

República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0613140-9 A2**



(22) Data de Depósito: 15/06/2006  
(43) Data da Publicação: 21/12/2010  
(RPI 2085)

(51) *Int.Cl.:*  
A61K 31/404  
A61F 2/06  
A61P 9/10

(54) Título: **AGONISTAS DE RECEPTORES NUCLEARES PARA TRATAMENTO DE ATEROSCLEROSE E/OU DOENÇA CARDIOVASCULAR RELACIONADA**

(30) Prioridade Unionista: 15/06/2005 EP PCT/EP2005/006515

(73) Titular(es): ACADEMISCH MEDISCH CENTRUM

(72) Inventor(es): CAROLINE JACOBA MARIA DE VRIES,  
ELISABETH KARIN ARKENBOUT, HANS PANNEKOEK, VIVIAN DE  
WAARD

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemens, Bigler &  
Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT EP2006005764 de 15/06/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/133943 de 21/12/2006

(57) Resumo: AGONISTAS DE RECEPTORES NUCLEARES PARA TRATAMENTO DE ATEROSCLEROSE E/OU DOENÇA CARDIOVASCULAR RELACIONADA. A presente invenção refere-se ao uso de um agonista de um ou mais dos receptores nucleares TR3, MINOR e NOT para a preparação de um medicamento para o tratamento de doença cardiovascular, em particular restenose intra-stent e/ou doença de enxerto de veia. A invenção também diz respeito aos dispositivos médicos, como stents e manguitos, que são revestidos com o agonista ou nos quais o agonista é incorporado e que são para o uso no tratamento de restenose intra-stent ou doença de enxerto de veia.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**AGONISTAS DE RECEPTORES NUCLEARES PARA TRATAMENTO DE ATEROSCLEROSE E/OU DOENÇA CARDIOVASCULAR RELACIONADA**".

A presente invenção refere-se ao novo uso de compostos no  
5 tratamento de aterosclerose e/ou doença cardiovascular relacionada à aterosclerose. A invenção diz respeito em particular ao uso dos ditos compostos no tratamento de aterosclerose e/ou doenças cardiovasculares relacionadas à aterosclerose e/ou distúrbios que envolvem uma proliferação excessiva de células de músculo liso (SMCs), como restenose intra-stent, doença de enxerto de veia, arteriosclerose de transplantação e falha de desvio arteriovenoso.  
10

O uso difundido atual de stents para tratar estenose coronária dramaticamente aumentou a incidência de lesões restenóticas intra-stent. Em uma subpopulação de pacientes, lesão arterial induzida por stent está associada à ativação celular e reentrada de células de músculo liso no ciclo celular que leva à proliferação celular exuberante e produção de matriz e consequentemente estreitamento luminal.  
15

Estratégias mostraram ter êxito em reduzir a taxa de desenvolvimento de restenose intra-stent, visam a inibição de proliferação celular de músculo liso. Notavelmente, revestimento de stents com rapamicina (sirolimus) resulta em apreensão do ciclo celular na transição de G1/S, enquanto que revestimento com paclitaxel induz um bloco mitótico através de estabilização dos microtúbulos. Embora estes métodos apresentem alguma promessa, eles também sofrem de certas limitações, como a a-especificidade de rapamicina e taxanos que inibem o crescimento de todas as células, incluindo células endoteliais que impedem reendotelialização apropriada da parede de vaso com stent assim arriscando efeitos tóxicos sistêmicos indesejáveis e cura imprópria da lesão.  
20  
25

A técnica cirúrgica de "bypass" é uma intervenção estabelecida para tratar doença de artéria coronária. Cirurgia de enxerto de desvio de artéria coronária (CABG) restabelece o fluxo sanguíneo para o tecido do coração que foi privado de sangue por causa da doença de artéria coronária. Durante a técnica  
30

cirúrgica de "bypass", um vaso de enxerto novo que carregará sangue oxigenado para ao redor do bloqueio em uma artéria coronária é cirurgicamente removido de outra localização no corpo. O vaso de enxerto é uma artéria ou veia saudável tirada por exemplo da perna, braço ou tórax. Ela é depois transferida para fora do coração.

Tanto a veia safena como a artéria mamária interna são frequentemente aplicadas como material de desvio. O desvio arterial tem um patência melhor que o desvio venoso em que a doença de enxerto de veia pode desenvolver, resultando em insuficiência de enxerto de veia em 10-30% dos pacientes por ano. Doença de enxerto de veia é o resultado da proliferação celular excessiva de músculo liso que pode ser causada por tensão mecânica. A artéria mamária é relativamente curta, limitando a quantidade de material de desvio disponível. Portanto, ela é vital para melhorar a função dos desvios venosos em termos de intensificação de longevidade.

Arteriosclerose de transplantação é a causa de insuficiência de órgão a longo prazo após transplantação de órgão e envolve proliferação celular excessiva de músculo liso nas artérias do órgão transplantado, resultando em lesões intimaes concêntricas que obstruem o fluxo sanguíneo.

Desvios arteriovenosos são aplicados nos pacientes de hemodiálise e insuficiência do desvio é causada por estiramento mecânico desproporcionado da parede do vaso venoso, causando hiperplasia celular de músculo liso vascular no compartimento venoso do desvio. Os desvios arteriovenosos falhos são tratados com colocação de stent intravascular.

Células do músculo liso desse modo desempenham um papel fundamental em patologias vasculares como a restenose descrita acima (intra-stent) após angioplastia, arteriosclerose de transplantação, doença de enxerto de veia seguindo técnica cirúrgica de "bypass" de artéria coronária, falha de desvio arteriovenoso, como também em aterosclerose. Embora os dois primeiros e os dois últimos tipos de doenças vasculares ocorram na parede de vaso arterial e na parede de vaso venoso, respectivamente, hiperplasia de célula de músculo liso é um fator crítico no princípio e progressão destas doenças de vasos grandes. Vários estímulos estão envolvidos na

iniciação de proliferação celular do músculo liso, dos quais as vias inflamatórias envolvendo macrófagos ativados estão bem-estabelecidas.

Na pesquisa que levou à invenção, por análise de expressão de ampla de genoma, os inventores revelaram que o Receptor órfão nuclear TR3 (TR3, também denominado Nur77, NAK1, NGFI-B, NR4A1), e Receptor órfão nuclear induzido por mitógeno (MINOR, também denominado NOR-1, NR4A3) e Receptor órfão nuclear de células T (NOT, também denominado nurr1, NR4A2) estão entre os genes que são especificamente induzidos em macrófagos e células de músculo liso sob condições ateroscleróticas. Estes três genes formam uma subfamília separada da superfamília de receptor nuclear de fatores de transcrição, que compreende aproximadamente 60 outros incluindo o receptor de estrogênio e os PPARs. Foi mostrado que TR3, MINOR e NOT são expressos em lesões ateroscleróticas humanas, doença de enxerto de veia, e em restenose intra-stent (ISR) e em lesões de desvio arteriovenoso porcino.

Para avaliar a função de fatores semelhantes a TR3 durante a formação de lesão *in vivo*, camundongos transgênicos foram gerados que expressam ou TR3 de comprimento total ou um inibidor de todos os três fatores de transcrição (denominados TR3dTA ou  $\Delta$ TA) sob controle de um promotor, que direciona expressão dos transgenes para células arteriais do músculo liso. Os camundongos foram desafiados por uma ligação de artéria carótida, que resulta na formação de uma lesão rica em célula de músculo liso. Tais lesões vasculares desenvolvem relativamente rápido e podem ser consideradas como o modelo murino de restenose. Camundongos transgênicos que expressam TR3dTA desenvolvem uma neointima maior substancial comparados aos camundongos do tipo selvagem. De acordo com estes dados, hiperplasia intimal é inibido fortemente em camundongos transgênicos que expressam TR3 em células arteriais do músculo liso.

Estes resultados desambigüamente demonstram que TR3, e concebivelmente também MINOR e NOT, inibem formação de lesão rica em célula de músculo liso. Desse modo, de acordo com a invenção foi descoberto que TR3 é um fator protetor que inibe proliferação celular de músculo liso

excessiva durante a formação de lesão vascular.

Além da expressão de TR3, MINOR e NOT em células do músculo liso, os fatores semelhantes a TR3 (isto é TR3, MINOR e NOT) são expressos em lesões ateroscleróticas humanas em macrófagos e em células endoteliais. A expressão de TR3, MINOR e NOT é intensificada fortemente sob ativação de macrófagos cultivados, ambos em macrófagos humanos primários e na linhagem celular monocítica/macrófagos THP-1. Conseqüentemente, foi demonstrado que fatores semelhantes a TR3 inibem liberação de citocina e quimiocina de macrófagos ativados, mais especificamente a expressão de interleucina-1beta, interleucina-6, interleucina-8, proteína-1 quimiotática de monócitos, proteína-1alfa inflamatória de macrófagos e proteína-1beta inflamatória de macrófagos. Além disso, em macrófagos cultivados carga de lipídio é inibida, correlatando com expressão reduzida de receptor-A e CD36 descontaminantes. Conseqüentemente fatores semelhantes a TR3 delimitam também a formação de lesões ateroscleróticas complexas. TR3 foi também demonstrado promover sobrevivência de células endoteliais e angiogênese (Zeng H et al., J Exp Med. 2006, 203:719-729) que facilitará os processos curativos na parede do vaso após lesão vascular como por exemplo angioplastia e colocação de stent.

Com base no acima, a estimulação de atividade de receptor nuclear semelhante a TR3 parece ser a chave para impedir ou reduzir doença cardiovascular relacionada à aterosclerose em geral, e em particular a ocorrência de estenose intra-stent, doença de enxerto de veia, arteriosclerose de transplantação e falha de desvio arteriovenoso.

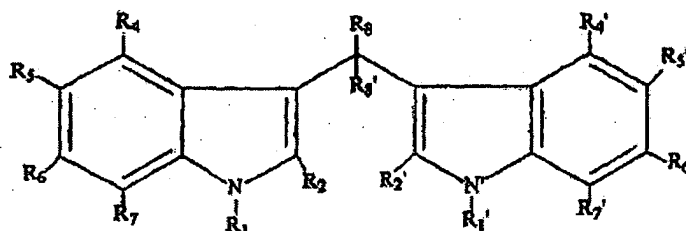
A invenção desse modo diz respeito ao uso de um agonista de um ou mais dos receptores nucleares TR3, MINOR e NOT para a preparação de um medicamento para o tratamento de aterosclerose e/ou doença cardiovascular relacionada à aterosclerose.

Em particular, a invenção diz respeito ao uso de um agonista de um ou mais dos receptores nucleares TR3, MINOR e NOT para a preparação de um medicamento para o tratamento de restenose intra-stent, doença de enxerto de veia, arteriosclerose de transplantação e/ou falha de desvio arte-

riovenoso.

De acordo com a invenção foi mostrado que a atividade transcripcional de TR3, MINOR e NOT é regulada por meio de agonistas não-tradicionais como 1,1-bis(3'-indolil)-1-(p-fenila substituída)metanos e, contendo substituintes de trifluorometila (DIM-C-pPhCF<sub>3</sub>), hidrogênio (DIM-C-Ph) e/ou metóxi (DIM-C-pPhOCH<sub>3</sub>), daqui por diante denominados "C-DIMs", que aumentam a atividade de fatores semelhantes a TR3 (Chintharlapalli et al., J Biol Chem. 2005;280:24903-24914), cujos compostos per se, como também a síntese destes, foram descritos em WO 02/28832.

Conseqüentemente, agonistas preferidos da invenção são os compostos da fórmula:



em que:

R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>1</sub>', R<sub>2</sub>', R<sub>4</sub>', R<sub>5</sub>', R<sub>6</sub>', e R<sub>7</sub>' são cada um independentemente selecionados do grupo que consiste em hidrogênio, um halogênio, um grupo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alquila linear, um grupo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alquila ramificado, um grupo alcóxi contendo um a dez átomos de carbono, e um grupo nitro; e

R<sub>8</sub> e R<sub>8</sub>' são cada um independentemente selecionados do grupo que consiste em hidrogênio, um grupo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alquila linear, um grupo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alquila ramificado, um grupo cicloalquila contendo um a dez átomos de carbono, e um grupo arila.

Em uma modalidade preferida R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>1</sub>', R<sub>2</sub>', R<sub>4</sub>', R<sub>5</sub>', R<sub>6</sub>', e R<sub>7</sub>' são cada um hidrogênio, e pelo menos um de R<sub>8</sub> e R<sub>8</sub>' é um grupo alquila ramificado, um grupo cicloalquila ou um grupo arila.

Preferivelmente, R<sub>8</sub> e R<sub>8</sub>' são cada um individualmente hidrogênio, metila, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>OH, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>, C<sub>10</sub>H<sub>7</sub>, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> ou C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>OCH<sub>3</sub>.

Compostos particulares preferidos que podem ser usados como agonistas de TR3, MINOR e/ou NOT da invenção são compostos em que R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>1</sub>', R<sub>2</sub>', R<sub>4</sub>', R<sub>5</sub>', R<sub>6</sub>', e R<sub>7</sub>' são cada um hidrogênio, e um de R<sub>8</sub>

e R<sub>8</sub>' é hidrogênio e o outro é C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CF<sub>3</sub>, ou C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>OCH<sub>3</sub>.

Em uma modalidade preferida, o agonista é um agonista de TR3.

Em uma modalidade específica da invenção, o tratamento é realizado por meio de um stent que tem o agonista incorporado nele e/ou revestido sobre o mesmo. Um stent é um dispositivo tubular em geral longitudinal formado de material biocompatível, preferivelmente um material metálico ou de plástico. Um stent típico inclui uma configuração flexível aberta. A configuração do stent permite configurar o stent em um estado radialmente comprimido para inserção de cateter intraluminal em um sítio apropriado. Uma vez corretamente posicionado dentro do lúmen de um vaso, o stent é radialmente expandido para suportar e reforçar o vaso. Expansão radial do stent pode ser realizada por um balão inflável ligado ao cateter, ou o stent pode ser do tipo auto-expansão que radialmente expandir-se uma vez posicionado.

Revestimentos podem ser aplicados através de processos como imersão, pulverização, deposição de vapor, polimerização de plasma, como também eletrogalvanização e deposição eletrostática. A pessoa versada no campo é muito bem capaz de selecionar um material de revestimento que é biocompatível e compatível com o agonista, como os "C-DIMs", e tais revestimentos são conhecidos na técnica. Preferivelmente tais revestimentos têm um perfil de eluição que libera o ingrediente ativo em um período mais longo de tempo.

Alternativamente, o próprio stent pode ser feito de um material que tem o agonista incorporado nele. Isto novamente pode ser um material de liberação lenta que libera o agonista em um período mais longo de tempo.

O stent pode também ser feito de um material biodegradável que pode ser revestido ou ter o agonista incorporado nele. Materiais biodegradáveis adequados que podem ser usados de acordo com a invenção são bem-conhecidos à pessoa versada.

Para o tratamento de doença de enxerto de veia o agonista pode ser aplicado à veia enxertada de vários modos. O agonista pode ser incorporado ou revestido em um manguito que é colocado ao redor da veia antes de enxertar. Alternativamente, a veia pode ser revestida com um líquido

contendo o agonista. Adequadamente tal líquido pode ser solidificado para evitar vazamento do agonista para fora do vaso. Preferivelmente tal solidificação pode acontecer antes da implantação da veia no sítio a ser tratado. Um exemplo de uma substância adequada é gel plurônico (também conhecido como Pluronic F127 ou Poloxamer 407) que é um polímero biocompatível que 5  
exibe características de gelação térmica reversa, isto é, o material existe como um líquido em temperatura ambiente e como um sólido em temperatura do corpo. Quando esfriado, o gel plurônico é indolor, incolor, e não-gorduroso. À temperatura do corpo ele engrossa rapidamente. O uso de gel plurônico 10  
para tratar enxertos de veia com aspirina é descrito por Torsney et al., *Circ. Res.* 94(11): 1466-1473 (2004).

Para o tratamento de doença de enxerto de veia o agonista pode também ser aplicado usando um stent externo biodegradável de poligalactina, como descrito por Vijayan et al., *J. Vasc. Surg.* 40(5): 1011-1019 (2004)).

15 A invenção desse modo também diz respeito a um dispositivo médico que é capaz de eluir um agonista de um ou mais dos receptores nucleares TR3, MINOR e NOT, em particular os agonistas descritos acima, para o uso no tratamento de aterosclerose e/ou distúrbios cardiovasculares relacionados à aterosclerose como restenose intra-stent, falha de desvio arteriovenoso e/ou doença de enxerto de veia. Para ser capaz de eluir os ditos 20  
agonistas, o dispositivo médico pode ser revestido com um revestimento adequado incorporando um ou mais dos ditos agonistas e de cujo revestimento os agonistas eluem-se após colocação do dispositivo por exemplo no vaso sanguíneo. O dispositivo médico pode também compreender um material 25  
adequado que incorpora um ou mais dos ditos agonistas, de qual material os agonistas eluem-se.

Em uma modalidade preferida particular, o dispositivo médico é um stent. Para o tratamento de restenose intra-stent, stents intraluminais são preferivelmente usados.

30 Em particular para o tratamento de doença de enxerto de veia o dispositivo médico preferivelmente é um manguito que é capaz de eluir um agonista de um ou mais dos receptores nucleares TR3, MINOR e NOT. De



acordo com a invenção, manguitos adequados são feitos por exemplo de gel plurônico, incorporando um ou mais dos agonistas da invenção.

Os agonistas da presente invenção podem ser adequadamente combinados com qualquer outro agente biologicamente ativo, isto é fármaco ou outra substância que têm um valor terapêutico, incluindo mas não limitado a antitrombóticos, anticoagulantes, agentes antiplaquetas, trombolíticos, antiproliferativos, agentes antiinflamatórios, e outros agentes que inibem restenose, inibidores de células do músculo liso, antibióticos e similares, e misturas destes.

10 A presente invenção será também ilustrada nos Exemplos que seguem e que não são intencionados a limitar a invenção de forma alguma. Nos Exemplos, referência é feita às figuras a seguir:

A figura 1 mostra imunistoquímica específica para célula endotelial e expressão de mRNA de TR3 em segmentos de veia perfundida. Segmentos de veia foram colocados em uma alça de desvio extracorpóreo durante a técnica cirúrgica de "bypass" e expostos ao fluxo sanguíneo total autólogo sob pressão arterial por 1 h. Sob perfusão, enxertos de veia sem stent (B, D, F) exibiram sobre-distensão. Em enxertos de veia com um stent externo (A, C, E) ativação biomecânica foi impedida. Segmentos de veia 20 expostos à perfusão em pressão alta mostraram perda de endotélio, enquanto que células endoteliais capilares (vermelhas) foram observadas próximas da adventícia como um controle para o procedimento (B). Colocação de stent externo preservou integridade do endotélio (A; monocamada vermelha). Expressão de mRNA de TR3 foi observada por hibridação radioativa *in situ* 25 (pontos pretos) na camada de célula de músculo liso circular (Ci) em enxertos de veia sem stent (D 200x; F 400x). Expressão de TR3 escassa foi vista nos enxertos de veia com stent (C 200x; E 400x) ou camada de célula de músculo liso longitudinal (Lo) (C-F).

O desenho esquemático da estrutura de parede de vaso venoso 30 mostra duas camadas de célula de músculo liso distintas; a camada de célula de músculo liso Lo e Ci. A linha pontilhada indica a borda entre a camada de célula de músculo liso Lo e Ci. Núcleos foram contratingidos em púrpuro

(C-F).

A figura 2 mostra expressão de TR3 e de PAI-1 em segmentos de veia perfundida. Segmentos de veia foram expostos por 6 h a sangue total autólogo sob pressão arterial (B, D) ou imediatamente fixados para servir  
5 como controles (A, C). Expressão de mRNA de TR3 e mRNA de PAI-1 foi detectada por hibridação radioativa *in situ* (pontos pretos) ao longo dos enxertos de veia após 6 h de perfusão (B, D), enquanto que expressão de TR3 e de PAI-1 esteve apenas escassamente presente em segmentos de veia de controle (A, C).

10 A figura 3 mostra proliferação induzida por estiramento cíclico em células venosas de músculo liso. Síntese de DNA foi aumentada em resposta a 24 h de estiramento cíclico em células venosas de músculo liso derivadas de dois doadores diferentes, enquanto que células arteriais de músculo liso dos mesmos doadores foram indiferentes em estirar-se (A). Incorporação de  
15 [<sup>3</sup>H]-timidina após estiramento foi expressada como porcentagem de valor de controle. p27<sup>Kip1</sup> foi sobre-regulado após 24 h de estiramento em células venosas de músculo liso, enquanto os níveis de expressão de p21<sup>Cip1</sup> permaneceram iguais a demonstrado por análise de Western Blot (B). Além disso, SM de alfa-actina foi sub-regulada em resposta ao estiramento em células  
20 venosas de músculo liso. Em lisados de células arteriais, a expressão destas proteínas ficou inalteradas. Expressão de alfa-tubulina serviu como controle para carga igual. SV indica células de músculo liso de veia safena; IMA, células de músculo liso de artéria mamária interna; c, controle; s, estiramento.

A figura 4 mostra expressão de TR3 induzida por estiramento em  
25 SMCs venosas e síntese de DNA intensificada após modificação de siRNA de TR3. (A) Expressão de mRNA de TR3 foi aumentada otimamente em SMCs venosas 1 a 2h após estiramento. Expressão de mRNA de TR3 foi corrigida para conteúdo de mRNA igual corrigindo para o estiramento de expressão de mRNA de HPRT. (B) Transfecção de siRNA de SMCs venosas resultou em  
30 sobre-regulação de expressão de mRNA de TR3 após 2h de estiramento cíclico com seqüências de siRNA específicas para gene de TR3, comparadas a um siRNA de controle. (C) Expressão de proteína de TR3 foi detectada

através de imunofluorescência. Em SMCs de IMA apenas sinal de base foi detectado (a, b). Expressão de proteína de TR3 é aumentada em resposta ao estiramento (5 h) em SMCs de SV (comparar c e d) e é sub-regulada por TR3-siRNA (comparar d e f). (D) Modificação de expressão de TR3 endógena

5 através de siRNA-TR3 resulta em síntese de DNA intensificada em resposta ao estiramento como medido por incorporação de [<sup>3</sup>H]-timidina, comparado às SMCs transfeccionadas com siRNA-Con. SV, SMCs de veia safena; IMA, SMCs de artéria mamária interna, \* = P < 0,01. Os resultados em A foram obtido em SV-SMCs derivadas de 6 doadores independentes, em B/C os

10 experimentos foram repetidos em 3 culturas de SV-SMCs distintas e em D em 5 culturas de SV-SMCs distintas.

A figura 5 mostra proliferação diminuída em células venosas de músculo liso com adenovírus de TR3. A expressão de proteína de TR3 após infecção de células venosas de músculo liso com adenovírus de codificação

15 de TR3 foi demonstrada por análise de Western Blot (A). TR3 foi expresso em células de músculo liso estiradas infectadas com TR3, enquanto que as células infectadas com mock não expressaram proteína de TR3 endógena mensurável. Nas células infectadas com TR3, síntese de alfa-actina de SM, calponina e de p27<sup>Kip1</sup> foi mais pronunciada que em células infectadas com

20 mock; alfa-Tubulina serviu como controle para carga igual. Incorporação de [<sup>3</sup>H]-timidina foi aumentada após 24 h de estiramento cíclico em células de músculo liso infetadas com vírus mock, enquanto que as células de músculo liso infetadas com vírus TR3 foram indiferentes em estirar-se (B). Incorporação de [<sup>3</sup>H]-timidina foi expressada como porcentagem do valor de controle de

25 mock.

A figura 6 mostra que um agonista de TR3 inibe síntese de DNA em SMCs venosas expostas ao estiramento cíclico.

(A) Incorporação de [<sup>3</sup>H]-timidina foi aumentada em SMCs em resposta a 24 h de estiramento cíclico, enquanto que 6-MP reduziu proliferação mediada por

30 estiramento de uma maneira dose-dependente. Incorporação de [<sup>3</sup>H]-timidina foi expressa como porcentagem do valor de controle. (B) A expressão de proteína SM $\alpha$ -actina, calponina e de p27<sup>Kip1</sup> em SMCs venosas estiradas

tratadas sem (-) ou com (+) 25  $\mu$ M de 6-MP é detectada por análise de Western Blot.  $\alpha$ -tubulina serviu como controle para carga igual. (C) Quando expressão de TR3 for modificada através de siRNA-TR, 6-MP já não inibe mais síntese de DNA, que foi medida por incorporação de [ $^3$ H]-timidina. Análise de ANOVA dos dados revelou significação dos dados. \* =  $P < 0,05$ , \*\* =  $P < 0,01$ , NS = não-significativo.

A figura 7 mostra a análise imunoistoquímica de uma lesão restenótica intra-stent e expressão de mRNA de TR3. Seções sucessivas de um espécime de restenose intra-stent são ensaiadas para (a) conteúdo de célula de músculo liso e (b) a presença de macrófagos. Apenas números limitados de macrófagos foram mostrados estar presentes. (c, alargamento em d) Hibridação radioativa *in situ* com uma ribossonda específica para TR3, revelou expressão ao longo da lesão, correspondendo com expressão predominante em células de músculo liso de lesão. Células que expressam mRNA de TR3 contêm pontos pretos. Núcleos foram contratingidos em púrpura.

A figura 8 mostra a hibridação radioativa *in situ* para demonstrar expressão de mRNA de TR3, MINOR e NOT em espécimes de aterectomia restenótica intra-stent (espécime 1; a-f e espécime 2; g-1). Expressão difratada ao longo das lesões foi observada para TR3 (a, alargamento em b; g alargamento em h), NOT (c, alargamento em d; i, alargamento em j) e MINOR (e, alargamento em f; k, alargamento em l). Ribossondas-sentido correspondentes não mostraram nenhuma base (dados não-mostrados).

A figura 9 mostra imunoistoquímica para demonstrar expressão da proteína de TR3. Seções sucessivas dos espécimes mostrados na figura 7 foram incubadas com um anticorpo direcionado contra TR3 para revelar um padrão similar de expressão de proteína de TR3 (vermelha-marrom) em restenose intra-stent como mRNA de TR3; (a, alargamento em b) espécime 1 e (c, alargamento em d) para espécime 2.

A figura 10 mostra a expressão de mRNA de TR3, MINOR e NOT por hibridação radioativa *in situ* na neoíntima e adventícia de porcos que receberam um enxerto arteriovenoso durante 4 semanas. Ribossondas-sentido correspondentes não mostraram nenhuma base (dados não-mostrados). A.

expressão de mRNA de TR3 na região do ombro e área de enxerto por hibridação radioativa *in situ* (pontos pretos), contra-tingidas com hematoxilina;  
 B. Expressão de mRNA de MINOR na região do ombro e área de enxerto por hibridação radioativa *in situ* (pontos pretos), contratingidas com hematoxilina;  
 5 C. Expressão de mRNA de NOT na região do ombro e área de enxerto por hibridação radioativa *in situ* (pontos pretos), contratingidas com hematoxilina.

A figura 11 mostra que o agonista de Nur77 6-MP intensifica a atividade de Nur77 em SMCs cultivadas. A atividade transcripcional de Nur77 foi monitorada medindo a atividade de luciferase em SMCs de expressão de  
 10 Nur77 transfeccionadas com um constructo de luciferase de repórter de Nur77, contendo o derivado de POMC de NurRE. Células foram cultivadas na ausência (C, barra branca) ou durante 24 horas na presença de 6-MP (6-MP, barra cinza) (Média  $\pm$  SD); \*  $P < 0,05$ .

A figura 12: agonista de NR4A inibe proliferação de SMCs culti-  
 15 vadas: envolvimento de Nur77.

A: síntese de DNA de SMCs, crescidas em meio com veículo (controle, barra branca) ou concentrações indicadas de 6-MP (barras cinzas). Síntese de DNA foi ensaiada por incorporação de [ $^3$ H]Timidina. Em 25  $\mu$ M ou 50  $\mu$ M de 6-MP, síntese de DNA é reduzida. (Média  $\pm$  SD, n=3); \*  $P < 0,05$ . B: Expressão de  
 20 mRNA de Nur77 é reduzida em SMCs transfeccionadas com siNur77 em comparação às SMCs transfeccionadas com siRNA de controle. Níveis de mRNA foram determinados através de RT-PCR de tempo real e conteúdo de cDNA das amostras foi corrigido para expressão de PO. (Média  $\pm$  SD, n=2); \*  $P < 0,05$ . C: O efeito de 6-MP em síntese de DNA foi determinado por incor-  
 25 poração de [ $^3$ H]timidina em SMCs transfeccionadas com siRNA de controle (triângulos brancos) ou transfeccionadas com siNur77 (quadrados pretos). 6-MP inibem síntese de DNA menos eficaz em células transfeccionadas de siNur77 que em células transfeccionadas de siRNA de controle, demonstrando que o efeito inibidor de 6-MP é pelo menos parcialmente mediado pela  
 30 ativação de Nur77 (Média  $\pm$  SD, n=2); \*  $P < 0,05$ .

A figura 13 mostra que o agonista 6-MP não é citotóxico para SMCs e não induz apoptose.

A: Viabilidade de SMCs incubadas durante 24 horas com veículo (controle, barra branca), 6-MP (barras cinzas) ou estaurosporina (Stau, barra listrada). Viabilidade das células foi determinada através de ensaio de MTT e expressa como uma porcentagem de controle. (Média  $\pm$  SD, n=3); \* P < 0,05.

5 B: SMCs foram incubadas durante 24 horas com veículo, 6-MP ou estaurosporina. Núcleos foram subseqüentemente tingidos usando tintura de Hoechst. Apenas estaurosporina induz apoptose e reduz viabilidade celular.

A figura 14 mostra expressão de mRNA de Nur77 na parede de vaso murino após lesão do manguito. Em pontos de tempo diferentes (6 h até  
10 7 dias) após colocação do manguito, segmentos de vaso do manguito foram colhidos e ensaiados para conteúdo de mRNA de Nur77. Os níveis de expressão de mRNA são indicados como a expressão relativa em comparação aos vasos operados fictícios. (média  $\pm$  SEM, n=6). mRNA de Nur77 já foi elevado 6 horas após lesão e permanece elevado até 7 dias.

15 A figura 15 mostra o efeito de liberação de agonista local de NR4A em formação de neointima. A: Cortes transversais representativos das artérias femorais de camundongos do tipo selvagem (Wt), camundongos transgênicos que expressam cDNA de Nur77 de comprimento total (Nur77) ou camundongos que expressam uma variante negativa dominante de Nur77  
20 ( $\Delta$ TA), com manguitos contendo quantidades diferentes de 6-MP. Os segmentos de vaso com manguito de camundongos Wt e transgênicos de Nur77 foram analisados por tingimento de HPS após 4 semanas e de camundongos transgênicos de  $\Delta$ TA após 2 semanas (ampliação 400x; setas indicam a lâmina elástica interna). B: Análises morfométricas dos segmentos de vaso com  
25 manguito revelaram área intimal total em camundongos Wt e transgênicos de Nur77 4 semanas após colocação dos manguitos. Manguitos continham ou nada (controle), 0,5% ou 1% de 6-MP. C: Área intimal total em artérias femorais com manguito em camundongos transgênicos de  $\Delta$ TA 2 semanas após colocação dos manguitos que contêm nada, 0,5% ou 1% de 6-MP.  
30 (média  $\pm$  SEM, n=6); \*P < 0,05; \*\* P < 0,01.

A figura 16 mostra que derivados de C-DIM inibem proliferação de SMCs cultivadas, humanas. Síntese de DNA de SMCs foi medida por incor-

poração de [<sup>3</sup>H]Timidina na presença de concentrações crescentes de soro e C-DIM-H, C-DIM-OCH<sub>3</sub> ou C-DIM-CF<sub>3</sub>. Todos os três C-DIMs inibem a síntese de DNA em SMCs de forma dose dependente. C-DIM-H é menos eficaz que C-DIM-OCH<sub>3</sub> e C-DIM-CF<sub>3</sub>.

5 A figura 17 mostra viabilidade de SMC, como avaliada por ensaio de MTT, em concentrações crescentes de derivados de C-DIM. C-DIM-H e C-DIM-OCH<sub>3</sub> não afetam a viabilidade de SMC até uma concentração de 10 micromolares, enquanto que C-DIM-CF<sub>3</sub> diminui a viabilidade de SMC em 10 micromolares e é tóxico às células a 20 micromolares.

10 A figura 18 mostra que C-DIM-H, C-DIM-OCH<sub>3</sub> ou C-DIM-CF<sub>3</sub> não induz apoptose em SMCs. SMCs foram incubadas durante 24 horas com veículo, composto de C-DIM (a 10 micromolares) ou estaurosporina. Núcleos foram subsequentemente tingidos usando tintura de Hoechst e a porcentagem dos núcleos apoptóticos foi determinada. Apenas estaurosporina induz  
15 apoptose.

A figura 19 mostra que C-DIM-OCH<sub>3</sub> inibe proliferação de SMCs e o envolvimento de TR3. Síntese de DNA de SMCs foi medida por incorporação de [<sup>3</sup>H]Timidina na presença de soro. Expressão de TR3 foi modificada por siRNA TR3-específica e foi mostrada que C-DIM-OCH<sub>3</sub> é menos eficaz  
20 quando expressão de TR3 é inibida, demonstrando que o efeito inibidor de C-DIM-OCH<sub>3</sub> é pelo menos parcialmente mediado através da ativação de TR3.

A figura 20 mostra a expressão macrófago-específica de Nur77, Nurr1 e NOR-1 em aterosclerose humana. Seções seriais de uma lesão do tipo II humana (doador III (≠) na Tabela 1), foram analisadas através de i-  
25 munoistoquímica para detectar macrófagos (A) e SMCs (B). Para demonstrar expressão macrófago-específica de Nur77, Nurr1 e NOR-1, as seções foram analisadas simultaneamente através de imunoistoquímica macrófago-específica e hibridação *in situ* com sondas gene-específicas (C-H). Ex-  
30 pressão de mRNA (grãos prata-pretos) co-localiza com vários macrófagos (em vermelho) como mostrado por ampliação aumentada por Nur77 (D), Nurr1 (F) e NOR-1 (H). D, F, H são alargamentos das áreas indicadas em C, E,

G respectivamente. MΦ, macrófagos; Neo, neoíntima; Lu, lúmen; M, meios. Setas em D, F e H indicam os macrófagos que expressam os mRNAs específicos.

A figura 21 demonstra expressão da proteína de Nur77, Nurr1 e NOR-1 em aterosclerose humana. Seções seriais de uma lesão do tipo II humana (doador V (†) na Tabela 1), foram analisadas através de imunohistoquímica para detectar macrófagos (A), SMCs (B), Nur77 (C), Nurr1 (D) ou NOR-1 (E). Proteína de Nur77, Nurr1 e NOR-1 é expressada predominantemente em células neointimais e está localizada nos núcleos. As seções mostradas em C-E foram contratingidas para núcleos. MΦ, macrófagos; Neo, neoíntima; Lu, lúmen; M, meios. As linhas pontilhadas indicam a lâmina elástica interna.

A figura 22 mostra a expressão de Nur77, Nurr1 e NOR-1 em macrófagos primários e macrófagos derivados por THP-1 em resposta a LPS e TNF $\alpha$ . Níveis de expressão de mRNA foram determinados através de RT-PCR de tempo real. Em macrófagos primários de 2 doadores diferentes tratados com LPS (100 ng/ml), TNF $\alpha$  (10 ng/ml) ou controle durante 2 horas s níveis de expressão aumentados de mRNA de Nur77, Nurr1 e NOR-1 foram observados (A). Em macrófagos níveis de expressão de mRNA derivados por THP-1 de Nur77, Nurr1 e NOR-1 em resposta a LPS (250 ng/ml, 2 horas) (B) e TNF $\alpha$  (10 ng/ml, 1 hora para Nur77 e Nurr1, 3 horas para NOR-1) (C) foram significativamente aumentados. Expressão ótima é mostrada nos painéis superiores e cursos de tempo são dados nos painéis inferiores. Experimentos de expressão ótima (n=3,  $\pm$  SD, teste t de Student, p < 0,05). Nos experimentos de curso de tempo um experimento representativo é mostrado (n=2). Expressão da proteína de NOR-1 foi analisada em macrófagos derivados por THP-1 tratados com LP (6 horas) através de imunofluorescência e localizados para o núcleo (D).

A figura 23 mostra a eficiência de transdução de infecção lentiviral das células de THP-1 e localização nuclear dos receptores nucleares codificados. Células de THP-1 infectadas com lentivírus vazio Mock (A, B) ou lentivírus de codificação de EGFP (C, D) foram analisadas através de citometria



de fluxo (A-D). Infecção lentiviral resultou em 80-90% de eficiência de transdução. Simultaneamente as células de THP-1 infetadas com lentivírus recombinante que codifica EGFP (E-G)', Nur77 (I-K), Nurr1 (M-O), NOR-1 (Q-S), ou com vírus Mock (H, L, P, e T) foram diferenciadas para macrófagos e analisadas para expressão de EGFP por fluorescência direta (EGFP e Hoechst) ou imunofluorescência localizada ao longo da célula, enquanto que os receptores nucleares estão predominantemente presentes nos núcleos. IF; (imuno)fluorescência.

A figura 24 mostra que sobre-expressão de fator de NR4A em macrófagos derivados de THP-1 reduz absorção de ox-LDL marcado com Dil e expressão de SR-A e CD36. (A) Absorção de ox-LDL marcado com Dil por 3, 6 e 24 horas foi determinada através de fluorometria. Carga de lipídio foi significativamente inferior em macrófagos de THP-1 que sobre-expressam Nur77, Nurr1 ou NOR-1 quando comparado com Mock ( $n=3$ ,  $\pm$  SD, teste t de Student,  $p < 0,01$ ). (B) Após 24 horas de tratamento de ox-LDL marcado com Dil, macrófagos de THP-1 foram analisados por microscopia confocal que mostra intensidade de fluorescência de Dil reduzida em macrófagos sobre-expressando Nur77, localizando para vacúolos de lipídio. (C) Expressão de mRNA de SR-A e CD36 foi determinada através de RT-PCR de tempo real. Macrófagos de THP-1 sobre-expressando Nur77, Nurr1 e NOR-1 expressaram níveis significativamente mais baixos de SR-A e CD36. (B,  $n=3$ ,  $\pm$  SD, teste t de Student;  $p < 0,01$ ).

A figura 25 mostra que sobre-expressão de Nur77, Nurr1 ou NOR-1 reduz produção de citocina e quimiocina inflamatória. Macrófagos de THP-1 que sobre-expressam Nur77, Nurr1 e NOR-1 foram estimulado com LPS (100 ng/ml),  $TNF\alpha$  (20 ng/ml) ou controle durante 3 horas e níveis de mRNA de MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  e MCP-1 (A.1) e IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 (A.2) foram determinados através de RT-PCR de tempo real. Em células infetadas com lentivírus Mock todos os genes analisados foram induzidos 20-8000 vezes após LPS e 3-10 vezes após  $TNF\alpha$  (com exceção de IL-6, não detectável após  $TNF\alpha$  (ND)). Macrófagos de THP-1 que sobre-expressam Nur77, Nurr1 e NOR-1 expressaram níveis de mRNA significativamente mais baixos (>50%

de redução) da maioria dos genes analisados ( $n=3$ ,  $\pm$  SD, teste t de Student,  $p < 0,05$ ). Níveis de proteína de IL-8, IL-1R e IL-6 foram determinados em meios condicionados (B). Sobrenadante foi colhido a 0, 6 e 24 horas após tratamento com LPS. Níveis de proteína de IL8, IL-1 e IL-6 foram significativamente re-  
 5 duzidos em macrófagos de THP-1 que sobre-expressam Nur77, Nurr1 e NOR-1s ( $n=3$ ,  $\pm$  SD, teste t de Student,  $p < 0,05$ ; ND: não detectável; NS: não-significativo).

## EXEMPLOS

### EXEMPLO 1

#### 10 RECEPTOR ÓRFÃO NUCLEAR DE TR3 IMPEDE PROLIFERAÇÃO INDUZIDA POR ESTIRAMENTO CÍCLICO DAS CÉLULAS VENOSAS DE MÚSCULO LISO

Para definir a contribuição relativa do estiramento cíclico sob  
 15 iniciação de doença de enxerto de veia e delinear o mecanismo subjacente deste estímulo em hiperplasia de SMC venosa comparada às SMCs derivadas da artéria mamária interna, a expressão do gene de resposta TR3 precoce foi estudada em modelos de estiramento de SMC distintos.

Primeiro, SMCs cultivadas derivadas de veias safenas e artérias  
 20 mamárias internas foram expostas ao estiramento cíclico e foi mostrado, de acordo com os dados publicados, que SMCs venosas tornam-se proliferativos enquanto que as SMCs arteriais permanecem inativas.

Segundo, tanto vasos humanos quanto de camundongo (trans-  
 gênico) foram estudados em modelos de cultura de órgão dedicados em que  
 25 pressão arterial (pulsátil) foi aplicada.

Terceiro, envolvimento funcional de TR3 em inibição de prolifera-  
 30 ção induzida por estiramento foi demonstrado sobre-expressando o gene, inibindo a expressão de TR3 endógeno com siRNA e intensificando a atividade de TR3 com 6-MP, um agonista de TR3.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 30 ESPÉCIMES DE TECIDO HUMANO

O modelo de perfusão *ex vivo* em que segmentos de veia safe-  
 nosa humana foram expostos a sangue total sob pressão arterial foi usado

como previamente descrito (Stooker et al., J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 121: 290-297, 2001). Brevemente, os segmentos de veia foram colocados em uma alça da circulação extracorpórea durante a técnica cirúrgica de "bypass" e foram expostos a sangue autólogo sob fluxo (não-pulsátil) e pressão arterial (60 mm Hg). Para estudar o efeito de sobre-distensão nas veias de desvio, os segmentos de veia foram perfundidos na presença ou ausência de um stent externo. Após uma e seis horas de perfusão os segmentos de veia foram colhidos, fixados em formalina e embebidos em parafina para exame histológico. Pacientes inclusos neste estudo deram seu consentimento informado e o estudo foi aprovado pelo comitê ético médico local. Anestesia e técnica cirúrgica de "bypass" cardiopulmonar foram executadas de acordo com protocolos rotineiros.

#### HIBRIDAÇÃO *IN SITU*

Hibridações *in situ* foram executadas como descritas em Boot RG et al. (Arterioscler Thromb Vasc Biol., 19:687-94, 1999). Sondas de TR3 e de PAI-1 foram sintetizadas: TR3, GenBank Nº L13740, pares de base (bp) 1221 a 1905; PAI-1, GenBank Nº X12701, bp 52 a 1308. As sondas foram marcadas com [<sup>35</sup>S]-UTP (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, U. K.).

Seções de parafina (5 microns) de segmentos de veia safenosa de controle e perfundida foram montadas em Lâminas SuperFrost Plus (Menzel-Glaser, Braunschweig, Alemanha). Após hibridação e lavagens rigorosas, as seções *in situ* foram cobertas com emulsão de pesquisa nuclear (ILFORD Imaging UK Limited, Cheshire, U. K.), expostas durante 2 a 9 semanas, depois desenvolvidas e contratingidas com hematoxilina e eosina.

Ribossondas-sentido combinados foram ensaiados para cada gene e foram mostrados não fazer não dar nem sinal de base nem específico. Como um controle para a integridade de RNA, hibridações *in situ* foram executadas com uma ribossonda anti-sentido para receptor de trombina PAR-1 (Genbank M62424 bp 3076-3472). PAR-1 foi expresso abundantemente em células de músculo liso de segmentos de veia de controle e perfundidos, indicando que a integridade do RNA era comparável em todos os espécimes (dados não-mostrados).

### IMUNOISTOQUÍMICA

Seções de parafina (5 microns) tiveram a parafina removida, reidratadas e incubadas com 0,3% (v/v) de peróxido de hidrogênio e bloqueadas com 10% (v/v) de soro de cabra pré-imune (DAKO, Glostrup, Dinamarca) em 10 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 150 mM de NaCl (TBS). Subseqüentemente, as seções foram incubadas durante a noite a 4°C com Ulex Europaeus Agglutinin biotinizada (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA) (1:50 diluição) em TBS, seguido por detecção com conjugados de estreptavidina-peroxidase de raiz forte (DAKO) e, subseqüentemente, com amino-etilcarbazol e peróxido de hidrogênio. Células cultivadas foram fixas com metanol e tingidas para alfa-actina de SM com anticorpo monoclonal 1A4 (1:200; DAKO), e anticorpos secundários de anticamundongo de cabra biotinizados (DAKO). Contra-tingindo com hematoxilina as seções foram embebidas em glicergel (Sigma, St., Louis, MO). Tingimento nuclear imunofluorescente foi executado com Hoechst 33258 (Sigma).

### CULTURA DE CÉLULA DE MÚSCULO LISO

Células de músculo liso venosas e arteriais foram cultivadas de explantes de veia safena (SV) e artéria mamária interna (IMA) em Meio 199 com HEPES contendo 20% (v/v) de soro bovino fetal (FBS) com penicilina e estreptomicina (GIBCO, Invitrogen Life Technologies, Breda, Países Baixos) e foram usadas nas passagens 4 a 6. As células de músculo liso foram caracterizadas com anticorpo monoclonal 1A4, direcionadas contra alfa-actina de SM (DAKO) e demonstraram tingimento fibrilar homogêneo. Durante a noite incubação com 10 microns de apoptose de célula de músculo liso induzida por clorofenilidrazona de cianeto de carbonila (CCCP) induziu.

Para estudar respostas induzidas por estiramento, as células de músculo liso foram semeadas em placas de 6 poços que contêm membranas flexíveis revestidas com colágeno (placas de cultivo de BioFlex®, Dunn Labortechnik GmbH, Asbach, Alemanha) e foram estiradas no aparelho Flexercell FX3000 (Dunn Labortechnik) por 1, 2, 4, 6, ou 24 h a 10% de estiramento a 0,5 Hz ou servidas como controle (sem estiramento). Lubrificante com base em silicone foi aplicado para impedir fricção entre a membrana e

pós-carga.

INCORPORAÇÃO DE [<sup>3</sup>H]-TIMIDINA, INFECÇÃO DE ADENOVÍRUS, E LETROPORAÇÃO DE SIRNA E TRATAMENTO COM 6-MP DE SMCS:

5 Células de músculo liso foram semeadas em placas de estiramento de 6 poços e quando aos poços estavam confluentes, as células de músculo foram feitas inativas por 16 h em meio contendo 0,5% (v/v) de FBS.

10 As placas foram transferidas para o Loading Station<sup>®</sup> e estiradas por 24 h. Placas de controle, sem estiramento, foram cultivadas sob condições idênticas. Depois disso, as células foram marcadas por 4 h com 0,5 microCi/mL de [metil-<sup>3</sup>H]-timidina (Amersham Biosciences).

Radioatividade incorporada foi precipitada por 30 min a 4°C com 10% (p/v) de ácido tricloroacético, lavada duas vezes com 5% (p/v) de ácido tricloroacético e dissolvida em 0,5 N NaOH. [<sup>3</sup>H]-timidina foi medida por contagem de cintilação líquida.

15 Quando células foram infetadas com adenovírus contendo mock ou TR3 (3x10<sup>8</sup> unidades formados de placas) por 2 h, as células foram deixadas restabelecer por 24 h em meio completo antes de elas terem sido inativadas. Tratamento de agonista (6-MP) foi iniciado 1 h antes do estiramento com 0, 1, 10, 25 microns C-DIM (matéria-prima a 40 mM em DMSO).

20 As seqüências de RNA de interferência pequenas a seguir (siRNA) foram usadas: siRNA de TR3, 5'-CAG UCC AGC CAU GCU CCU C dTdT-3', e siRNA mutada de controle, 5'-CAG ACG AGC CUU GCU CGU C dTdT-3' (Ambion Inc., UK). Por cavidade de Flexerplate 1 µg de siRNA foi transfectado em 5x10<sup>5</sup> SMCs usando reagente de Nucleofector para SMCs (A-  
25 maxa GmbH, Cologne, Alemanha) como pelas recomendações do fabricante e subseqüentemente as células foram colocadas nas placas de estiramento e foram tratadas como descrito acima.

A ANÁLISE DE WESTERN BLOT

30 Eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida foi executada com lisados de célula (30 microg por rota) e meios de cultura concentrados (equivalente de 200 microl por rota). As proteínas foram transferidas para nitrocelulose - Protran (Schleicher e Schuell,

's-Hertogenbosch, Países Baixos).

Expressão de p27<sup>Kip1</sup> (BD Biosciences, Alphen a/d Rijn, Países Baixos), p21<sup>Cip1</sup> (BD), SM alfa-actina (DAKO), PAI-1 (MAI-12; Biopool, Umea, Suécia), TR3 (M-210; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), calponina (clone hCP; Sigma) e alfa-tubulina (Cedar Lane, Hornby, Ontário, Canadá) foi estudada, usando os anticorpos indicados direcionados contra estas proteínas. Anticorpos primários foram incubados durante a noite a 4°C em 5% de Protifar Plus (Nutricia, Cuijk, Países Baixos) em TBS. Como anticorpos secundários, antiovelho de cabra conjugado com peroxidase de raiz forte (para detecção de p27<sup>Kip1</sup> e de TR3) ou anticamundongo de cabra (para todos os outros) (BioRad II Laboratórios Inc., Hercules, CA) em uma diluição de 1:5000 em TBS foram usados.

Proteínas foram visualizadas por detecção de quimiluminescência intensificada (Lumi - Light<sup>PLUS</sup>; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha). Análise quantitativa foi executada por Lumi-Imager (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemanha). Tingimento de alfa-tubulina serviu como um controle para carga.

#### RT-PCR DE TEMPO REAL

RNA total foi isolado usando reagente de Trizol (GIBCO). cDNA foi sintetizado através de transcrição reversa (RT) de 1 microg de RNA total com SuperScript II (GIBCO) e 0,5 microg de (dT) iniciador 12-18. Reação em cadeia de polimerase de tempo real (PCR) foi executada com o uso do kit I FastStart DNA Master SYBR Green (Roche) no LightCycler System (Roche). Iniciadores para TR3 foram como segue: (adiante) e (reverso)

5'-GTTCTCTGGAGGTCATCCGCAAG-3' e (reverso) 5'-GCAGGGACCTTGAGAAGGCCA-3'. Como um controle para quantidade igual de cDNA de primeiro filamento em amostras diferentes determinaram-se níveis de mRNA de hipoxantina fosforibosil transferase (HPRT) com iniciadores (adiante) 5'-TAATTATGGACAGGACTGAACG-3' e (reverso) 5'-CACAATCAAGACATTCTTTCCAG-3'.

#### RESULTADOS

#### EXPRESSÃO DE TR3 EM SEGMENTOS DE VEIA SAFENA PERFUNDIDA

Para estudar os processos moleculares que causam doença de enxerto de veia, um modelo de perfusão *ex vivo* foi aplicado em que segmentos de veias safenas foram colocados na circulação extracorpórea durante a técnica cirúrgica de "bypass" de artéria coronária. Durante a perfusão, distensão significativa foi observada nas veias safenas sem stent que resultou em uma perda quase completa da camada de células endoteliais após já 1 h de perfusão sob pressão arterial.

Veias protegidas contra tensão mecânica excessiva devido à colocação de um stent externo continham endotélio intacto após perfusão (como ilustrado por imunistoquímica endotélio-específica, Figura 1A).

Nos segmentos de veia sem stent tingimento específico para células endoteliais revelou a presença de células endoteliais em vasos capilares na adventícia, enquanto que o endotélio luminal tinha desaparecido (Figura 1B).

A estrutura das veias safenas difere na organização de célula de músculo liso da parede arterial, visto que as veias contêm duas camadas de célula de músculo liso que são orientadas em direções opostas. Uma camada de células de músculo liso longitudinalmente orientadas é situada perto do lúmen do vaso e uma camada de células de músculo liso circulares (como nos vasos arteriais) está presente adjacente à adventícia (Figura 1, desenho esquemático). Em pesquisa para genes envolvidos em doença de enxerto de veia, expressão de mRNA de gene de resposta precoce TR3 foi ensaiada em segmentos de veia perfundida *ex vivo* por hibridação radioativa *in situ*. Após 1 h de perfusão, expressão de TR3 foi detectada em células endoteliais ocasionais e células de músculo liso nos segmentos de veia sem stent (Figura 1C, E). Porém, expressão de TR3 extensiva foi detectada predominantemente na camada de células de músculo liso circulares dos segmentos de veia sem stent (Figura 1D, F). Expressão de TR3 foi virtualmente ausente no segmento de veia de controle (Figura 2A). Ainda, após 6 h de perfusão, TR3 foi expressado abundantemente ao longo do vaso inteiro, em ambas as camadas de célula de músculo liso longitudinais e circulares, na veia perfundida sem stent (Figura 2B).

Além disso, expressão de mRNA de PAI-1 foi analisada uma vez que no momento PAI-1 é o único gene conhecido que está tanto relacionado com biologia vascular como tem um elemento de resposta de TR3 funcional. PAI-1 esteve presente em células endoteliais ocasionais e células de músculo liso em veias de controle (Figura 2C) e após 1 h de perfusão (dados não-mostrados). Porém, expressão de PAI-1 foi aumentada fortemente em células de músculo liso após 6 h de perfusão (Figura 2D).

Em conclusão, mRNA de TR3 e PAI-1 são expressos em células de músculo liso em enxertos de veia safena submetidos à perfusão sob pressão arterial e expressão de mRNA de TR3 está localizada inicialmente nas SMCs circularmente orientadas. A camada de SMC circular é a parte externa da parede de vaso venoso indicando que a expressão de TR3 não é induzida presumivelmente por um fator circulante no sangue ou em resposta ao dano de célula endotelial, mas do contrário que o estímulo fundamental é estiramento cíclico.

#### PROLIFERAÇÃO INDUZIDA POR ESTIRAMENTO CÍCLICO EM CÉLULAS DO MÚSCULO LISO VENOSO

Para investigar por qual material de desvio de artéria mamária tem uma patência melhor que o material de desvio derivado de veia safena, a diferença intrínseca entre as células de músculo liso derivadas destes vasos diferentes foi estudada em resposta à tensão mecânica. Para os experimentos de estiramento *in vitro* um dispositivo de estiramento experimental (aparelho Flexercell FX-3000) foi aplicado em que todas as células são expostas à mesma extensão de estiramento. Padronização deste modelo de estiramento envolveu análise de síntese de DNA.

Células de músculo liso, derivadas de artéria mamária ou origem de veia safena, foram submetidas a 10% de estiramento cíclico (0,5 Hz) por 24 h e incorporação de [<sup>3</sup>H]-timidina foi medida. Foi observado que estiramento induziu síntese de DNA em células venosas de músculo liso (2 a 3,5 vezes, dependente do doador A ou B), enquanto que as células arteriais do músculo liso derivadas dos mesmos indivíduos permaneceram inativas (Figura 3A).



Para também substanciar alterações na progressão do ciclo celular, o nível de expressão das proteínas de ciclo celular foi analisado em lisados de células de células do músculo liso estiradas de origem venosa e arterial. Inibidor de cinase ciclina-dependente P27<sup>Kip1</sup> foi constatado ser diminuído em estiramento em células venosas de músculo liso (Figura 3B). Em contraste, estiramento não alterou a expressão de p27<sup>Cip1</sup> em células arteriais do músculo liso. A expressão de outro inibidor de ciclo celular, p21<sup>Cip1</sup>, não foi afetada pelo estiramento em células venosas de músculo liso e arteriais. Expressão de SM alfa-actina foi ensaiada como um marcador para células de músculo liso inativas e foi diminuída moderadamente em células venosas de músculo liso após estiramento (Figura 3B).

Em conclusão, alongamento mecânico cíclico induziu o fenótipo proliferativo em células de músculo liso de veia safena, enquanto que células de músculo liso de artéria mamária permaneceram inativas.

#### 15 EXPRESSÃO DE TR3 INDUZIDA POR ESTIRAMENTO CÍCLICO EM CÉLULAS VENOSAS DE MÚSCULO LISO

Para estender as observações feitas nos segmentos de SV expostos à perfusão, foi determinado se o mRNA de TR3 é também expresso por SMCs cultivadas *in vitro* sob estiramento cíclico. SMCs de veia safena e artéria mamária foram estiradas durante períodos de 1, 2, 4 ou 6 h, enquanto as células não-estiradas serviram como controles. mRNA de TR3 foi sobre-regulada em SMCs arteriais (figura 4A). Porém, em SMCs venosas, expressão de mRNA de TR3 foi induzida 14,2 +/- 1,7 vezes após a 1 a 2 h de estiramento cíclico para um nível significativamente mais alto que em SMCs arteriais. Expressão de proteína de TR3 foi analisada através de imunofluorescência (figura 4C, a-d), demonstrando apenas sinal de base em SMCs de artéria mamária sem e com estiramento (a, b). Em SMCs de veia safena transfeccionada com um siRNA de controle, expressão de proteína de TR3 é robustamente induzida após 5h de estiramento (c, d). Novamente, SMCs derivadas de artéria mamária parecem ser distintas das SMCs venosas e parecem menos responsivas ao estiramento cíclico.

Em estudos anteriores descreveu-se e aplicou-se uma variante

negativa dominante de TR3 ( $\Delta$ TA) que inibe a atividade de todos fatores semelhantes a TR3. No estudo atual, selecionou-se especificamente modificar a expressão de TR3 em SMCs venosas através de siRNA TR3-específico. Claramente, siRNA TR3-específico reduziu a expressão de mRNA de TR3 endógena após 2 h de estiramento cíclico em aproximadamente 30% da expressão na presença de um siRNA de controle (figura 4B). Expressão de proteína de TR3 foi também reduzida através de modificação de siRNA como mostrado na figura 4C por imunofluorescência (comparar d e f). Significativamente, esta redução na expressão de TR3 resultou em uma resposta proliferativa aumentada das células em resposta ao estiramento como mostrado por experimentos de incorporação de [ $^3$ H]-timidina (figura 4D).

#### EXPRESSÃO ADENOVIRAL DE TR3 DIMINUIU PROLIFERAÇÃO EM CÉLULAS VENOSAS DE MÚSCULO LISO

Para avaliar o envolvimento funcional de TR3 na resposta de células venosas de músculo liso à tensão mecânica, TR3 foi sobre-expresso aplicando infecção adenoviral. Expressão de proteína de TR3 em células de músculo liso estiradas foi confirmada por análise de Western Blotting (Figura 5A). Até mesmo após estiramento, as células de músculo liso infectadas com vírus de TR3 mostraram um fenótipo de célula de músculo liso mais diferenciado (contrátil) refletido por síntese aumentada de alfa-actina de SM, calponina e proteína de p27<sup>Kip1</sup> quando comparadas às células infectadas com vírus mock (Figura 5A).

Após 24 h de estiramento, as células infectadas com vírus foram ensaiadas para síntese de DNA mediante incorporação de [ $^3$ H]-timidina. Células infectadas com vírus mock mostraram uma resposta similar que as células venosas de músculo liso não-infectadas (comparar com a Figura 3A) incorporação de [ $^3$ H]-timidina foi induzida 2,7 vezes sob estiramento (Figura 5B). Células de músculo liso infectadas com TR3 não proliferaram sob condições de estiramento cíclico como revelado por uma quantidade igual de incorporação de [ $^3$ H]-timidina em células de controle e de músculo liso infectadas com TR3 estiradas.

Em conclusão, sobre-expressão de TR3 impede a diferenciação

para um fenótipo proliferativo.

### PROLIFERAÇÃO DIMINUÍDA EM CÉLULAS VENOSAS DE MÚSCULO LISO ATRAVÉS DE TRATAMENTO DE AGONISTA DE TR3

Para determinar se 6-mercaptopurina (6-MP), um agonista de TR3 conhecido, influência proliferação induzida por estiramento, SMCs venosas foram tratadas com 6-MP em várias concentrações. SMCs venosas sem tratar, submetidas a 24 h de estiramento, mostraram uma indução de 2,5 vezes de incorporação de [<sup>3</sup>H]-timidina, enquanto que o efeito na síntese de DNA foi reduzido em uma maneira dose-dependente através de tratamento com 6-MP (figura 6A). A 25 μM de 6-MP, síntese de DNA induzida por estiramento foi completamente inibida. Análogo à sobre-expressão de TR3, 6-MP também aumenta SMα-actina e calponina como também expressão de proteína de p27<sup>kip1</sup> sob condições de estiramento (figura 6B). Para revelar a contribuição relativa de TR3 na inibição mediada por 6-MP de proliferação induzida por estiramento, ensaiou-se o efeito de 6-MP em síntese de DNA em SMCs transfeccionadas com TR3-siRNA (figura 6C). Modificação de TR3 através de siRNA abole completamente o efeito de 6-MP na síntese de DNA induzida por estiramento. Estes dados de forma desambígua demonstram que TR3 medeia o efeito inibidor de 6-MP na resposta proliferativa de SMCs sob estiramento, e que os agonistas de TR3, como os agonistas de acordo com a invenção, os "c-DIMs", são candidatos de fármaco muito promissores no tratamento de doenças cardiovasculares relacionadas à ateroscleros.

### CONCLUSÃO

Em conclusão, doença de enxerto de veia é o resultado de proliferação de SMC excessiva em resposta à estimulação biomecânica de enxertos de desvios venosos. SMCs venosas respondem ao estiramento cíclico por iniciação de proliferação, enquanto ao mesmo tempo também sistemas de realimentação inibidores do ciclo celular são ativados, como os recentemente descritos para a via de IEX-1 (Schulze et al., Circ. Res. 93: 207-212, 2003) e a via de fator de transcrição de TR3 como identificado neste estudo. A atividade de TR3 endógeno é intensificada pro 6-MP que mostra os agonistas de TR3, como 6-MP, podem modular espessamento intimal biomecânico após técnica

cirúrgica de "bypass" como um meio para impedir proliferação de SMC excessiva e doença de enxerto de veia subsequente. Os dados acima desse modo mostram que TR3 pode atuar como um alvo para intervenção em doença de enxerto de veia.

## 5 EXEMPLO 2

### EXPRESSÃO DE RECEPTORES NUCLEARES TR3, MINOR E NOT EM RESTENOSE INTRA-STENT E EM LESÕES DE DESVIO ARTERIOVENOSO PORCINO

10 No exemplo atual, expressão de fatores semelhantes a TR3 em restenose intra-stent e em lesões de desvio arteriovenoso porcino foi estudada por hibridação *in situ* e imunoistoquímica.

#### MATERIAIS E MÉTODOS

##### ESPÉCIMES DE TECIDO HUMANO

15 As amostras de tecido humano foram obtidas, com consentimento informado, de pacientes que sofrem aterectomia coronária direcional para restenose intra-stent, de acordo com os protocolos aprovados pelos Medical Committees of the Academic Medical Center, Amsterdã e a University of Groningen, Groningen (Países Baixos). Os espécimes recuperados foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido, armazenados a -80°C, e  
20 seções de 5 mm foram montadas em lâminas de vidro SuperFrost Plus para imunoistoquímica e hibridação *in situ* (Emergo, Tournai, Bélgica).

##### ESPÉCIMES DE TECIDO PORCINO

25 Porcas de Landrace receberam enxertos arteriovenosos (enxerto AV) bilateralmente entre a artéria carótida e a veia jugular usando politetrafluoroetileno expandido (ePTFE). Após 4 semanas os enxertos e os vasos adjacentes foram perfundidos com solução salina e subsequente com formalina em pressão fisiológica. Subseqüentemente, enxertos e vasos adjacentes foram excisados e imersos em formalina por pelo menos 24 h após o qual blocos de 5 mm de parafina foram embebidos. Dos espécimes recuperados,  
30 seções de 5 um foram montadas em lâminas SuperFrost Plus de vidro para hibridação *in situ* (Emergo, Tournai, Bélgica). O modelo de porco e a histologia de lesão de enxerto neointimal são descritos em detalhes por

Rotmans JL et al., Journal of Surgical Research 113, 161-171 (2003) e Circulation 111, 1537-42(2005). O modelo é usado como um modelo para insuficiência de enxerto arteriovenoso (em outras palavras estenose).

### HIBRIDAÇÃO *IN SITU*

- 5                    Hibridação *in situ* radioativa foi executada como previamente descrita. As ribossondas a seguir foram usadas: TR3, Genbank L13740, pares de base (bp) 1221-1905; MINOR, Genbank U12767, bp 1435-2172; NOT, Genbank X75918, bp 119-1003. Ribossondas-sentido combinadas foram ensaiadas para cada gene e foram mostradas não fazer nem do sinal de base  
10 nem um específico.

### IMUNOISTOQUÍMICA, WESTERN BLOT E ENSAIO IMUNORRADIOMÉTRICO

- 15                    Antígeno de TR3 foi detectado através de imunoistoquímica com um anti-soro de coelho, direcionado contra Nur77 (M-210, Santa Cruz Biotechnology, CA).

### RESULTADOS

#### EXPRESSÃO DE TR3, MINOR E NOT EM ESPÉCIMES DE ATERECTOMIA

- 20                    Nove espécimes de restenose intra-stent, obtidos por aterectomia direcional intravascular em artérias coronárias de nove pacientes diferentes, foram examinados por hibridação *in situ* e imunoistoquímica para expressão dos receptores nucleares TR3, MINOR e NOT. Tabela 1 mostra os resultados.

TABELA 1

	Gênero	idade	porcentagem de células expressando		
			TR3	NOT	MINOR
1	Feminino	75	38	35	25
2	Macho	68	31	25	16
3	Macho	68	31	23	33
4	Macho	57	13	27	7
5	Macho	75	17	18	18
6	Macho	62	2	48	nd
7	Feminino	48	45	28	4
8	Macho	69	78	50	21

	Gênero	idade	porcentagem de células expressando		
			TR3	NOT	MINOR
9	Feminino	48	43	70	13

O tipo de célula principal presente em lesões restenóticas intra-stent é a célula de músculo liso como é mostrada na figura 7a através de imunoistoquímica específico para célula de músculo liso. Porém, em algumas áreas macrófagos difratados estão presentes (figura 7b). Expressão de mRNA de TR3 abundante foi observada como mostrado na figura 7c (ampliação na figura 7d). Análises extensivas de expressão de mRNA de TR3, MINOR e NOT foram executadas e os dados em dois espécimes, derivados de dois doadores distintos, estão mostrados na figura 8 (a-f e g-1, espécime 1 e 2, respectivamente).

Em cada espécime em seções sucessivas, a expressão substancial foi observada de mRNA de TR3 (a, b, g, h), MINOR (c, d, i, j) e NOT (e, f, k, 1). Nos nove espécimes diferentes analisados, a maioria dos espécimes mostraram expressão destes fatores de transcrição ao longo da lesão, como nos exemplos típicos mostrados, com claramente nem todas as células de músculo liso expressando os fatores semelhantes a TR3. A porcentagem de células que expressam um dos receptores nucleares foi determinada e revelada  $33 \pm 22\%$  das células positivas para TR3,  $36 \pm 17\%$  das células com expressão de NOT, enquanto  $17 \pm 10\%$  expressaram MINOR (Tabela 1). De acordo com os resultados obtidos para expressão de mRNA de TR3, imunoistoquímica com anticorpos de anti-TR3 revelou que a proteína de TR3 foi também expressa em seções sucessivas destes espécimes de restenose intra-stent (figura 9).

#### EXPRESSÃO DE TR3, MINOR E NOT EM NEOÍNTIMA DE ENXERTO ARTERIOVENOSO EM UM MODELO DE PORCO PARA INSUFICIÊNCIA DE ENXERTO DE AV

Seções de parafina porcinas foram analisadas para a expressão de mRNA de TR3, MINOR e NOT por hibridação radioativa *in situ*. Todos os 3 receptores nucleares TR3, MINOR e NOT foram extensiva e altamente expressos no ombro e região de almofada da neoíntima de enxerto que princi-

palmente consiste em células de músculo liso vasculares proliferativas. Além disso, TR3, MINOR e NOT foram também expressos na área ao redor do enxerto em que além das células de músculo liso, células inflamatórias como macrófagos estão presentes (Figura 10 A-C).

## 5 CONCLUSÃO

Este exemplo demonstra a expressão de todos os três membros da subfamília semelhantes a TR3 em neointima intra-stent e neointima de enxerto arteriovenoso. Apesar do efeito inibidor claro de TR3 sobre o crescimento de célula de músculo liso, sua atividade é aparentemente insuficiente para impedir restenose sintomática em sítios de stent e/ou colocação de enxerto nos pacientes estudados. A presente invenção é com base em aumentar a atividade de TR3 pré-existente por agonistas cuja intervenção é visada em diminuir a formação neointimal em geral e restenose.

De acordo com a invenção foi constatado que C-DIMs intensificam a atividade de fatores semelhantes a TR3. Alvejamento destes fatores com compostos de molécula pequena, como C-DIMs, é altamente específico para áreas doentes da árvore vascular uma vez que os fatores semelhantes a TR3 são sintetizados caracteristicamente em lesão células de músculo liso e não em artérias normais.

## 20 EXEMPLO 3

### ATIVACÃO DE AGONISTA DE NUR77 (TR3) PROTEGE CONTRA FORMAÇÃO NEOINTIMAL

Um modelo de camundongo bem-definido de formação neointimal consiste em colocação de um manguito perivascular não-constritivo ao redor da artéria femoral do camundongo (Quax et al. Circulation 103: 562-569, 25 2001). Foi mostrado que o manguito perivascular não-constritivo pode ser construído de uma formulação polimérica adequada para liberação de fármaco controlada (Cais et al. Biomaterials 26:5386-5394, 2005). Um tal manguito de polímero de elução de fármaco novo simultaneamente induz hiperplasia intimal reprodutível e permite liberação confinada de fármacos para o segmento de vaso com manguito. No estudo atual, estes manguitos de elução de fármaco foram aplicados para avaliar o efeito local dos agonista de 30

TR3 sobre a formação de neointima.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### CULTURA DE SMC

SMCs humanas foram explantadas de artérias de cordão umbilical. Células foram cultivadas em DMEM (Invitrogen Life Technologies, Breda, Países Baixos) com 10% (v/v) de soro bovino fetal (FBS) com penicilina e estreptomicina (Invitrogen). Células foram usadas nas passagens cinco a sete. As SMCs foram caracterizadas com um anticorpo monoclonal, direcionado contra alfa-actina de músculo liso (1A4, DAKO), e demonstraram tingimento fibrilar uniforme. Para determinar a viabilidade celular, as células foram lavadas com PBS e subseqüentemente incubadas em meio na presença de 0,5 mg/ml de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT; Sigma Diagnostics, St. Louis). Após duas horas, o meio foi descartado, os cristais de formazan foram dissolvidos em isopropanol e densidade óptica foi medida a 590 nm. Apoptose foi induzida incubando as células durante 24 horas em meio com 0,25  $\mu$ M de estaurosporina (Sigma). Subseqüentemente, SMCs foram fixadas, tingidas com tintura de Hoechst e o número relativo de núcleos apoptóticos foi determinado.

### EXPERIMENTOS DE TRANSFEÇÃO E ENSAIO DE LUCIFERASE

Células foram eletroporadas usando o método de Amaxa (Amaxa, Alemanha) com reagente de nucleofector para SMCs. Em cada transfecção, 0,5-1,0 x 10<sup>6</sup> células foram usadas e 3,5  $\mu$ g de plasmídeo de repórter de Nur77 com 1,5  $\mu$ g de plasmídeo de Renilla luciferase (contendo o promotor de timidina cinase) para corrigir para número de célula e eficiência de transfecção. O plasmídeo de repórter de NUR77 continha o elemento de resposta de Nur (NurRE) do promotor de POMC em triplicata com o promotor mínimo de -34/+63 de gene de POMC.<sup>19</sup> 24 horas após transfecção, as células foram incubadas com 6-MP (Sigma) por 24 horas e atividade de luciferase foi ensaiada com o sistema de repórter de luciferase Dual (Promega, Madison, WI).

### ENSAIO DE SÍNTESE DE DNA

SMCs foram semeadas em placas de 24 poços a 1-4 x 10<sup>4</sup> células por cavidade e alcançados 60% a 70% de confluência após 24 horas. SMCs



foram feitas inativas através de incubação durante 24 horas em meio livre de FBS. 6-MP foi dissolvido em dimetilsulfóxido e aplicado uma hora antes da estimulação de FBS. SMCs foram estimuladas durante 24 horas com 10% (v/v) de FBS e subsequentemente células foram marcadas durante 18 horas com 0,25 pCi/cavidade de [metil-<sup>3</sup>H]timidina (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). Radioatividade incorporada foi precipitada por 30 min a 4°C com 10% (p/v) de ácido tricloroacético, lavada duas vezes com 5% (p/v) de ácido tricloroacético, e dissolvida em 0,5 N de NaOH (0,5 ml por cavidade). [<sup>3</sup>H]timidina incorporada foi medida por contagem de cintilação líquida.

#### 10 EXPERIMENTOS DE siRNA

As seqüências de (si)RNA de interferência pequena a seguir foram usadas: siRNA de Nur77, 5'-CAG UCC AGC CAU GCU CCU C dTdT-3', como previamente descrito<sup>20</sup>, e siRNA de controle, 5'-CAG ACG AGC CUU GCU CGU C dTdT-3' (Ambion Inc., Austin, Texas). Cinco pg de siRNA foram transfeccionados para 0,5-1 x 10<sup>6</sup> SMCs, usando reagente de nucleofector para SMCs (Amaxa) como pelas recomendações do fabricante. mRNA total foi isolado cinco dias após transfecção, usando o kit de miniprep de mRNA absolutamente (Stratagene, La Jolla, CA). Síntese de cDNA subsequente foi executada usando o kit de síntese de cDNA de iScript (Biorad, Hercules, CA).

20 Reação em cadeia de polimerase de tempo real (PCR) foi executada usando mistura verde de SYBR (Biorad) no MyIQ System (Biorad). Preparadores para Nur77 foram como segue: (adiante) 5'-GTTCTCTGGAGGTCATCCGCAAG-3' e (reverso) 5'-GCAGGGACCTTGAGAAGGCCA-3'. Como um controle para quantidade igual de cDNA de primeiro filamento em amostras diferentes nós

25 corrigimos para níveis de mRNA de Fosfoproteína Ribossômica (PO), que foram determinados com os iniciadores a seguir (adiante) 5'-TCGACAATGGCAGCATCTAC -3' e (reverso) 5'-ATCCGTCTCCACAGACAAGG-3'.

#### MANGUITOS DE ELUÇÃO DE FÁRMACO

30 Manguitos de liberação de fármaco com base em poli( $\epsilon$ -caprolactona) foram fabricados como previamente descritos (Cais et al. Biomaterials 26: 5386-5394, 2005). Brevemente, 6-MP foi dissolvido em

concentrações diferentes em mistura de fármaco-polímero misturada, fundida e os manguitos foram projetados para ajustar ao redor da artéria femoral de camundongos. Manguitos de eluição de fármaco são formatados como cilindros longitudinalmente cortados com um diâmetro interno de 0,5 mm, um diâmetro externo de 1,0 mm, um comprimento de 2,0 mm e um peso de aproximadamente 5,0 mg. Manguitos de eluição de fármaco foram carregados com 0,5% (p/p) e 1% (p/p) de 6-MP e os perfis de liberação *in vitro* foram determinados durante um período de 4 semanas, como descrito antes (n=5/grupo). 6-MP mostrou uma liberação contínua e dose-dependente. Liberação total em 4 semanas foi:  $11,3 \pm 2,3$  pg (46,3%) e  $30,0 \pm 3,5$  pg (58,7%) para o manguito de eluição de 6-MP de 0,5% e 1%, respectivamente.

#### MODELO MURINO DE MANGUITO DE ARTÉRIA FEMORAL

Todo o trabalho de animais foi aprovado por autoridade reguladora institucional de AMC e realizado conforme as diretrizes emitidas pelo governo holandês. Camundongos de FVB do tipo selvagem (Wt), camundongos transgênicos que expressam o gene de Nur77 de comprimento total (Nur77), ou camundongos que expressam uma variante dominante-negativa de Nur77 ( $\Delta$ TA) (as duas últimas cepas sob controle do promotor de SM22 $\alpha$ , que direciona a expressão de transgenes específicos para SMCs), em uma base de FVB, foram usados para experimentos. Camundongos machos de 10-12 semanas de idade foram alimentados com uma dieta de comida padrão. Na hora da cirurgia, os camundongos foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de 5 mg/kg de Dormicum (Roche, Basel, Suíça), 0,5 mg/kg de Dormitor (Orion, Helsinki, Finlândia) e 0,05 mg/kg de Fentanila (Janssen, Geel, Bélgica). A artéria femoral foi dissecada de seus ambientes e livremente embebidas com um manguito não-constritivo. Ou um controle, manguito vazio ou um manguito de eluição de 6-MP (0,5% ou 1% p/p) foi usado (n=6/grupo).

#### EXPRESSÃO DE mRNA DE NUR77 (TR3) EM ARTÉRIA FEMORAL DE CAMUNDONGO COM MANGUITO

Camundongos Wt machos sofreram colocação de manguito de artéria femoral como descrito acima. Os animais foram sacrificados em pontos

de tempo diferentes após cirurgia (0, 6, 24, 48, 72 horas, e 7 dias), empregando quatro camundongos para cada ponto de tempo. Artérias femorais foram isoladas, colhidas e congeladas rapidamente. RNA total foi isolado usando o RNeasy Fibrous Tissues Mini-Kit (Qiagen, Venlo, Países Baixos), de acordo com o protocolo do fabricante. cDNA foi feito de todas as amostras de RNA, usando contos de RT-PCR Ready-To-Go (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia).

Os iniciadores de extensão de íntrons e sondas foram projetados para hibridar com cDNA de Nur77 murino (sentido: 5'-GGGCATGGTGAAGGAAGTTGT-3'; anti-sentido: 5'-AGGCTGCTTGGGTTTTGAAG-3'; Sonda: 5'-CCGCCCTTTTAGGCTGTCTGTCCG-3'), usando Primer Express<sup>®</sup> 1.5 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Hipoxantina fosforibosiltransferase (HPRT) foi ensaiada para corrigir a entrada de cDNA. Para cada ponto de tempo, RT-PCR foi executada em duplicata. Os dados estão apresentados como indução em vezes de expressão de mRNA de Nur77 em vasos lesados e não-lesados.

#### QUANTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DAS LESÕES INTIMAIS EM ARTÉRIAS FEMORAIS COM MANGUITO

Camundongos Wt e transgênicos sobre-expressando Nur77 foram sacrificados em 28 dias após colocação de manguito, enquanto que camundongos transgênicos de  $\Delta$ TA foram sacrificados em 14 dias após cirurgia. O tórax foi aberto e uma perfusão de pressão moderada (100 mmHg) com 4% (v/v) de formaldeído em 0,9% (p/v) de NaCl foi executada por 5 min através de furo cardíaco. Após perfusão, as artérias femorais foram colhidas, fixadas durante a noite em 4% (v/v) de formaldeído, desidratadas e embebidas em parafina. Cortes transversais seriais (5  $\mu$ m de espessura) para análise histológica foram usados ao longo do comprimento inteiro da artéria femoral com manguito. Todas as amostras foram habitualmente tingidas com hematoxilina-floxina-açafrão (HPS). Tingimento de elastina de Weigert foi usado para visualizar as lâminas elásticas. Dez cortes transversais igualmente espaçados foram usados em todos os camundongos para quantificar as lesões

intimais. Usando software de análise de imagem (Leica Qwin, Wetzlar, Alemanha), área mediana transversal total foi medida entre a lâmina elástica externa e interna; área intimal transversal total foi medida entre a monocamada de célula endotelial e a lâmina elástica interna.

## 5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Experimentos *in vitro* foram repetidos pelo menos duas vezes e é apresentado como média  $\pm$  SD e foram analisados por teste t de Student. Os experimentos animais estão apresentados como média  $\pm$  SEM e são analisados usando o teste U de Mann-Whitney (SPSS 11.5 para Windows). Valores P menos que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

## RESULTADOS

### 6-MP INTENSIFICA ATIVIDADE DE NUR77 (TR3) EM SMCS CULTIVADAS

Para investigar se 6-MP aumenta a atividade transcripcional de Nur77 em células vasculares, SMCs humanas foram transduzidas com lentivírus que codifica Nur77, resultando em expressão em 85-90% das células infectadas e níveis de mRNA de Nur77 aumentados comparados às SMCs infectadas com mock (dados não-mostrados). Imunofluorescência de SMCs transduzidas revelou sobre-expressão de proteína de Nur77 para o núcleo (dados não-mostrados). SMCs sobre-expressando Nur77 foram subsequentemente eletroporadas com o constructo repórter de vaga-lume luciferase, contendo a seqüência NurRE palindrômica (elemento de resposta de Nur77 do promotor de POMC) (TGATATTT<sub>n6</sub>AAATGCCA) para monitorar a atividade transcripcional de Nur77 em combinação com o constructo de timidina cinase-renila luciferase como um controle para eficiência da transfecção.

Incubação de SMCs durante 24 horas com 50  $\mu$ M de 6-MP resulta em um aumento de 10 vezes em atividade de Nur77 (Figura 11). Estes dados indicam claramente que o agonista 6-MP robustamente intensifica atividade de Nur77 (TR3) em SMCs cultivadas.

### 6-MP INIBEM PROLIFERAÇÃO DE SMCS: ENVOLVIMENTO DE NUR77 (TR3)

Para estudar se 6-MP modula proliferação de SMC, investigou-se a síntese de DNA de SMCs cultivadas, humanas na presença de concen-

trações crescentes de 6-MP. Como esperado, 6-MP inibe a síntese de DNA em SMCs (Figura 12A). para avaliar a contribuição específica de Nur77 neste processo, a expressão de Nur77 foi modificada por (si)RNA de interferência pequena em SMCs humanas. Transfecção com siRNA direcionado contra Nur77 ou com siRNA de controle, resulta em sobre-regulação de níveis de mRNA de Nur77 induzidos por FBS nas células transfectadas de siNur77, como determinado por RT-PCR de tempo real (Figura 12B). Incorporação de [<sup>3</sup>H]Timidina é significativamente mais alta em células em que Nur77 é modificado através de siRNA gene-específico em comparação às SMCs transfectadas com siRNA de controle. Para visualizar o efeito relativo de 6-MP na síntese de DNA em SMCs transfectadas com RNA de siNur77 ou com siRNA de controle, expressou-se a incorporação de [<sup>3</sup>H]Timidina como porcentagem de condição de controle (Figura 12C). Síntese de DNA é inibida por 6-MP em 61% quando as SMCs com siRNA de controle são transfectadas, enquanto que o efeito de 6-MP é significativamente menor em SMCs transfectadas com siRNA Nur77-específico, uma vez que apenas 41% de inibição da síntese de DNA é observada. Estes dados demonstram claramente que 6-MP inibe a síntese de DNA em SMCs pelo menos em parte através da ativação de Nur77. Possivelmente, o efeito restante de 6-MP pode ser atribuído à atividade de Nur77 residual e/ou à ativação de Nurr1 e/ou NOR-1 mediada por 6-MP.

#### 6-MP NÃO É CITOTÓXICO PARA SMCS E NÃO INDUZ APOPTOSE

Para verificar se 6-MP é citotóxico, SMCs inativas foram incubadas durante 24 horas com concentrações crescentes de 6-MP e viabilidade das células foi determinada com um ensaio de MTT padrão. O número de células viáveis é reduzido em resposta à estaurosporina (35% de redução), enquanto que 6-MP não afeta a viabilidade celular (Figura 13A), indicando que sob estas condições 6-MP não têm nenhum efeito citotóxico em SMCs humanas.

Para investigar se 6-MP induz apoptose em SMCs, SMCs inativas foram incubadas durante 24 horas com concentrações crescentes de 6-MP. Como um controle positivo, estaurosporina foi mostrada induzir apoptose em

SMCs ( $50\% \pm 4\%$ ). Claramente, nenhuma evidência foi encontrada que 6-MP afeta morte celular sob estas condições ( $3\% \pm 2\%$ ) em comparação às células de controle ( $4\% \pm 2\%$ ). (Figura 13B).

#### NUR77 (TR3) É EXPRESSO DURANTE O PROCESSO DE FORMAÇÃO DA NEOÍNTIMA

5 Para avaliar o efeito inibidor potencial do agonista de NUR77 (TR3) 6-MP na formação de lesão rica em SMC *in vivo*, o modelo murino bem-estabelecido de formação de neoíntima induzida por manguito foi aplicado. Expressão de mRNA de Nur77 foi estudada durante formação de neoíntima e, como descrito na Figura 14, expressão de mRNA de Nur77 é sobre-regulada após colocação de manguito como uma função de tempo e mostra ótima expressão 6 horas após lesão vascular ( $189 \pm 26$  vezes de aumento). Expressão de mRNA de Nur77 é intensificada até 7 dias após cirurgia em comparação aos vasos pseudo-operados sem manguito ( $13,4 \pm$   
10 1,1 vezes de aumento). Dado que as transcrições de mRNA de Nur77 são reguladas sob lesão vascular estritamente dependente das condições e tempo, é concebível que Nur77 desempenha um papel no processo de formação da neoíntima.  
15

#### EFEITO DE 6-MP NA FORMAÇÃO DE NEOÍNTIMA INDUZIDA POR MANGUITO EM CAMUNDONGOS DO TIPO SELVAGEM, TRANSGÊNICOS DE NUR77 E $\Delta$ TA

20 Para avaliar o efeito de 6-MP na formação de neoíntima induzida por manguito *in vivo*, um manguito de elução de fármaco foi empregado carregado com concentrações crescentes de 6-MP que permitem liberação perivascular restringida, local dos compostos para o segmento de vaso com manguito. O efeito de 6-MP foi avaliado inicialmente em animais do tipo selvagem (Wt) e camundongos transgênicos que expressam cDNA de Nur77 de comprimento total na parede de vaso arterial. Análise microscópica de segmentos de artéria femoral com manguito revelou que, após quatro semanas,  
25 uma neoíntima concêntrica foi formada em camundongos que recebem um controle manguito de elução de fármaco vazio em camundongos Wt e transgênicos de Nur77. Animais que recebem um manguito de elução de  
30

6-MP mostraram hiperplasia intimal reduzida (Figura 15A).

5 Análises morfométrica revelaram inibição significativa de formação de neoíntima induzida por manguito em segmentos de vaso, localmente tratados com concentração de 6-MP mais alta (1%), em ambos camundongos Wt (P = 0,02) e transgênicos de Nur77 (P = 0,007, Figura 15B). Animais Wt tratados com 0,5% de manguitos de elução de 6-MP não mostraram uma diminuição na formação de neoíntima (P = 0.32), enquanto a mesma concentração de 6-MP reduziu substancialmente a formação de neoíntima em camundongos transgênicos de Nur77 (P = 0,02). Nenhuma alteração foi observada em áreas medianas das artérias femorais com manguito (dados não-mostrados).

10 Por conseguinte, uma diminuição dose-dependente similar foi vista em razões de íntima/média de camundongos transgênicos de Nur77 tratados com 6-MP; manguito de controle:  $0,75 \pm 0,11$ ; 0,5% de 6-MP:  $0,47 \pm 0,05$ , (P = 0,04); 1% de 6-MP:  $0,30 \pm 0,06$ , (P = 0,003). Novamente, razões de íntima/média de artérias com manguito em camundongos Wt foram apenas significativamente diminuídas nos manguitos de 1% de 6-MP: manguito de controle:  $1,10 \pm 0,16$ ; 0,5%:  $0,75 \pm 0,05$ , (P = 0,15); 1%:  $0,51 \pm 0,03$ , (P = 0,008).

20 Para também estabelecer envolvimento funcional de Nur77 nos efeitos mediados por 6-MP em formação da neoíntima, manguitos de elução de 6-MP foram colocados ao redor da artéria femoral de camundongos transgênicos, expressando uma variante dominante-negativa de Nur77 (LTA) que inibe a atividade de todos os três fatores semelhantes a Nur77.

25 Previamente, foi mostrado que lesões ricas em SMC desenvolvem-se relativamente rápido após ligação da artéria carótida em camundongos transgênicos de  $\Delta$ TA. De acordo com estes dados, neste estudo intensificado formação de lesão no modelo de manguito de artéria femoral correntemente aplicado foi observada, resultando em lesões quase completamente oclusivas dentro de 4 semanas (dados não-mostrados). Para confi-  
30 antemente avaliar o efeito de manguitos de elução de 6-MP em camundongos transgênicos de  $\Delta$ TA, analisou-se a formação de neoíntima após 2 semanas

(Figura 15A). Análises morfométricas da área intimal revelou que liberação local de 6-MP em camundongos transgênicos de  $\Delta$ TA não alteraram a espessura média e nem tiveram nenhum efeito significativo na formação de neoíntima no manguito de 6-MP de 0,5% ( $P = 0,46$ ) nem no de 1% ( $P = 0,37$ ) (Figura 15C).

Completamente, estes dados estão de acordo com as observações *in vitro* e demonstram que 6-MP inibe formação de neoíntima induzida por manguito envolvendo ativação de Nur77.

Foi desse modo mostrado que intensificando a atividade de NUR77 (TR3) em 6-MP inibe proliferação de SMC e protege contra formação de lesão rica em SMC. Estas observações mostram claramente que o receptor nuclear Nur77 (TR3) é um alvo potencial para impedir restenose (intra-stent).

#### CONCLUSÃO

Em conclusão, foi demonstrado que Nur77 é altamente expresso em camundongos durante a formação de neoíntima induzida por manguito, mas não em artérias pseudo-operadas murino.

Além disso, foi mostrado claramente que ativação de Nur77 por 6-MP reduz proliferação de SMC humana e protege contra formação de neoíntima em um modelo de restenose de camundongo. Ativação do receptor nuclear Nur77 por 6-MP ou através de outros ativadores/agonistas desse modo é um método racional para tratar restenose (intra-stent).

#### EXEMPLO 4

ATIVACÃO MEDIADA POR C-DIM DE TR3 PROTEGE CONTRA PROLIFERAÇÃO CELULAR DE MÚSCULO LISO EXCESSIVA E FORMAÇÃO DE LESÃO RICA EM CÉLULA DE MÚSCULO LISO EM CAMUNDONGOS.

Neste exemplo, é mostrado que derivados de C-DIM inibem proliferação de SMC *in vitro* e a aplicação *in vivo* é descrita de C-DIMs em um modelo de camundongo de restenose de camundongo validado com manguitos de elução de fármaco. No modelo de camundongo como descrito em Moroi M et al., (J. Clin. Invest. (1998) 101:1225-32) um manguito perivascular de encaixe livre ao redor da artéria femoral induz a formação de uma lesão



rica em célula músculo liso que se assemelha às patologias específicas para célula de músculo liso observadas em seres humanos. Este modelo foi adaptado em manguitos de eluição de fármaco, similares aos stents de eluição de fármaco. C-DIMs são reversivelmente ligados a estes manguitos e o efeito sobre a formação de lesão é avaliado através de procedimentos operacionais. Este experimento foi executado com dos camundongos do tipo selvagem, transgênicos de TR3 e de dTA. Conhecimento extensivo sobre a farmacologia e toxicidade de derivados de C-DIM está disponível.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 10 CULTURA DE SMC

SMCs humanas são explantadas de artérias do cordão umbilical. Células foram cultivadas em DMEM (Invitrogen Life Technologies, Breda, Países Baixos) com 10% (v/v) de soro bovino fetal (FBS) com penicilina e estreptomicina (Invitrogen). Células foram usadas nas passagens cinco a sete. SMCs foram caracterizadas com um anticorpo monoclonal, direcionadas contra alfa-actina de músculo liso (1A4, DAKO), e demonstraram tingimento fibrilar uniforme. Para determinar a viabilidade celular, as células foram lavadas com PBS e subseqüentemente incubadas em meio na presença de 0,5 mg/ml de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT; Sigma Diagnostics, St. Louis). Após duas horas, meio foi descartado, cristais de formazan foram dissolvidos em isopropanol e densidade óptica foi medida a 590 nm. Apoptose foi induzida incubando as células durante 24 horas em meio com 0,25  $\mu$ M de estaurosporina (Sigma). Subseqüentemente, SMCs foram fixadas, tingidas com tinta de Hoechst e o número relativo dos núcleos apoptóticos foi determinado.

### 25 ENSAIO DE SÍNTESE DE DNA

SMCs foram semeadas em placas de 24 poços a  $1-4 \times 10^9$  células por cavidade e alcançado 60% a 70% de confluência após 24 horas. SMCs foram feitas inativas através de incubação durante 24 horas em meio livre de FBS. 6-MP foi dissolvido em dimetilsulfóxido e uma hora aplicado antes da estimulação de FBS. SMCs foram estimuladas durante 24 horas com 10% (v/v) de FBS e subseqüentemente as células foram marcadas durante 18 horas

com 0,25 pCi/cavidade de [metil-<sup>3</sup>H]timidina (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). Radioatividade incorporada foi precipitada por 30 min a 4°C com 10% (p/v) de ácido tricloroacético, lavada duas vezes com 5% (p/v) de ácido tricloroacético, e dissolvida em 0,5 N de NaOH (0,5 ml por cavidade).

5 [<sup>3</sup>H]timidina incorporada foi medida por contagem de cintilação líquida.

#### EXPERIMENTOS DE siRNA

As seqüências de (si)RNA de interferência pequena a seguir foram usadas: siRNA de Nur77, 5'-CAG UCC AGC CAU GCU CCU C dTdT-3', como previamente descrito, e siRNA de controle, 5'-CAG ACG AGC CUU  
10 GCU CGU C dTdT-3' (Ambion Inc., Austin, Texas). Cinco µg de siRNA foram transfeccionados em 0,5-1 x 10<sup>6</sup> SMCs, usando reagente de Nucleofector para SMCs (Amamax) como pelas recomendações do fabricante. mRNA total foi isolado cinco dias após transfecção, usando o kit de miniprep absolutamente de mRNA (Stratagene, La Jolla, CA). Síntese de cDNA subsequente foi  
15 executada usando o kit de síntese de cDNA iScript (Biorad, Hercules, CA). Reação em cadeia de polimerase de tempo real (PCR) foi executada usando mistura verde de SYBR (Biorad) no MyIQ System (Biorad). Preparadores para Nur77 foram como segue: (adiante) 5'-GTTCTCTGGAGGTCATCCGCAAG-3' e (reverso) 5'-GCAGGGACCTTGAGAAGGCCA-3'. Como um controle para  
20 quantidade igual de cDNA de primeiro filamento em amostras diferentes nós corrigimos para níveis de mRNA de Fosfoproteína Ribossômica (P0) que foram determinados com os iniciadores a seguir (adiante)

5'-TCGACAATGGCAGCATCTAC-3' e

(reverso) 5'-ATCCGTCTCCACAGACAAGG-3'.

#### 25 MANGUITOS DE ELUÇÃO DE FÁRMACO

Manguitos de elução de C-DIM foram feitos misturando derivados de C-DIM a 70°C com policaprolacteno e fundindo uma entubação (0,5 mm de diâmetro interno, 1,0 mm de diâmetro externo). Descrito em detalhes em Cais et al., Biomaterials. 2005;26:5386-94.

#### 30 COLOCAÇÃO DO MANGUITO DE ARTÉRIA FEMORAL

Todo o trabalho dos animais foi aprovado por autoridade reguladora institucional de AMC e realizados conforme as diretrizes emitidas pelo

governo holandês. Camundongos de FVB do tipo selvagem (Wt), camundongos transgênicos que expressam o gene de Nur77 de comprimento total (Nur77), ou camundongos que expressam uma variante dominante-negativa de Nur77 ( $\Delta$ TA) (as duas cepas posteriores sob controle do promotor de SM22a direcionando a expressão de transgenes específicos para SMCs), em uma base de FVB, foram usados para os experimentos. Camundongos machos são anestesiadas com uma injeção intraperitoneal com uma solução de Midazolam (12,5 mg/kg do peso do corpo) e Hypnorm (0,01 ml/camundongo). A artéria femoral esquerda é isolada do tecido circunvizinho, livremente embainhada com um manguito de 2,0 mm feito de policaprolacteno e polietileno glicol de 0,5 mm de diâmetro interno, 1,0 mm de diâmetro externo foi colocado frouxamente ao redor da artéria femoral e atado no lugar com uma sutura 6-0. O manguito é mais amplo que o vaso e não obstrói o fluxo sanguíneo. A artéria femoral direita foi dissecada do tecido circunvizinho (pseudo-operado), mas um manguito não foi colocado. As artérias femorais foram substituídas, e as feridas foram suturadas. Após restabelecimento da anestesia, os animais foram dados dieta padrão e água ad libitum. Camundongos do tipo selvagem e camundongos transgênicos de TR3 ou dRT são tratados com manguitos de controle simples ou com manguitos de eluição de C-DIM, em cada grupo são incluídos 6 camundongos.

#### AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DAS LESÕES INTIMAIS

Após 2 a 4 semanas, os camundongos foram anestesiados, o tórax foi aberto e perfusão de pressão moderada (100 mmHg) com 3,7% de formaldeído em 0,9% de NaCl (p/vol) por 10 min foi executada através de furos cardíacos. Após perfusão, a artéria femoral foi colhida, fixada durante a noite e embebida em parafina. Seções seriais (5 mm de espessura) foram usadas ao longo do comprimento inteiro da artéria femoral com manguito por análise histológica.

#### QUANTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA NAS SEÇÕES DA ARTÉRIA FEMORAL COM MANGUITO

Seções de parafina são igualmente tingidas com hematoxilina/eosina e dez seção transversais igualmente espaçadas (200  $\mu$ m) são

usadas para quantificar a lesão intimal. Usando software de análise de imagem (Leica, Qwin) a área medial de corte transversal total é medida entre a lâmina elástica externa e interna. Área intimal de corte transversal total é também medida entre a monocamada de célula endotelial e a lâmina elástica interna.

### ANÁLISE ESTATÍSTICA

Análises estatísticas foram executadas com SPSS, software versão 10.0.5. Valores experimentais são expressos como média SEM. A significação das diferenças foi determinada usando o teste U bicaudal de Mann-Whitney não-paramétrico e expressa como um valor de probabilidade.

### RESULTADOS

#### DERIVADOS D EC-DIM INIBEM PROLIFERAÇÃO DE SMCs.

Para estudar se C-DIMs modulam proliferação de SMC, nós investigamos a síntese de DNA de SMCs cultivadas, humanas na presença de concentrações crescentes de C-DIM-H, C-DIM-OCH3 ou C-DIM-CF3 por ensaios de incorporação de [<sup>3</sup>H]timidina. Todos os três C-DIMs inibem a síntese de DNA em SMCs de forma dose dependente (Figura 16). C-DIM-H é menos eficaz que C-DIM-OCH3 e C-DIM-CF3.

#### DERIVADOS DE C-DIM E VIABILIDADE DE CÉLULA DE MÚSCULO LISO.

Para verificar se C-DIMs são citotóxicos, SMCs inativas foram incubadas durante 24 horas com concentrações crescentes de compostos de C-DIM e viabilidade das células foi determinado com um ensaio de MTT padrão. C-DIM-H e C-DIM-OCH3 reduziram a viabilidade celular das células a 20 µM moderadamente, enquanto que até 10 µM nenhuma redução significativa na viabilidade celular foi observada para C-DIM-H e C-DIM-OCH3 (Figura 17). Pra investigar se C-DIMs induzem apoptose em SMCs, SMCs inativas foram incubadas durante 24 horas com C-DIMs a uma concentração final de 10 µM. Como um controle positivo, estaurosporina foi mostrada induzir apoptose em SMCs. Claramente, nenhuma evidência foi encontrada que C-DIMs afetam a morte celular sob estas condições em comparação com as células de controle (Figura 18).

#### INIBIÇÃO DE PROLIFERAÇÃO DE SMC POR C-DIM-OCH3 ENVOLVE TR3.

Para avaliar a contribuição específica de TR3 em inibição mediada por C-DIM-OCH3 de proliferação de SMC, expressão de TR3 foi modificada mediante interferência pequena (si)RNA em SMCs humanos. Transfecção com siRNA direcionado contra TR3 ou com siRNA de controle, resulta em sobre-regulação de níveis de mRNA de TR3 induzidos por FBS nas células transfeccionadas de siTR3, como determinado por RT-PCR de tempo real (Figura 12B). Para revelar o efeito relativo de C-DIM-OCH3 na síntese de DNA em SMCs transfeccionadas ou com RNA de siTR3 ou com siRNA de controle, nós expressamos a incorporação de [<sup>3</sup>H]Timidina como porcentagem de condição de controle (Figura 19). Síntese de DNA é inibida por C-DIM-OCH3 em 49,7% quando SMCs são transfeccionadas com siRNA de controle, enquanto que o efeito de C-DIM-OCH3 é significativamente menor em SMCs transfeccionadas com siRNA TR3-específico, uma vez que apenas 40,1% de inibição da síntese de DNA são observados. Estes dados demonstram claramente que C-DIM-OCH3 inibe a síntese de DNA em SMCs pelo menos em parte através de ativação de TR3. O mais provavelmente, também Nurr1 e possivelmente também NOR-1 estão envolvidos nos efeitos mediados por C-DIM-OCH3, explicando por que nenhuma inibição total do efeito de C-DIM-OCH3 foi observado após modificação de TR3.

#### 20 EFEITO DE C-DIMS EM FORMAÇÃO DE LESÃO RICA EM CÉLULA DE MÚSCULO LISO EM CAMUNDONGOS DO TIPO SELVAGEM, TRANSGÊNICOS DE TR3 E ΔTA

Dos camundongos tratados com manguitos de controle simples, os camundongos de TR3 mostraram para músculo menos formação de lesão rica em célula de músculo liso na esquerda artéria femoral que os camundongos do tipo selvagem. Os camundongos de dTA desenvolveram mais lesões de célula de músculo liso que os camundongos do tipo selvagem, que está de acordo com o conhecimento que dTA é um inibidor dominante-negativo de TR3, MINOR e NOT. Camundongos de TR3 tratados com manguitos de elução de C-DIM desenvolveram novamente lesões menores que os camundongos de TR3 tratados com manguito simples. Também em camundongos do tipo selvagem, o tamanho da lesão foi menor devido à in-

corporação de DIM no manguito. Em contraste, o estiramento da formação de lesão em camundongos de dTA foi similar aos manguitos simples e manguitos de elução de C-DIM. O resultado posterior foi esperado, porque nos camundongos de dTA a atividade endógena como também fatores semelhantes a TR3 transgênicos são bloqueados. Estes dados indicam claramente que os derivados de C-DIM inibem a formação de lesões ricas em célula de músculo liso em um fator semelhante a TR3 de modo dependente.

#### EXEMPLO 5

#### RECEPTORES NUCLEARES NUR77, NURR1 E NOR-1 EXPRESSOS EM MACRÓFAGOS DE LESÃO ATEROSCLERÓTICA REDUZEM CARGA DE LIPÍDIO E RESPOSTAS INFLAMATÓRIAS

Neste exemplo, é mostrado pela primeira vez que de todos os três membros da família de NR4A Nur77, Nurr1 e NOR-1 são expressos em macrófagos de lesão aterosclerótica humanos e é demonstrado que estes fatores reduzem a absorção de lipoproteína de baixa densidade oxidada (ox-LDL) como também inibem a resposta inflamatória aos estímulos inflamatórios em macrófagos humanos.

#### MATERIAIS E MÉTODOS

##### ESPÉCIMES DE TECIDO HUMANO

As amostras de tecido humano foram obtidas com consentimento informado de doadores de órgão, de acordo com protocolos aprovados pelo Committee of the Academic Medical Center, Amsterdã. Os espécimes foram embebidos em parafina, seccionados, e montados em lâminas de vidro (Superfrost-Plus, Emergo).

Espécimes vasculares foram caracterizados através de imunistoquímica com anticorpos específicos para SMCs e macrófagos para estabelecer o estágio de doença de acordo com a classificação da American Heart Association.

##### IMUNOISTOQUÍMICA E IMUNOISTOQUÍMICA DUPLA *IN SITU*

Macrófagos foram detectados pelo anticorpo monoclonal Ham56 (DAKO) e SMCs pelo anticorpo monoclonal 1A4 (DAKO) direcionados contra  $\alpha$ -actina de músculo liso, em espécimes vasculares humanos. Anti-Nur77

(M-210, Santa Cruz Biotechnology), anti-Nurr1 (M-196, Santa Cruz Biotechnology) e anti-NOR-1 foram usados para detectar os receptores nucleares de NR4A. Brevemente, após desparafinização e extinção de peroxidase endógena, recuperação do antígeno de citrato foi executada, seguido por bloqueio e permeabilização com 1% (p/vol) de albumina de soro bovino, 1% (vol/vol) de soro de cabra normal e 0,5% de Triton-X 100 e incubação de anticorpo primária durante a noite a 4°C. Após incubação de anticorpo secundário de EgG de antiovelho de cabra marcado com biotina (DAKO) seguido por esteptavidina-HRP (DAKO), detecção de AEC (Sigma) foi aplicada. Tingimento sozinho após incubação do anticorpo secundário serviu como um controle negativo.

Combinação de hibridação *in situ* gene-específica radioativa e imunistoquímica macrófago-específica foram essencialmente executadas como previamente descrito. Para hibridação *in situ* as ribossondas a seguir foram sintetizadas: Nur77, GenBank Nº L13740, bp 1221 a 1905; Nurr1, GenBank Nº X75918, bp 119 a 1003 e NOR-1, GenBank Nº U12767, bp 1435 a 2172. Após hibridação, os macrófagos foram detectados usando imunistoquímica como descrita acima, seguido por radiografia de emulsão. Ribossondas-sentido combinadas foram ensaiadas para cada gene e foram mostradas não dar nem sinal de base nem não-específico. As seções foram expostas durante 4 a 8 semanas. Todas as lâminas foram contratingidas com hemotoxilina e embebidas em glicergel (DAKO).

#### Cultura de Célula

Monócitos/macrófagos humanos primário foram isolados de revestimentos tamponantes de doadores de sangue, obtidos do banco de sangue central holandês Sanquin. Após isolamento por centrifugação de gradiente Ficoll-Paque (Pharmacia Biotech), o kit de seleção monócito-negativo (Dynal) e purificação mediada por adesão, as células foram cultivadas durante 48 horas a uma densidade de células/ml de  $0,5 \times 10^6$  antes dos experimentos serem executados. Células de THP-1 monocíticas humanas (ATCC) foram cultivadas em RPMI 1640, 10% (vol/vol) de soro bovino fetal e 100 U/ml de penicilina/estreptomicina (GIBCO-BRL). Células foram

banhadas em placas de 12 poços a uma densidade de células/ml de  $0,5 \times 10^6$ , diferenciadas em macrófagos por PMA (100 ng/ml) durante 48 horas. Após diferenciação, as células foram lavadas duas vezes com PBS e crescidas em meio durante 24 horas. Reagentes usados foram PMA (Sigma), LPS (Sigma), TNF $\alpha$  humana recombinante (R&D) e ox-LDL marcado com Dil (Intra-  
 5 cel-RP-173).

### CONSTRUCTO E PRODUÇÃO VETOR LENTIVIRAL

cDNA de hNur77 (GenBank D49728, bp 8-1920) foi clonado nos sítios de XbaI-NdeI do vetor de pRR1-cPpt-PGK-PreSIN (PGK-Nur77). cDNA  
 10 de hNurr1 (Genbank X75918, bp 73-2310) foi colocado nos sítios de Sall-Nsil do vetor de pRR1-cPpt-PGK-PreSIN (PGK-Nurr1) e cDNA de hNOR-1 (Genbank D78579, bp 513-2872) foi ligado no sítio de XbaI do vetor de pRR1-cPpt-PGK-PreSIN (PGK-NOR-1). PGK-EGFP-PreSIN (PGK-EGFP) foi  
 15 construído isolando o cDNA de EGFP do pEGFP-N2 do vetor de expressão (Clontech) usando digestão de Sall-XbaI, subseqüentemente ligado nos sítios correspondentes do vetor de pRR1-cPpt-PGK-PreSIN. Todos os constructos foram verificados através de seqüenciação de DNA. Matérias-primas do vírus foram produzidas como conhecido. Brevemente, 20  $\mu$ g de Vetor de transfe-  
 20 rência de PGK, 13  $\mu$ g de pMDLg/pRRE, 7  $\mu$ g de pVSV-g, e 5  $\mu$ g de pRSV-rev foram co-transfeccionados em  $180 \text{ cm}^2$  de células de HEK293T usando o método de co-precipitação de fosfato de cálcio. Meio condicionado foi colhido a 48 horas e 72 horas após transfecção, filtrado através de filtros de 0,45  $\mu$ m e concentrados por ultra centrifugação (20.000 rpm, 2 horas, 4°C). Determinação das titulações virais foi executada transluzindo células HEK 293 com  
 25 concentrado viral serialmente diluído, 48 horas após DNA genômico total de transdução ter sido isolado destas células e o número de cópias de DNA de vetor ter sido determinado usando análise de PCR com vetor de pRR1-cPpt-PGK-PreSIN como padrão de calibração  
 (iniciador adiante: 5'-GTGCAGCAGCAGAACAATTTG-3',  
 30 iniciador reverso: 5'-CCCCAGACTGTGAGTTGCAA-3').

### INFECCÃO LENTIVIRAL

Células de THP-1 foram transduzidas na presença de 10  $\mu$ g/ml de



DEAE-dextrana com lentivírus recombinante durante 24 horas a uma Multiplicidade de infecção de 3. Lentivírus de amostra (Mock) e de EGFP foram tomados como controles. Após transdução, as células foram cultivadas em suspensão durante 72 horas, diferenciadas em macrófagos e cultivadas como descrito acima. Sobre-expressão de Nur77, Nurr1, NOR-1 e EGFP foi verificada através de análises citométricas de fluxo (EGFP) e imunofluorescência (Figura 16). Brevemente, as células cultivadas em vidro foram fixas por 20 min com 4% (p/vol) de PBS de paraformaldeído e permeabilizads com 0,5% (vol/vol) de Triton-X-100. As células foram tingidas através de anti-Nur77 (M-210, Santa Cruz Biotechnology), anti-Nurr1 (M-196, Santa Cruz Biotechnology) e anti-NOR-1 para detecção de Nur77, Nurr1 e NOR-1 respectivamente, seguido por IgG de anti-cabra de jumento conjugado com Alexa Fluor 568 (Molecular Probes). Núcleos foram tingidos com Hoechst.

#### ANÁLISE DE RNA E DE PROTEÍNA

RNA total foi extraído usando kit de Miniprep absolutamente de RNA (Stratagene). cDNA foi feito usando kit de Síntese de cDNA iScript (Biorad) e RT-PCR semiquantitativa de tempo real foi executada usando iQ SYBR-Green Super-Mix no sistema de RT-PCR MyiQ (Biorad). Preparadores específicos para Nur77, Nurr1, NOR-1, receptor-A descontaminante (SR-A), CD36, proteína-1 $\alpha$  inflamatória de macrófago (MIP-1 $\alpha$ ) e 1 $\beta$  (MIP-1 $\beta$ ), MCP-1, IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6 e proteína ribossômica P0 foram designados como segue:

Nur77: Ad: 5'-gttctctggaggatccgca ag-3'  
Rv: 5'-gcagggaccttgagaaggcca-3'

Nurr1: Ad: 5'-tattccaggtccaggcgaa-3'  
Rv: 5'-gctaatacgaaggacaaacag-3'

NOR-1: Ad: 5'-cc aagccttagcctgcctgtc-3'  
Rv: 5'-agcctgtcccttact ctggtgg-3'

IL-1 $\beta$ : Ad: 5'-tggcagaaagggaaca gaaagg-3'  
Rv: 5'-gtgagtaggagaggtgagagagg-3'

IL-6: Ad: 5'-tgtagccgccccacacag-3'  
Rv: 5'-gctg cttcacacatgttactcttg-3'

IL8: Ad: 5'-ctgcg ccaacacagaaatta-3'

		Rv: 5'-attgcatctggcaacc ctac-3'
MIP-1 $\beta$ :	Ad: 5'-gcgtgactgtcctgtctctcc-3'	
		Rv: 5'-accacaaagttgcgaggaagc-3'
MIP-1 $\alpha$ :	Ad: 5'-acgggcagcagacagtgg-3'	
5		Rv: 5'-ggcgtgtcag cagcaagtg-3'
MCP-1:	Ad: 5'-cctagcttt cccagacacc-3'	
		Rv: 5'-cccaggggtagaactgtgg-3'
SR-A:	Ad: 5'-ctcgtcaatgacagctttgcttc-3'	
		Rv: 5'-tcgtttcccacttcaggagttgag-3'
10	CD36:	Ad: 5'-gagaactgttatggggctat-3'
		Rv: 5'-ttcaactggagagc aaagg-3'
	P0:	Ad: 5'-tcgacaatggcagc atctac-3'
		Rv: 5'-atccgtctccacagacaagg-3'

15 Todos dados de RT-PCR foram corrigidos para proteína ribossômica de gene de manutenção P0. Níveis da proteína de IL-8, IL-1 $\beta$  e IL-6 foram determinados em sobrenadante de culturas de célula por BD<sup>®</sup> Cytometric Bead Array de acordo com o protocolo do fabricante. Experimentos foram executados em duplicata e repetidos pelo menos duas vezes.

#### CARGA DE LIPÍDIO, QUANTIFICAÇÃO E MICROSCOPIA

20 Após infecção lentiviral, os macrófagos derivados por THP-1 foram tratados com ox-LDL marcado com Dil por períodos de tempo indicados, subseqüentemente lavados duas vezes com PBS e lisados em isopropanol puro. Após sonificação e 10 minutos de centrifugação (13000 g) o sobrenadante foi medido através de fluorometria. Para microscopia confocal, as células foram cultivadas em vidro e tratadas com ox-LDL marcado com Dil.  
25 Experimentos foram executados em duplicata e repetidos pelo menos duas vezes.

#### ANÁLISES ESTATÍSTICAS

30 Testes t de Student foram executados. Induções de vezes e porcentagens foram calculadas após normalização para o controle.

#### RESULTADOS

#### NUR77, NURR1 E NOR-1 SÃO EXPRESSOS EM MACRÓFAGOS DE LE-

## SÃO ATEROSCLERÓTICA HUMANOS

Em estudos anteriores, expressão de Nur77, Nurr1 e NOR-1 tanto em SMCs quanto ECs em lesões ateroscleróticas foi demonstrada. Neste estudo, expressão de Nur77, Nurr1 e NOR-1 em macrófagos de lesão aterosclerótica foi demonstrado combinando imunotintamento macrófago-específico com hibridação *in situ* gene-específica. Espécimes de aorta de 8 doadores de órgão diferentes (3 machos e 5 fêmeas, idade de 40-69 anos) foram caracterizados através de imunistoquímica de acordo com as diretrizes da American Heart Association (Tabela 2; Figura 20A, B e 21 A, B). A complexidade das lesões analisadas variou de classe II a VI. Os níveis de expressão de mRNA de Nur77, Nurr1 e NOR-1 em macrófagos de lesão e SMCs foram registrados e a localização específica da expressão na lesão indicada. Como um exemplo típico de uma lesão prematura, uma lesão do tipo II com níveis de expressão de mRNA altos de todos os três receptores nucleares em macrófagos é mostrada (Figura 20, C-H; † na Tabela 2). Expressão de proteína de Nur77, Nurr1 e NOR-1 localiza para o núcleo em áreas ricas em macrófagos e é comparável com o padrão de expressão de mRNA (Figura 21, A-E; ‡ na Tabela 2). Notavelmente, em lesões complexas, expressão macrófago-específica proeminente está localizada em áreas de lesão distintas, especialmente para assumir regiões e macrófagos infiltrados nos meios.

## MACRÓFAGOS HUMANOS PRIMÁRIOS ATIVADOS E MACRÓFAGOS DERIVADOS DE THP-1 EXPRESSAM NUR77, NURR1 E NOR-1.

Níveis de expressão altos dos fatores de NR4A em macrófagos de lesão ateroscleróticos nos incitaram a estudar se sua expressão é dependente das condições inflamatórias que são usualmente encontradas nestas áreas doentes. Além disso, a atividade funcional destes fatores de transcrição foi determinada em estudos *in vitro*. A expressão de Nur77, Nurr1 e NOR-1 tanto em monócitos/macrófagos primários como também em macrófagos derivados de THP-1 tratados com PMA ensaiados foi através de RT-PCR semiquantitativa de tempo real e imunofluorescência em resposta aos estímulos inflamatórios. Em monócitos/macrófagos primários (derivados

de 2 doadores diferentes), os níveis de expressão de mRNA de todos os três receptores nucleares são altamente induzidos por LPS e moderadamente induzidos por TNF $\alpha$  2 horas após estimulação (Figura 22A). Similarmente, em macrófagos derivados por THP-1 Nur77, Nurr1 e NOR-1 são induzidos fortemente (50-150 vezes) em resposta a LPS, 2 horas após estimulação e induzidos baixo-a-moderadamente (3-6 vezes) em resposta a TNF $\alpha$ . Expressão de Nur77 e de Nurr1 é ótima a 1 hora, enquanto que indução de mRNA de NOR-1 é ótima 3 horas após estimulação de TNF $\alpha$  (Figura 22B). Curvas de expressão de mRNA de curso de tempo foram executadas e mostraram indução transitente de todos os três fatores de transcrição em resposta a LPS e estimulação de TNF $\alpha$  (Figura 22C). Análise de imunofluorescência revelou expressão de proteína de NOR-1 intensificada 6 horas após estimulação de LPS localizando para o núcleo (Figura 22D).

#### 15 SOBRE-EXPRESSÃO LENTIVIRAL DE NUR77, NURR1 E NOR-1 REDUZ CARGA DE LIPÍDIO DE OX-LDL

Para estudar a função de Nur77, Nurr1 e NOR-1 em macrófagos, células de THP-1 foram infectadas com lentivírus que expressam estes fatores ou vírus Mock de controle e determinado o efeito sobre carga de lipídio, uma marca de aterosclerose. Nur77, Nurr1 e NOR-1 sobre-expressos por lentivírus recombinante resultou em 80-90% de eficiência de transdução e localização nuclear das proteínas codificadas (Figura 23). A absorção de ox-LDL marcado com Dil foi quantificada por fluorometria. Em macrófagos que sobre-expressam fatores de NR4A há já uma tendência de absorção de lipídio reduzida após 3 a 6 horas, com uma redução de mais de 30% após 24 horas (Figura 24A). Microscopia confocal foi executada para avaliar a localização celular de ox-LDL marcado com Dil em macrófagos. Após 24 horas fluorescência de Dil localiza para vacúolos de lipídio e a intensidade de fluorescência é baixa em macrófagos sobre-expressando Nur77 quando comparado às células infectadas com vírus Mock (Figura 24B).

30 Uma vez que SR-A e CD36 são genes importantes envolvidos na absorção de lipoproteína modificada, os níveis de expressão de mRNA destes genes foram determinados através de RT-PCR semiquantitativa de tempo

real. Macrófagos de THP-1 que sobre-expressam Nur77, Nurr1 e NOR-1 expressam níveis significativamente inferiores de SR-A e CD36 que as células infetadas com vírus Mock (Figura 24C).

#### SOBRE-EXPRESSÃO LENTIVIRAL DE NUR77, NURR1 E NOR-1 REDUZ EXPRESSÃO INFLAMATÓRIA DE QUIMIOCINA E DE CITOCINA

5 Em seguida, o efeito de sobre-expressão mediada por lentivírus de Nur77, Nurr1 e NOR-1 sobre expressão de mRNA de quimiocina e citocina e concentração de proteína segregada foi ensaiado (Figura 25). Níveis de mRNA das quimiocinas MIP-1 $\alpha$  e 1 $\beta$ , MCP-1 e IL-8 e das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e IL-6 foram determinados através de RT-PCR semi-quantitativa de tempo real após estimulação com LPS, TNF $\alpha$  ou veículo (Figura 25A). Como um controle para a atividade de LPS e TNF $\alpha$ , os níveis de mRNA foram ensaiados em macrófagos infetados com Mock (Figura 25A). Com exceção da expressão de IL-6, que não é detectável (ND) após estimulação de TNF $\alpha$ , os níveis de expressão de mRNA destes genes inflamatórios são induzidos 20-8000 vezes por LPS e 3-10 vezes por TNF $\alpha$ . Níveis de mRNA destas quimiocinas e citocinas analisadas são robustamente reduzidos (2-10 vezes) em macrófagos de THP-1 ou sobre-expressando Nur77, Nurr1 ou NOR-1 quando comparado às células infetadas com Mock ambos após estimulação LPS e de TNF $\alpha$ , como também em seus controles não-estimulados. Como uma exceção, expressão de mRNA de MCP-1 é 2,5 vezes induzida por TNF $\alpha$  em macrófagos sobre-expressando NOR-1 e não significativamente diferente em células sobre-expressando Nurr1 quando comparadas às células infetadas de Mock. Além dos resultados de mRNA descritos, nós determinamos as concentrações de proteína de IL-8, IL-13 e IL-6 (Figura 25B) no meio condicionado de macrófagos de THP-1 infetados com lentivírus. Meios condicionados foram colhidos a 0, 6 e 24 horas após tratamento com LPS e as concentrações de proteína foram determinadas por BDTM Cytometric Bead Array.

30 Sobre-expressão de Nur77, Nurr1 ou NOR-1 resulta em uma redução significativa de secreção induzida por LPS de IL-8, IL-1 $\beta$  e IL-6 por macrófagos de THP-1, com exceção de IL-8 no caso de sobre-expressão de NOR-1.

**TABELA 2: CARACTERÍSTICAS DOS DOADORES E PERFIS DE EXPRESSÃO DE MRNA DE NUR77, NURR1 E NOR-1**

Sexo	Idade (yrs)	Classe (AHA)	Lesão MØ			Lesão SMC			Área de expressão na parede de vaso
			Nur77	Nurr1	NOR-1	Nur77	Nurr1	NOR-1	
F	40	II	+	++	++	++	+	+	neoíntima
F	41	II	+	+	+	++	+	+	neoíntima
F†	56	II	++	++	++	++	+	+	neoíntima
F	59	II	+	++	++	++	+	+	neoíntima
M†	66	II-III	+++	+++	+++	++	++	++	neoíntima
M	49	V	+++	+++	+++	++	+	+	meios ativados de suporte, neoíntima
F	49	VI	++	++	++	++	++	++	meios ativados de suporte, neoíntima
M	66	VI	++	++	++	++	++	++	meios ativados de suporte, neoíntima

M: macho; F: fêmea; yrs: anos; AHA: Classificação da American Heart Association;

+: expressão baixa, ++: expressão moderada, +++: expressão alta;

†: mostrado na Figura 20; ‡: mostrado na Figura 21.

EXEMPLO 6USO DE MANGUITOS DE ELUÇÃO DE C-DIM PARA IMPEDIR FORMAÇÃO DE LESÃO ATEROSCLERÓTICA (CONTENDO CÉLULAS DE MÚSCULO LISO E CÉLULAS INFLAMATÓRIAS) EM CAMUNDONGOS

5 TR3, MINOR e NOT são expressos em lesões ateroscleróticas humanas em células de músculo liso, células endoteliais e também em um subconjunto de macrófagos. Além disso, a expressão de TR3, MINOR e NOT é intensificada fortemente sob ativação de macrófagos cultivados, tanto em macrófagos humanos primários quanto na linhagem celular monocítica/de  
10 macrófagos THP-1. Nós mostramos que fatores semelhantes a TR3 inibem liberação de citocina e reduzem a carga de lipídio de macrófagos ativados e por conseguinte pode delimitar a formação de lesões ateroscleróticas.

Para analisar o efeito de compostos de C-DIM na formação de lesões ateroscleróticas contendo macrófago um experimento similar foi executado como descrito no Exemplo 3 e 4, exceto que camundongos de ApoE<sup>-/-</sup> ou ApoE\*3Leiden são aplicados. Camundongos de ApoE<sup>-/-</sup> ou ApoE\*3Leiden são expostos a uma dieta rica em colesterol e subseqüentemente um manguito perivascular é colocado ao redor da artéria femoral que resulta em aterosclerose acelerada. Dentro de 2-4 semanas uma lesão rica em macrófagos e em célula de músculo liso é formada dentro da artéria com manguito,  
20 como descrito por Lardenoye J. H. et al Circ. Res. (2000) 87:248-53.

MATERIAIS E MÉTODOSANIMAIS

25 Nestes experimentos, camundongos de ApoE<sup>-/-</sup> ou camundongos de ApoE\*3Leiden são aplicados. Camundongos de oito a 12 semanas de idade foram colocados 4 semanas antes da cirurgia em uma dieta de gordura alta enriquecida com colesterol para melhorar a absorção de colesterol intestinal e suprimir a síntese de ácido biliar.

MANGUITOS DE ELUÇÃO DE FÁRMACO

30 Manguitos de elução de C-DIM são feitos misturando DIM a 70°C com policaprolacteno e fundido uma entubação (0,5 mm de diâmetro interno, 1,0 mm de diâmetro externo). Descrito em detalhes em Cais et al., Biomate-

rials. 2005;26:5386-94.

#### COLOCAÇÃO DE MANGUITO NA ARTÉRIA FEMORAL

Camundongos são anestesiados com uma injeção intraperitoneal com uma solução de Midazolam (12,5 mg/kg do peso do corpo) e Hypnorm  
5 (0,01 ml/camundongo). A artéria femoral esquerda é isolada do tecido circunvizinho, livremente embainhada com um manguito de 2,0 mm feito de policaprolacteno e polietileno glicol, 0,5 mm de diâmetro interno, 1,0 mm de diâmetro externo foi colocado frouxamente ao redor da artéria femoral e atado no lugar com uma sutura de 6-0. O manguito é mais amplo que o vaso e não  
10 obstrói o fluxo sanguíneo.

A artéria femoral direita é dissecada do tecido circunvizinho (pseudo-operado), mas um manguito não é colocado. As artérias femorais são substituídas, e as feridas são suturadas. Após restabelecimento da anestesia, os animais foram dados dieta de gordura alta enriquecida de colesterol e água ad libitum. Os camundongos ou são tratados com manguitos  
15 de controle simples ou com manguitos de elução de C-DIM, em cada grupo 6 camundongos são incluídos. Descrito em detalhes em Cais et al., Biomaterials. 2005;26:5386-94.

#### AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DE LESÕES INTIMAS

20 Após 2 a 4 semanas, os camundongos foram anestesiados, o tórax é aberto e perfusão de pressão moderada (100 mmHg) com 3,7% de formaldeído em 0,9% de NaCl (p/vol) por 10 min é executada através de furos cardíacos. Após perfusão, a artéria femoral é colhida, fixada durante a noite e embebida em parafina. Seções seriais (5 mm de espessura) são usadas ao  
25 longo do comprimento inteiro da artéria femoral com manguito por análise histológica.

#### QUANTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA NAS SEÇÕES DA ARTÉRIA FEMORAL COM MANGUITO

Seções de parafina são tingidas com hematoxilina/eosina e dez  
30 seções transversais igualmente espaçadas (200 mm de distância) são usadas para quantificar a lesão intimal. Usando software de análise de imagem (Leica, Qwin) as áreas medianas de corte transversal totais são medidas entre a



lâmina elástica externa e interna; área intimal de corte transversal total é também medida entre a monocamada de célula endotelial e a lâmina elástica interna. As células de músculo liso e macrófagos são visualizados com anticorpos específicos ao tipo de célula; o anticorpo monoclonal 1A4 (Dako, 5 Glastrup, Dinamarca) detectando SM alfa-actina e Mac-3 (Accurate Chemicals) para detectar monócitos e macrófagos, respectivamente.

### ANÁLISE ESTATÍSTICA

Análises estatísticas são executadas com SPSS, software versão 10.0.5. Valores experimentais são expressos como média SEM. A signifi- 10 ção das diferenças é determinada usando o teste U bicaudal de Mann-Whitney não-paramétrico e expressa como um valor de probabilidade.

### RESULTADOS

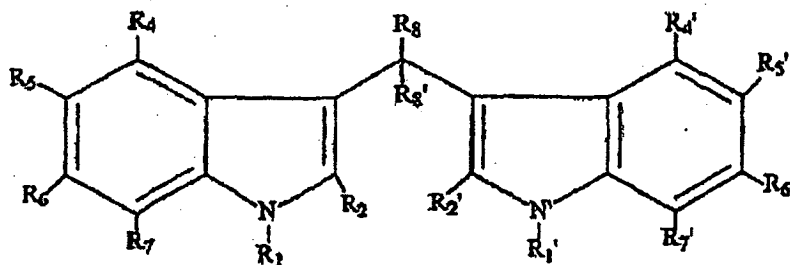
É constatado que derivados de C-DIM quando aplicados de um 15 manguito de elução de fármaco inibem a formação de lesões ateroscleróticas estatisticamente significativo. Tanto a contribuição dos macrófagos quanto das células de músculo liso nas lesões é reduzida nos manguitos de elução de C-DIM comparados aos manguitos simples. Estes dados suportam aplicação potencial de DIM em stents intravasculares de elução de fármaco em seres humanos.

## REIVINDICAÇÕES

1. Uso de um agonista de um ou mais dos receptores nucleares TR3, MINOR e NOT para a preparação de um medicamento para o tratamento de aterosclerose e doença cardiovascular relacionada à aterosclerose.

5 2. Uso de acordo com a reivindicação 1, em que a doença cardiovascular relacionada à aterosclerose é restenose intra-stent, doença de enxerto de veia, arteriosclerose de transplantação e/ou falha de desvio arteriovenoso.

10 3. Uso de acordo com a reivindicação 3, em que o agonista é um composto da fórmula:



em que:

15  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_4$ ,  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_1'$ ,  $R_2'$ ,  $R_4'$ ,  $R_5'$ ,  $R_6'$ , e  $R_7'$  são cada um independentemente selecionados do grupo que consiste em hidrogênio, um halógeno, um grupo  $C_1$ - $C_{10}$  alquila linear, um grupo  $C_1$ - $C_{10}$  alquila ramificado, um grupo alcóxi contendo um a dez átomos de carbono, e um grupo nitro; e

$R_8$  e  $R_8'$  são cada um independentemente selecionados do grupo que consiste em hidrogênio, um grupo  $C_1$ - $C_{10}$  alquila linear, um grupo  $C_1$ - $C_{10}$  alquila ramificado, um grupo cicloalquila contendo um a dez átomos de carbono, e um grupo arila.

20 4. Uso de acordo com a reivindicação 3, em que  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_4$ ,  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_1'$ ,  $R_2'$ ,  $R_4'$ ,  $R_5'$ ,  $R_6'$ , e  $R_7'$  são cada um hidrogênio, e pelo menos um de  $R_8$  e  $R_8'$  é um grupo alquila ramificado, um grupo cicloalquila ou um grupo arila.

25 5. Uso de acordo com a reivindicação 3 ou 4, em que  $R_8$  e  $R_8'$  são cada um individualmente hidrogênio, metila,  $C_6H_5$ ,  $C_6H_4OH$ ,  $C_6H_4CH_3$ ,  $C_6H_4CF_3$ ,  $C_{10}H_7$ ,  $C_6H_4C_6H_5$  ou  $C_6H_4OCH_3$ .

6. Uso de acordo com a reivindicação 5, em que um de  $R_8$  e  $R_8'$  é hidrogênio e o outro é  $C_6H_5$ ,  $C_6H_4CF_3$ , ou  $C_6H_4OCH_3$ .

7. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, em que o tratamento é realizado por meio de um stent que tem o agonista incorporado nele e/ou revestido sobre o mesmo.

8. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, em que o tratamento é realizado por meio de um revestimento vascular.

9. Uso de acordo com a reivindicação 8, em que o revestimento vascular é na forma de um manguito para a veia de enxerto.

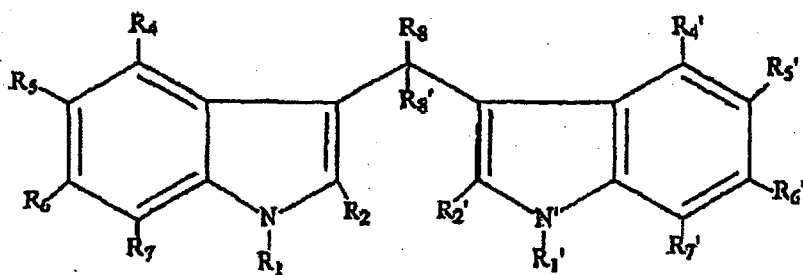
10. Uso de acordo com a reivindicação 8, em que o revestimento vascular é na forma de um revestimento líquido que é aplicado à veia de enxerto e fixado a ele antes da implantação.

11. Uso de acordo com a reivindicação 8, em que o revestimento é gel plurônico compreendendo o agonista.

12. Dispositivo médico capaz de eluir um agonista de um ou mais dos receptores nucleares TR3, MINOR e NOT para o uso no tratamento de aterosclerose e/ou doença cardiovascular relacionada à aterosclerose.

13. Dispositivo médico de acordo com a reivindicação 12, em que a doença cardiovascular relacionada à aterosclerose é restenose intra-stent, doença de enxerto de veia, arteriosclerose de transplantação e/ou falha de desvio arteriovenoso.

14. Dispositivo médico de acordo com a reivindicação 13, em que o agonista é um composto da fórmula:



em que:

$R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_4$ ,  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_1'$ ,  $R_2'$ ,  $R_4'$ ,  $R_5'$ ,  $R_6'$ , e  $R_7'$  são cada um independentemente selecionados do grupo que consiste em hidrogênio, um halógeno, um grupo  $C_1$ - $C_{10}$  alquila linear, um grupo  $C_1$ - $C_{10}$  alquila ramificado, um grupo alcóxi contendo um a dez átomos de carbono, e um grupo nitro; e

$R_8$  e  $R_8'$  são cada um independentemente selecionados do grupo que consiste em hidrogênio, um grupo  $C_1$ - $C_{10}$  alquila linear, um grupo  $C_1$ - $C_{10}$  alquila ramificado, um grupo cicloalquila contendo um a dez átomos de carbono, e um grupo arila.

5                    15. Dispositivo médico de acordo com a reivindicação 14, em que  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_4$ ,  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_1'$ ,  $R_2'$ ,  $R_4'$ ,  $R_5'$ ,  $R_6'$ , e  $R_7'$  são cada um hidrogênio, e pelo menos um de  $R_8$  e  $R_8'$  é um grupo alquila ramificado, um grupo cicloalquila ou um grupo arila.

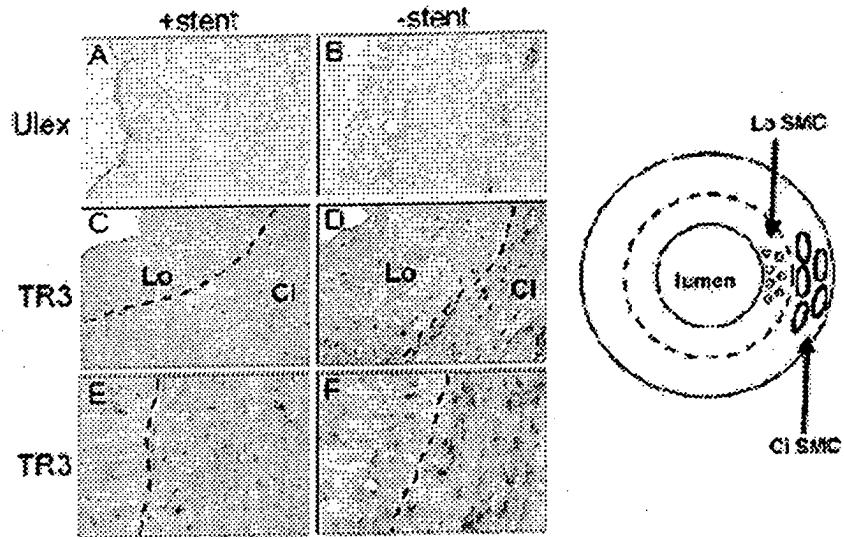
10                    16. Dispositivo médico de acordo com a reivindicação 14 ou 15, em que  $R_8$  e  $R_8'$  são cada um individualmente hidrogênio, metila,  $C_6H_5$ ,  $C_6H_4OH$ ,  $C_6H_4CH_3$ ,  $C_6H_4CF_3$ ,  $C_{10}H_7$ ,  $C_6H_4C_6H_5$  ou  $C_6H_4OCH_3$ .

17. Dispositivo médico de acordo com a reivindicação 16, em que um de  $R_8$  e  $R_8'$  é hidrogênio e o outro é  $C_6H_5$ ,  $C_6H_4CF_3$ , ou  $C_6H_4OCH_3$ .

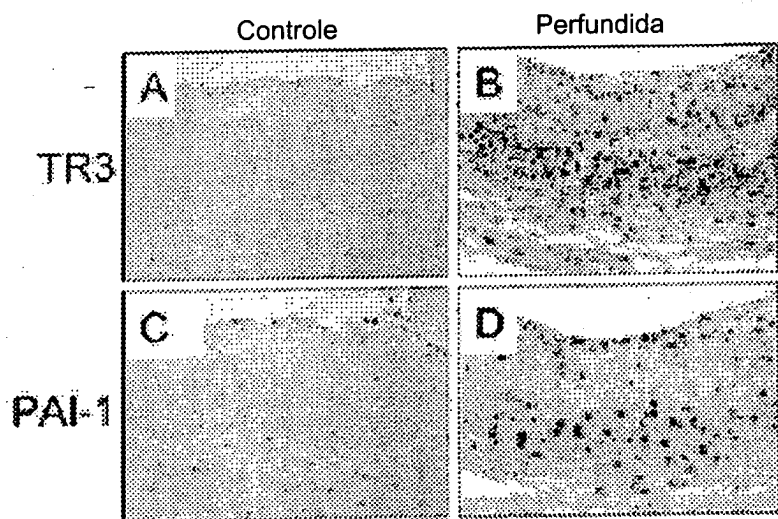
15                    18. Dispositivo médico de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 a 17, em que o agonista é incorporado e/ou revestido sobre o dispositivo médico.

19. Dispositivo médico de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 a 18, em que o dispositivo médico é um stent.

20                    20. Dispositivo médico de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 a 18, em que o dispositivo médico é um manguito.



**Fig. 1**



**Fig. 2**

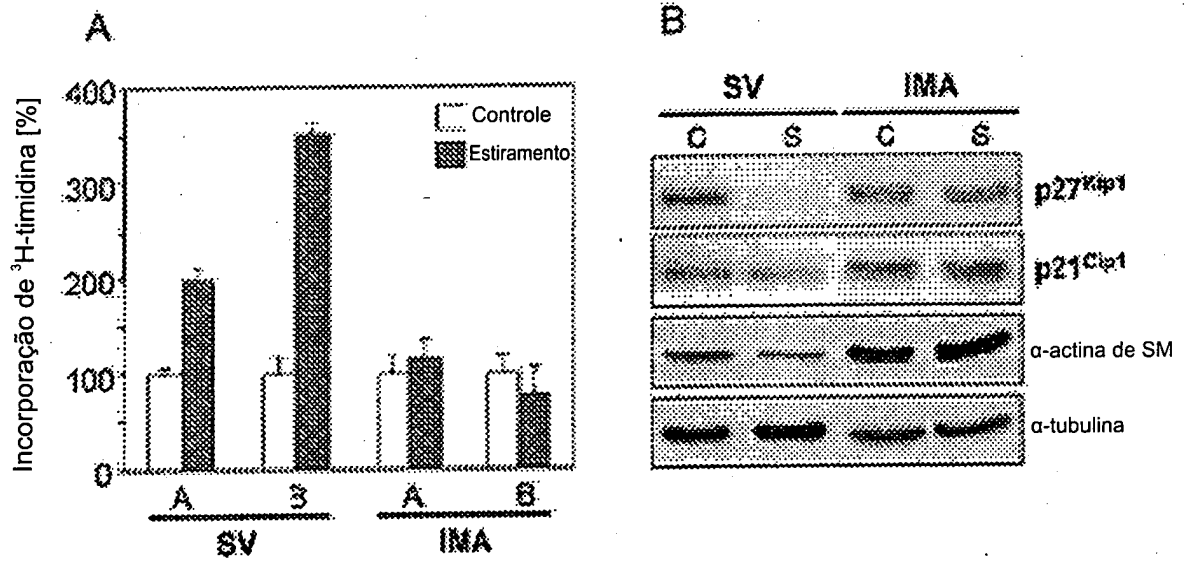
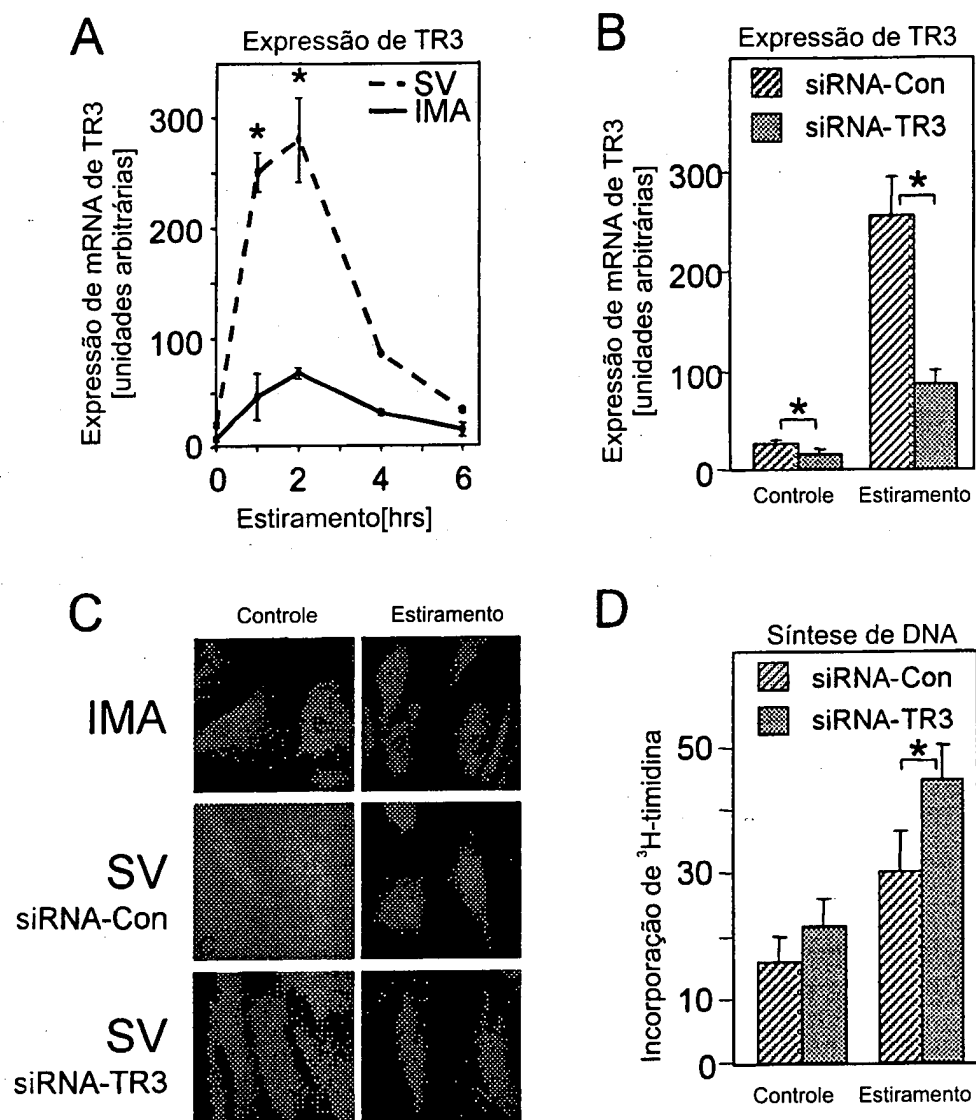


Fig. 3

Fig. 4



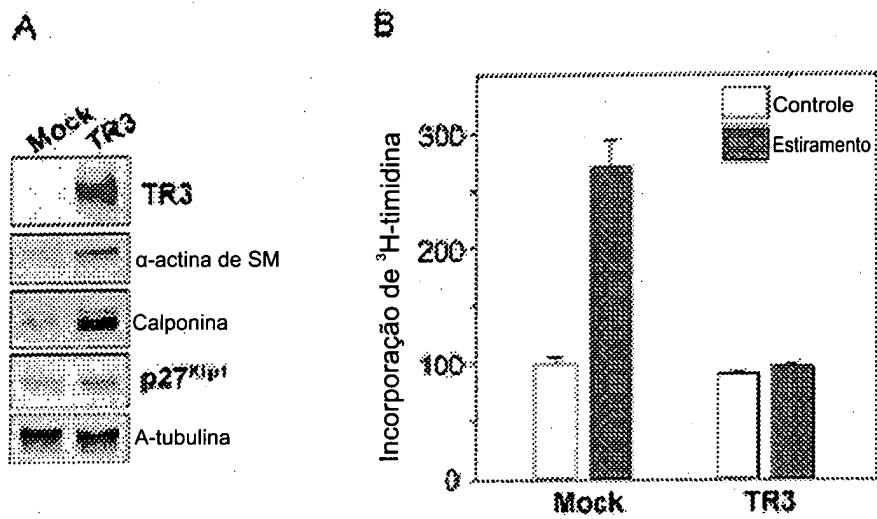
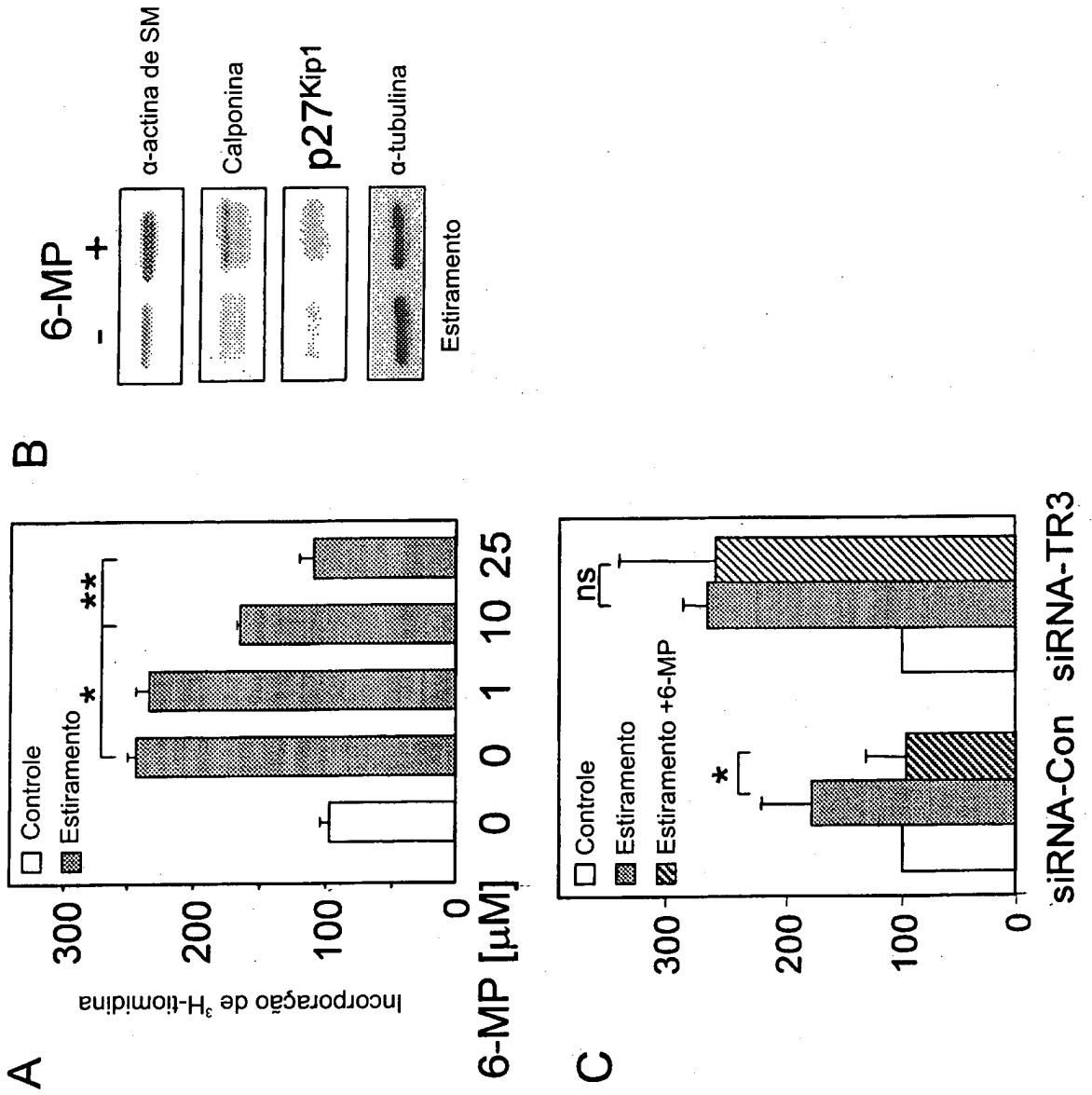


Fig. 5



Fig. 6



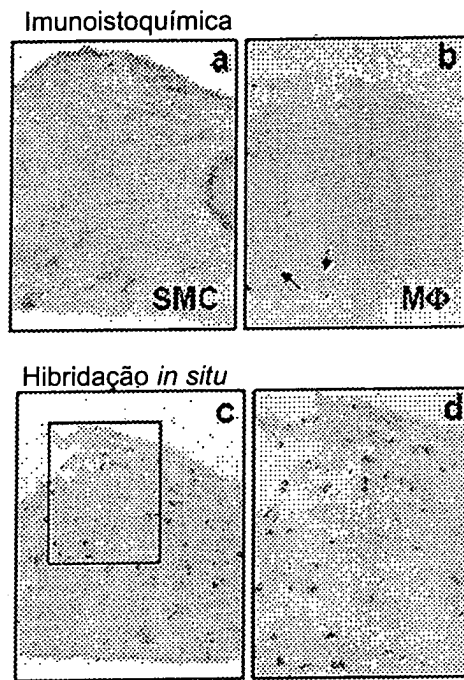


Fig. 7

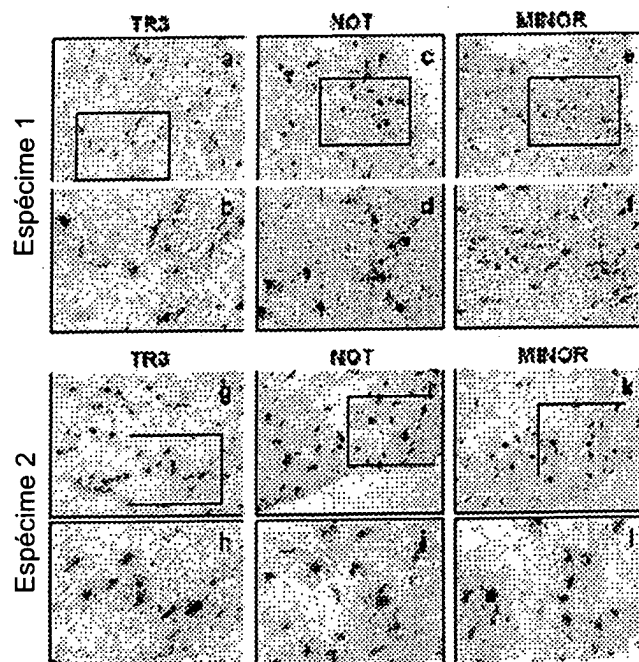
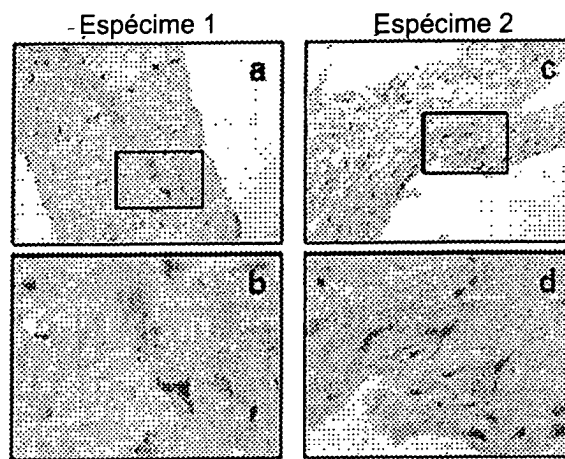
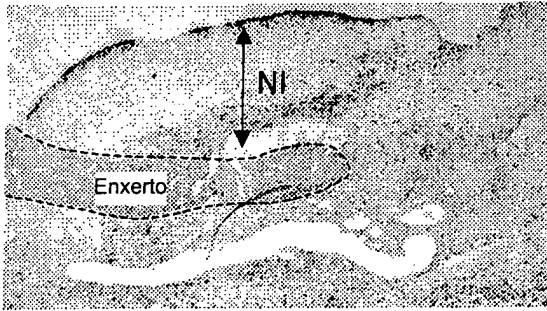


Fig. 8

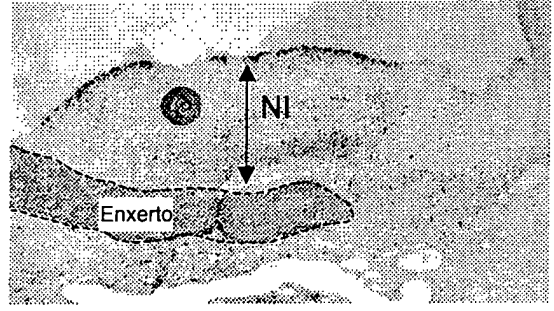


**Fig. 9**

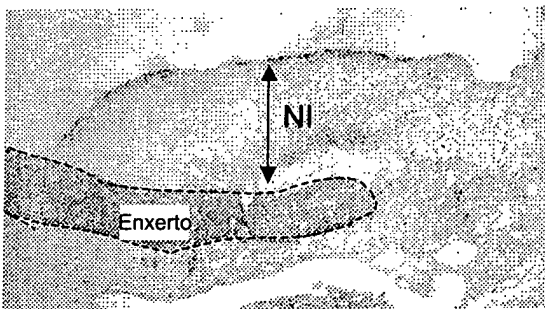
**Fig. 10**



A



B



C

Fig. 11

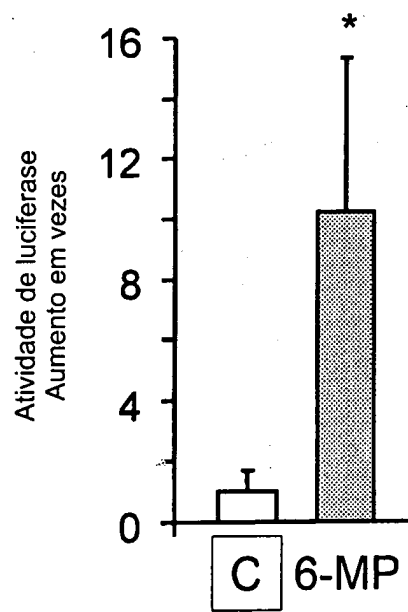
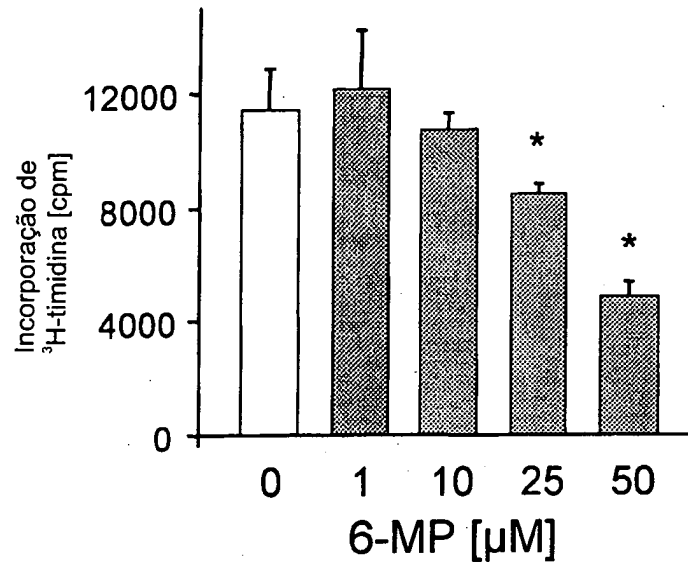
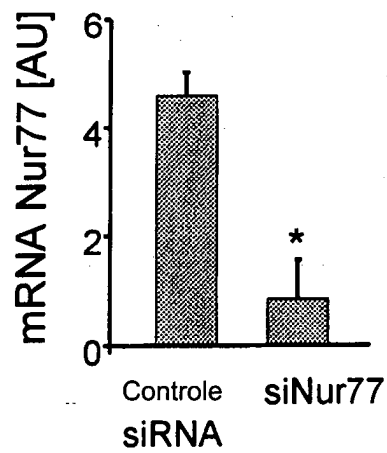


Fig. 12

A



B



C

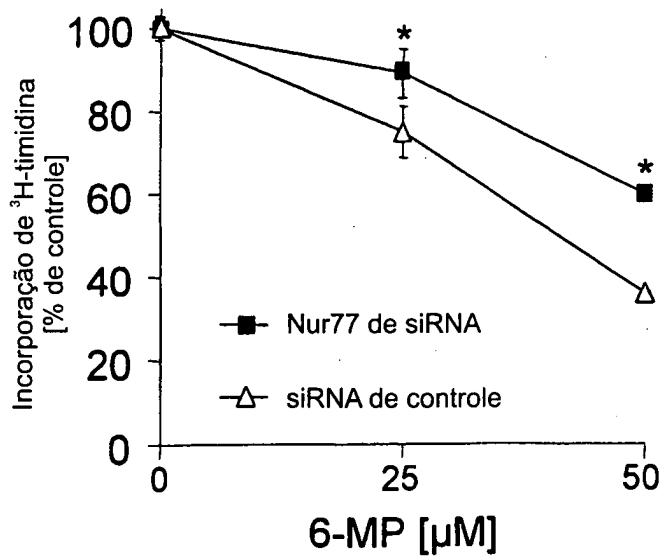
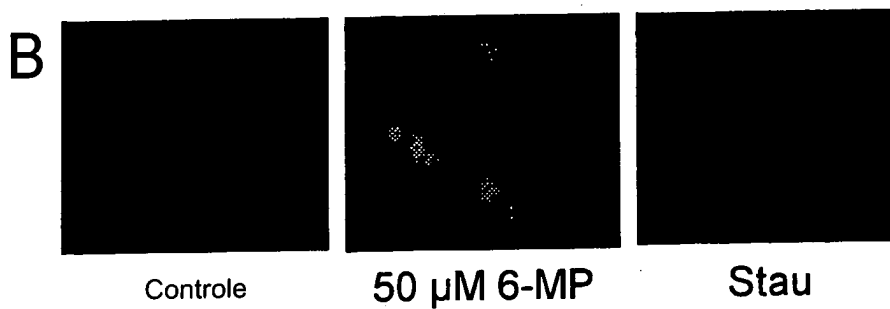
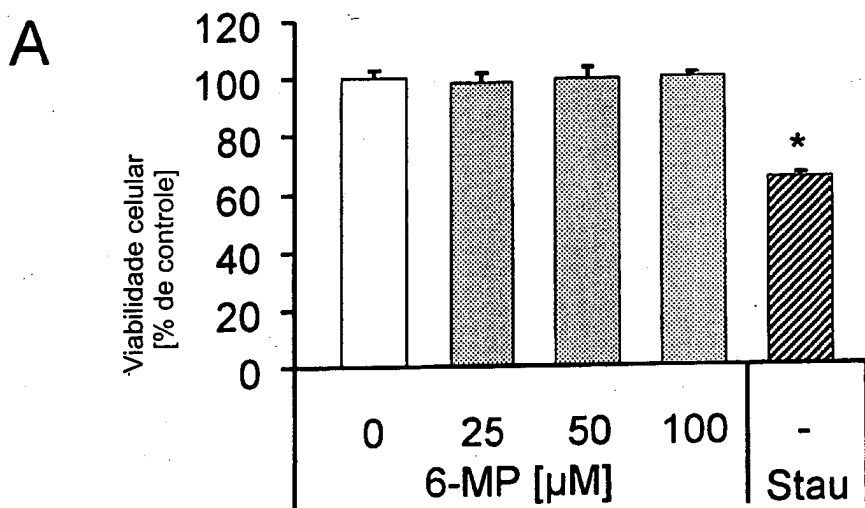
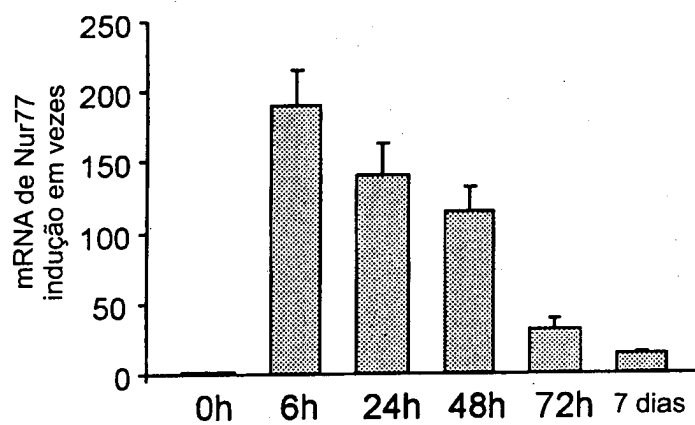


Fig. 13

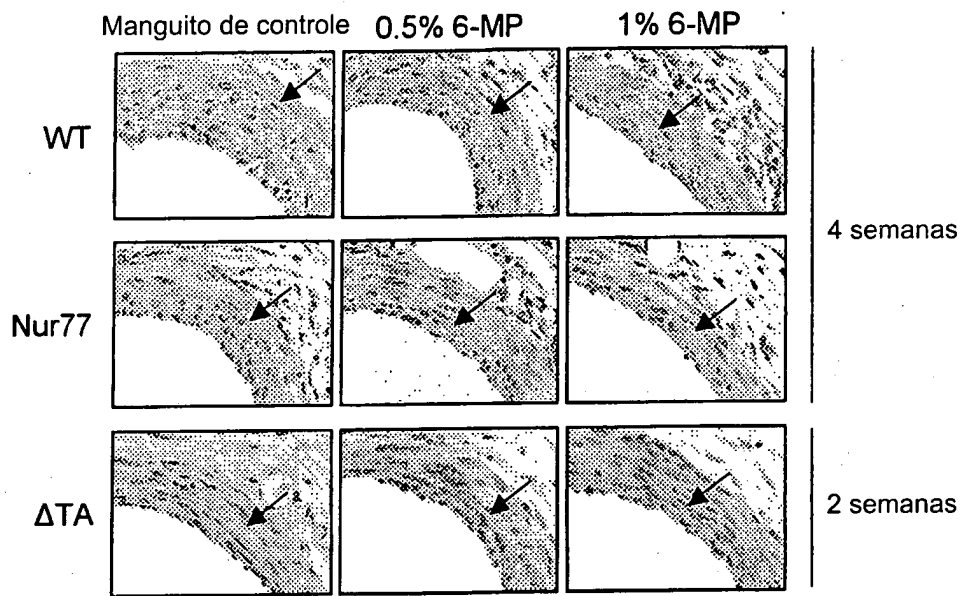


**Fig. 14**

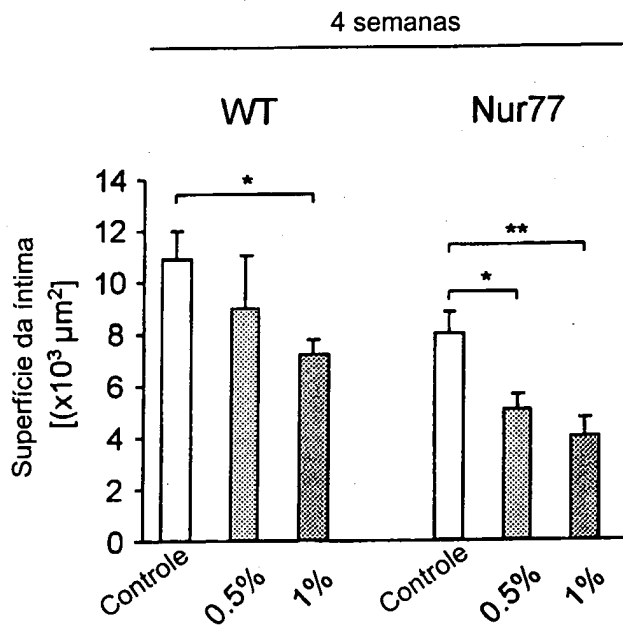


**Fig. 15**

**A**



**B**



**C**

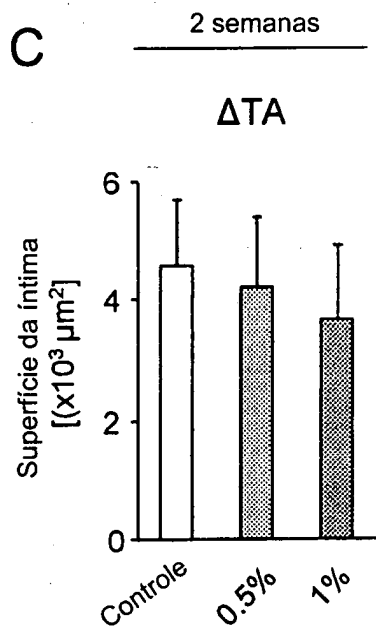


Fig. 16

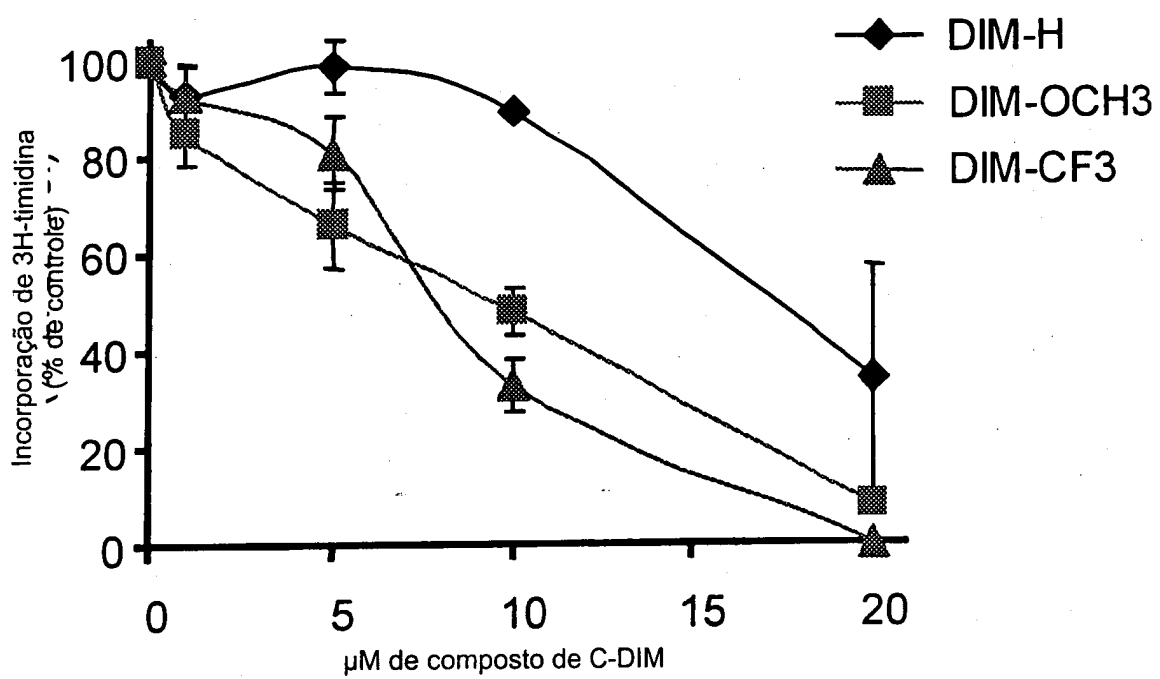
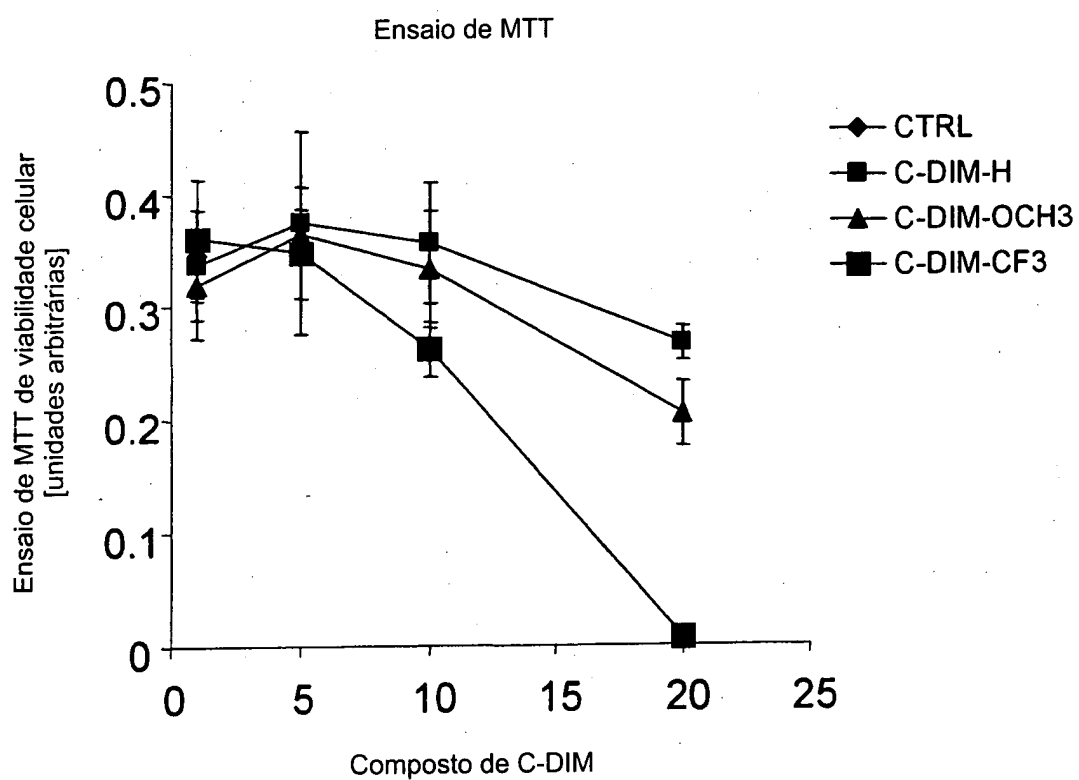


Fig. 17



**Fig. 18**

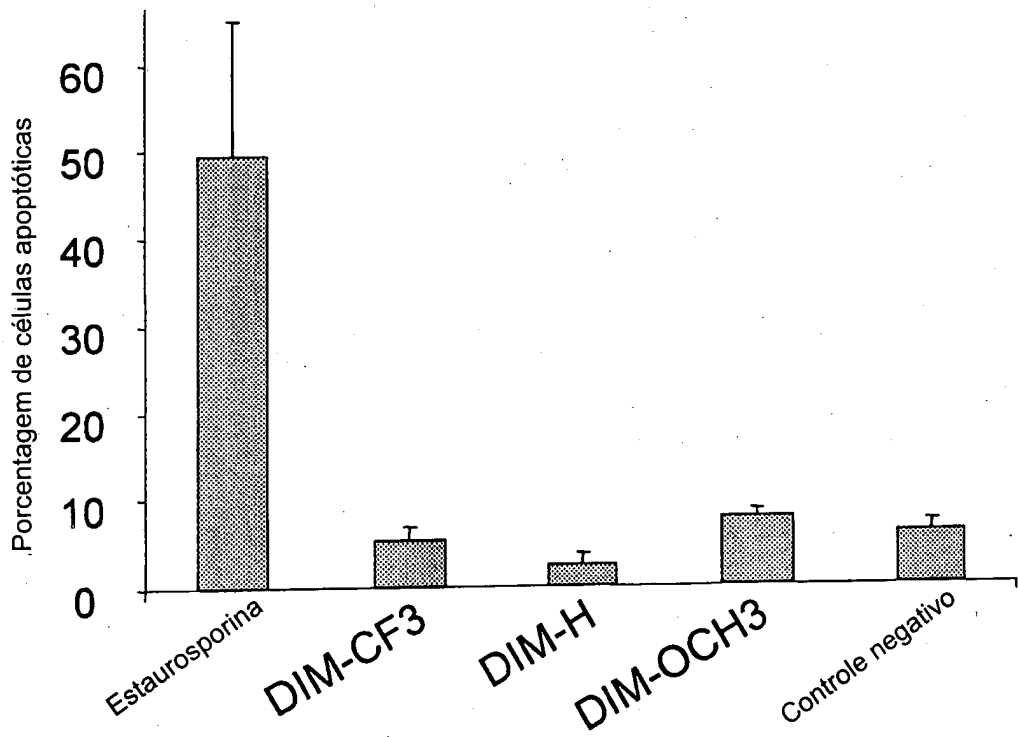
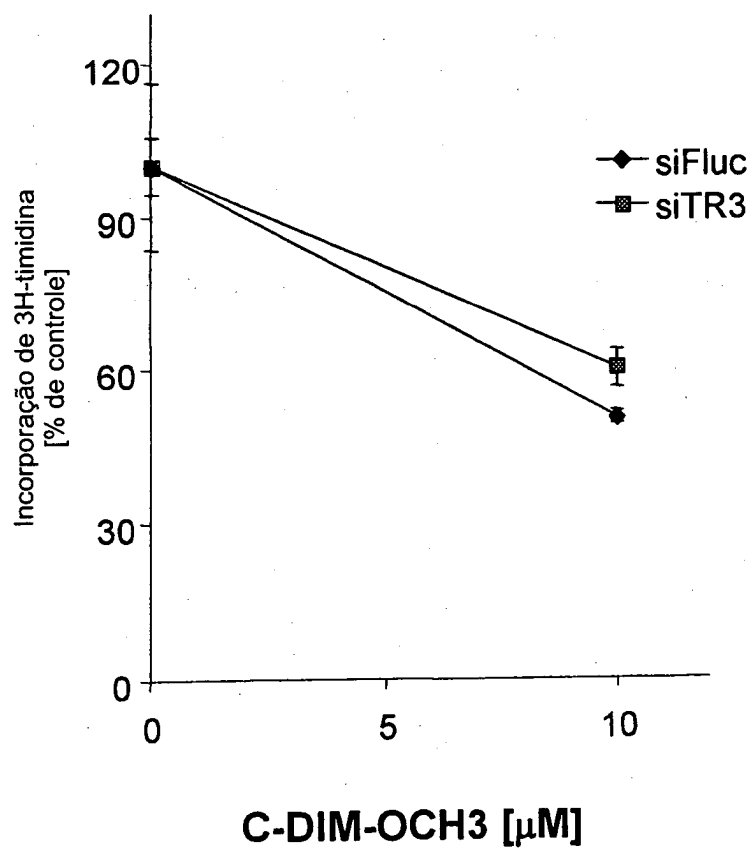


Fig. 19



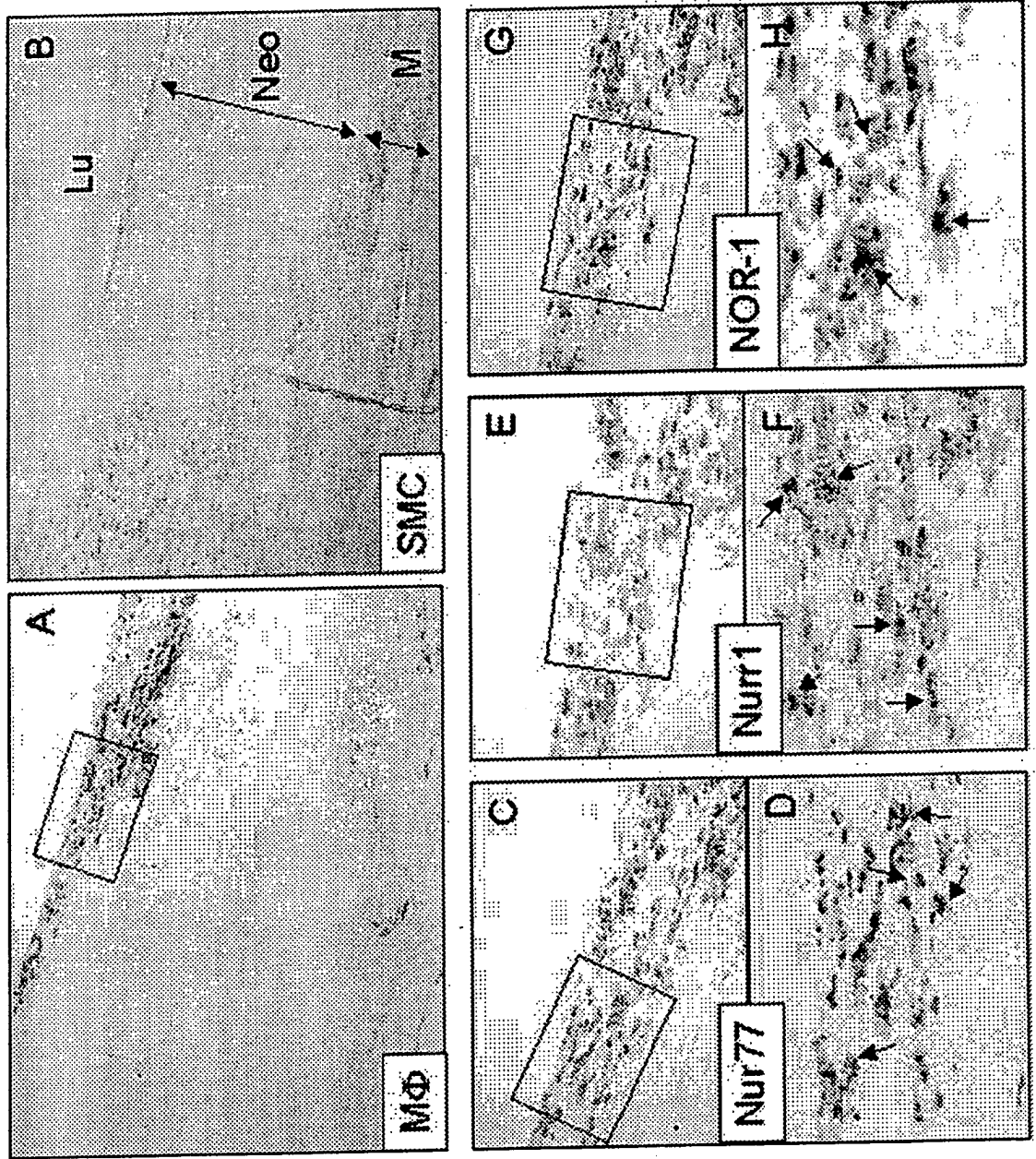


Fig. 20

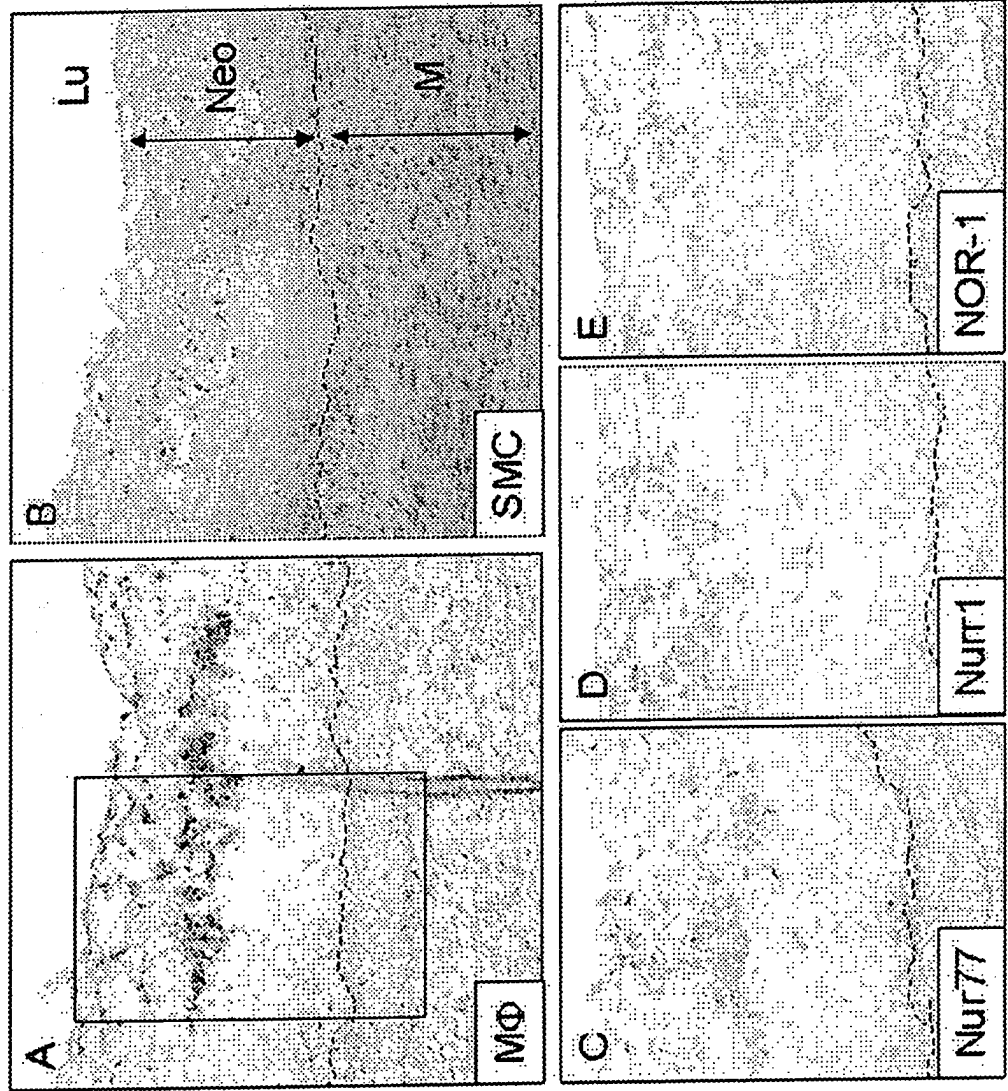
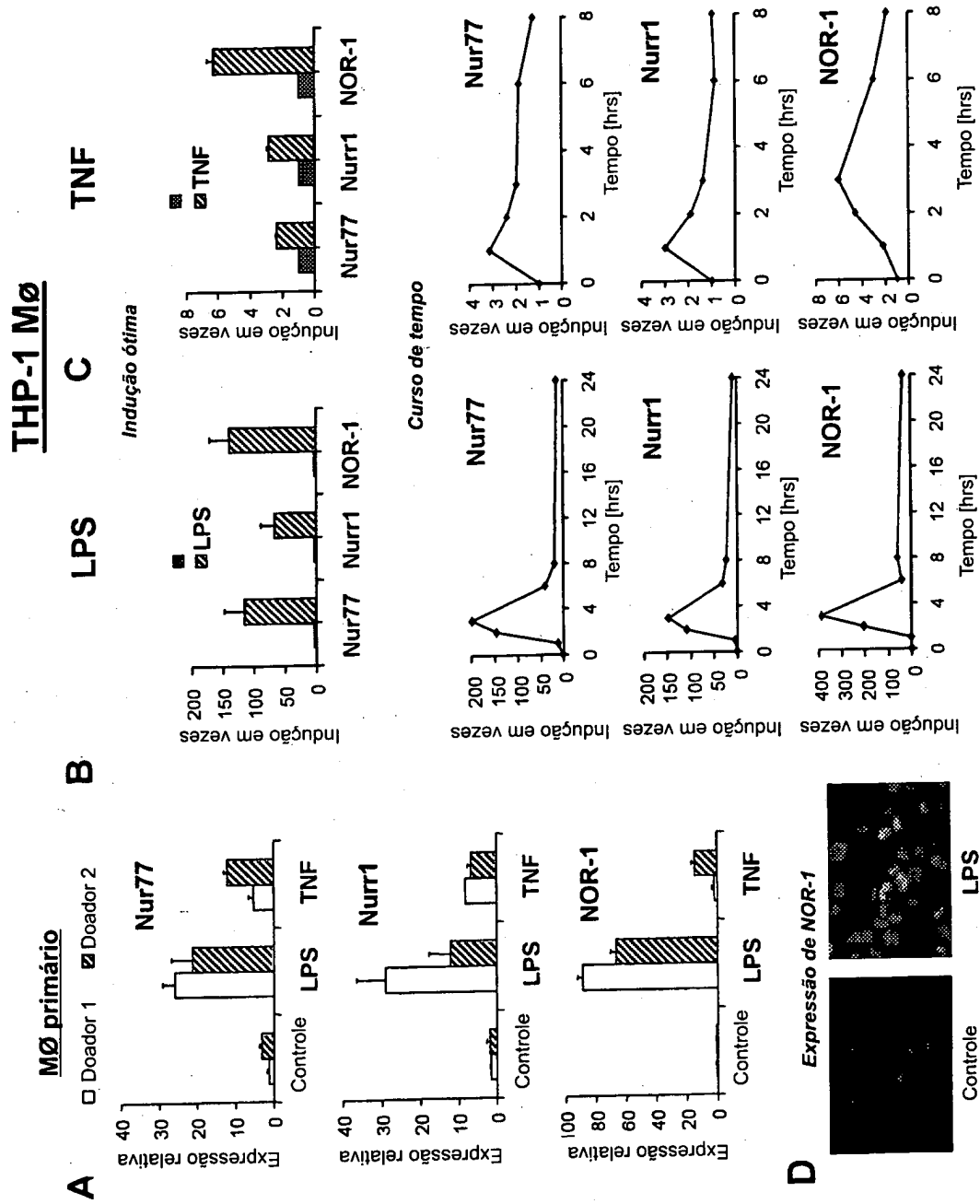


Fig. 21

**Fig. 22**





**FIG. 23**

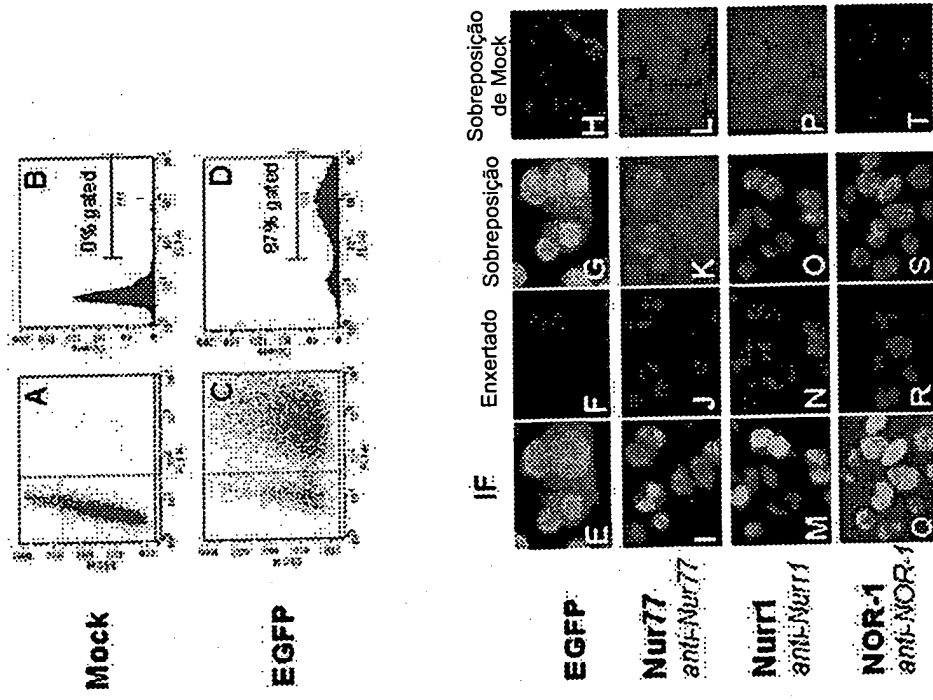


Fig. 24

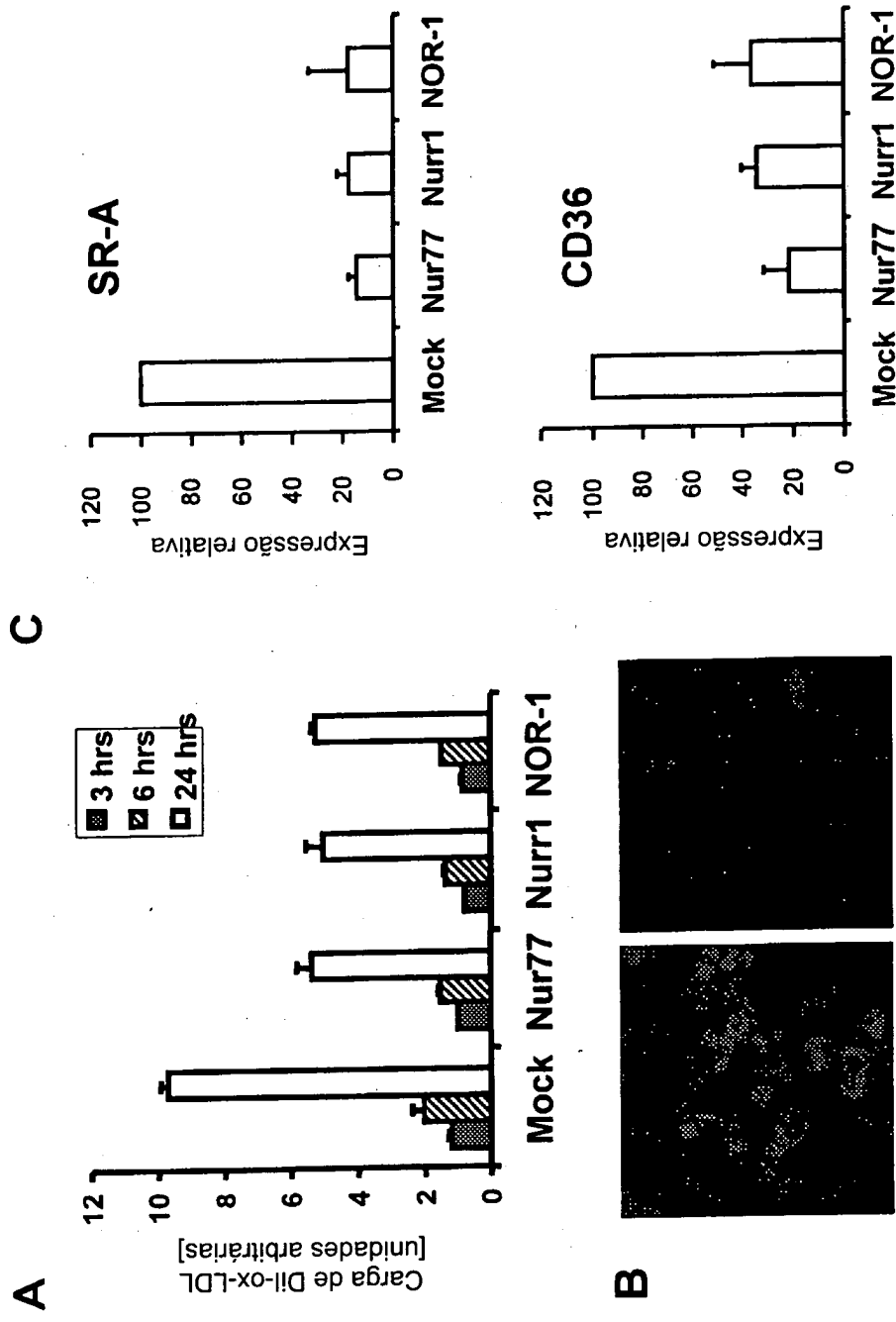
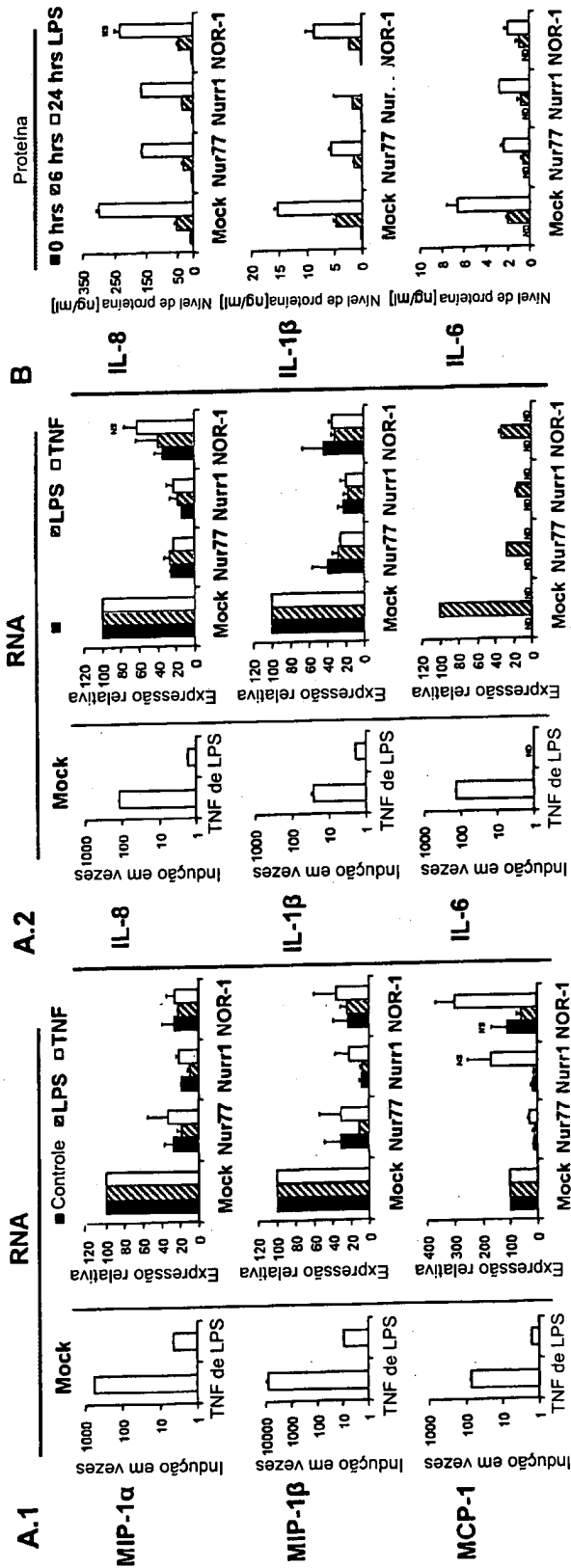


Fig. 25



PI 0613140-9

## RESUMO

Patente de Invenção: **"AGONISTAS DE RECEPTORES NUCLEARES PARA TRATAMENTO DE ATEROSCLEROSE E/OU DOENÇA CARDIOVASCULAR RELACIONADA"**.

5           A presente invenção refere-se ao uso de um agonista de um ou mais dos receptores nucleares TR3, MINOR e NOT para a preparação de um medicamento para o tratamento de doença cardiovascular, em particular restenose intra-stent e/ou doença de enxerto de veia. A invenção também diz respeito aos dispositivos médicos, como stents e manguitos, que são revestidos com o agonista ou nos quais o agonista é incorporado e que são para o

10           uso no tratamento de restenose intra-stent ou doença de enxerto de veia.