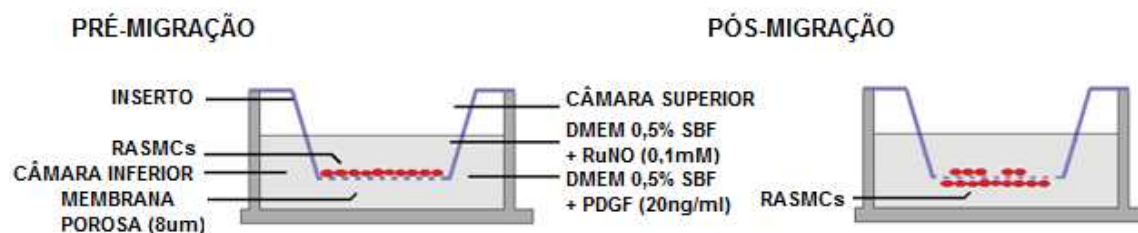


Figura 5. Representação esquemática do protocolo experimental utilizado para análise de migração quimiotática. Esquerda, as células são adicionadas à câmara superior de insertos com membranas porosas, na presença ou ausência do complexo Ru(cyclam)NO, e induzidas à migração para câmara inferior utilizando um meio condicionado com PDGF-BB (20 η g/ml). **Direita,** após o período de migração de quatro horas as células migrantes aderem à superfície inferior da membrana porosa.

Após o período de incubação, as células que não migraram foram delicadamente removidas com um swab, e as células que migraram na parte inferior da membrana foram fixadas em metanol e coradas pela técnica de hematoxilina-eosina. Após secagem *overnight* as membranas porosas dos insertos foram delicadamente removidas com o auxílio de um bisturi, e foram colocadas sob lâminas e, após adição de 5 μ l de uma solução de glicerol 80% em PBS, foram adicionadas lamínulas por sob as membranas, garantindo a integridade da membrana. Quatro campos randomizados por membrana foram utilizados para contagem do número de células que migraram em um microscópio invertido Leica DM2000 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Foram realizados três experimentos independentes em triplicatas.

3.7.2 WOUND-HEALING

No ensaio *wound healing*, um ensaio qualitativo para avaliação da migração celular, foram utilizadas placas de cultura de 12 poços com aproximadamente 2.10^5 células por poço. Após 24 horas de incubação as células foram carenciadas para minimização da proliferação celular. Foram realizadas duas escarificações lineares por poço, com o auxílio de uma ponteira estéril (10 μ l-*pipette tip*). Após lavagem para retirada das células suspensas, foi adicionado 1 mL de meio sem soro contendo o complexo Ru(cyclam)NO (100 μ M) e na presença ou ausência de PDGF-BB (20 η g/mL). Imagens contendo as duas margens das escarificações foram capturadas nos tempos zero e 16 horas, utilizando o microscópio invertido Leica DM2000 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Foram realizados três experimentos em triplicatas.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados submetidos à análise estatística estão representados como média \pm erro padrão dos valores. As diferenças entre as médias dos valores foram avaliadas pela análise de variância de uma via (*one way ANOVA*) para variáveis não-paramétricas, seguido de teste de Bonferroni, utilizando o *software* GraphPad Prism v.5. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,001$.

4. Resultados

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS VSMCs OBTIDAS POR CULTURA PRIMÁRIA

Com o objetivo caracterizar a cultura primária de VSMCs, foi realizado ensaio de imunocitoquímica para marcação da proteína contrátil α -SMA e SM-MHC, isoformas expressas somente na célula muscular lisa madura (Worth *et al.*, 2001).

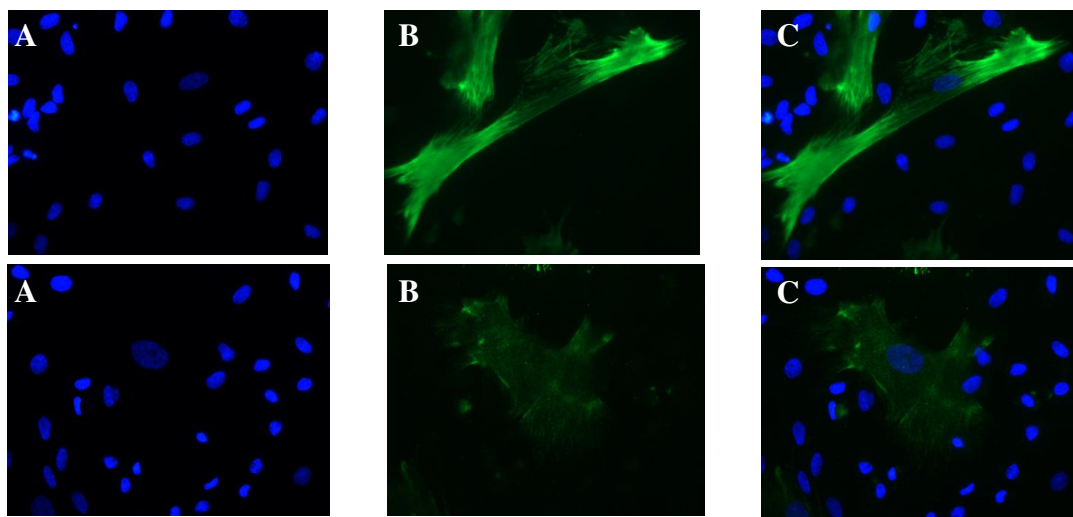


Figura 6. Imagem de microscopia de fluorescência de VSMCs por imunocitoquímica para a proteína α -SMA, em células nas passagens 01 (superior) e 03 (inferior). (A) Núcleo celular corado com Hoechst 33342 (azul); (B) Anticorpo primário anti- α -SMA e secundário contra coelho-FITC (verde); (C) Sobreposição das imagens A e B. (x400)

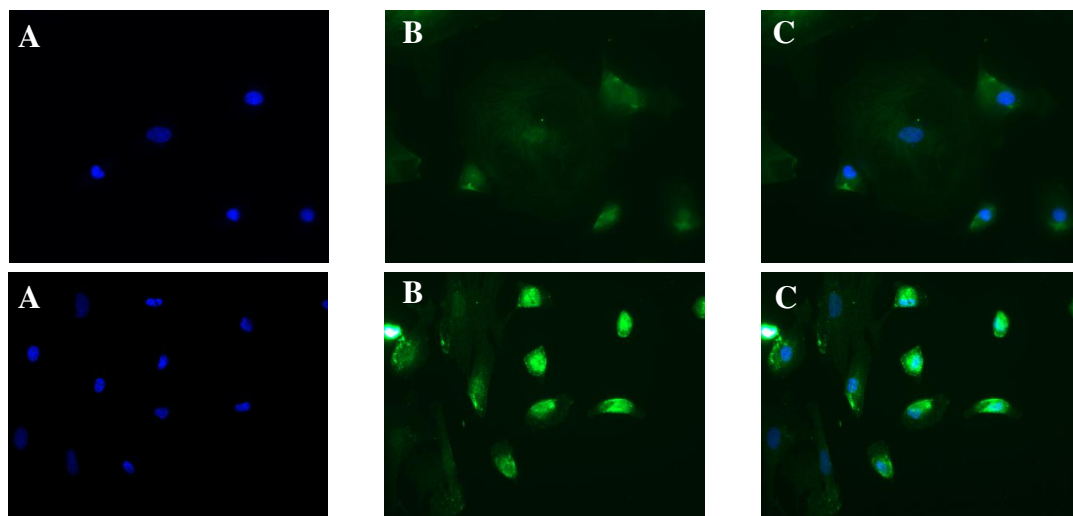


Figura 7. Imagem de microscopia de fluorescência de VSMCs por imunocitoquímica para proteína SM-MHC, em células nas passagens 01 (superior) e 03 (inferior). (A) Núcleo celular corado com Hoechst 33342 (azul); (B) Anticorpo primário anti-SM-MHC e secundário contra camundongo-FITC (verde); (C) Sobreposição das imagens A e B. (x400).

As VSMCs isoladas apresentaram imunomarcagem para α -SMA (figura 6) e SM-MHC (figura 7), demonstrando grande intensidade de fluorescência. Para confirmar que as marcações correspondem a células, o núcleo celular foi devidamente marcado com o corante Hoechst 33342.

4.2 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO COMPLEXO

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

As células tratadas sofreram perda gradativa de viabilidade, de maneira dose-dependente. Como demonstra a tabela 2, a citotoxicidade induzida pelo complexo Ru(cyclam)NO demonstrou-se significativamente menor em relação ao SNP ($p < 0,001$), sendo que a porcentagem de células viáveis na maior concentração avaliada (1.500 μ M) foi de $72\% \pm 5,51$ após 24 horas e $68\% \pm 5,8$ após 48 horas de exposição. Já exposição ao SNP, a cultura sofreu fortemente o efeito tóxico da droga, reduzindo a porcentagem de células viáveis para apenas $33\% \pm 7,36$ após 24 horas de exposição à Ru(cyclam)NO na concentração 1.500 μ M e, em 48 horas há eliminação de praticamente 100% da população celular, provavelmente devido à liberação simultânea de íons cianeto.

Tabela 2. Citotoxicidade do complexo Ru(cyclam)NO e SNP, expressa como a porcentagem de células viáveis em relação ao controle, avaliada pelo método de redução de MTT, após exposição por 24 e 48 horas.

Concentração	Ru(cyclam)NO		SNP	
	24h	48h	24h	48h
100 μ M	$97,5\% \pm 1,5$	$93,5\% \pm 3,0^*$	$93,5\% \pm 4,3$	$62,5\% \pm 2,9$
500 μ M	$89\% \pm 3^*$	$80\% \pm 4^*$	$75\% \pm 8$	$52,5\% \pm 4,3$
1.000 μ M	$78\% \pm 6^*$	$72\% \pm 5^*$	$59\% \pm 6$	$17,5\% \pm 2,7$
1.500 μ M	$72,5\% \pm 5,5^*$	$68\% \pm 6^*$	$33\% \pm 8$	0%

Dados representam média \pm E.P.M de três experimentos independentes. *, $p < 0,001$ vs SNP.

De forma semelhante aos experimentos de redução de MTT, a toxicidade induzida pelo complexo quando avaliada pelo método de incorporação do corante NR foi muito menor que a induzida por SNP, como demonstra a tabela 3. Neste caso, a viabilidade, avaliada pela integridade lisossomal, foi reduzida a $68\% \pm 5,4$ para o complexo Ru(cyclam)NO e $56,5\% \pm 7,5$ para o SNP após 24 horas de exposição, na concentração $1.500\mu\text{M}$, e, na exposição por 48 horas, observou-se a redução para $72\% \pm 1,7$ na porcentagem de células viáveis na presença do complexo Ru(cyclam)NO, enquanto nas células tratadas com SNP observou-se completa perda de viabilidade.

Tabela 3. Citotoxicidade do complexo Ru(cyclam)NO e SNP, expressa como a porcentagem de células viáveis em relação ao controle, avaliada pelo método de incorporação de NR, após exposição por 24 e 48 horas.

Concentração	Ru(cyclam)NO		SNP	
	24h	48h	24h	48h
100 μM	$97\% \pm 2$	$97,5\% \pm 1,5$	$87\% \pm 5^*$	$59,5\% \pm 4,2$
500 μM	$89\% \pm 4^{**}$	$83\% \pm 2$	$81\% \pm 7^*$	$44,2\% \pm 7,2$
1.000 μM	$81,5\% \pm 4,6^*$	$75\% \pm 5$	$70\% \pm 7^*$	$15\% \pm 4$
1.500 μM	$68\% \pm 5^*$	$72\% \pm 2$	$56,5\% \pm 7,5^*$	0%

Dados representam média \pm E.P.M de três experimentos independentes. *, $p < 0,001$ vs SNP.

4.3 DETERMINAÇÃO DE NITRATO NO MEIO

O pré-tratamento das células com L-NAME inibe a síntese de NO pela enzima óxido nítrico sintase, e, portanto, as concentrações determinadas são referentes apenas ao nitrato derivado do metabolismo do NO liberado do complexo. Nota-se, na figura 8, que as concentrações de nitrato se elevam logo após a adição do complexo ao meio celular, atingindo o pico de liberação em trinta minutos, onde a concentração de nitrato atinge $13 \mu\text{M} \pm 4,8$. Sua capacidade de liberação foi mais lenta em relação ao SNP, cujo ápice de liberação se deu em cinco minutos $13 \mu\text{M} \pm 3,7$, e foi mantido por quinze minutos ao menos.

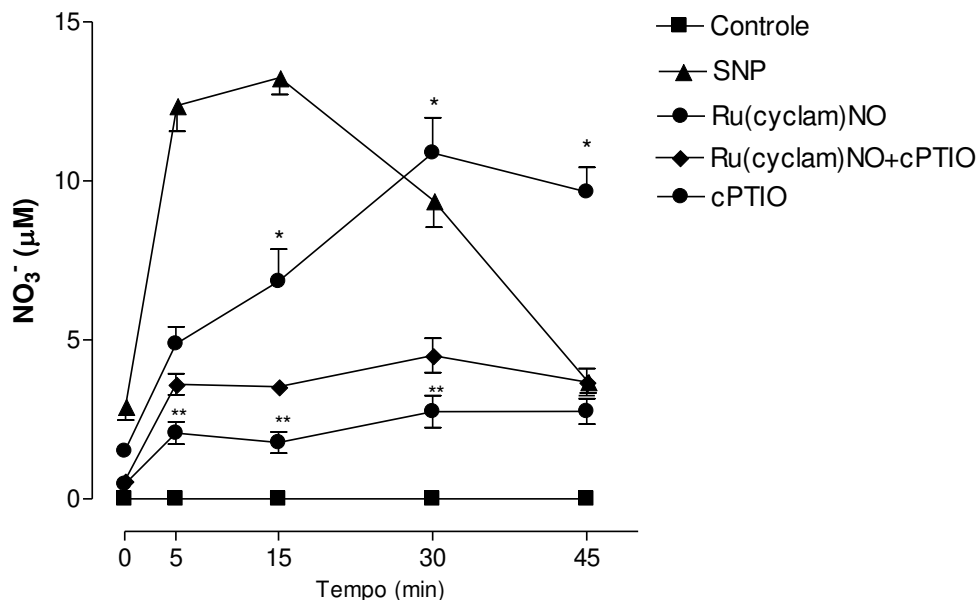


Figura 8. Curva temporal da concentração de nitrato no meio de cultura de VSMCs tratadas, avaliada pelo método de quimioluminescência. As células foram pré-tratadas com L-NAME (250 µM) e então tratadas com SNP (100 µM) ou com o complexo Ru(cyclam)NO (100 µM) na presença e ausência de cPTIO (50 µM). Alíquotas do meio de cultura foram recolhidas nos tempos zero, 5, 15, 30 e 45 minutos de exposição, e as concentrações de nitrato mensuradas por reação de quimioluminescência ozônio/NO no Sievers NOA. Concentração em resposta ao tempo de exposição a Ru(cyclam)NO (100 µM), SNP (100 µM) e cPTIO (50 µM). Dados representam média ± E.P.M de três experimentos independentes. **Controle**, VSMCs sem estímulo. *, p < 0,001 vs Ru(cyclam)NO; **, p < 0,001 vs Ru(cyclam)NO+cPTIO.

O cPTIO é um radical estável que oxida o NO para gerar dióxido de nitrogênio e 2-fenil-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil (PTIO) (Millar, Thiernemann, 2002). Este radical é um sequestrador (*scavenger*) da forma radicalar do NO (Akaike *et al.*, 1993), portanto sua ação bloqueia a resposta para o NO exógeno (Rand, Li, 1995). Após o tratamento com cPTIO as concentrações de nitrato foram similares ao controle, em todos os tempos analisados. Nos tratamentos com Ru(cyclam)NO + cPTIO, foi observado que as concentrações de nitrato foram reduzidas (p < 0,001), com resposta máxima de 4,5 µM ± 4,0, sendo apenas parcialmente bloqueadas.

4.4 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DO COMPLEXO NA PROLIFERAÇÃO CELULAR DE VSMCs INDUZIDA POR PDGF-BB

O ensaio de incorporação de timidina triciada foi aplicado para determinação da proliferação celular em resposta a diferentes tratamentos. Como demonstra a figura 9, o tratamento com PDGF-BB estimulou significativamente a proliferação das células em comparação ao grupo controle ($p < 0,001$), enquanto o tratamento concomitante com Ru(cyclam)NO reduziu significativamente a proliferação induzida por PDGF-BB ($p < 0,001$ vs PDGF-BB).

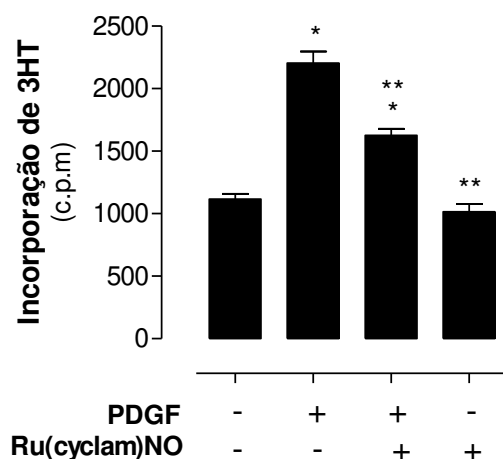


Figura 9. Inibição da resposta proliferativa de VSMCs induzida pelo PDGF-BB após 48 horas de tratamento. (A) Análise da proliferação pela incorporação de nucleotídeo marcado [3 H]-timidina (3HT- 1 μ Ci/ml) ao DNA durante a replicação, em células tratadas com o complexo Ru(cyclam)NO (100 μ M), na presença ou ausência de PDGF-BB (20 η g/ml). Dados representam média \pm E.P.M de três experimentos independentes. **Controle**, VSMCs sem estímulo. *, $p < 0,001$ vs Controle; **, $p < 0,001$ vs PDGF-BB.

A expressão do PCNA (figura 10) no grupo PDGF-BB foi aumentada em mais de duas vezes quando comparada a expressão no controle. O tratamento concomitante com Ru(cyclam)NO inibiu significativamente o aumento da expressão de PCNA. O tratamento somente com o complexo apresentou valores similares ao controle. Esses resultados demonstram que o tratamento com o complexo inibe a proliferação de VSMCs induzida por PDGF-BB.

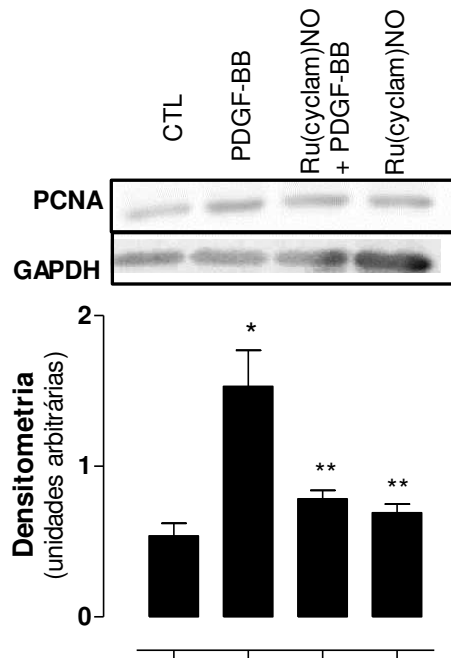


Figura 10. Inibição da resposta proliferativa induzida por PDGF-BB em VSMCs após 48 horas de tratamento, avaliada pela expressão do marcador de proliferação PCNA. *Western blotting* representativo de três experimentos independentes da análise da expressão da proteína PCNA em células tratadas com o complexo Ru(cyclam)NO (100 μ M), na presença e ausência de PDGF-BB (20 η g/ml). A quantificação da proteína PCNA foi normalizada em correspondência a expressão da proteína GAPDH. Dados representam média \pm E.P.M de três experimentos independentes. CTL, VSMCs sem estímulo. *, $p < 0,001$ vs CTL; **, $p < 0,001$ vs PDGF-BB.

4.5 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DO COMPLEXO NA MIGRAÇÃO CELULAR DE VSMCs INDUZIDA POR PDGF-BB

A resposta do tratamento com o complexo Ru(cyclam)NO na migração celular induzida por PDGF-BB foi avaliada pelos ensaios de *transwell* e *wound-healing*. No ensaio *transwell*, o PDGF-BB aumentou significativamente o número de células transmembrana em comparação ao controle ($p < 0,001$), enquanto que o tratamento com Ru(cyclam)NO inibiu significativamente a migração induzida por PDGF-BB ($p < 0,001$ vs PDGF-BB). O tratamento com o complexo isolado reduziu em menor escala na migração transmembrana das VSMCs (figura 11).

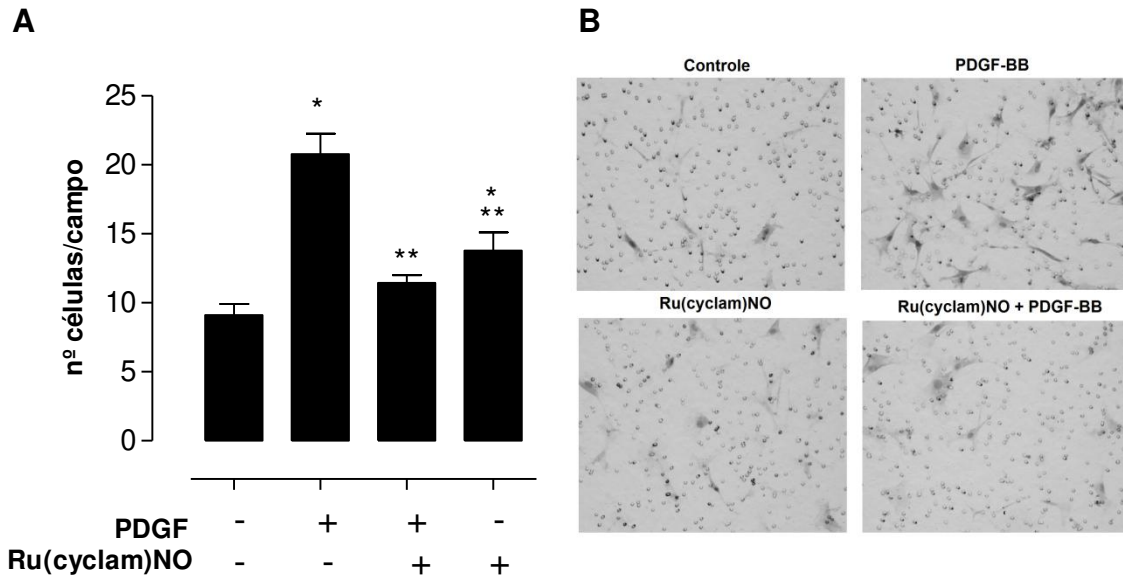


Figura 11. Inibição da resposta migratória induzida por PDGF-BB em VSMCs, avaliada por ensaio de migração *transwell*. Células foram ressuspensas e adicionadas à câmara superior de insertos com membranas porosas (8 μ m), na presença do complexo Ru(cyclam)NO (100 μ M), e induzidas à migração durante 4 horas pela adição de PDGF-BB à câmara inferior do inserto. Células transmembrana foram fixadas e coradas com HE. **(A)** Contagem direta das células transmembrana, em quatro campos aleatórios por amostra e **(B)** figura representativa da migração após 4h de exposição ao PDGF-BB (x200). Dados representam média \pm E.P.M de três experimentos independentes. **Controle**, VSMCs sem estímulo. *, $p < 0,001$ vs Controle; **, $p < 0,001$ vs PDGF-BB.

Utilizou-se método alternativo para avaliação da motilidade celular, onde também se examinou o efeito do complexo Ru(cyclam)NO na migração de VSMCs induzida por PDGF-BB por meio de ensaio de migração não direcional *wound-healing* (Liang, Park, Guan, 2007). Como demonstra a figura 12, a migração estimulada por PDGF-BB para a área da escarificação foi intensa, quase fechando completamente a escarificação em 16 horas, enquanto o tratamento concomitante com Ru(cyclam)NO retardou o processo de fechamento induzido por PDGF-BB.

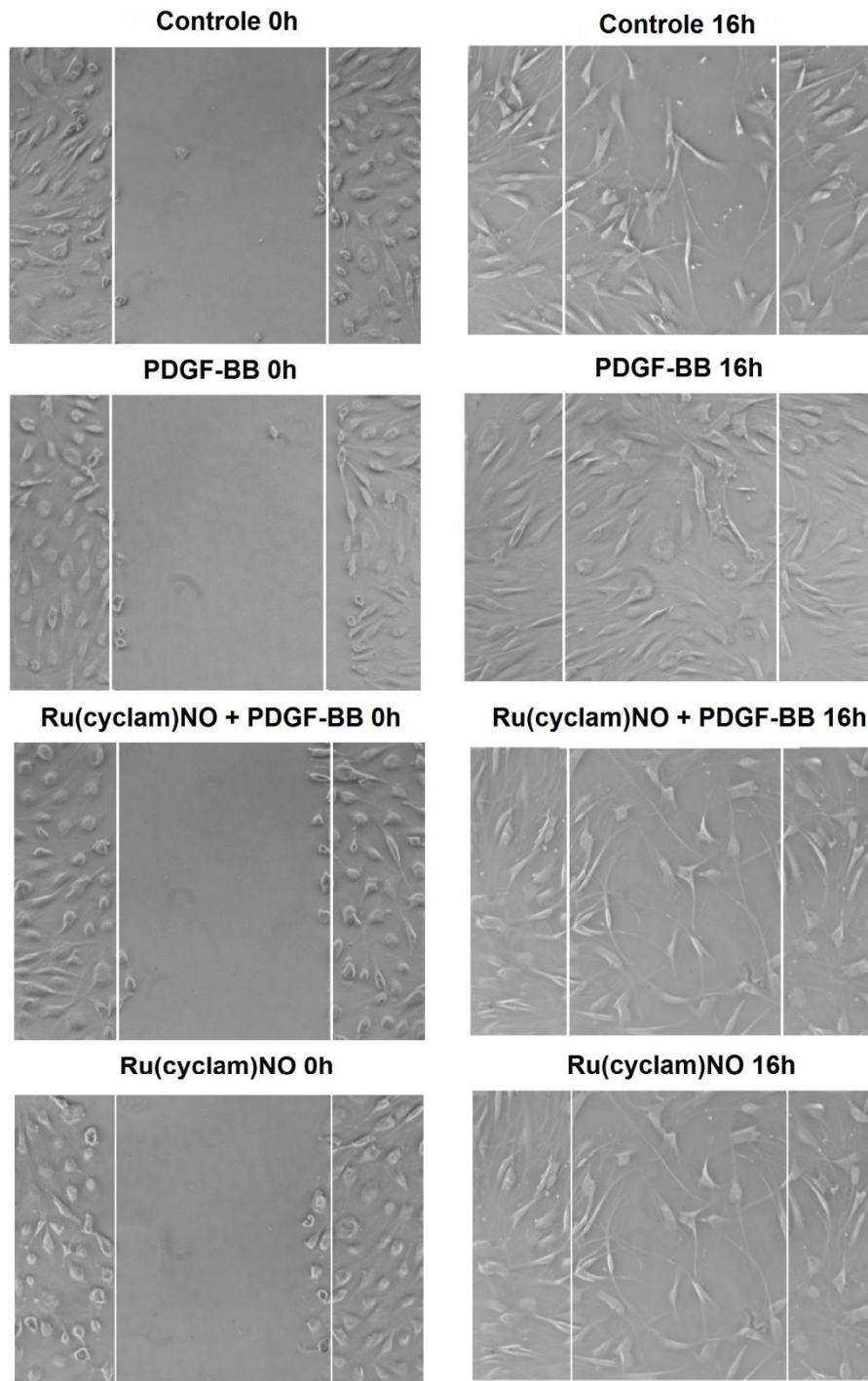


Figura 12. Inibição da resposta migratória induzida por PDGF-BB em VSMCs, avaliada através de ensaio de migração *wound healing*. Após as células adquirirem total confluência, foram carenciadas por 24 horas e então as monocamadas foram escarificadas utilizando uma ponteira e, após lavagem, as células foram tratadas por 16 horas com o complexo Ru(cyclam)NO (100 μ M), na presença ou ausência de PDGF-BB (20 η g/mL). As imagens foram capturadas no tempo zero, logo após escarificação, e após 16 horas de estímulo (x40). **Controle**, VSMCs sem estímulo.

4.6 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DO COMPLEXO NA MODULAÇÃO DO FENÓTIPO DA VSMCs INDUZIDA POR PDGF-BB

A redução da contratilidade está diretamente relacionada à modulação do fenótipo das VSMCs, de maduro/diferenciado para sintético/proliferativo, onde há redução da expressão de proteínas contráteis, em especial a proteína α -SMA, característica do fenótipo maduro/diferenciado das VSMCs. A indução do fenótipo proliferativo nas células tratadas com PDGF-BB foi confirmada pela redução significativa da expressão da proteína α -SMA ($p < 0,001$) em até 60,0% (± 17), como demonstra a figura 13, enquanto nas células tratadas com Ru(cyclam)NO houve inibição significativa desta resposta ($p < 0,001$ vs PDGF-BB). O tratamento isolado com o complexo manteve a expressão da proteína α -SMA em níveis similares ao controle.

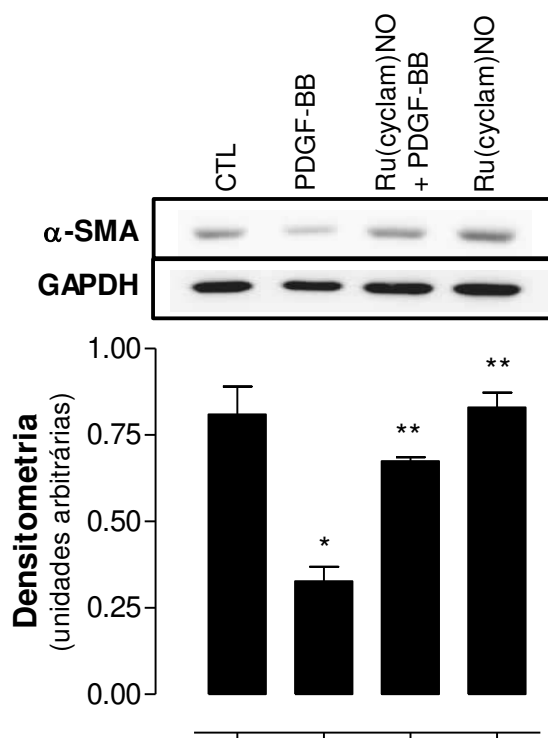


Figura 13. Expressão da proteína contrátil α -SMA, marcadora do fenótipo maduro/diferenciado, em VSMCs tratadas, avaliada pela técnica de *western blotting*. As células foram carenciadas e então incubadas na presença do complexo Ru(cyclam)NO (100 μ M), na presença ou ausência de PDGF-BB (20ng/ml). Os lisados celulares foram obtidos após 48 horas de tratamento, sendo o meio repostado a cada 24 horas. *Western blotting* representativo de três experimentos independentes. A quantificação da proteína foi normalizada em correspondência a expressão da proteína GAPDH. CTL, VSMCs sem estímulo. *, $p < 0,001$ vs CTL; **, $p < 0,001$ vs PDGF.

Amostras de VSMCs tratadas com o complexo Ru(cyclam)NO (100 μ M), na presença ou ausência de PDGF-BB (20 η g/ml), também foram submetidas a *western blotting* para avaliar o envolvimento do fator de transcrição ELK-1 na modulação do fenótipo da VSMCs induzida pelo PDGF-BB, verificado pelo aumento de sua fosforilação em serina-383, pelo aumento da densidade das bandas de p-ELK-1 (figura 14), sendo significativamente superior ao controle ($p < 0,001$). O conteúdo de ELK-1 total não se alterou. O pré-tratamento com Ru(cyclam)NO determinou atenuação significativa da resposta observada no tratamento com PDGF-BB ($p < 0,001$). Nota-se que o complexo Ru(cyclam)NO, isoladamente, também induziu aumento na fosforilação de ELK-1.

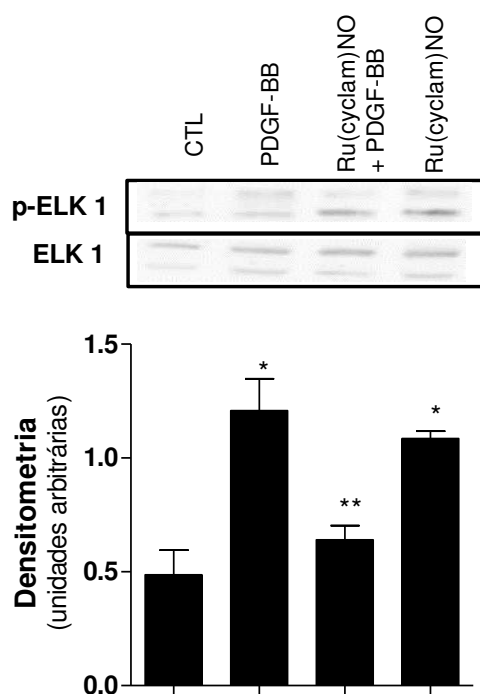


Figura 14. Expressão do fator de transcrição ELK-1 em resposta ao tratamento com o complexo Ru(cyclam)NO, na presença ou ausência de PDGF-BB. Análise da resposta do tratamento com o complexo Ru(cyclam)NO (100 μ M) na prevenção da fosforilação do fator de transcrição ELK-1 induzida pelo tratamento com PDGF-BB (20 η g/ml). *Western blotting* representativo de três experimentos independentes da análise da expressão da proteína ELK-1 total e fosforilada. A quantificação das proteínas foram normalizadas em correspondência a expressão da proteína GAPDH. CTL, VSMCs sem estímulo. *, $p < 0,001$ vs CTL; **, $p < 0,001$ vs PDGF.

5. Discussão

O NO é uma molécula de interesse químico e biológico, que tem nos últimos anos estimulado a comunidade científica, principalmente por suas funções bioquímicas e possíveis aplicações terapêuticas. Sua molécula, caracterizada como o menor mensageiro biológico, não depende de transportadores específicos nem de canais intracelulares, difundindo-se livremente pela célula. Diversos estudos demonstram sua capacidade de prevenção da ativação e adesão plaquetária, leucocitária, e consequente redução da inflamação, além da inibir a proliferação e migração de células musculares lisas, e estimular o crescimento de células endoteliais, essenciais à cicatrização do endotélio após lesões (Ahanchi *et al.*, 2007; de Mel *et al.*, 2008).

Por suas características multifuncionais, o NO emergiu como um potencial agente terapêutico, e diversos estudos utilizando compostos doadores de NO tem sido desenvolvidos nos últimos anos, com destaque para os nitrosilos complexos de rutênio.

Os complexos de rutênio são moléculas especialmente interessantes, visto que apresentam baixa toxicidade, são solúveis em água, são estáveis em relação à exposição ao oxigênio, liberam NO de forma modulada e também apresentam potencial de redução acessível a diversos redutores presentes em meio fisiológico (Borges *et al.*, 1998, 2004). Possuem boa aplicação biológica, como, por exemplo, agente imunossupressor (Bastos *et al.*, 1998), antibiótico (Navarro *et al.*, 1997), anticancerígeno (Sava, Bergamo, 2000), antifúngico (de Lima *et al.*, 2003) e como agente parasitário (Silva *et al.*, 2010).

A baixa toxicidade dos complexos de rutênio é uma de suas atrativas particularidades. Esta se deve, em parte, à semelhança das propriedades físico-químicas deste íon metálico com o íon ferro (Allardyce, Dyson, 2001). A toxicidade de um metal também está relacionada com seu estado de oxidação, e o rutênio tem a habilidade de atingir vários estágios de oxidação (II, III e IV) em meio fisiológico, provavelmente devido às reações redox causadas pela enzima citocromo oxidase, pela glutatona ou pelo ascorbato (Allardyce, Dyson, 2001; Tfouni *et al.*, 2012).

Dessa forma, devido ao conhecimento dessas propriedades, diversos complexos tem sido o foco do grupo de pesquisa do Prof. Dr. Elia Tfouni e do Prof. Dr. Douglas W.

Franco, que ao longo da última década tem sintetizado, caracterizado e estudado propriedades de nitrosilos complexos de rutênio, sendo que, junto ao nosso laboratório tem produzido diversos estudos na busca de suas aplicações biológicas no âmbito cardiovascular. Neste estudo, avaliamos as respostas do nitrosilo complexo de rutênio, Ru(cyclam)NO, em VSMCs frente a um estímulo que induz a modulação fenotípica dessas células e estimula de forma descontrolada sua proliferação e migração.

Como o possível uso terapêutico de uma droga está condicionado, além da verificação de sua atividade biológica, ao estudo de sua toxicidade, inicialmente realizamos protocolos experimentais para definir o potencial citotóxico de Ru(cyclam)NO para as VSMCs.

A citotoxicidade de um agente pode ser avaliada por diferentes métodos, os quais analisam, de maneira geral: 1) o nível de integridade da membrana; 2) nível de síntese de macromoléculas; 3) nível do crescimento celular e 4) nível da atividade funcional de organelas (Mitchell *et al.*, 1989). Dentre os ensaios supracitados, neste estudo foram realizados ensaios que avaliam a integridade lisossomal e a atividade mitocondrial através da incorporação do corante NR e da redução do MTT, respectivamente, após exposição à droga.

Os resultados obtidos nos ensaios realizados, sumarizados nas tabelas 2 e 3, indicaram a baixa toxicidade do Ru(cyclam)NO em relação ao SNP, considerando que a cultura tem uma perda gradativa de viabilidade celular, sobretudo o fato de que na presença do SNP o efeito sobre a cultura de células foi muito mais intenso, decaindo a zero o número de células viáveis. Tal fato pode ser explicado devido ao SNP ser um doador que requer metabolização para liberar NO. Esta reação é catalisada por enzimas presentes na membrana plasmática e é acompanhada pela liberação de íons cianeto como produto de biotransformação deste doador, e cujo acúmulo é considerado altamente tóxico (Bates *et al.*, 1991). Enquanto que o complexo Ru(cyclam)NO requer a presença de redutores no meio para liberar o NO, e, conseqüentemente, não gera metabólitos tóxicos. Em comparação ao grupo controle, a toxicidade de Ru(cyclam)NO na maior concentração avaliada não ultrapassou 32% em 24 ou 48 horas de exposição, em ambos os ensaios.

Os resultados também indicaram que não existe uma seletividade do complexo em relação a organelas, uma vez que os valores de redução de viabilidade nos dois ensaios foram muito próximos.

O valor de IC_{50} para o complexo Ru(cyclam)NO em células VSMCs não foi encontrado na faixa de concentração utilizada. Diversos estudos com nitrosilos complexos de rutênio tem demonstrado a baixa toxicidade desta classe de complexos, e em cultura de células V79 (fibroblastos de pulmão de hamster chinês) já foi demonstrado que a toxicidade do complexo Ru(cyclam)NO se apresenta por volta de 3,0mM (Torsoni *et al.*, 2002), e, em células de melanoma murino (Melan-a), o IC_{50} deste complexo foi de 9,8mM (Gomes, Espreadico, Tfouni, 2007).

Dessa forma, os resultados indicaram que o complexo Ru(cyclam)NO pode ter sua aplicação experimental com segurança.

Avaliamos também a capacidade de liberação de NO pelo complexo. Como citado anteriormente, a liberação do NO a partir do complexo ocorre após redução monoeletrônica do íon nitrosil por agentes redutores. Durante este estudo, o meio de cultura não foi suplementado com agentes redutores, como, por exemplo, o ácido ascórbico, utilizado em alguns experimentos *in vitro* com nitrosilos de rutênio (Zanichelli *et al.*, 2007). Entretanto, já foi demonstrado em estudos com cultura de células de HepG2 (células de carcinoma de fígado) e em mitocôndrias isoladas a capacidade de liberação de NO por nitrosilos de rutênio mediada por processos de redução nas mitocôndrias, envolvendo a oxidação do NAD(P)H, não sendo necessária a presença de outros redutores no meio (Pestana *et al.*, 2009).

Após sua liberação, o NO é rapidamente inativado e convertido aos metabólitos nitrato e/ou nitrito (Moncada *et al.*, 1991). A quantificação precisa e direta do NO é muito difícil devido a sua curta meia vida e alta reatividade. Uma das formas mais utilizadas é, portanto, a determinação de seus produtos mais estáveis, indicadores reconhecidos de sua biodisponibilidade (Lundberg, Weitzberg, 2005). Assim, no presente estudo a quantificação temporal de metabólito nitrato, a partir da análise do meio de cultura das VSMCs tratadas,

foi realizada através do método de quimiluminescência NO/ozônio. Neste ensaio foi possível observar aumento significativo dos níveis de nitrato após os primeiros cinco minutos de tratamento. A concentração atingiu o ápice após 30 minutos e manteve-se elevada. Esse resultado, apesar de indireto, nos permite avaliar a liberação de NO pelo complexo e, observando também os resultados obtidos com o doador SNP, pode-se estimar que a liberação de NO pelo complexo Ru(cyclam)NO é mais lenta, sendo isto um importante diferencial entre esses dois compostos, já que uma das limitações do uso terapêutico do SNP é justamente a rápida liberação de NO (Yakazu *et al.*, 2001).

Observamos que as concentrações de nitrato referente ao metabolismo do NO liberado do complexo na presença do captador cPTIO foram apenas parcialmente reduzidas. Nesse sentido, podemos considerar que a velocidade de captação de NO pelo cPTIO pode ser mais lenta em relação à liberação de NO pelo complexo, e a possibilidade de pré-incubação com o sequestrador deve ser considerada, ou ainda que a concentração utilizada no tratamento, que não foi equimolar, pode não ter sido suficiente para o bloqueio desta resposta.

Uma vez caracterizada a citotoxicidade do complexo e de sua capacidade de liberação de NO, iniciamos a análise de seus efeitos sobre a proliferação e migração de VSMCs.

Sabe-se que a integridade do endotélio é essencial à manutenção da homeostase dos vasos, e regula múltiplas funções como o controle do tônus, a permeabilidade, e como fonte primária NO. O rompimento do endotélio é o fator primário para a ativação de CMLs. Há extensa liberação de citocinas inflamatórias e fatores de crescimento que vão promover a proliferação e migração de CMLs, além da ativação e adesão de leucócitos e plaquetas e redução da biodisponibilidade de NO. A modulação fenotípica das CMLs eleva a síntese de matriz extracelular causando espessamento do lúmen resultando em hiperplasia intimal, oclusões e frequentes episódios de trombose (Naghavi *et al.*, 2013).

Diversos estudos demonstraram a capacidade do NO na prevenção dessa resposta (Ahanchi *et al.*, 2007; de Mel *et al.*, 2008), e o desenvolvimento de agentes capazes de

liberar níveis fisiológicos de NO de forma modulada representam um grande avanço na contenção de lesões endoteliais, processos trombóticos e o desenvolvimento de hiperplasia intimal, eventos chave no desenvolvimento de algumas condições como as doenças vasculares oclusivas (Naghavi *et al.*, 2013).

O uso de modelos experimentais *in vivo* para a análise das propriedades biológicas desse complexo seria muito interessante, porém, apesar da grande importância dos ensaios *in vivo*, esse tipo de abordagem experimental vem sendo cada vez mais criticada pelo grande número de animais utilizados e diferenças entre as espécies. Na tentativa de solucionar este problema, várias estratégias de estudo *in vitro* estão sendo analisados e recomendados para análise de novas substâncias, em especial para estudos pré-clínicos, onde a cultura de células se apresenta como uma ferramenta atraente (Cazarin *et al.*, 2004).

Estudos realizados em cultura de células são atrativos por diversos motivos, especialmente pelo fácil acesso à observação detalhada, diferentemente do estudo em animais. Porém algumas desvantagens estão presentes no método: 1) a senescência celular limita o número de expansões das células originadas de tecidos normais; 2) algumas células podem escapar da senescência e se dividir continuamente de modo similar ao de uma linhagem celular, e 3) existe o alto risco de contaminação celular, já que os tecidos consistem de uma mistura de tipos celulares que precisam ser removidos (Freshney, 1987; Cedar, 2006).

No caso da aorta, utilizada neste estudo, a ampla distribuição de células endoteliais da camada íntima e de fibroblastos da camada adventícia aumenta o risco de contaminação celular nas culturas de CMLs. Por outro lado, a camada média é constituída exclusivamente de CMLs, garantindo uma cultura mais pura. Este problema pode ser amenizado com a marcação de proteínas que caracterizam o aparato contrátil do músculo liso através do método de imunocitoquímica, o qual identifica as células em cultura e diferencia o fenótipo (Worth *et al.*, 2001).

Nas VSMCs utilizadas no estudo, a constante determinação da expressão das proteínas contráteis α -SMA e SM-MHC, características de CMLs maduras, permitiu a

avaliação do estado das células em cultura, sendo realizado a cada mudança de passagem celular. Para evitar a perda do fenótipo devido à senescência da cultura, foram utilizadas células até a quarta passagem.

A diversidade fenotípica da CML sugere que a composição celular e funcional é distinta em diferentes órgãos e mesmo que a contração seja a principal função desta célula, sua capacidade plástica em resposta a estímulos mitogênicos pode ser traduzida como um mecanismo de sobrevivência, por exemplo, na intenção de reparar um dano vascular. Entretanto, a CML pode adaptar-se ao fenótipo proliferativo/sintético caracterizado por aumento de proliferação celular, migração e síntese de matriz extracelular, contribuindo para o desenvolvimento de patologias (Ross, 2003).

Normalmente, após a lesão endotelial, há intensa liberação de múltiplos de fatores de crescimento, que vão se ligar aos receptores na membrana plasmática desencadeando diversas cascatas de sinais intracelulares que, integrados no núcleo, resultam na expressão de proteínas necessárias à divisão e proliferação celular (Libby *et al.*, 1992; Hansson, 1993). Níveis elevados de PDGF-BB foram observados em condições de remodelamento vascular (Yoo *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2013; Ning *et al.*, 2013), e sabe-se que este fator pode induzir a modulação fenotípica da VSMCs, resultando em aumento da proliferação, migração e redução da contratilidade *in vitro* (Hirst *et al.*, 2000).

Por outro lado, vários grupos de pesquisa demonstraram os mecanismos intracelulares mediadores da inibição da proliferação da VSMCs induzida por NO (Wink, Mitchell, 1998 Costa, Aussrey, 2005; Ning *et al.* 2013), dependentes ou não de GMPc, incluindo atenuação da progressão do ciclo celular (Sakar *et al.*, 1997) ou a S-nitrosilação de proteínas relevantes a proliferação celular (Blachier *et al.*, 1996).

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

Esse marcador radioativo é adicionado ao meio de cultivo e, ao final do período de tratamento, permite a realização da contagem de células que incorporaram o nucleotídeo durante a síntese de DNA, no caso, estimulada por PDGF-BB. Observou-se que o fator de crescimento aumentou significativamente incorporação de timidina e, portanto, a proliferação celular, e que o complexo Ru(cyclam)NO previne este evento.

Outro ensaio de proliferação foi realizamos por meio da análise da expressão do marcador de proliferação celular PCNA. O PCNA é uma proteína nuclear não histônica de 29kDa componente da maquinaria de duplicação do DNA e regulação do crescimento celular (Alberts *et al.*, 1997; Alves *et al.*, 1999). A progressão das células no ciclo celular envolve a ativação sequencial de proteínas regulatórias como ciclinas, quinases dependentes de ciclinas (CDK) e p53, que modulam a progressão das células da fase G₀/G₁ para a fase S. A CDK por sua vez está envolvida na fosforilação de proteína retinoblastoma e o acúmulo do PCNA (Li *et al.*, 2005).

Nossos resultados indicaram aumento da expressão de PCNA nos grupos tratados por 48 horas com PDGF-BB, significativamente maior em relação ao grupo controle (p <0,001), e que esta resposta foi bloqueada de forma significativa pelo tratamento concomitante com o complexo Ru(cyclam)NO. O tratamento isolado com o complexo apresentou resposta similar ao controle.

A determinação dos efeitos do complexo Ru(cyclam)NO no progressão do ciclo celular ainda necessita de estudos, assim será possível compreender melhor a atividade anti-proliferativa do complexo.

A maioria dos estudos no que refere ao efeito antiproliferativo do NO na VSMC utilizam compostos nitrosotíóis como doadores de NO, os quais detém mecanismos adicionais (Ricardo *et al.*, 2002; Gaston *et al.*, 2003; Acharya *et al.*, 2012). Contudo, o efeito observado neste estudo foi reproduzível, mesmo utilizando outra classe de doadores de NO, e o complexo Ru(cyclam)NO inibiu nitidamente a proliferação celular induzida pelo tratamento com PDGF-BB. Nesses ensaios, como a citotoxicidade só se tornou

evidente na concentração 500 μM , pode-se confirmar a relevância do efeito anti-proliferativo do complexo Ru(cyclam)NO em VSMCs.

O PDGF-BB é também um potente agente quimiotático para as VSMCs, regulando fortemente a migração celular, outro evento importante em condições patológicas de remodelamento (Caramori *et al.*, 1997).

A migração celular *in vitro* e *in vivo* se inicia a partir da estimulação de receptores de superfície celular que traduzem o sinal extracelular a uma série de eventos coordenados de remodelamento que vão alterar a estrutura do citoesqueleto (Gerthoffer, 2007), e uma variedade de métodos *in vitro* são utilizados para definir os mecanismos de migração celular. A maioria utiliza métodos microscópicos para registrar mudanças de posições e formatos celulares ou uma modificação da câmara de Boyden (*transwell*) para análise do movimento celular através de uma membrana porosa a partir de um estímulo quimiotático (Gerthoffer, 2007).

Realizamos ensaios *transwell*, um ensaio de migração direcional, para avaliação da migração frente ao estímulo quimiotático do PDGF-BB e resposta anti-migratória do complexo Ru(cyclam)NO nesta condição. Foi notável o aumento na migração das células tratadas com PDGF-BB, sendo o número de células transmembrana mais que o dobro do que o observado no grupo controle, porém o tratamento das células com Ru(cyclam)NO inibiu em 45% essa resposta.

A capacidade de inibição da migração celular pelo NO frente a estímulos quimiotáticos já foi observada em outros estudos. Seymour e colaboradores (2010), utilizando VSMCs tratadas com os doadores de NO DETA/NO e SNAP, ambos na concentração 100 μM , demonstraram suas capacidades de inibição da migração frente ao estímulo do PDGF-BB, trombospondina-1 e fibronectina. A inibição da migração induzida por PDGF-BB por estes compostos foi de 40 e 20%, respectivamente, demonstrando que o complexo Ru(cyclam)NO pode ter melhor eficácia anti-migratória em comparação a outras classes de doadores de NO.

Como complemento, realizamos um ensaio caracterizado por avaliar a migração aleatória de células a partir da remoção de células de uma camada confluenta, gerando uma escarificação e posterior estímulo a migração celular. Os resultados, embora considerados qualitativos, foram muito similares ao do ensaio transwell. O PDGF-BB induz fortemente a migração das células e o total fechamento da área da escarificação, enquanto que na presença simultânea do complexo Ru(cyclam)NO inibiu esta resposta, retardando o fechamento da área da escarificação.

Como discutido anteriormente, a modulação do fenótipo da VSCM é o evento inicial para o remodelamento vascular, e que a expressão de proteínas marcadores do fenótipo maduro, como a proteína contrátil α -SMA, tem significativa redução. Mediante estímulo das VSMCs com PDGF-BB caracterizamos a modulação para o fenótipo proliferativo/sintético, mas, sobretudo, verificamos que o tratamento com o complexo preveniu a alteração fenotípica e manteve a expressão da proteína contrátil.

A grande maioria dos estímulos à modulação do fenótipo conhecidos incluem a ativação de vias de sinalização por fatores de crescimento e citocinas, como, por exemplo, a via MAPK / ERK 1/2, com conseqüente ativação de fatores de transcrição essenciais à proliferação e migração (Cho *et al.*, 2000; Sharony *et al.*, 2006). Diversos desses fatores já foram implicados na sinalização celular para proliferação, incluindo ELK-1, um complexo ternário, que pode ser induzido pelo PDGF-BB via sinais distais da via MAPK / ERK 1/2, e suprimir a expressão de genes marcadores do fenótipo contrátil (Dandre, Owens, 2004; Muto *et al.*, 2007).

O tratamento das VSMCs com PDGF-BB estimulou significativamente a fosforilação de ELK-1 ($p < 0,001$). Foi verificado que quando as células foram pré-tratadas com Ru(cyclam)NO e então tratadas com PDGF-BB a fosforilação não ocorreu, demonstrando que o pré-tratamento preveniu a ativação deste fator de transcrição. Tal resposta não pode ser mediada por interações estruturais entre o complexo e o fator de crescimento, já que observamos nos tratamentos isolados o aumento significativo da fosforilação de ELK-1, inclusive no tratamento com Ru(cyclam)NO. Sugerimos que esta resposta pode estar relacionada ao fenótipo celular. CMLs no estado contrátil parecem não

responder ao efeito inibitório do NO, diferentemente das células que se encontram no estado proliferativo/sintético.

Tais efeitos necessitam melhor caracterização, de forma a avaliar qual o mecanismo de ativação da ELK-1, e se alterações em outras vias de sinalização também podem estar envolvidas na resposta do Ru(cyclam)NO. Deve-se também avaliar se as respostas obtidas são exclusivamente devidas à ação do NO e ainda se são GMPc dependentes ou independentes. O uso de inibidores da GCs ou do captador de NO cPTIO são alternativas para aprofundar este estudo.

Outro aspecto a ser considerado no mecanismo de ação da resposta anti-proliferativa do complexo compreende a análise da expressão gênica, já que a síntese protéica não a reflete diretamente uma série de mecanismos entre esses dois processos que encontram-se envolvidos. Assim, a análise da expressão de genes como *c-fos* e *c-jun* permitiriam melhor entendimento sobre a resposta do complexo na proliferação celular.

Resumindo os resultados encontrados (figura 15), podemos avaliar que o complexo Ru(cyclam)NO, além de apresentar baixa citotoxicidade e capacidade de liberação de NO mais lenta, foi capaz de inibir a proliferação e a migração de VSMCs induzidas pelo fator de crescimento PDGF-BB, e também preveniu a modulação do fenótipo celular, preservando a característica contrátil. Embora seu mecanismo de ação não esteja ainda bem caracterizado, este complexo demonstrou atividade biológica singular, e sua aplicação em algumas condições clínicas onde há descontrole de processos de proliferação e migração de CMLs apresenta-se como uma proposta interessante.

A reestenose pós-angioplastia é uma dessas condições. Caracterizada por excessiva hiperplasia intimal e com elevados custos de tratamento, acomete cerca de 20 a 40% dos pacientes submetidos a procedimentos de revascularização (Kipshidze *et al.*, 2005), e ainda não existem esquemas terapêuticos capazes de solucionar integralmente este problema. Considerando a atividade biológica deste complexo, no futuro, sua aplicação pode ser uma alternativa à terapêutica, a partir do desenvolvimento de dispositivos endovasculares eluidores de Ru(cyclam)NO, já que nada similar está disponível no mercado.

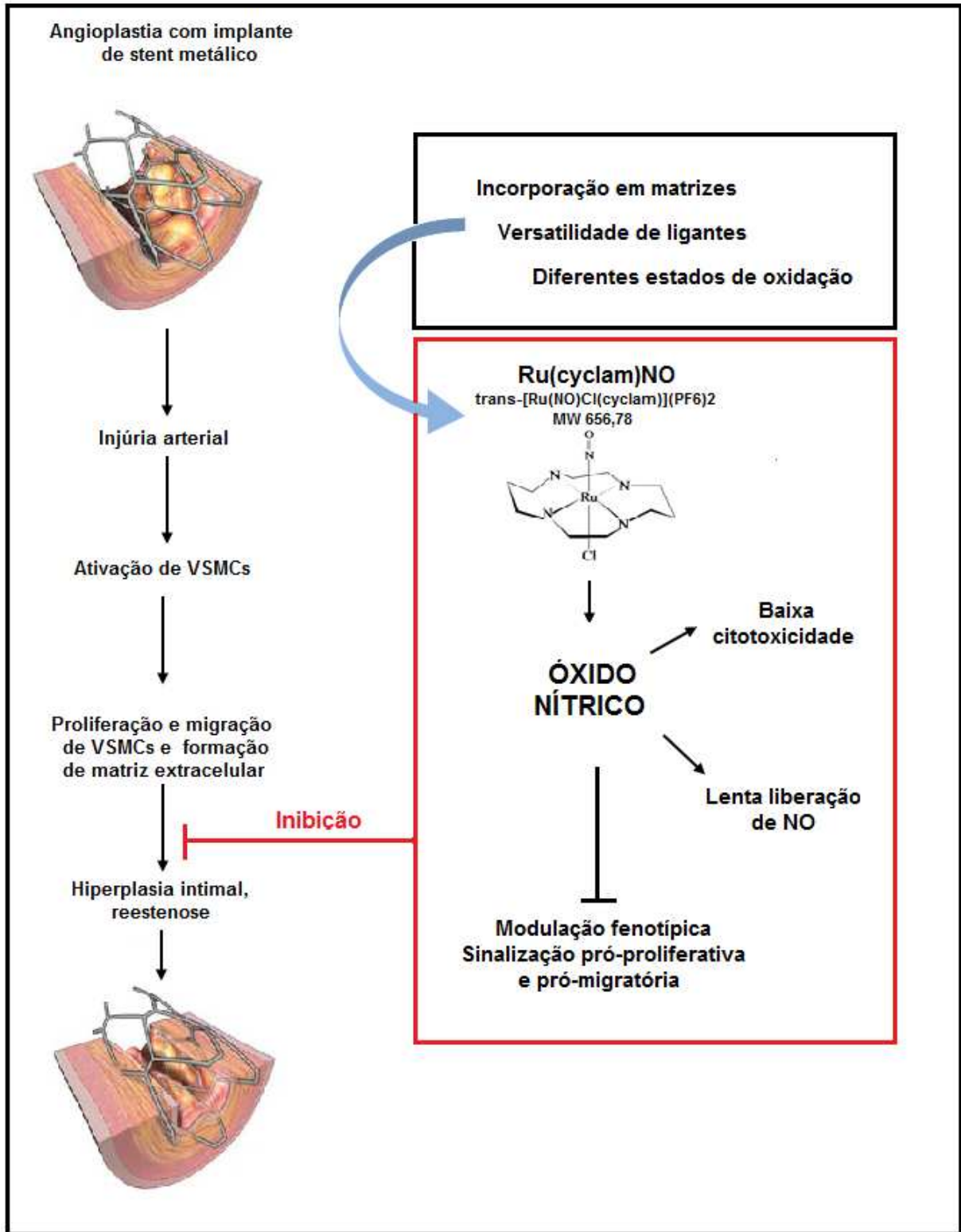


Figura 15. Resumo das características do complexo Ru(cyclam)NO e exemplo de possível aplicação.

6. Conclusão

A atividade do complexo de rutênio doador de óxido nítrico *trans*-[Ru(NO)Cl(cyclam)](PF₆)₂, nomeado Ru(cyclam)NO, foi caracterizada em estudos *in vitro* em células VSCM, considerando que:

- 1) Demonstrou baixa citotoxicidade, verificada em ambos os ensaios realizados;
- 2) Demonstrou liberar NO de forma mais lenta, em comparação ao SNP, verificado pela concentração de nitrato no meio em relação ao tempo de tratamento.
- 3) Foi eficaz na inibição da proliferação e migração de VSMCs induzidas por PDGF-BB.
- 4) O complexo previniu a modulação fenotípica de VSMCs induzida por PDGF-BB, mantendo a característica contrátil das células.

As respostas verificadas nos tratamentos com o complexo foram promissoras e mostram a validade de estudos pré-clínicos para utilização deste composto em dispositivos cardiovasculares. Entretanto necessitam de estudos mais direcionados ao esclarecimento do seu mecanismo de ação, de modo a definir os mecanismos moleculares envolvidos.

7. Referências

- Abrams MJ, Murrer BA. (1993) *Metal compounds in therapy and diagnosis*. **Science**. 6: 725-730.
- Acharya G, Lee CH, Lee Y. (2012) *Optimization of cardiovascular stent against restenosis: factorial design-based statistical analysis of polymer coating conditions*. **PLOS one**. 7: 159-167.
- Ahanchi SS, Tsihlis ND, Kibbe MR. (2007) *The role of nitric oxide in the pathophysiology of intimal hyperplasia*. **J Vasc Surg**. 45: A64-A73.
- Ainscough EW, Brodie AM. (1995) *Nitric oxide: some old and some new perspectives*. **J Chem Educ**. 72: 686-692.
- Akaike T, Yoshida M, Miyamoto Y, Sato K, Kohno M, Sasamoto K, Miyasaki K, Ueda S, Maeda H. (1993) *Antagonistic action of imidazolineoxyl N-oxides against endothelium-derived relaxing factor/NO through a radical reaction*. **Biochem**. 26 (3): 827-832.
- Alberts B, Bray D, Lewis J. (1997) *Biologia Molecular da Célula*. 3ed. São Paulo: Artes Médicas.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Martin R, Roberts K, Walter P. (2002) *Molecular Biology of the Cell*. 4ed. New York: Garland Science.
- Allardyce CS, Dyson PJ. (2001) *Ruthenium in medicine: current clinical uses and future prospects*. **Platinum Met Rev**. 45: 62.
- Alves VAF, Bacchi CE, Vassalo J. (1999) *Manual de imunohistoquímica*. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia. 1ed.
- Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. (2008) *Role of platelet-derived growth factor in physiology and medicine*. **Genes Dev**. 15: 1276-1312.
- Ang AH, Tachas G, Campbell JH, Bateman JF, Campbell GR. (1990) *Collagen synthesis by cultured rabbit aortic smooth muscle cells: alteration with phenotype*. **Biochem J**. 265: 461-469.
- Barreto RL, Correia CRD, Muscará MN (2005) *Óxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos*. **Quím Nova**. 28: 1046-1054.
- Barros BF, Franco DW, Toledo JC, Tfouni E, Krieger MH. (2002) *A new inorganic vasodilator trans-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃(NO)](PF₆)₃: Hypotensive effect of vasodilator endothelium-dependent and independent in different hypertensive animals*. **Nitric Oxide**. 7: 50-56.
- Bastos CM, Gordon KA, Ocain TD. (1998) *Synthesis and immunosuppressive activity of ruthenium complexes*. **Bioorg. Med. Chem. Let**. 8: 147-155.

- Bates JN, Baker MT, Guerra R, Harrison DG. (1991) *Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue. Evidence that reduction of the nitroprusside anion and cyanide loss are required.* **Biochem Pharmacol.** 42: 157-165.
- Beamish JA, He P, Kottke-Marchant K, Marchant RE. (2010) *Molecular regulation of contractile smooth muscle cell phenotype: implications for vascular tissue engineering.* **Tissue Eng.** 16: 467-491.
- Blachier F, Robert V, Selamnia M, Mayeur C, Duee PH. (1996) *Sodium nitroprusside inhibits proliferation and putrescine synthesis in human colon carcinoma cells.* **FEBS Lett.** 396: 315-318.
- Borenfreund E, Puerner JA. (1984) *A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90).* **J. Tiss. Cult. Meth.** 9: 7-9.
- Borges SS, Davanzo CU, Castellano EE, Z-Schpector J, Silva SC, Franco DW. (1998) *Ruthenium nitrosyl complexes with N-heterocyclic ligands.* **Inorg Chem.** 37 (11): 2670-2677.
- Bryan NS. (2006) *Nitrite in nitric oxide biology: Cause or consequence? A systems-based review.* **Free Radical Bio Med.** 41: 691-701.
- Buga GM, Wei LH, Bauer PM, Fukuto JM, Ignarro LJ. (1998) *Ng-hydroxy-L-arginine and nitric oxide inhibit Caco-2 tumor cell proliferation by distinct mechanism.* **Am J Physiol.** 275: 1256-1264.
- Camoretti-Mercado B, Dulin NO, Solway J. (2003) *Serum response factor function and dysfunction in smooth muscle.* **Respir Physiol Neurobiol.** 137: 223-235.
- Campbell GR, Campbell JH, Manderson JA, Horrigan S, Rennick RE. (1988) *Arterial smooth muscle: a multifunctional mesenchymal cell.* **Arch Pathol Lab Med.** 112: 977-986.
- Caramori PRA, Yamamoto GI, Zago AJ. (1997) *Reestenose após angioplastia: fisiopatogenia.* **Arq Bras Cardiol.** 69: 141-150.
- Cazarin KCC, Corrêa CL, Zambrone FAD. (2004) *Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual.* **Rev Bras Cien Farm.** 40 (3): 57-59.
- Cedar SH. (2006) *The function of stem cells and their future role in health care.* **Br J Nurs.** 15 (2): 104-107.
- Cerqueira JB, Silva LF, Lopes LG, Moraes ME, Nascimento NR. (2010) *Relaxation of rabbit corpus cavernosum smooth muscle and aortic vascular endothelium induced by nitric oxide donor substances of the nitrosyl-ruthenium complex.* **Int Braz J Urol.** 34: 638-645.

- Chang L, Karin M. (2001) *Mammalian MAP kinase signalling cascades*. **Nature**. 410: 37:40.
- Cho A, Graves J, Reidy MA. (2000) *Mitogen-activated protein kinases mediated matrix metalloproteinase-9 expression in vascular smooth muscle cells*. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 20: 2527-2532.
- Clarke MJ. (2006) *Ruthenium metallopharmaceuticals*. **Coord Chem Rev**. 196: 281-305.
- Cornwell TL, Arnold E, Boerth NJ, Lincoln TM. (1994) *Inhibition of smooth muscle cell growth by nitric oxide and activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP*. **Am J Physiol Cell Physiol**. 267: 1405-1413.
- Costa RSA, Assreuy J. *Nitric oxide inhibits irreversibly P815 cell proliferation: involvement of potassium channels*. **Cell Prolif**. 35: 321-332.
- Culotta E, Koshland-Junior DE. (1992) *NO news is good news*. **Science**. 258: 1862-1865.
- Dandre F, Owens GK. (2004) *Platelet-derived growth factor and ETS-1 transcription factor negatively regulate transcription of multiple smooth muscle cell differentiation marker genes*. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. 286: 2042-2051.
- de Lima RG, Lever AB, Ito IY, da Silva RS. (2003) *Antifungal activity of novel catecholamine ruthenium (III) complexes*. **Trans Metal Chem**. 28: 272-275.
- de Mel A, Jell G, Stevens MM, Seifalian AM. (2008) *Biofunctional of biomaterials for accelerated in situ endothelization: a review*. **Biomacromolecules**. 9: 2969-2979.
- de Ruiter MC, Poelmann RE, Vanmunsteren JC, Mironov V, Markwald RR, Gittenburger DR, Groot AC. (1997) *Embryonic endothelial cells transdifferentiate into mesenchymal cells expressing smooth muscle actins in vivo and in vitro*. **Circ Res**. 80: 444-451.
- Denizot F, Lang R. (1986) *Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability*. **J. Immunol. Meth**. 89: 271-277.
- Dixon CJ, Bowler WB, Fleetwood P, Ginty AF, Gallagher JA, Carron JA. (1997) *Extracellular nucleotides stimulate proliferation in MCF-7 breast cancer cells via P2-purinoceptors*. **Br. J. Cancer**. 75: 34-39.
- Du KL, Ip HS, Li J, Chen M, Dandre F, Yu W, et al. (2003) *Myocardin is a critical serum response factor cofactor in the transcriptional program regulating smooth muscle cell differentiation*. **Mol Cell Biol**. 23: 2425-2437.
- Dusse LMS, Vieira LM, Carvalho MG. (2003) *Revisão sobre óxido nítrico*. **J Bras Patol Med Lab**. 39: 343-350.

- Dwyer FP, Mayhew EM, Roe A, Schulman. (1965) *Inhibition of landschuetz ascites tumour growth by metal chelates derived from 3,4,7,8-tetramethyl-1,10-phenanthroline*. **Brit J Cancer**. 19: 195-199.
- Feelisch M. (1998) *The use of nitric oxide donors in pharmacological studies*. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol**. 358: 113-122.
- Feldman PL, Griffith OW, Stuehr DJ. (1993) *The surprising life of nitric oxide*. **Chem Eng News**. 20: 26-38.
- Fernandes DJ, Ravenhall CE, Harris T, Tran T, Vlahos R, Stewart AG. (1998) *Contribution of p38^{MAPK} signalling pathway in human cultured airway smooth muscle cells in mitogen-specific*. **Br J Pharmacol**. 142: 1182-1190.
- Ferreira KQ, Schneider JF, Nascente PA, Rodrigues-Filho UP, Tfouni E. (2006) *Desing of a NO photoinduced releaser xerogel based on the controlled nitric oxide donor trans-[Ru(NO)Cl(cyclam)](PF6)2(cyclam=1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane)*. **J Colloid Interface Sci**. 15: 543-552.
- Ferri N. (2012) *AMP-activated protein kinase and the control of smooth muscle cell hyperproliferation in vascular disease*. **Vasc Pharmac**. 52: 9-13.
- Forrester JS, Fishbein M, Helfant R, Fagin J. (1991) *A paradigm for restenosis based on cell biology: clues for the development of new preventive therapies*. **J Am Coll Cardiol**. 17: 758-769
- Freshney I. (1987) *Culture of animals cells: a manual of basic technique*. 2^oed. New York: Allan Liss Inc.
- Friederich JA, Butterworth JF. (1995) *Sodium nitroprusside: Twenty years and counting*. **Anesth Analg**. 81: 152-162.
- Gabbiani G, Schmid E, Winter S, Chapponier C, Chastonay C, Vandekerckhove J, Weber K, Franke WW. (1981) *Vascular smooth muscle differ from other smooth muscle cells: predominance of vimentin filaments and a specific α -type actin*. **Proc Natl Acad Sci USA**. 78: 298-302.
- Gaston BM, Carver J, Doctor A, Palmer J. (2003) *S-nitrosylation signaling in cell biology*. **Mol Intervent**. 3: 253-263.
- Geiger B, Tokuyasu KT, Dutton AH, Singer SJ. (1980) *Vinculin, a intracellular protein localized at specialized sites where microfilament bundles terminate at cell membranes*. **Proc Natl Acad Sci USA**. 77: 4127-4131.

- Gerthoffer WT. (2007) *Mechanisms of vascular smooth muscle cell migration*. **Circ Res.** 100 (5): 607-621.
- Gewaltig MT, Kojda G. (2002) *Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential*. **Cardiovasc Res.** 55: 250-260.
- Gharios GB, Ponticos M, Rajkumar V, Abraham D. (2004) *Extra-cellular matrix in vascular networks*. **Cell Prolif.** 37: 207-220.
- Giustarini D, Milzani A, Colombo R, Dalle-Done I, Rossi R (2003) *Nitric oxide and S-nitrosothiols in human blood*. **Clin Chim Acta.** 330: 85-98.
- Gomes AJ, Espreafico EM, Tfouni E. (2007) *trans-[Ru(NO)Cl(cyclam)](PF₆)₂ encapsulated in microparticles for delivery of nitric oxide toneoplastic cells*. **6th International Congresso of Pharmaceutical Sciences** – CIFARP, Ribeirão Preto, Brasil.
- Hansson GK. (1993) *Immune and inflammatory mechanisms in the development of atherosclerosis*. **Br Heart J.** 69: S38-S41.
- Hasegawa Y, Morita F. (1992) *Role of 17-kDa essential light chain isoforms of aorta smooth muscle myosin*. **J Biochem.** 111: 804-809.
- Hatai T, Matsuzawa A, Inoshita S, Mochida Y, Kuroda T, Sakamaki K, Kuida K, Yonehara S, Ichijo H, Takeda K. (2000) *Execution of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK-1)-induced apoptosis by the mitochondria-dependent caspase activation*. **J Biol Chem.** 275: 26576-26581.
- Hillebrands JL, Klatter FA, van den Hurk BMH, Popa ER, Nieuwenhuis P, Rozing J. (2001) *Origin of neointimal endothelium and α -actin-positive smooth muscle cells in transplant arteriosclerosis*. **J Clin Invest.** 107: 1411-1422.
- Hirst SJ, Twort CW, Lee TH. (2000) *Differential effects of extracellular matrix proteins on human airway smooth muscle cell proliferation*. **Am J Respir Cell Mol Biol.** 23: 335-344.
- Hungerford JE, Little CD. (1999) *Developmental biology of the vascular smooth muscle cell: building a multilayered vessel wall*. **J Vas Res.** 36: 2-27.
- Ignarro, L. (2000) *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology*. San Diego, California, USA, 1.Ed., Academic Press, 2000. p30-63.
- Ishida A, Sasaguri T, Kosada C, Nojima H, Ogata J. (1997) *Induction of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 (Sdi1/Cip1/Waf1) by nitric oxide generation vasodilator in vascular smooth muscle cells*. **J Biol Chem.** 272: 10050-10057.

- Janero DR. (2000) *Nitric oxide (NO)-related pharmaceuticals: contemporary approaches to therapeutic NO modulation. Free Radical Biol Med.* 28: 1495-1506.
- Jawien A, Bowen Pope DF, Lindner V, Schwartz SM, Clowes AW. (1992) *Platelet derived growth factor promotes smooth muscle cell migration and intimal thickening in a rat model of balloon angioplasty. J Clin Invest.* 89: 507-511.
- Jeremy JY, Rowe D, Emsley AM, Newby AC. (1999) *Nitric oxide and the proliferation of vascular smooth muscle cells. Cardiovasc Res.* 43: 580-594.
- Kawai-Kowase K, Owens GK. (2007) *Multiple repressor pathways contribute to phenotypic switching of vascular smooth muscle cells. Am J Physiol Cell Physiol.* 292: 59-69.
- Kipshidze N, Dangas G, Tsapenko M, Moses J, Leon MB, Kutryk M, Serruys P. (2004) *Role of the endothelium in modulating neointimal formation: Vasculoprotective approaches to attenuate restenosis after percutaneous coronary interventions. J Am Coll Cardiol.* 44: 733-739.
- Kodja G, Feelisch M, Noack E. (1995) *Sulfhydryl-containing nitrate esters: a new class of nitric oxide donors. Cardiovasc Drug Rev.* 13: 275-288.
- Kubes P, Suzuki M, Granger DN. (1991) *Nitric oxide: a endogenous modulator of leukocyte adhesion. Proc Natl Acad Sci USA.* 88: 4651-4655.
- Lehmann J. (2000) *Nitric oxide donors: current trends in therapeutic applications. Exp Opin Ther Pat.* 10: 579-594.
- Li H, Samouilov A, Liu X, Zweier JL (2001) *Characterization of the magnitude and kinetics of xanthine oxidase-catalysed nitrite reduction. Evaluation of its role in nitric oxide generation in anoxic tissues. J Biol Chem.* 276: 24482-24489.
- Li Y, Wang L, Li S, Guo T, Guo X, Yan P, Chen Y, Wang L, Lu C. (2005) *p53 protein activates the transcription of human proliferating cell nuclear antigen in response to 4-nitroquinoline N-oxide treatment. Int J Biochem Cell Biol.* 37: 416-426.
- Liang CC, Park AY, Guan JL. (2007) *In vitro scratch assay: a convenient and expressive method for analysis of cell migration in vivo. Nat Protocols.* 2 (2): 329-333.
- Libby P, Schwartz D, Brogi E, Tanaka H, Clinton SK. (1992) *A cascade model for restenosis. A special case of atherosclerosis progression. Circulation.* 86: 47-52.
- Lundberg JO, Weitzberg E. (2005) *NO generation from nitrite and its role in vascular control. Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25: 915-922.

- Mabrouk EL, Singh A, Touyz RM, Schffrin EL. (2000) *Anti-proliferative effect of L-NAME on rat vascular smooth muscle cells. Life Sci.* 18: 1613-1623.
- Marcondes FG, Ferro AA, Souza-Torsoni A, Sumitami M, Clarke MJ, Franco DW, Tfouni E, Krieger MH. (2002) *In vivo effects of the controlled NO donor/scavenger ruthenium cyclam complexes on blood pressure. Life Sci.* 70: 2735-2752.
- Megson IL. (2000) *Nitric oxide donors drugs. Drugs Future.* 25: 701-715.
- Miano JM, Cserjesi P, Ligon KL, Periasamy M, Olson EN. (1994) *Smooth muscle myosin heavy chain exclusively marks the smooth muscle lineage during mouse embryogenesis. Circ Res.* 75: 803-812.
- Miano JM, Long X, Fujiwara K. (2003) *Serum response factor: master regulator of actin cytoskeleton and contractile apparatus. Am J Physiol Cell Physiol.* 292: C70-C81.
- Millar CG, Thiermermann C. (2002) *Carboxy-PTIO, a scavenger of nitric oxide, selectively inhibits the increase in medullary perfusion and improves renal function in endotoxemia. Shock.* 18: 64-68.
- Mitchell JB, Cook JA, DeGraff W, Glatstein E, Russo A. (1989) *Glutathione modulation in cancer treatment: Will it work? Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 16: 1289-1295.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. (1991) *Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. Pharmacol Rev.* 43: 109-142.
- Mooradian DL, Hustell TC, Keefer LK. (1995) *Nitric oxide donor molecules: effect of NO release rate on vascular smooth muscle cell proliferation in vitro. J Cardiovasc Pharmacol.* 25: 674-678.
- Mosmann T. (1983) *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol.* 65: 55-63.
- Mosse PRL, Campbell GR, Wang ZL. (1985) *Smooth muscle phenotypic expression in human carotid arteries. Comparison of cells from diffuse intimal thickenings adjacent to atheromatous plaques with those of the media. Lab Invest.* 53: 556-562.
- Murgia I, Pinto MC, Delledonne M, Soave C, Gara L. (2004) *Comparative effects of various nitric oxide donors on ferritin regulation, programmed cell death, and cell redox state in plant cells. J Plant Physiol.* 161: 777-783.
- Muto A, Fitzgerald TN, Pimiento JM, Maloney SP, Teso D, Paszkowiak JJ, Westvik TS, Kudo FA, Nishibe T, Dardik A. (2007) *Smooth muscle cell signal transduction: implications for vascular biology for vascular surgeons. J Vasc Surg.* 45A: 15-24.

- Myers PR, Tanner MA. (1998) *Vascular endothelial cell regulation of extracellular matrix collagen: role of nitric oxide*. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 18: 717-722.
- Myllarniemi M, Frosen J, Calderon LG, Buchdunger E, Lemstrom K, Hayry P. (1999) *Selective tyrosine kinase inhibitor for the platelet-derived growth factor receptor in vitro inhibits smooth muscle cell proliferation after reinjury of arterial intima in vivo*. **Cardiovasc Drug Develop**. 13: 159-168.
- Naghavi N, de Mel A, Alavijeh OS, Cousins BG, Seifalian AM. (2013) *Nitric oxide donors for cardiovascular implant applications*. **Small**. 9: 22-35.
- Napoli C, Ignarro LJ. (2001) *Nitric oxide and atherosclerosis*. **Nitric Oxide**. 5: 88-97.
- Navarro M, Perez H, Sanchez-Delgado RA. (1997) *Síntesis and antimalarial activity in vitro and in vivo of the new gold-chloroquine complex*. **J Med Chem**. 40: 1937-1997.
- Ning Y, Huang H, Dong Y, Sun Q, Zhang W, Xu W, Li Q. (2013) *5-Aza-2'-deoxycytidine inhibited PDGF-induced rat airway smooth muscle cell phenotypic switching*. **Arch Toxicol**. 2: 1008.
- Osti RZ, Franco DW. (2007) *Aspects of nitrite association with trans-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃H₂O]²⁺*. **Polyhedron**. 26: 4746-4750.
- Owens GK, Thompson MM. (1986) *Developmental changes in isoactin expression in rat aortic smooth muscle cells in vivo: relationship between growth and cytodifferentiation*. **J Biol Chem**. 261: 13373-13380.
- Owens GK. (1995) *Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells*. **Physiol Rev**. 75: 487-517.
- Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. (2003) *Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease*. **Physiol Rev**. 84: 767-801.
- Owens GK. (2007) *Molecular control of vascular smooth muscle cell differentiation and phenotypic plasticity*. **Novartis Found Symp**. 283: 174-191.
- Park ES, Lee KP, Jung SH, Lee DY, Won KJ, Yun YP, Kim B. (2013) *Compound K, a intestinal metabolite of ginsenosides, inhibits PDGF-BB induced VSMC proliferation and migration through G1 arrest and attenuates neointimal hyperplasia after arterial injury*. **Atherosclerosis**. 228: 53-60.
- Pescatore LA, Bonatto D, Forti FL, Sadok A, Kovacic H, Laurindo FR. (2012) *Protein Disulfide Isomerase Is Required for Platelet-derived Growth Factor-induced Vascular Smooth Muscle Cell Migration, Nox1 NADPH Oxidase Expression, and RhoGTPase Activation*. **J Biol Chem**. 287: 29290-29300.

- Pestana CR, Phelippin DPS, Polizello ACM, Dorta DJ, Uyemura SA, Santos AC, Doro FG, Rodrigues FP, Tfouni E, Curti C. (2009) *Effects of mitochondria of mitochondria-induced nitric oxide release from a ruthenium nitrosyl complex. Nitric Oxide.* 20: 24-30.
- Pollman MJ, Yamada T, Horiuchi M. (1996) *Vasoactive substances regulate vascular smooth muscle cell apoptosis. Countervailing influences of nitric oxide and angiotensin II. Circ Res.* 79: 748-756
- Queiroz SL, Batista AA. (1999) *Funções biológicas do óxido nítrico. Quím Nova.* 22: 584-590.
- Rand MJ, Li CG. (1995) *Discrimination by the NO-trapping agent, carboxy-PTIO, between NO and the nitrergic transmitter but not between NO and EDRF. Br J Pharmacol.* 116: 1906-1910.
- Rathbone MP, Deforge S, Deluca B, Gabel, B, Laurensen C, Middlemiss P, Parkinson S. (1992) *Purinergic stimulation of cell division and differentiation: mechanisms and pharmacological implications. Med. Hypotheses.* 37: 213-119.
- Ricardo KF, Sishido SM, Oliveira MG, Krieger MH. (2002) *Characterization of the hypotensive effect of S-nitroso-N-acetylcysteine in normotensive and hypertensive conscious rats. Nitric Oxide.* 7: 57-66.
- Richter-Addo GB, Legdzins P. (1992) *Metal nitrosyls.* New York, USA, Oxford University Press, Inc. p1-48.
- Riddell RJ, Clothier RH, Ba lls M. (1986) *An evaluation of three in vitro cytotoxicity assays. Food Chem. Toxicol.* 24: 469-471.
- Rocha ML, Castro PF, Pereira AC, Rodrigues GJ, Batista AC, da Silva RS, Bendhack LM. (2011) *A new nitrosyl ruthenium complex nitric oxide donor presents higher efficacy than sodium nitroprusside on relaxation of airway smooth muscle. Eur J Pharm Sci.* 43: 370-377.
- Rodrigues GJ, Pereira AC, Vercesi JA, Lima RG, Silva RS, Bendhack LM. (2012) *Long-lasting hypotensive effect in renal hypertensive rats induced by nitric oxide released from a ruthenium complex. J Cardiovasc Pharmacol.* 60 (2): 193-198.
- Ross R. (1995) *Cell biology of atherosclerosis. Ann Rev Physiol.* 57: 791:804.
- Rovner AS, Murphy RA, Owens GK. (1986) *Expression of smooth muscle and nonmuscle myosin heavy chain in cultured vascular smooth muscle cells. J Biol Chem.* 261: 14740-14745.
- Sakar R, Gordon D, Stanley JC, Webb RC. (1997) *Cell cycle effects of nitric oxide on vascular smooth muscle cells. Am J Physiol.* 272: 1810-1818.

- Sava G, Bergamo A. (1995) *Ruthenium-based compounds and tumor growth control. Int J Onc.* 17 (2): 353-564.
- Schwartz SM. (1997) *Smooth muscle migration in vascular development and pathogenesis. Transpl Immunol.* 5: 255-260.
- Seger R, Krebs EG. (1995) *The MAPK signaling cascade. FASEB J.* 9: 726-735.
- Seymour K, Han X, Sadowitz B, Maier KG, Gahtan V. (2010) *Differential effect of nitric oxide on thrombospondin-1, PDGF and fibronectin-induced migration of vascular smooth muscle cells. Am J Surg.* 200 (5): 615-619.
- Sharony R, Pintucci G, Saunders PC, Grossi EA, Baumann FG, Galloway AC, Mignatti P. (2006) *Matrix metalloproteinase expression in vein grafts: role of inflammatory mediators and extracellular signal-regulated kinases-1 and 2. Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 290: H1651-H1659.
- Silva JJN, Guedes PMM, Zottis A, Balliano TL, Silva FON, Lopes LGF, EILena J, Oliva G, Andricopulo AD, Franco DW, Silva JS. (2010) *Novel ruthenium complexes as potential drugs for Chagas's disease: enzyme inhibition and in vitro/in vivo trypanocidal activity. Br J Pharmacol.* 160: 260-269.
- Silvestre-Roig C, Fernández P, Esteban V, Pello OM, Indolfi C, Rodríguez C, Rodríguez-Calvo R, López-Maderuelo MD, Bauriedel G, Hutter R, Fuster V, Ibáñez B, Redondo JM, Martínez-Gonzalez J, Andrés V. (2013) *Inactivation of nuclear factor- γ inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation. Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 33: 1036-1045.
- Slater TF, Sawyer B, Strauli U. (1963) *Studies from succinate-tetrazolium reductase systems: III Points of coupling of four different tetrazolium salts. Biochim Biophys Acta.* 77: 383-393.
- Sobue K, Sellers JR. (1991) *Caldesmon, a novel regulatory protein in smooth muscle and nonmuscle actomyosin systems. J Biol Chem.* 266: 12115-12118.
- Sokolowska M, Rokita H, Wlodek L. (2003) *Activation of DNA synthesis in human hepatoblastoma HEPG2 cells by the nitric oxide donor, sodium nitroprusside. Fund Clin Pharmacol.* 17: 599-607.
- Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. (1992) *Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. Science.* 258: 1898-1902.
- Stuehr DJ, Griffith OW. (1992) *Mammalian nitric oxide synthases. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 65: 287-294.

- Tfouni E, Krieger MH, McGarvey BR, Franco DW. (2003) *Structure, chemical and photochemical reactivity and biological activity of some ruthenium amine nitrosyl complexes. Coord Chem Rev.* 236: 57-69.
- Tfouni E, Ferreira KQ, Doro FG, Silva RS, Rocha ZN. (2005) *Ru(II) and Ru(III) complexes with cyclam and related species. Coord Chem Rev.* 249: 405-418.
- Tfouni E, Doro FG, Figueiredo LE, Pereira JC, Metzker G, Franco DW. (2010) Tailoring NO donors metallopharmaceuticals: ruthenium nitrosyl amines and aliphatic tetraazamacrocycles. *Curr Med Chem.* 17 (31): 3643-3657.
- Tfouni E, Doro FG, Gomes AJ, Silva RS, Metzker G, Benini PGZ, Franco DW. (2010) *Immobilized ruthenium complexes and aspects of their reactivity. Coord Chem Rev.* 254: 355-371.
- Tfouni E, Truzzi DR, Tavares A, Gomes AJ, Figueiredo LE, Franco DW. (2012) *Biological activity of ruthenium nitrosyl complexes. Nitric Oxide.* 26: 38-53.
- Torsoni AS, de Barros BF, Toledo JC, Haun M, Krieger MH, Franco DW. (2002) *Hypotensive properties and acute toxicity of trans-[Ru(NH(3)4)P(OEt)(3)(NO)](PF(6))(3), a new nitric oxide donor. Nitric Oxide.* 6 (3): 247-254.
- Wallace JL, Elliot SN, Del Soldato P, McKnight W, Sannicolo F, Cirino G. (1997) *Gastrointestinal sparing anti-inflammatory drugs: the development of nitric oxide-releasing NSAIDs. Drug Develop Res.* 42: 144-149.
- Wang PG, Xian M, Tang X, Wu X, Wen Z, Cai T, Janczuk AJ. (2002) *Nitric oxide donors: chemical activities and biological applications. Chem Rev.* 102:1091-1134.
- Wang HU, Chen ZF, Anderson DJ. (2004) *Myocardin and ternary complex factors compete for SRF to control smooth muscle gene expression. Nature.* 428: 185-189.
- Williams DLH. (2003) *A chemist's view of the nitric oxide story. Org Biomol Chem.* 3: 441-449.
- Winder SJ, Sutherland C, Walsh MP. (1991) *Biochemical and functional characterization of smooth muscle calponin. Adv Exp Med Biol.* 304: 37-51.
- Wink DA, Grisham MB, Mitchell JB, Ford PC. (1996) Direct and indirect effects of nitric oxide in chemical reactions relevant to biology. *In: Packer L. Nitric oxide. Part A: sources and detection of NO, NO synthase. Methods in Enzymology.* San Diego, California, USA, 1ed. Academic Press. p12-31.
- Wink DA, Mitchell JB. (1998) *Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic and citoprotective mechanisms of nitric oxide. Free Rad Biol Med.* 25: 434-456.

- Worth NF, Rolf BE, Song J, Campbell GR. (2001) *Vascular smooth muscle cell phenotypic modulation in culture is associated with reorganisation of contractile and cytoskeletal proteins. Cell Motil Cytoskeleton.* 49: 130-145.
- Yakasu Y, Iwasawa K, Narita H, Kindscher JD, Benson KT, Goto H. *Hemodynamic and sympathetic effects of fenoldopam and sodium nitroprusside. Acta Anesthesiol Scand.* 45 (9): 1176-1180.
- Yan Z, Yokota T, Zhang W, Hansson GK. (1996) *Expression of inducible nitric oxide synthase inhibits platelet adhesion and restores blood flow in the injured artery. Circulation.* 79: 38-44.
- Yoo SH, Lim Y, Kim SJ, Yoo KD, Yoo HS, Hong JT, Lee MY, Yun YP. (2013) *Sulphorane inhibits PDGF-induced proliferation of rat aortic vascular smooth muscle cell by up-regulation of p53 leading to G1/S cell cycle arrest. Vasc Pharmacol.* 26: 1537-1891
- Yu PJ, Ferrari G, Pirelli L, Gulkarov I, Galloway AC, Mignatti P, Pintucci G. (2007) *Vascular injury and modulation of MAPKs: a targeted approach to therapy of restenosis. Cell Signalling.* 19: 1359-1371.
- Zanichelli PG, Miotto AM, Estrela HF, Soares FR, Grassi-Kassisse DM, Spadari-Bratfisch RC, Castellano EE, Roncaroli F, Parise AR, Olabe JA, de Brito AR, Franco DW. (2004) *The [Ru(Hedta)NO](0.1-) system: structure, chemical reactivity and biological assays. J Inorg Biochem.* 98 (11): 1921-1932.
- Zanichelli PG, Estrela HF, Spadari-Bratfich RC, Grassi-Kassisse DM, Franco DW. (2007) *The effects of ruthenium tetrammine compounds on vascular smooth muscle. Nitric Oxide.* 16 (2): 189-196.90

8. Anexos

COMPOSIÇÃO COMPLETA DO MEIO DE CULTURA

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) – Sigma #D5648

Inorganic Salts		Other	
CaCl ₂	0.2	D-Glucose	4.5
Fe(NO ₃) ₃ • 9H ₂ O	0.0001	HEPES	—
MgSO ₄	0.09767	Phenol Red • Na	0.0159
KCl	0.4	Pyruvic Acid • Na	0.11
NaHCO ₃	3.7	ADD	
NaCl	6.4	Glucose	—
NaH ₂ PO ₄	0.109	L-Glutamine	0.584
Amino Acids		NaHCO ₃	—
L-Alanyl-L-Glutamine	—		
L-Arginine • HCl	0.084		
L-Cysteine • 2HCl	0.0626		
L-Glutamine	—		
Glycine	0.03		
L-Histidine • HCl • H ₂ O	0.042		
L-Isoleucine	0.105		
L-Leucine	0.105		
L-Lysine • HCl	0.146		
L-Methionine	0.03		
L-Phenylalanine	0.066		
L-Serine	0.042		
L-Threonine	0.095		
L-Tryptophan	0.016		
L-Tyrosine • 2Na • 2H ₂ O	0.10379		
L-Valine	0.094		
Vitamins			
Choline Chloride	0.004		
Folic Acid	0.004		
<i>myo</i> -Inositol	0.0072		
Niacinamide	0.004		
D-Pantothenic Acid • ½Ca	0.004		
Pyridoxal • HCl	—		
Pyridoxine • HCl	0.00404		
Riboflavin	0.0004		
Thiamine • HCl	0.004		



UNICAMP



CEUA/Unicamp

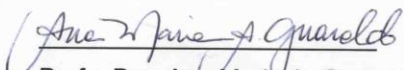
**Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp**

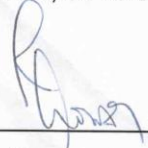
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Atividade biológica dos complexos de Rutênio com potencial doador de Óxido Nítrico e seus respectivos marcadores moleculares na prevenção da reestenose" (protocolo nº 2916-1), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Marta Helena Krieger / Mariana Gonçalves de Oliveira, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 22 de outubro de 2012.

Campinas, 22 de outubro de 2012.


Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>