

DENISE DE CASTRO FERNANDES

**Modulação do estado redox em células endoteliais por forças  
hemodinâmicas: efeito do “shear stress” na expressão e atividade da  
dissulfeto isomerase protéica**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo, para obtenção do  
título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Francisco Rafael Martins Laurindo

São Paulo

2007

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

@reprodução autorizada pelo autor

Femandes, Denise de Castro

Modulação do estado redox em células endoteliais por forças hemodinâmicas :  
efeito do "shear stress" na expressão e atividade da dissulfeto isomerase protéica /  
Denise de Castro Femandes. -- São Paulo, 2007.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Departamento de Cardio-Pneumologia.

Área de concentração: Cardiologia.

Orientador: Francisco Rafael Martins Laurindo.

Descritores: 1.NADPH oxidase 2.Isomerase de dissulfeto da proteína 3.Células  
endoteliais 4.Estresse mecânico 5.Óxido nítrico 6.Superóxidos 7.Espécies de oxigênio  
reativas 8.Estresse oxidativo/fisiologia 9.Endotélio vascular/fisiologia

USP/FM/SBD-168/07

*Ao Rodrigo, pelo amor pleno e compreensão.*

*Aos meus pais, Artur e Aláide, pelo apoio  
carinhoso e incondicional.*

*Aos meus irmãos, Vitor e Ricardo,  
pela fraterna torcida.*

## **Agradecimentos**

Ao meu orientador, Prof. Francisco RM Laurindo, cujo apoio e confiança desde o início foram essenciais para meu amadurecimento científico. As conversas científicas (os famosos “brainstorm”) tornaram-se um grande prazer durante o doutoramento, e contribuíram para minha certeza em continuar na vida acadêmica.

Ao Dr. Célio X Santos, velho conhecido que se tornou grande amigo, que teve papel fundamental em meu desenvolvimento profissional, com conversas instigantes e provocativas, recheadas de idéias possíveis e algumas impossíveis mas fascinantes.

Ao João Wosniak Jr, colega e amigo de laboratório, que, além do apoio durante o doutoramento, me ajudou no cultivo celular e no desenvolvimento e otimização de condições experimentais de ensaios de biologia molecular.

À Maria A Bertoline, agradável companheira, que com zelo e primor manteve o HPLC sempre em condições de trabalho; além de toda atenção dispensada em pequenos detalhes diários que me foram preciosos.

Ao Prof. Hanjoong Jo, por tornar este trabalho possível ao colaborar na obtenção do sistema cone-e-placa.

À Laura Ventura, pela quantificação de nitrito e nitrato nas amostras de meio de cultura no analisador de óxido nítrico.

Ao Dr. Marcel Liberman, por realizar a lesão por cateter-balão em coelhos e analisar a fluorescência derivada da dihidroetidina por nos tecidos das íliacas dos mesmos, e ao Estêvão Bassi, pela análise de infiltrados macrofágicos nas artérias íliacas destes coelhos.

À Dra. Ana L Garippo, pelo auxílio no uso do microscópio confocal.

Pela ajuda bem vinda na reta final, a Ana Heloísa Manoel, pela medida da atividade da NADPH oxidase em células musculares lisas transfectadas e ao Victor Debbas por auxílio em alguns western blots.

Aos Prof. Eduardo Krieger, Prof. Heraldo P Souza, e Profa. Lucia R Lopes, por cederem seus laboratórios e reagentes para alguns experimentos.

Aos colegas e amigos de laboratório, pelas discussões científicas e contribuições em diversos aspectos: Angélica M Amanso, Claudia R Andrade, Elídia L Bonfim, Leonardo Tanaka, Leonora Loppnow, Luciana A Pescatore, Marcus A Paes, Maria Cristina D Tomazella, Vanda Yoshida.

Aos meus familiares queridos, que sem o apoio de vocês a jornada teria sido mais difícil e possivelmente menos fértil.

Este trabalho foi financiado pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) processo 04/05351-7.

# SUMÁRIO

## Lista de Abreviaturas

## Resumo

## Summary

## INTRODUÇÃO GERAL \_\_\_\_\_ 1

## OBJETIVOS \_\_\_\_\_ 8

## MATERIAIS E MÉTODOS \_\_\_\_\_ 9

1. Análise da oxidação da dihidroetidina in vitro por HPLC \_\_\_\_\_ 10
2. Análise da oxidação da DHE em VSMC \_\_\_\_\_ 12
3. Transfecção transitória e medida da atividade da SOD1 em VSMC \_\_\_\_\_ 15
4. Medida da atividade da NADPH oxidase em fração de membrana \_\_\_\_\_ 16
5. Medida de consumo de oxigênio \_\_\_\_\_ 18
6. Quantificação de heme em homogenatos de VSMC \_\_\_\_\_ 18
6. Modelo de lesão arterial por cateter-balão em íliaca de coelho \_\_\_\_\_ 19
7. Análise da oxidação da DHE em tecidos \_\_\_\_\_ 20
8. Medida da atividade peroxidásica e expressão da mieloperoxidase em tecidos \_\_\_\_\_ 21
9. Shear laminar em células endoteliais em cultura \_\_\_\_\_ 22
10. Quantificação de nitrito e nitrato em meio de cultura \_\_\_\_\_ 24
11. Purificação e nitrosação da PDI recombinante \_\_\_\_\_ 25
12. Quantificação de mRNA por real-time PCR \_\_\_\_\_ 26
13. Imunoprecipitação \_\_\_\_\_ 27
14. Medida da nitrosação da PDI por "biotin-switch" \_\_\_\_\_ 28
15. Fracionamento celular em gradiente de sacarose \_\_\_\_\_ 29
16. Microscopia confocal \_\_\_\_\_ 30
17. Transfecção transitória da PDI em células endoteliais \_\_\_\_\_ 31
18. Análise da expressão e fosforilação protéicas (western blot) \_\_\_\_\_ 32
19. Análise estatística \_\_\_\_\_ 33

## CAPÍTULO I: \_\_\_\_\_ 34

### *Análise dos produtos derivados da oxidação da dihidroetidina por HPLC como medida da produção de ânion radical superóxido e da atividade da NADPH oxidase em sistemas vasculares* \_\_\_\_\_ 34

#### 1. Introdução \_\_\_\_\_ 34

#### 2. Resultados \_\_\_\_\_ 40

- 2.1. Estudos in vitro da oxidação da DHE \_\_\_\_\_ 40
- 2.2. Análise da produção de radical ânion superóxido em células musculares lisas \_\_\_\_\_ 43
- 2.3. Estudo da atividade da atividade da NADPH oxidase pela oxidação da DHE \_\_\_\_\_ 53
- 2.4. Análise da fluorescência total derivada da oxidação da dihidroetidina em tecidos \_\_\_\_\_ 58

#### 3. Discussão \_\_\_\_\_ 62

#### 4. Conclusão \_\_\_\_\_ 67



|  |            |
|--|------------|
| <b>CAPÍTULO II:</b>  | <b>68</b>  |
| <i>Envolvimento da Dissulfeto Isomerase Protéica na regulação redox associada à produção de óxido nítrico durante shear laminar em células endoteliais</i> | <b>68</b>  |
| <b>1. Introdução</b>   | <b>68</b>  |
| 1.1. Formação de espécies reativas durante o shear stress em células endoteliais: envolvimento da NADPH oxidase  | 71         |
| 1.2. Envolvimento da dissulfeto isomerase protéica na modulação redox em células vasculares  | 74         |
| <b>2. Resultados</b>   | <b>77</b>  |
| 2.1. Expressão e compartimentalização da PDI durante shear laminar   | 77         |
| 2.2. Estado redox celular após shear laminar sustentado  | 81         |
| 2.3. Modulação da atividade da NADPH oxidase vascular pela PDI   | 87         |
| 2.4. Envolvimento da PDI na manutenção dos níveis de óxido nítrico bioativo durante shear laminar  | 93         |
| <b>3. Discussão</b>  | <b>101</b> |
| <b>4. Conclusão</b>  | <b>110</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>  | <b>111</b> |
| <b>CURRICULUM VITAE</b>  | <b>122</b> |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| ANG II                        | angiotensina  |
| DHE                           | dihidroetidina, hidroetidina, dihidroetídio                 |
| DTPA                          | N,N,N',N''-penta-acetato-dietilenotriamina                  |
| CO <sub>2</sub>               | dióxido de carbono  |
| eNOS                          | óxido nítrico sintase endotelial                            |
| ecSOD                         | superóxido dismutase extracelular                           |
| E/DHE                         | razão etídio/DHE consumida                                  |
| EOH                           | 2-hidroxietídio   |
| EOH/DHE                       | razão 2-hidroxietídio/DHE consumida                         |
| EDTA                          | etilenodiaminatetraacetato de sódio dihidratado             |
| EGTA                          | etileno-bis(oxietilenonitrila)tetraacetato de sódio         |
| GSH                           | glutaciona reduzida   |
| GSSG                          | glutaciona oxidada  |
| HRP                           | peroxidase de rabanete                                      |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Peróxido de hidrogênio                                      |
| HPLC                          | cromatografia de alta performance                           |
| LPS                           | Lipopolissacarídeo  |
| LS                            | estresse de cisalhamento laminar ( <i>laminar shear</i> )   |
| PDI                           | dissulfeto isomerase protéica                               |
| PDI-wt                        | dissulfeto isomerase protéica selvagem                      |
| PDI-mut                       | dissulfeto isomerase protéica mutada                        |
| •NO                           | óxido nítrico   |
| Nox                           | isoforma da NADPH oxidase ( <i>Non-phagocytic oxidase</i> ) |
| O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>  | ânion radical superóxido                                    |
| ONOO <sup>-</sup>             | peroxinitrito   |
| PDI                           | isomerase dissulfeto proteica                               |
| Peg-Cat                       | catalase conjugada a polietilenoglicol                      |
| Peg-SOD                       | SOD conjugada a polietilenoglicol                           |

|                |   |
|----------------|---|
| PBS            | salina pH 7,4   |
| PBS/DTPA       | salina pH 7,4 contendo DTPA 0,1 mM  |
| RAEC           | células endoteliais de aorta de coelho ( <i>rabbit aortic endothelial cells</i> ) |
| RNS            | espécies reativas de nitrogênio ( <i>reactive nitrogen species</i> )              |
| ROS            | espécies reativas de oxigênio ( <i>reactive oxygen species</i> )                  |
| SOD            | superóxido dismutase  |
| St             | condição estática (vs. shear laminar) ( <i>static</i> )                           |
| VSMC           | células musculares lisas ( <i>vascular smooth muscle cells</i> )                  |
| UA             | unidades arbitrárias  |
| $\epsilon$     | absortividade molar   |
| k              | constante de velocidade de reação   |
| $\lambda_{ex}$ | comprimento de onda de excitação  |
| $\lambda_{em}$ | comprimento de onda de emissão  |

## Resumo

FERNANDES DC. Modulação do estado redox em células endoteliais por forças hemodinâmicas: efeito do “shear stress” na expressão e atividade da dissulfeto isomerase protéica [Tese]. São Paulo. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2007. 125 p.

O shear stress laminar (LS) é o principal mantenedor do tônus vascular. O LS sustentado aumenta a produção pela eNOS de NO, que é vasodilatador, anti-inflamatório e anti-aterogênico. Entretanto, aumentos no shear laminar levam a uma produção transitória de superóxido via o complexo NADPH oxidase. Recentemente nosso grupo demonstrou que a NADPH oxidase é regulada pelos tióis da Dissulfeto Isomerase Protéica (PDI), pertencente à família da tioredoxina. Ainda, a PDI é capaz de internalizar NO exógeno via reações de trans-nitrosação. Na primeira parte deste trabalho, validamos metodologia para medida específica da produção de superóxido e da atividade da NADPH oxidase em células vasculares, baseada na oxidação da dihidroetidina. Na segunda parte, focamos na hipótese de que a modulação da atividade da NADPH oxidase pela PDI poderia afetar os níveis de NO durante o LS sustentado. Células endoteliais de aorta de coelho (RAEC) submetidas a LS ( $15 \text{ dinas/cm}^2$ ) em modelo de cone-e-placa por 18h exibiram (vs. controle estático): a) menor produção de superóxido (~50%); b) menor produção de peróxido de hidrogênio em fração de membrana estimulada com NADPH (~20%); c) menor expressão de mRNA das subunidades Nox1 (67%) e Nox4 (45%); d) aumento da expressão protéica da eNOS (~50%) e níveis de nitrito no meio de cultura ( $\Delta = 7.1 \pm 2.5 \mu\text{M}$ ); e) Menor expressão protéica da PDI total e na fração de membrana (~20%) sem alterações na razão PDI fração de membrana/PDI total. RAEC foram transfectadas com plasmídeo que codifica PDI selvagem ou mutada nos quatro tióis do sítio ativo, ambas contendo cauda c-myc. A expressão forçada (2x) da PDI mutada mas não da selvagem causou aumento dos níveis de nitrito após LS ( $\Delta_{\text{mutada}} = 17.2 \pm 2.9 \mu\text{M}$  vs.  $\Delta_{\text{WT}} = 7.0 \pm 1.5 \mu\text{M}$ ). Por microscopia confocal observamos localizações celulares similares entre a PDI superexpressa selvagem e mutada. A PDI co-imunoprecipitou com p22phox, subunidade da NADPH oxidase, mas não com eNOS ou caveolina-1, tanto na condição estática quanto após LS. Estudos de fracionamento celular em gradiente de sacarose mostrou que a PDI está distribuída em diversas frações na condição estática, inclusive as frações enriquecidas em caveolina-1, mas migra para frações mais densas que não contém caveolina-1, após LS. Estes resultados sugerem que a PDI está envolvida na regulação dos níveis de NO durante a LS por efeitos na atividade da NADPH oxidase.

**Descritores:** 1.NADPH oxidase 2.Isomerase de dissulfeto da proteína 3.Células endoteliais 4.Estresse mecânico 5.Óxido nítrico 6.Superóxidos 7.Espécies de oxigênio reativas 8.Estresse oxidativo/fisiologia 9.Endotélio vascular/fisiologia

## Abstract

FERNANDES DC. Redox modulation by hemodynamic forces in endothelial cells: shear stress effects in protein disulfide isomerase expression and activity [Thesis]. São Paulo. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2007. 125 p.

Shear stress is a major determinant of endothelial function. Generally, sustained laminar shear (LS) leads to eNOS-derived NO production and is vasodilator, anti-inflammatory and anti-atherogenic. However, increases in LS trigger transient superoxide production via NADPH oxidase complex. Recently, we showed that NADPH oxidase undergoes thiol-dependent regulation by thioredoxin superfamily chaperone Protein Disulfide Isomerase (PDI). PDI is known to promote NO internalization via trans-nitrosation reactions. In the first part, we validated superoxide measurement in cells and tissues and NADPH oxidase activity in cell membrane fraction by analysis of dihydroethidium oxidation. In the second part, we focused on hypotheses that PDI-dependent support of NADPH oxidase activity affects NO output during sustained LS. Rabbit aortic endothelial cells (RAEC) submitted to LS (15 dynes/cm<sup>2</sup>) in a cone-plate system for 18h exhibited (vs. static controls): a) Decreased (~50%) superoxide production; b) Decreased (~20%) NADPH-triggered hydrogen peroxide production in membrane fraction; c) Decreased mRNA expression of Nox1 (67%) and Nox4 (45%); d) Increased eNOS expression (~50%) and nitrite levels in culture medium ( $\Delta = 7.1 \pm 2.5 \mu\text{M}$ ); e) Decrease in total and membrane fraction PDI protein expression (~20%) without changes in membrane fraction/total ratio of PDI. RAEC were transfected with *c-myc*-tagged plasmid coding for wild-type PDI (WT) or PDI mutated in 4 thioredoxin-motif cysteine residues. Forced expression (2-fold) of mutated but not WT PDI led to increase in nitrite output after LS ( $\Delta_{\text{mutated}} = 17.2 \pm 2.9 \mu\text{M}$  vs.  $\Delta_{\text{WT}} = 7.0 \pm 1.5 \mu\text{M}$ ). Confocal microscopy indicated similar subcellular localization between WT and mutated PDI. PDI co-immunoprecipitated with p22phox NADPH oxidase subunit, but not with eNOS or caveolin-1, either in static condition or after LS. Fractionation studies in sucrose gradients showed that PDI is distributed throughout several fractions in static condition, including caveolin-1-enriched fractions, but migrates to higher-density fractions, not containing caveolin-1, during sustained LS. These results suggest that PDI is involved in regulation of NO output during LS via its effects on NADPH oxidase activity.

**Descriptors:** 1.NADPH oxidase 2.Protein disulfide isomerase 3.Endothelial cells 4.Mechanical stress 5.Nitric oxide 6.Superoxides 7.Reactive oxygen species 8.Oxidative stress/physiology 9.Vascular endothelium/physiology

## INTRODUÇÃO GERAL

O estresse de cisalhamento (ou *shear stress*) é a força de fricção gerada do fluxo sanguíneo sobre o endotélio vascular. O *shear stress* laminar exibe efeitos ateroprotetores, tais como ativação da enzima óxido nítrico sintase (eNOS), produção de óxido nítrico ( $\bullet\text{NO}$ ), vasodilatação, além de inibição da apoptose e da adesão de monócitos (Berk et al, 1998). De fato, o shear laminar é o principal agonista fisiológico da produção endotelial de  $\bullet\text{NO}$ . Entretanto, regiões de vasos que apresentam alterações no padrão do *shear stress*, que causam distúrbios no fluxo (sendo o mais comum o padrão de shear oscilatório), são associadas à predisposição para formação de placa aterosclerótica (Gimbrone et al., 2000). Os mecanismos pelos quais o shear laminar age como ateroprotetor e o shear oscilatório inicia ou contribui para aterogênese ainda estão sob debate. Recentemente foi demonstrado que os dois tipos de *shear stress* (laminar ou oscilatório) regulam de forma diferenciada a produção do radical ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) em células endoteliais: enquanto o shear oscilatório aumenta a produção de superóxido pela isoforma Nox1 do complexo NADPH oxidase, o shear laminar gera um aumento transiente da produção superóxido seguido de forte inibição (Hwang et al., 2003). Desta forma, a produção de superóxido por *shear stress* pode ter um papel sinalizador das adaptações vasculares relacionadas às diferentes forças mecânicas.

Portanto, tanto a identificação de qual espécie reativa é gerada como sua quantificação são informações importantes, quando não essenciais, no entendimento do modelo de estudo, como é o caso do *shear stress*. Ainda, de particular importância é a medida da atividade da NADPH oxidase. Entretanto, a identificação/quantificação de espécies reativas de oxigênio (dentre elas, de ânion radical superóxido) não é trivial, devido à suas altas constantes de velocidade de reação (e conseqüente baixo tempo de meia vida em ambientes intracelulares), baixa concentração e reação cruzada entre as diversas espécies reativas que podem estar envolvidas (Tarpey et al., 2004). Recentemente, foi desenvolvida uma metodologia mais específica para detecção de superóxido a partir da reação deste radical com o composto dihidroetidina (DHE) por Zhao e colaboradores (2003, 2005), cuja aplicação foi parcialmente explorada em sistemas vasculares por Fink e colaboradores (2004). A DHE é uma molécula amplamente utilizada em microscopia de fluorescência de células e tecidos, por ser permeável a membranas e, uma vez oxidada, emitir fluorescência na região do filtro rodamina (Bindokas et al., 1996). Inicialmente, a fluorescência total derivada da oxidação da DHE foi atribuída à formação do composto fluorescente etídio, mas recentemente Zhao e colaboradores mostraram que também é formado outro composto fluorescente, o 2-hidroxi-etídio (EOH), capaz de emitir fluorescência na mesma região do filtro rodamina. Portanto, a fluorescência total observada no microscópio em células e tecidos, é uma soma da fluorescência de cada um destes dois produtos. Conhecer quais oxidantes formam EOH e/ou etídio, bem como identificá-los, torna-se essencial para a interpretação correta do significado da fluorescência total

observada no microscópio. A identificação (e quantificação) dos dois produtos, EOH e etídio, pode ser resolvida por cromatografia líquida de alta performance com detecção por fluorescência (Zhao et al., 2003). Enquanto a formação de EOH em sistemas biológicos foi associada à oxidação da DHE especificamente pelo ânion radical superóxido (Zhao et al., 2003; Fink et al., 2004), a formação de etídio foi associada à oxidação inespecífica por outros oxidantes, ainda pouco explorada (Fink et al., 2004; Zhao et al., 2005). A fim de compreendermos melhor os detalhes experimentais da técnica, bem como aplicá-la de forma eficiente nos modelos estudados em nosso grupo de pesquisa, validamos a análise dos produtos de oxidação da DHE para células em cultura e tecidos. Além disso, otimizamos as condições para medir a atividade da NADPH oxidase em células musculares lisas. Estes experimentos estão descritos e discutidos no Capítulo I.

Inicialmente, a análise da oxidação da DHE in vitro mostrou que EOH pode ser formado por sistema xantina/xantina oxidase (gerador de superóxido), e também por peroxinitrito/ $\text{CO}_2$  e reagente de Fenton em menor grau. Interessante, peroxidase/ $\text{H}_2\text{O}_2$  foi capaz de produzir preferencialmente etídio, enquanto  $\text{H}_2\text{O}_2$  somente não foi capaz de oxidar a DHE a produtos fluorescentes. Em células musculares lisas (VSMC) estimuladas com angiotensina II, um conhecido agonista da NADPH oxidase vascular (Clemens e Griendling, 2006), verificamos um aumento da formação de EOH em 60%, que foi inibida por Peg-SOD ou superexpressão de SOD, sugerindo fortemente que o superóxido é a espécie reativa envolvida neste sistema. Ainda, mostramos que a incubação de DHE com fração de membrana estimulada com NADPH (medida da atividade da NADPH oxidase), aumentou especificamente



os níveis de EOH quando as células foram previamente estimuladas com angiotensina II. Este ensaio foi adaptado para leitor de fluorescência de microplaca, que consome menos reagente e principalmente, tempo. Também empregamos esta metodologia em tecidos de artérias ilíacas de coelhos normolipidêmicos submetidos à lesão por superdistensão de balão. Durante a reparação tecidual, aos 14 dias após a lesão, ocorre um aumento da fluorescência total derivada da oxidação da DHE (Szocz et al., 2002; Leite et al., 2004). Observamos que os níveis de EOH e etídio aumentam em 1,5- a 2-vezes em relação à artéria controle, e Peg-SOD foi capaz de inibir somente a formação de EOH. Interessante, os altos níveis de etídio observados nas artérias lesadas, e inibidos em 40% por Peg-Cat, sugeriram uma eventual participação de peroxidases neste modelo, já que in vitro peroxidases foram capazes de oxidar a DHE quase exclusivamente a etídio. De fato, verificamos que a atividade peroxidásica total foi 5-vezes maior nas artérias lesadas em relação às artérias controle. Este trabalho de validação da metodologia tornou a análise dos produtos derivados da DHE por HPLC uma importante ferramenta na análise dos efeitos do *shear stress* em células endoteliais e tem contribuído para diversos trabalhos de nosso grupo de pesquisa. Ainda, identificamos interferentes que podem confundir a interpretação dos resultados obtidos com células e tecidos, como a densidade celular inicial e a exposição à luz ambiente durante o procedimento de extração dos compostos fluorescentes. Em suma, este método aumenta a especificidade da análise de sistemas que geram superóxido, em especial em estudos de sistemas vasculares.

No Capítulo II descrevemos o estudo sobre a modulação do estado redox durante o shear laminar, com enfoque na dissulfeto isomerase protéica (PDI), uma tiol oxidorreductase ubíqua e bastante conservada entre as espécies, da superfamília da tioredoxina. Recentemente, nosso laboratório mostrou que a regulação do complexo NADPH oxidase é dependente das cisteínas do sítio ativo da PDI (Janiszewski et al., 2005). Além da regulação funcional, a PDI co-imunoprecipita com as isoformas Nox1, Nox2 e Nox4 da NADPH oxidase, e transloca-se para a fração particulada de membranas quando as VSMC são estimuladas com o agonista da NADPH oxidase angiotensina II (Janiszewski et al., 2005). Importante, a PDI na membrana plasmática é capaz de internalizar  $\bullet$ NO exógeno, via reações de transnitrosação (Zai et al., 1999). Ainda, a isoforma Nox1 encontra-se na membrana plasmática de VSMC, mais especificamente, em cavéolas, por co-localizar-se com a proteína caveolina-1 (Hilenski et al., 2004). Neste mesmo microambiente celular ocorre a ativação da eNOS durante o shear laminar (Gratton et al., 2004) e o shear laminar sustentado promove aumento do número de cavéolas em células endoteliais (Boyd et al., 2003). Dentro deste contexto, investigamos a expressão e a função da PDI na modulação redox dos efeitos do *shear stress* laminar em células endoteliais de aorta de coelho (RAEC) em cultura, especialmente dos níveis de  $\bullet$ NO bioativo.

Após shear laminar sustentado (por 18h), observamos diminuição na expressão total da PDI, bem como do mRNA das isoformas Nox1 (67%) e Nox4 (45%) da NADPH oxidase e da atividade da NADPH oxidase (20%) (vs. controle estático). Estes dados corroboram com a menor produção de espécies reativas de

oxigênio nas RAEC (medida pela oxidação da DHE em células por HPLC) e em outros tipos de células endoteliais (Hwang et al., 2003). Interessante, após shear laminar por 1h, a PDI migrou para a fração de membrana; período em que há maior produção de espécies reativas, possivelmente mediada pela Nox1 (Hwang et al., 2003).

Para compreendermos melhor o papel da PDI na modulação dos níveis de  $\bullet$ NO bioativo durante o shear laminar sustentado, utilizamos RAEC transfectadas transitoriamente com PDI selvagem ou PDI mutada nos quatro tópicos do sítio ativo. A PDI superexpressa distribuiu-se de forma similar nas células do controle estático e após shear laminar sustentado; entretanto, houve maior concentração da PDI superexpressa (selvagem ou mutada) em fração de membrana após o shear laminar. As células transfectadas com PDI mutada apresentaram produção de  $\bullet$ NO 2,5 vezes maior após shear laminar por 18h, enquanto que a superexpressão da PDI selvagem não alterou os níveis de óxido nítrico, ambos comparados às células não transfectadas submetidas a shear laminar (PDI endógena). O mais intrigante entretanto, foi a maior produção de ROS em 30%, especialmente de  $H_2O_2$ , observada nas células transfectadas com PDI mutada comparada à PDI selvagem. Os aumentos simultâneos da produção de  $\bullet$ NO e ROS sugerem que a PDI deve de fato regular os níveis de óxido nítrico bioativo durante o shear laminar sustentado, e esta regulação é dependente do estado redox do seu sítio ativo.

Este balanço entre a produção de  $\bullet$ NO e ROS na célula endotelial parece ser um mecanismo finamente regulado e complexo, pois a adição de enzimas antioxidantes, SOD ou catalase, gerou efeitos opostos na produção de  $\bullet$ NO nas

células transfectadas com PDI selvagem vs. mutada durante o shear laminar. De fato, estudos in vitro com VSMC transfectadas mostraram que aumentos na expressão da PDI selvagem geram maior atividade da NADPH oxidase, preferencialmente da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que é considerado o principal produto da isoforma Nox4 (Lassegue e Clempus, 2003). Já a PDI mutada manteve a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> maior que o basal, mas aumentou também em ~30% a produção de superóxido. Estes dados, tomados em conjunto aos demais descritos no capítulo II, sugerem um complexo e importante papel para PDI durante o shear laminar, pois, ao regular a atividade da NADPH oxidase e portanto, a concentração estacionária de ROS, modularia vias de um servomecanismo que controlaria a produção de •NO e ROS, no qual a PDI tem um papel-chave em sua operação. Este servomecanismo de manutenção dos níveis de •NO bioativo é discutido no capítulo II.

## OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho são:

1ª parte) Validar a análise por HPLC dos produtos fluorescentes derivados da oxidação da dihidroetidina em sistemas vasculares. Em particular, adaptar esta metodologia para quantificar a atividade da NADPH oxidase vascular.

2ª parte) Avaliar a expressão e a função da dissulfeto isomerase protéica na modulação redox dos efeitos do *shear stress* laminar em células endoteliais.

Nesta parte, objetiva-se, especificamente:

1-Avaliar a expressão protéica e a localização subcelular da PDI em células endoteliais em cultura submetidas a *shear stress* laminar.

2-Avaliar o efeito do *shear stress* na interação entre PDI e subunidades da NAD(P)H oxidase e migração destas proteínas para microdomínios lipídicos (especificamente, cavéolas).

3-Avaliar o efeito do antagonismo da PDI e da NADPH oxidase na produção de  $\cdot\text{NO}$  e das espécies reativas de oxigênio em células endoteliais submetidas a *shear stress* laminar.

## **Materiais e métodos**

Dihidroetidina, reagente AmplexRed<sup>®</sup> e Lipofectamina<sup>®</sup> foram adquiridos da Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA); xantina, xantina oxidase, GSNO, SpermineNONOato da Calbiochem (San Diego, CA, EUA) e peróxido de hidrogênio da Merck (Darmstadt, Alemanha). Todos os outros reagentes, incluindo DNA de timo de bezerro, foram comprados da Sigma (St. Louis, MO, EUA). Peroxinitrito foi sintetizado a partir da mistura (1:1) de nitrito de sódio (0,6 M) e peróxido de hidrogênio (0,65 M) e sua concentração foi determinada espectrofotometricamente ( $\epsilon_{302nm} = 1.670 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) (Beckman et al., 1990). As soluções estoque de DHE (10 mM) foram preparadas em DMSO e armazenadas sob nitrogênio líquido, no escuro, a -20°C. Todas as soluções foram preparadas com água purificada em sistema Milli-Q, e posteriormente tratadas com Chellex-100 para remoção de metais de transição contaminantes.

Dosagem de proteína em homogenatos foi realizada com kit Protein Assay (BioRad) baseando-se em curva de calibração realizada com solução de albumina de concentração conhecida.

Os Métodos estão descritos conforme a seqüência de resultados apresentados nos dois capítulos, Capítulo I (ítems 1 a 8) e Capítulo II (ítems 9 a 18), com exceção dos métodos que foram empregados nos dois Capítulos. Há a descrição breve dos objetivos de cada método. A análise estatística (item 19) aplica-se a todos os resultados descritos, com  $n \geq 3$ .

## **1. Análise da oxidação da dihidroetidina in vitro por HPLC**

**Objetivo:** *A análise in vitro da oxidação da DHE, uma molécula não fluorescente, permitiu determinar quais ROS oxidam a DHE para produtos fluorescentes na região do filtro rodamina ( $\lambda_{exc}$  510nm,  $\lambda_{em}$  595nm). Os produtos de reação foram analisados por espectrofotometria no visível e por cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Por HPLC quantificam-se os dois produtos fluorescentes formados pela oxidação da DHE: 2-hidroxi-etídio e etídio. Enquanto a formação do primeiro é relacionada à formação de ânion radical superóxido e/ou peroxinitrito (em presença de  $CO_2$ ); o segundo reflete geração de  $H_2O_2$  e/ou maior atividade de peroxidases (ver Discussão – Capítulo I).*

Dihidroetidina (50  $\mu$ M) foi oxidada em tampão fosfato (100 mM, pH 7,4, DTPA 100  $\mu$ M) por diferentes sistemas: (a) peróxido de hidrogênio (1-5 mM) na presença ou ausência de sulfato ferroso/EDTA (0,5 mM/0,5 mM); (b) peroxinitrito (1 mM), adicionado em presença ou ausência de bicarbonato (25 mM); (c) HRP/peróxido de hidrogênio (0,2 U/mL/ 5 mM). Todos os sistemas foram incubados por 30 minutos a 37°C, no escuro, e mantidos em gelo até análise posterior, com exceção das incubações contendo peroxinitrito, que foram realizadas em 5 minutos. Neste caso vale ressaltar que o pH do tampão após a adição de peroxinitrito, tanto em presença quanto em ausência de bicarbonato, não variou (pH = 7,5  $\pm$  0,1). A concentração de dióxido de carbono foi calculada a partir da concentração de bicarbonato adicionada através do pKa 6,4 (Bonini et al., 1999). As amostras foram

analisadas por HPLC conforme descrito acima e por absorção na região do visível (400-600nm) (Espectrofotômetro Beckman DU-640).

A separação dos compostos DHE, EOH e etídio foi realizada como descrita anteriormente por Zhao et al. (2003), com algumas modificações, em sistema HPLC (Waters) equipado com detectores de absorbância (varredura de fotodiodo) (W2996) e de fluorescência (W2475). A separação foi realizada em coluna NovaPak C<sub>18</sub> (3,9 x 150 mm, 5 µm de diâmetro de partícula), com gradiente entre acetonitrila pura e mistura de água/acetonitrila (9:1 v/v, contendo ácido trifluoracético 0,1%), com fluxo de 0,4 mL/min. As corridas foram iniciadas com a mistura de água/acetonitrila, após 10 min aplicou-se gradiente linear com aumento da proporção de acetonitrila pura até esta mistura chegar em 40% durante os 10 min seguintes; esta proporção foi mantida por mais 10 min.

Dihidroetidina foi monitorada por absorção na região UV a 245nm, enquanto que os compostos fluorescentes EOH e etídio foram monitorados por detecção por fluorescência ( $\lambda_{exc}$  510 nm,  $\lambda_{em}$  595 nm). A quantificação dos compostos foi realizada por comparação das integrais das áreas dos picos correspondentes com as integrais obtidas com padrões autênticos submetidos às mesmas condições cromatográficas. A concentração dos padrões foi quantificada pela absorvidade molar de cada composto (etídio  $\epsilon_{285nm} = 5.740 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  e DHE  $\epsilon_{265nm} = 1.963 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). O padrão de EOH foi preparado conforme descrito anteriormente (Zhao et al., 2003). Resumidamente, DHE (50 µM) foi oxidada pelo sistema xantina/xantina oxidase (0,5 mM/0,05 U/mL) em PBS (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7,78 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,2 mM, NaCl 140 mM, KCl 2,73 mM, pH 7,4) contendo 100 µM DTPA (PBS/DTPA) a 37°C por 30 min.



2-Hidroxi-etídio foi separado sob as condições de separação em HPLC descritas acima, coletado e liofilizado. O resíduo cor-de-rosa obtido foi ressuspendido em DMSO e analisado em espectrofotômetro (EOH  $\epsilon_{475\text{nm}} = 9.400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) (Zielonka et al., 2005).

## **2. Análise da oxidação da DHE em VSMC**

**Objetivo:** *A fluorescência total (observada em microscópio de fluorescência) derivada da oxidação da DHE permite a análise da produção total de ROS em células em cultura, sem distinguir os diferentes produtos fluorescentes derivados da oxidação da DHE. Em contrapartida, por HPLC é possível quantificar os compostos 2-hidroxi-etídio e etídio (conforme item 1) formados em células em cultura, e inferir sobre a identidade das ROS envolvidas.*

a) Por fluorescência total: Células musculares lisas de aorta de coelho imortalizadas (VSMC) (Buonassissi et al., 1976) foram crescidas em placa de 24 poços em meio F-12 suplementado com soro fetal bovino 10%, estreptomicina (100  $\mu\text{M}$ ) e penicilina (100 U/mL) e estimuladas com angiotensina II (ANG II, 100 nM, 4h). As células foram lavadas com PBS duas vezes e incubadas com DHE (5  $\mu\text{M}$ ) em PBS por 10 min no escuro. Em alguns casos, VSMC foram previamente incubadas ou não com Peg-SOD (25 U/mL) ou Peg-Cat (200U/mL) por 15 min. As imagens foram obtidas em microscópio de fluorescência (Zeiss Axiovert 200M) com software Axiovision 3.0, equipado com filtro rodamina ( $\lambda_{\text{exc}} 546 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} 590 \text{ nm}$ ), sempre

comparando-se as lâminas de VSMC controles e estimuladas com parâmetros previamente fixados.

b) Por separação dos compostos fluorescentes em HPLC: VSMC foram crescidas em placa de 6 poços e estimuladas com ANG II (100 nM, 4h). Em alguns casos, após 3h da adição de ANG II, adicionou-se pela próxima 1h de estímulo: i) superóxido dismutase conjugada a polietilenoglicol (25 U/mL, Peg-SOD), ii) catalase conjugada a polietilenoglicol (200 U/mL, Peg-Cat) ou iii) polietilenoglicol, em concentrações correspondentes às estimadas para as proteínas antioxidantes conjugadas (0,8 a 2,4 nmol/mL). As células foram lavadas duas vezes com PBS, incubadas em PBS/DTPA (0,5 mL) contendo DHE (50 µM) por 30 min. Vale a pena ressaltar que as células foram privadas de soro fetal bovino apenas nos 30 min finais, durante a incubação com DHE. Finalmente, as células foram novamente lavadas com PBS para retirada da DHE que não foi incorporada, e raspadas em presença de 0,5 mL de acetonitrila. O extrato de células foi centrifugado (12.000g por 10 min a 4°C) para retirada de debris. As células musculares de linhagem que usamos neste trabalho não se desprenderam da placa durante a incubação com DHE; entretanto, observamos que em alguns casos, as VSMC de artéria de coelho de cultura primária se soltavam durante este período de incubação. Portanto, testamos a substituição do PBS/DTPA por tampões que contém glicose e cálcio, tampão Hanks (CaCl<sub>2</sub> 1,3 mM, MgSO<sub>4</sub> 0,8 mM, KCl 5,4 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,4 mM, NaHCO<sub>3</sub> 4,3 mM, NaCl 137 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,3 mM, glicose 5,6 mM, pH 7,4) e tampão Krebs (CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM, KCl 4,9 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5,7 mM, NaCl 145 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5,7 mM, glicose 5,5 mM, pH 7,4), ambos contendo DTPA 100 µM. Os dois

tampões foram capazes de inibir o descolamento das células de cultura primária, e não alteraram as razões de EOH/DHE e E/DHE de células estimuladas ou não com ANG II, comparando-se com as razões obtidas com emprego de PBS/DTPA (dados não mostrados). Todas as extrações foram realizadas em acetonitrila, pois este solvente foi mais eficiente em extrair EOH do DNA em incubações *in vitro*, comparado a metanol (a extração do etídio foi similar entre os dois solventes, dados não mostrados). Para mantermos a reprodutibilidade, a raspagem das células foi feita de dois em dois poços. Os sobrenadantes dos extratos foram secos sob vácuo (Speed VacR Plus SC-110A, Thermo Savant) e os resíduos armazenados a -20°C no escuro até análise. As amostras foram ressuspensas em 120 µl de PBS/DTPA e injetadas no sistema de HPLC (100 µL). Durante a separação cromatográfica, a quantificação de DHE remanescente (que não reagiu) foi utilizada como controle interno da extração orgânica. Desta forma, os dados foram expressos como EOH por DHE consumida (EOH/DHE) e etídio por DHE consumida (E/DHE). A DHE consumida foi calculada como a diferença entre a concentração inicial adicionada às células e a DHE remanescente no extrato celular quantificada por HPLC. Como foram observados recentemente a interferência de luz e ultrassom na oxidação da DHE *in vitro* (Zielonka et al., 2006), comparamos a formação de EOH e etídio em extratos de VSMC (em acetonitrila) submetidos ou não a ultrassom (3 ciclos a 8W de 15 segundos) e à luz ambiente (30 min em gelo). Enquanto o procedimento de ultrassom não alterou a formação dos dois compostos, a incidência de luz ambiente foi capaz de aumentar a razão EOH/DHE em 4 vezes em relação ao extrato mantido

no escuro. Portanto, todos os experimentos desenvolvidos neste trabalho foram realizados em ausência de luz.

### **3. Transfecção transitória e medida da atividade da SOD1 em VSMC**

**Objetivo:** *Experimentos de superexpressão em células em cultura visam aumentar a expressão protéica (e por conseqüência, a atividade total da enzima envolvida) de determinada proteína, para uma análise mais detalhada dos efeitos intracelulares da proteína em questão. Neste caso, de forma bem simplificada, a superexpressão da superóxido dismutase (SOD, enzima que dismuta o ânion radical superóxido em água e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), implica em menores níveis intracelulares de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>.*

a) **Transfecção transitória:** O vetor de expressão para células de mamíferos contendo a seqüência da SOD1 (pCMV, Invitrogen) foi gentilmente cedida pelo Prof. Mariano Janiszewski, da Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina. VSMC (3 x 10<sup>5</sup>) foram crescidas em placas de 6 poços, e após 24h seguidas por 1h de carenciamento (meio F12 sem soro fetal bovino) o meio de cultura foi substituído por meio de transfecção: meio F12 para transfecção (sem soro fetal bovino e sem antibióticos), contendo 5 µg do cDNA e 10 µL de Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Após 8h, o meio de transfecção foi substituído por meio F12 contendo soro fetal bovino 10% e antibióticos. A eficiência da transfecção transitória da SOD1 foi confirmada por aumento da expressão da SOD1 (por western blot) e de sua atividade (por inibição da redução do citocromo c<sup>3+</sup>).

b) Medida da atividade da SOD: A atividade da enzima SOD baseia-se na proteção (pelo extrato celular que contém SOD) da redução de citocromo  $c^{3+}$  em citocromo  $c^{2+}$ , que ocorre pela produção de ânion radical superóxido produzido pelo sistema enzimático xantina/xantina oxidase. Homogenatos das células (10-15  $\mu$ g) foram adicionados à cubeta contendo tampão fosfato (50 mM, pH 7,8 contendo EDTA 0,1 mM), xantina (0,5 mM), xantina oxidase (cerca de 0,2 U/mL) e citocromo  $c^{3+}$  (20  $\mu$ M). Acompanhou-se a absorvância a 550 nm a 25°C. A redução de 50% da oxidação do citocromo  $c^{3+}$  pelo homogenato foi considerada 1U de SOD (Imley & Fridovich, 1991).

#### ***4. Medida da atividade da NADPH oxidase em fração de membrana***

**Objetivo**: *A atividade da enzima NADPH oxidase é medida pela detecção de ânion radical superóxido produzido após estímulo com NADPH (em solução aerada). Como esta enzima é encontrada em membranas celulares, os ensaios são realizados com homogenatos de fração de membranas.*

Homogenatos de fração de membrana foram obtidos por ultracentrifugação seqüencial como descrito anteriormente (Laurindo et al., 2002). Resumidamente, células crescidas em placas de 100 mm foram lavadas com PBS gelado, raspadas em presença de tampão de lise A (Tris 50 mM pH 7,4 contendo EDTA 0,1mM, EGTA 0,1mM, aprotinina 10  $\mu$ g/mL, leupeptina 10  $\mu$ g/mL e fluoreto de fenilmetilsulfonila 1mM). Os homogenatos foram sonicados (3 ciclos a 8W de 10 segundos),

centrifugados para retirada de mitocôndrias e núcleos (18.000g por 15 min), e os sobrenadantes foram centrifugados a 100.000g por 1h para obtenção da fração enriquecida de membranas celulares. As dosagens de proteína foram realizadas com reagente Bradford (BioRad). As frações de membrana foram usadas em ensaios de atividade da NADPH oxidase analisada por HPLC (a) ou por ensaio de microplaca contendo DHE (b) ou reagente Amplex Red® (c). Ainda as frações de membranas foram utilizadas para análise de eventual redox cycling da DHE pelo ensaio de consumo de oxigênio em presença de NADPH (item 5 abaixo).

a) Por separação dos compostos fluorescentes por HPLC: Fração de membrana (cerca de 20 µg de proteína) foi incubada com DHE (50 µM) a 37°C (volume final de 120 µL) e NADPH (300 µM) no escuro, na presença ou ausência de SOD (20 µg/mL). Após diferentes tempos de incubação, as amostras foram mantidas em gelo, no escuro, até a análise por HPLC (volume de injeção de 100 µL).

b) Por fluorescência total da DHE em microplaca: Fração de membrana (10 µg de proteína) foi incubada com DHE (10 µM) e DNA de timo de bezerro (1,25 µg/mL) em PBS/DTPA, em presença de NADPH (50 µM), volume final de 120 µL, por 30 min, a 37°C, no escuro. A fluorescência total foi medida empregando-se dois filtros diferentes: (a) rodamina ( $\lambda_{exc}$  490 nm,  $\lambda_{em}$  590 nm) e (b) acridina ( $\lambda_{exc}$  490 nm,  $\lambda_{em}$  570 nm), em espectrofluorímetro de placa de 96 poços (Wallac Victor<sup>2</sup> 1420-Multilabel Counter, EUA, PerkinElmer<sup>TM</sup>).

c) Por produção da resorufina: Neste caso, a atividade da NADPH oxidase foi medida pelo acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; para isso, fração de membrana (20 µg) foi incubada com NADPH (250 µM) em PBS (pH 7,4 contendo EDTA 100µM) na presença de HRP

(10 U/mL) e reagente Amplex Red (250  $\mu$ M) a 37°C no escuro em placa de 96 poços (volume final de 120  $\mu$ L). A absorbância foi acompanhada a 575nm por 60min em leitor de elisa (Spectramax 340, Molecular Devices).

### **5. Medida de consumo de oxigênio**

**Objetivo:** *Por esta metodologia é possível medir quanto do oxigênio dissolvido em soluções aquosas é consumido por minuto em reações químicas ou por organelas/células permeabilizadas.*

As incubações foram feitas em PBS pH 7,4, contendo EDTA 0,1 mM (volume final de 0,75 mL) em cela de reação termostatizada a 37°C, contendo eletrodo de oxigênio (Clark, Hansatech, Norfolk, Inglaterra) calibrado com adição de ditionito de sódio (uma ponta de espátula). A concentração de saturação de oxigênio nesta temperatura é de 210  $\mu$ M (Robinson e Coope, 1970). Após estabilização da linha base, adicionou-se à cela de reação, seqüencialmente, com intervalos de 10 min: fração de membrana (100  $\mu$ g de proteína); NADH ou NADPH (0,3 – 1 mM); e lucigenina ou DHE, em diferentes concentrações (0,05 – 1 mM), e acompanhou-se o consumo de oxigênio por pelo menos 1h.

### **6. Quantificação de heme em homogenatos de VSMC**

**Objetivo:** *A quantificação de heme reflete os níveis de heme-proteínas nas células.*

Homogenatos de VSMC (cerca de 200 µg de proteína) foram incubados com solução de Drabkin ( $K_3Fe(CN)_6$  600 µM/KCN 770 µM/ $NaHCO_3$  12 mM) por 10 min a temperatura ambiente. A quantidade de heme foi estimada espectrofotometricamente pela formação do complexo heme-cianeto ( $Hm(CN)_2$ ) ( $\epsilon_{545\text{ nm}} = 1,13 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Drabkin, 1971).

## ***6. Modelo de lesão arterial por cateter-balão em íliaca de coelho***

**Objetivo:** *Este modelo simula em animais de experimentação o procedimento de angioplastia, e permite comparar os eventos fisiológicos/bioquímicos que ocorrem na lesão da artéria íliaca com a outra íliaca não lesada do mesmo animal, após alguns dias da intervenção.*

A lesão por distensão em artéria íliaca foi realizada em coelhos machos normolipidêmicos (New Zealand White), anestesiados com pentobarbital, empregando-se um cateter-balão para angioplastia coronariana, de diâmetro de 2,75 mm, insuflado a 8 atm, como descrito anteriormente (Laurindo et al., 2002; Leite et al., 2003). Após 14 dias da lesão, os coelhos foram sacrificados com pentobarbital e a aorta abdominal foi perfundida com PBS para remover todo o sangue. As artérias ílicas lesada (esquerda) e normal (direita) foram removidas, limpas e cortadas em segmentos para análise imediata para análise por HPLC, atividade peroxidásica e fluorescência total da DHE por microscopia.



## **7. Análise da oxidação da DHE em tecidos**

**Objetivo:** *A fluorescência total (observada em microscópio de fluorescência) derivada da oxidação da DHE permite a análise da produção total de ROS em tecidos, sem distinguir os diferentes produtos de oxidação da DHE formados. Em contrapartida, por HPLC é possível quantificar os compostos 2-hidroxi-etídio e etídio (conforme item 1) formados em células em cultura, e inferir sobre a identidade das espécies reativas de oxigênio envolvidas.*

a) Por fluorescência total: Para análise de fluorescência total, secções de tecido (30  $\mu\text{m}$ ) foram incubadas com DHE (2  $\mu\text{M}$ ) a 37°C por 20 min. Em alguns casos, as secções foram previamente incubadas ou não com Peg-SOD (25 U/mL) ou azida (0,5%) por 15 min. As imagens foram obtidas em microscópio de fluorescência (Zeiss Axiovert 200M) com software Axiovision 3.0, equipado com filtro rodamina ( $\lambda_{\text{exc}}$  546 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  590 nm), sempre se comparando secções de tecido controle e lesado com parâmetros previamente fixados.

b) Por separação dos compostos fluorescentes por HPLC: Segmentos de artéria ilíaca (cerca de 3 mm de comprimento) foram incubados em 0,5 mL de PBS/DTPA em presença ou ausência de Peg-SOD ou Peg-Cat por 15 min a 37°C; em seguida adicionou-se DHE (50  $\mu\text{M}$ ) e as incubações foram mantidas no escuro por mais 30 min a 37°C. Os segmentos foram lavados em PBS, pulverizados em almofariz com auxílio de pistilo em presença de nitrogênio líquido, e o pó foi transferido para um tubo de 1,5 mL ao qual adicionou-se acetonitrila (0,5 mL). Os

homogenatos foram sonicados (3 ciclos a 8W de 10 segundos), centrifugados (12.000g por 10 min) e os sobrenadantes processados e analisados de forma similar aos extratos obtidos de células musculares lisas descritos anteriormente.

### ***8. Medida da atividade peroxidásica e expressão da mieloperoxidase em tecidos***

**Objetivo:** *A medida da atividade peroxidásica total reflete quão ativas estão as peroxidases nas células ou tecido, e aumentos de atividade peroxidásica total são associados a maior estresse oxidativo.*

a) Atividade peroxidásica total: VSMC ( $3-30 \times 10^5$ ) crescidas em placas de 150 mm (e previamente lavadas com PBS) ou segmentos de artéria ilíaca (cerca de 2 mm) foram incubados em tampão fosfato (50 mM, pH 6,2), contendo orto-dianisidina (0,8 mM) e peróxido de hidrogênio (1,5 mM). No caso das VSMC, adicionou-se saponina (0,1%) ao tampão e as placas foram submetidas a leve agitação. A velocidade de oxidação da orto-dianisidina foi monitorada espectrofotometricamente. Definiu-se uma unidade de atividade peroxidásica a quantidade de enzima necessária para produzir 1  $\mu\text{mol}/\text{min}$  de orto-dianisidina oxidada, a 25°C ( $\epsilon_{460 \text{ nm}} = 1,13 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Bradley et al., 1982).

b) Expressão da mieloperoxidase: Segmentos de artérias ilíacas foram lavados em PBS, pulverizados em almofariz com auxílio de pistilo em presença de nitrogênio líquido, e o pó ressuspendido em tampão de lise B (Tris-base 20 mM pH

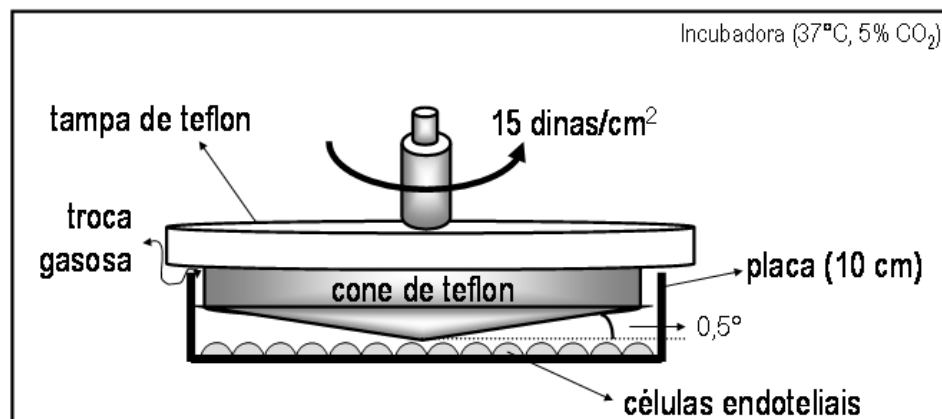
8,0, NaCl 137 mM, NP-40 1%, glicerol 10%, NP-40, contendo inibidores de protease aprotinina 10 µg/mL, leupeptina 10 µg/mL e fluoreto de fenilmetilsulfonila 1mM). Os homogenatos foram sonicados (3 ciclos a 8W de 10 segundos), centrifugados (12.000g por 10 min) para retirada de debris e, as proteínas dos sobrenadantes (30 µg) foram submetidas à separação em gel de poliacrilamida 10%. Após transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose e marcação com anticorpo anti-mieloperoxidase feito em coelho (Calbiochem, 1:5.000) ou β-actina (Sigma, 1:2000), as proteínas imunorreativas marcadas com HRP foram reveladas com kit ECL (Amersham). A densitometria das bandas de peso molecular de 110 kDa (mieloperoxidase) e 42 kDa (β-actina) foi realizada com o programa Scion<sup>®</sup> (Amersham).

### ***9. Shear laminar em células endoteliais em cultura***

**Objetivo:** *Este modelo simula em células endoteliais em cultura o mesmo estresse mecânico de cisalhamento que o sangue arterial imprime no endotélio, a partir do movimento unidirecional do meio de cultura. Desta forma, é possível realizar experimentos controlados que seriam extremamente difíceis em modelo animal.*

As células endoteliais de aorta de coelho (RAEC, linhagem imortalizada) (Buonassisi e Venter, 1976), foram mantidas em meio F12 suplementado com soro fetal bovino (10%), estreptomicina (100 µM) e penicilina (100 U/mL). Utilizamos o equipamento de *shear stress* de cone-e-placa, em colaboração com Dr. Hanjoong

Jo, da Emory University, EUA (Figura 1). RAEC ( $1,5 \times 10^6$ ) foram crescidas em placa de cultura de 10 cm de diâmetro (Falcon®) e após 24h os cones de teflon esterilizados (sob luz UV por 30 min) foram colocados sobre o meio de cultura (10 mL) das placas para aplicação do *shear stress*. Os cones apresentam uma angulação de  $0,5^\circ$  (centro-borda) e baixa resistência a líquidos, ideal para simular o *shear stress* no meio de cultura (Go et al., 1998). Para gerar o fluxo laminar, aplicou-se rotação de 400 rpm, que corresponde a  $15 \text{ dinas/cm}^2$  por tempos determinados (1h e 18h). Como controles dos experimentos, comparamos com RAEC em condição estática, isto é, sem alterações hemodinâmicas.



**Figura 1: Representação esquemática do sistema cone-e-placa para estudo de shear stress em células em cultura.** As células endoteliais de aorta de coelho foram expostas a *shear stress* (laminar, fluxo unidirecional de  $15 \text{ dinas/cm}^2$ ), pela rotação do cone de teflon (com ângulo de  $0,5^\circ$  do centro do cone para as bordas) sobre o meio de cultura. A temperatura ( $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ) e a concentração de CO<sub>2</sub> (5%) foram mantidas constantes. O *shear stress* gerado é calculado considerando-se as dimensões da placa de cultura de células (Falcon®) e a viscosidade do meio de cultura (F-12 contendo 10% de soro fetal bovino) (adaptado de Jo et al., 2006).

## **10. Quantificação de nitrito e nitrato em meio de cultura**

**Objetivo:** *Após shear laminar sustentado, ocorre aumento da produção de  $\bullet\text{NO}$  devido ao aumento de expressão e atividade da eNOS em células endoteliais. Parte do  $\bullet\text{NO}$  acumulado é convertido a nitrito e nitrato no meio de cultura. A quantificação de nitrito reflete a atividade enzimática da eNOS, enquanto mudanças nos níveis de nitrato podem implicar na produção de peroxinitrito (formado a partir da reação entre  $\bullet\text{NO}$  e ânion radical superóxido).*

a) Reação de Griess em microplaca: Em 100  $\mu\text{L}$  de meio de cultura adicionou-se 50  $\mu\text{L}$  de cloreto de N-(1-naftil)etilenodiamina (0,1 %) e 50 $\mu\text{L}$  de sulfanilamida (1 % em  $\text{H}_3\text{PO}_4$  2,5 %). Após 10 minutos de incubação mediu-se a absorbância a 540nm em leitor de elisa e calculou-se a concentração de nitrito pela curva de calibração feita em paralelo (1-40  $\mu\text{M}$ ) (Saville, 1958).

b) Analizador de Óxido Nítrico: Pelo analisador de  $\bullet\text{NO}$  (NOA<sup>TM</sup> 280, Sievers) foram medidas as concentrações de nitrito e nitrato. Para nitrito, a solução na cela de reação era composta por KI/HAc (temperatura ambiente) e para nitrato, a solução continha  $\text{VaCl}_3/\text{HCl}$  ( $T = 95^\circ\text{C}$ ). Após injeção de 20 $\mu\text{L}$  de meio de cultura, a concentração de nitrito e nitrato foi baseada em curvas de calibração feitas no mesmo dia com soluções padrões de  $\text{NaNO}_2$  (0,5 - 7,5  $\mu\text{M}$ ) e  $\text{NaNO}_3$  (1-30  $\mu\text{M}$ ).

Os resultados estão apresentados como  $\text{nmol NO}_2^-/10^6$  células, a fim de corrigir eventuais diferenças no volume de meio de cultura após o shear laminar

sustentado e número de células, especialmente nos experimentos que envolviam células transfectadas.

### **11. Purificação e nitroação da PDI recombinante**

**Objetivo:** *A purificação de qualquer proteína visa a análise in vitro de aspectos bioquímicos da mesma em condições experimentais controladas. Estas proteínas isoladas podem ser modificadas estruturalmente, como é o caso da alteração do estado redox de cisteínas por nitroação, por exemplo.*

O plasmídeo contendo a seqüência da PDI (cedido pelo Dr. Bulent Mutus, da Universidade de Windsor, Canadá) foi superexpresso em bactérias *E. coli* competentes, após indução com IPTG. Após lise bacteriana, a purificação da PDI foi realizada por separação em coluna de níquel (Ni-CAM<sup>TM</sup> HC Resin, Sigma), com eluição com imidazol (10 mM), pois a proteína recombinante apresenta cauda His6. A PDI purificada (10 µM) foi reduzida pela incubação com DTT (100 µM) por 30 min a temperatura ambiente. Os tióis livres da PDI foram quantificados pela reação com 5,5-ditiobis(ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB, 1 mM) em tampão glicina (100 mM, pH 8,5) por 10 min a temperatura ambiente e medida da abosorbância a 412nm ( $\epsilon = 1,36 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Quijano et al., 1997). A PDI reduzida foi nitrosada pela incubação da PDI (9 µM) com NaNO<sub>2</sub> (90 µM) em HCl (0,5 M) por 30 min a temperatura ambiente. A remoção do excesso de reagentes (DTT e NaNO<sub>2</sub>) foi

realizada por intensiva diálise contra tampão fosfato (20 mM, pH 7,4, EDTA 100µM) a 4°C.

## **12. Quantificação de mRNA por real-time PCR**

**Objetivo:** *Por esta técnica é possível quantificar o mRNA codificante de determinadas proteínas. Atualmente esta técnica é a mais indicada para quantificação da expressão das isoformas das Noxes, já que os anticorpos específicos produzidos para cada isoforma apresentam reação cruzada com as demais isoformas.*

O mRNA total das RAEC foi purificado com o RNA SpinMini RNA isolation kit GE. A quantificação do mRNA foi feita por absorbância a 260nm (NanoDrop, marca) e a pureza confirmada pela análise das bandas de rRNA em gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídio. O mRNA (3-5 µg) foi convertido em cDNA pela incubação com OligodT<sub>(12-18)</sub> (25 ng/µL), dNTP (500 µM de cada), DTT (5 µM), RNase OUT (2U/µL) e SuperScript II, a 42°C por 50 min.

As seqüências dos primers das isoformas da NADPH oxidase de células de coelho foram desenhadas graças à colaboração com Prof. Lassegue (Emory University, Atlanta, EUA) que já havia clonado as seqüências das Noxes de coelho e tornou-as disponíveis para nossos estudos (pois não estão ainda publicadas no PubMed). Estas sequências permitiram a obtenção de padrões (em plasmídeos) e o desenho de primers de altas temperaturas para RT-PCR em tempo real, que foram

gentilmente cedidos ao nosso grupo. Os clones foram obtidos a partir de amostras de cólon (Nox1) e rim (Nox4) de coelho. Os plasmídeos foram amplificados em bactérias competentes e purificados pelo sistema de Kit (MidPrep/Qiagen). As soluções de reação para as corridas de Real Time PCR foram realizadas com: plasmídeo (entre  $10^3$  a  $10^8$  cópias/reação), primers (200 nM), cDNA (150 ng) e reagente Sybr MasterMix (Invitrogen) conforme especificações sugeridas pelo fabricante. Os primers utilizados foram: Nox1, forward CATCATGGAAGGAAGGAGA, reverse GCTCCGGATAAACTCCACA; Nox 4, forward CCACAGACTTGGCTTTGGAT, reverse TACTGGCCAGGTCTTGCTTT; GAPDH, forward TCACCATCTTCCAGGAGCGA, reverse CACAATGCCGAAGTGGTCGT. As reações foram acompanhadas no equipamento de Real Time modelo RG 3000 (Corbett).

### **13. Imunoprecipitação**

**Objetivo:** *Esta técnica baseia-se na interação hidrofóbica e/ou covalente entre duas proteínas; utilizando-se anticorpo contra uma delas, a outra fará parte do imunocomplexo e poderá ser separada das demais proteínas do homogenato protéico e ser detectada por western blot, por exemplo.*

Homogenato total (0,5 mg) das células endoteliais foi incubado com anticorpo específico (5  $\mu$ L), sob agitação a 4°C, *overnight*. Após incubação com proteína A (GE Healthcare) por 2h, sob agitação, a 4°C, a proteína A (contendo os imunocomplexos) foi lavada 3 vezes com tampão Tris pH 8,0 (20 mM), contendo



NaCl (150 mM), glicerol 10%, EDTA (2 mM), EGTA (2 mM) e triton (1%). Tampão de amostra (30 µL) foi adicionado à proteína A, e após desnaturação das proteínas a 100°C por 5 min, o tampão de amostra contendo os imunocomplexos (25 µL) foi aplicado em gel SDS-PAGE para separação eletroforética de proteínas seguida de western blot.

#### ***14. Medida da nitrosação da PDI por “biotin-switch”***

**Objetivo:** *Esta técnica permite marcar as proteínas nitrosadas, ao ligar um marcador de forma específica e irreversível a cada cisteína nitrosada. Este marcador é analisado depois por western blot.*

A medida de nitrosação foi realizada conforme Jaffrey e colaboradores (2001), com poucas alterações. Após LS, as células foram lisadas em presença de tampão HEN (Hepes 250 mM pH 7,7, neocuproína 0,1 mM, EDTA 1 mM, SDS 1%) contendo N-etilmaleimida 20 mM, chaps 0,5% e inibidores de protease (aprotinina 10 µg/mL, leupeptina 10 µg/mL e fluoreto de fenilmetilsulfonila 1mM), e o extrato ficou sob agitação por 30 min a 4°C. As proteínas foram precipitadas com acetona, e após centrifugação (14.000g, 20 min, 4°C), foram ressuspensas em tampão HEN. Os grupos nitrosotíóis foram reduzidos com a adição de ácido ascórbico (10 mM) e biotinilados com a adição de MBP (50 µM) concomitantemente, e o extrato foi mantido sob agitação por 1h a temperatura ambiente. Até este momento todas as etapas foram realizadas no escuro. As proteínas foram precipitadas novamente com

acetona, e após centrifugação (14.000g, 20 min, 4°C), foram ressuspensas em PBS, EDTA 0,1 mM contendo inibidores de protease. Os extratos foram submetidos à separação de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) seguido de western blot, com revelação com anticorpo anti-biotina conjugado com HRP (1:2000, Calbiochem).

### **15. Fracionamento celular em gradiente de sacarose**

**Objetivo:** *O fracionamento celular em gradiente de sacarose, que não utiliza detergentes em sua composição, permite analisar as frações lipídicas de baixa densidade, como “lipid rafts” e cavéolas.*

O procedimento foi realizado como em Song e colaboradores (1996). Após shear, as células foram lavadas com PBS duas vezes, lisadas em presença de tampão de lise (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 150 mM pH 11, contendo EDTA 1 mM e inibidores de protease aprotinina 10 µg/mL, leupeptina 10 µg/mL e fluoreto de fenilmetilsulfonila 1mM), homogenizadas manualmente (10 movimentos), e sonicadas (3 ciclos de 20 seg, a 8W). O extrato foi misturado 1:1 com solução de sacarose 90% (em Hepes 20 mM pH 6,7 contendo NaCl 150 mM) e colocado em tubo próprio para ultracentrifugação, e adicionou-se lentamente 6 mL de sacarose 35% e em, seguida, 4 mL de sacarose 5% (ambas em Hepes 20 mM pH 6,7 contendo NaCl 150 mM e Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 250 mM). Após 30h de ultracentrifugação a 38000 rpm (rotor TH-64I, Sorvall) alíquotas de 1 mL foram retiradas, dialisadas exaustivamente contra

tampão fosfato 10 mM pH 7,4 (para retirada da sacarose), secas sob vácuo (SpeedVac), ressuspendidas em tampão de amostra e aplicadas em gel de poliacrilamida para separação de proteínas, seguido de procedimento de western blot. A retirada da sacarose permite uma melhor revelação de certas proteínas, como é o caso da PDI.

## **16. Microscopia confocal**

**Objetivo:** *Este tipo de microscopia se baseia no princípio da confocalidade, e permite analisar apenas um plano da célula/tecido. Após marcação com anticorpos específicos para determinadas proteínas, é possível analisar a localização intracelular e/ou mudanças no padrão de marcação das mesmas. Além disso, é possível utilizar dois anticorpos diferentes e analisar se ambos marcam a mesma região no plano, caracterizando a co-localização das proteínas no microambiente celular.*

Após shear laminar, as células contidas nas placas (diâmetro 10cm) foram fixadas com paraformaldeído 4% overnight. As placas foram cortadas com auxílio de uma espátula quente (5 x 5 cm) e quatro secções (~ 1-2 cm de diâmetro) foram definidas com auxílio da PapPen (Sigma). Após permeabilização (Nonidet P40 0,1% em PBS), as células foram incubadas com anticorpo primário (anti-PDI da Stressgen, 1:2000; anti-caveolina-1 da BD Transduction, 1:250; anti-c-myc, 1:1000, Sigma) diluídos em PBS contendo albumina (1%) overnight a 4°C. Alguns poços foram

incubados com um segundo anticorpo primário (anti-Nox1 da Santa Cruz, 1:100) por 1h. Após incubação com anticorpos secundários (anti-camundongo conjugado com Alexa548 ou anti-cabra conjugado com FITC), as células foram incubadas com 4'6-diamidina-2-fenilindol (DAPI, 10 µg/mL, Sigma) e analisadas em microscópio confocal Zeiss LSM510 Meta (projeto Multiusuários Fapesp 04/08908-2).

### ***17. Transfecção transitória da PDI em células endoteliais***

**Objetivo:** *Estes experimentos de superexpressão da PDI visam comparar ganho/perda da função da PDI, ao utilizarmos vetores que codificavam a PDI selvagem ou a PDI mutada nos tióis de seu sítio ativo.*

Os plasmídeos contendo as sequências da PDI selvagem de rato (PDI-wt) ou da PDI mutada nas quatro cisteínas do sítio ativo (PDI-mut) em pCR3.1 (Invitrogen) foram cedidos pelo Dr. Tomohiro Nakamura (Neuroscience and Aging Center Burnham Institute for Medical Research, La Jolla, Califórnia). A PDI mutada apresenta mutação de cisteína para serina nos dois motivos tioredoxina (C36S, C39S, C383S, C386S), e contém cauda c-myc, sequência de 10 aminoácidos inserida 7 aminoácidos antes da sequência KDEL, que permite a sinalização KDEL de retenção no retículo endoplasmático (Uehara et al., 2006). Os plasmídeos foram superexpressos em *E. coli* DH5 $\alpha$  competentes e purificados com kit MaxiPrep (Qiagen).

RAEC ( $1,0 \times 10^6$ ) foram crescidas em placas de cultura de 10 cm de diâmetro (Falcon®). Após 24h substituiu-se o meio de cultura por 10 mL de meio de transfecção (F12 contendo SFB 10%, 12µg de plasmídeo e 25µL de Lipofectamina®, Invitrogen). Após 8h, o meio de transfecção foi substituído pelo meio de cultura. Após 18h, iniciou-se o shear laminar.

### ***18. Análise da expressão e fosforilação protéicas (western blot)***

**Objetivo:** *Análise da expressão protéica em células/tecidos é geralmente realizada pela técnica western blot, na qual as proteínas do homogenato (celular/tecidual) são separadas por tamanho, fixadas em membrana de nitrocelulose e proteínas específicas são marcadas com determinados anticorpos, e analisadas por reação quimiluminescente.*

Homogenatos celulares ou fração de membrana (30 µg de proteína) foram submetidos a separação em gel de poliacrilamida (10-12%), seguido de transferência para membrana de nitrocelulose e marcação com anticorpo primário *overnight* e marcação com anticorpo secundário por 1h. A imunomarcação foi revelada por reação quimiluminescente (Tris-base 100 mM pH 8,5 contendo luminol 2,5 mM, ácido p-cumárico 400 µM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5,4 mM). Os anticorpos primários usados foram: anti-eNOS (feito em coelho, Upstate, 1:2000), anti-PDI (Stressgen, 1:1000), anti-PDI (ABR, 1:1000), anti-KDEL (1:1000, Stressgen), anti-caveolina-1 (BD Transduction, 1:1000), anti-c-myc (Sigma, 1:10000), anti-fosfo-Akt (Santa Cruz,

1:1000), anti-Akt (Upstate, 1:1000), anti-SOD (Oxis, 1:1000), anti- $\beta$ -actina (Sigma, 1:2000); anticorpos secundários conjugados com HRP empregados foram (utilizados em diluição duas vezes maior que o anticorpo primário): anti-camundongo (Calbiochem), anti-coelho (Calbiochem), anti-cabra (Calbiochem). A densitometria das bandas foi realizada com o programa ImageQuant<sup>®</sup> 2005 (GE Healthcare).

Para a análise da fosforilação protéica, os homogenatos celulares foram obtidos pela lise mecânica das células previamente lavadas com PBS/EDTA 0,1 mM, em tampão de lise B (item 9) contendo também inibidores de fosfatases (ortovanadato de sódio, fluoresto de sódio, glicrofosfato de sódio), seguido de descanso a 4°C, e retirada de debris (1000g por 5 min).

### **19. Análise estatística**

Os valores foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média. As comparações estatísticas foram realizadas através de teste *t* de Student para valores não pareados ou análise de variâncias (ANOVA), seguida por teste Student-Newman Keuls, com significância estatística de 5%. O software utilizado foi The Primer of Biostatistics, de Stanton A. Glantz, versão 3.01, McGraw-Hill, 1992.

## CAPÍTULO I:

### *Análise dos produtos derivados da oxidação da dihidroetidina por HPLC como medida da produção de ânion radical superóxido e da atividade da NADPH oxidase em sistemas vasculares*

#### 1. Introdução

A produção de espécies reativas derivadas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) foi, durante muito tempo, associada apenas a processos envolvendo dano oxidativo à biomoléculas, com conseqüente injúria celular e tecidual. Entretanto, este paradigma começou a ser mudado nos anos 60, com a descoberta por McCord e Fridovich da existência da enzima superóxido dismutase (SOD) em sistemas biológicos – uma enzima que dismuta o ânion radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) para peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e  $O_2$  (McCord e Fridovich, 1969), e foi definitivamente superado nos anos 80, com a descoberta por Ignarro, Furchgott, Murad e Moncada, da identidade do fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF), responsável pela vasodilatação, como sendo o radical livre óxido nítrico ( $^{\bullet}NO$ ) (Arnold et al. , 1977; Furchgott e Zawadzki, 1980; Ignarro et al., 1987; Palmer et al., 1988). Desde então, somam-se inúmeras evidências do importante papel sinalizador mediado pelas ROS/RNS, por exemplo, via ativação por oxidação de

sítios específicos de fatores de transcrição (como NFκB, AP-1), com conseqüente aumento da transcrição de genes que codificam enzimas antioxidantes (como peroxirredoxinas, SOD, catalase, tioredoxina, etc.) e/ou enzimas produtoras de espécies reativas (como a NADPH oxidase) (Liu et al., 2005; Clempus e Griendling, 2006). Ainda, as espécies reativas apresentam importante papel na modulação da atividade de fosfatases e na abertura de canais de potássio da mitocôndria (Claiborne et al., 1999; Facundo et al., 2006). Recentemente, foi descrita a dissociação de Ras-GDP mediada por ânion radical superóxido ou radical  $\cdot\text{NO}_2$ , e conseqüente ativação de Ras (Heo e Campbell, 2006). Portanto, para um melhor entendimento de todos os processos que envolvem a produção de ROS/RNS, torna-se essencial identificá-las e, se possível, quantificá-las em cada situação específica.

Entretanto, a medida da produção *in situ* da produção das espécies reativas é bastante complexa. Por exemplo, os níveis intracelulares de ânion radical superóxido deve ser um balanço entre sua produção basal e sua dismutação catalisada pela SOD (tanto a isoforma citosólica quanto a mitocondrial), que culmina em concentrações estacionárias que não ultrapassam 1 nM (Tarpey et al., 2004). Além da SOD, há outros alvos que mantêm baixos os níveis de superóxido, como antioxidantes de baixo peso molecular e a SOD extracelular (Abrahamsson et al., 1992). Desta forma, em sistemas biológicos, o tempo de meia vida das espécies reativas é curto (da ordem de segundos), o que requer métodos para identificá-las que sejam eficientes (para competir com os outros alvos intra/extracelulares) e sensíveis (devido à baixa concentração estacionária). Ainda, o método deve apresentar acesso intracelular adequado (a fim de refletir a concentração



intracelular) e principalmente, ser específico. Entretanto, geralmente as substâncias utilizadas na detecção de ROS/RNS reagem com mais de uma espécie reativa, o que impede sua identificação inequívoca.

Em sistemas vasculares, a produção exacerbada de ânion radical superóxido está associada a diversas patologias, como disfunção endotelial e aterosclerose (Taniyama e Griendling, 2003). Sua identificação direta, por EPR, é difícil devido às suas baixas concentrações *in vivo* e seu baixo tempo de meia-vida. O uso de captadores de spin para análise de superóxido é limitado, pois ainda não existe um que possibilite sua identificação inequívoca (Tarpey et al., 2004). Como o ânion radical superóxido pode ser reduzido ou oxidado, existem técnicas indiretas (colorimétricas, quimiluminescentes ou fluorescentes), que exploram uma ou outra via (Tabela 1). Em geral, as moléculas que são reduzidas pelo superóxido, como citocromo- $c^{3+}$ , NBT e principalmente, lucigenina, são passíveis de *redox cycling*, isto é, a molécula reduzida é capaz de reagir com o oxigênio dissolvido no meio reacional e gerar superóxido artifactual (Janiszewski et al., 2002). Já as moléculas que são oxidadas pelo ânion radical superóxido podem ser oxidadas por outras espécies reativas, tornando a identificação pouco específica.

Dentre as moléculas que exploram a química oxidante do superóxido, a dihidroetidina (DHE) é a que tem sido amplamente utilizada como marcador da produção de ânion radical superóxido, principalmente pela observação por microscopia da fluorescência total em células e tecidos (Bindokas et al., 1996; Miller et al., 1998). Isto se deve a alguns estudos em meados da década de 90, que sugeriram que a DHE seria oxidada pelo superóxido ao produto fluorescente etídio.

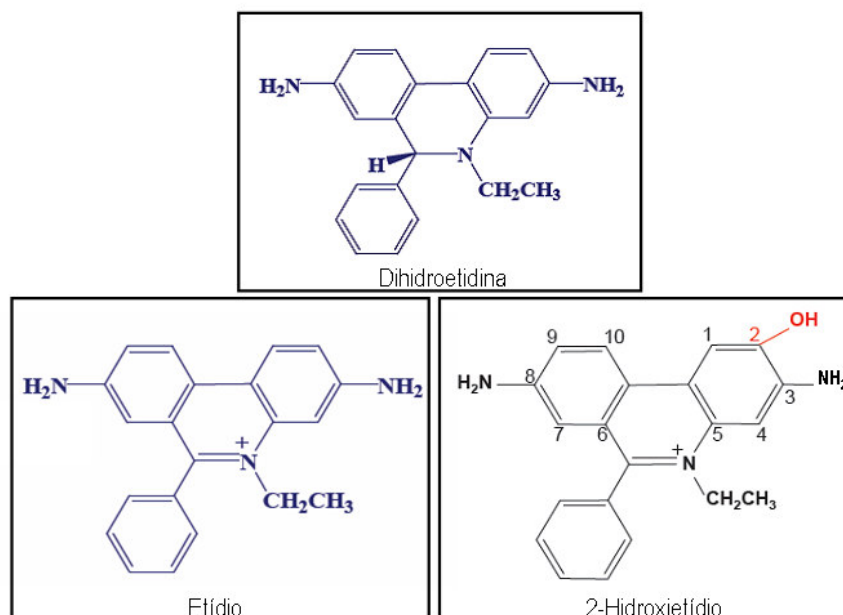
**Tabela 1 - Diferentes moléculas empregadas para identificar o radical ânion superóxido.** Estas moléculas podem ser reduzidas pelo radical superóxido ( $\text{molécula}^n + \text{O}_2^{\bullet-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{molécula}^{n-1} + \text{H}_2\text{O}_2$ ) ou oxidadas ( $\text{molécula}^n + \text{O}_2^{\bullet-} \rightarrow \text{molécula}^{n+1} + \text{O}_2$ ).

| Tipo de ensaio                      | Moléculas que exploram a química redutora do radical superóxido | Moléculas que exploram a química oxidante do radical superóxido                                      |
|-------------------------------------|---|--|
| Colorimétrico (espectrofotométrico) | Citocromo c<br>NBT (nitroblue tetrazolium)                      | Aconitase  |
| Quimiluminescente                   | Lucigenina  | Celenterazina<br>CLA (2-metil-6-fenila-3,7-dihidroimidazol(1,2- $\alpha$ )pirazina-3-ona)<br>Luminol |
| Fluorescente                        | -   | Dihidroetidina   |

A DHE difunde-se facilmente pela membrana celular por ser uma molécula hidrofóbica e sem carga, ao contrário de seu produto etídio, que tem carga positiva (Figura 2) e interage fortemente com os grupos fosfato do DNA (por interações eletrostáticas) e em seguida intercala-se ao DNA das células (via interações hidrofóbicas) (Garbett et al., 2004). Estudos iniciais de fluorescência total mostraram que a DHE é oxidada para produto(s) fluorescente(s) especificamente pelo ânion radical superóxido, enquanto que outros oxidantes (como peroxinitrito,  $\text{H}_2\text{O}_2$  ou ácido hipocloroso) não são capazes de oxidá-la a produto(s) fluorescente(s) (Bindokas et al., 1996). Além disso, ao contrário da lucigenina, a DHE não sofre *redox cycling* (Patsoukis et al., 2005) nem interferências de redutores como glutatona (Fink et al., 2004).

Entretanto, Zhao e colaboradores (2003) mostraram que a oxidação *in vitro* da DHE por superóxido forma um composto fluorescente diferente do etídio, que pode ser separado por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) com

detecção por fluorescência. Este novo composto teve sua estrutura caracterizada como 2-hidroxi-etídio (EOH) e trata-se da estrutura do etídio com adição de uma hidroxila no carbono 2 do anel fenantreno (Figura 2). A partir destes estudos, a formação do EOH foi associada à oxidação específica da DHE pelo superóxido, enquanto que a produção de etídio estaria relacionada à oxidação da DHE por outras espécies reativas (Zhao et al., 2003; Fink et al., 2004). Os mecanismos que envolvem a oxidação da DHE ainda não são conhecidos, porém, possivelmente envolve a formação de um radical intermediário ( $DHE^{\bullet}$ ) (Benov et al., 1998).



**Figura 2: Estruturas químicas da dihidroetídina e dos compostos fluorescentes derivados de sua oxidação, etídio e 2-hidroxi-etídio.** Por seu caráter hidrofóbico e não possuir carga, a dihidroetídina é capaz de cruzar membranas lipídicas facilmente. Já os compostos etídio e 2-hidroxi-etídio, ligam-se fortemente aos grupos fosfato da cadeia do DNA celular graças à sua carga positiva, o que confere aumento da fluorescência destes dois compostos.

Portanto, a fluorescência total derivada da DHE observada por microscopia em células e tecidos seria, na verdade, a soma dos compostos fluorescentes (etídio e EOH) e não refletiria apenas a produção específica de superóxido, mas, na verdade, a soma da geração de ânion radical superóxido e de outras espécies reativas; isto é, refletiria o estresse oxidativo total. Isto se torna claro ao se sobrepor os espectros de emissão dos dois compostos obtidos para o mesmo comprimento de onda de excitação ( $\lambda_{ex}$ ). Existe grande interferência entre os espectros de emissão de etídio e EOH para  $\lambda_{ex}$  entre 490 – 510 nm (Zhao et al., 2005).

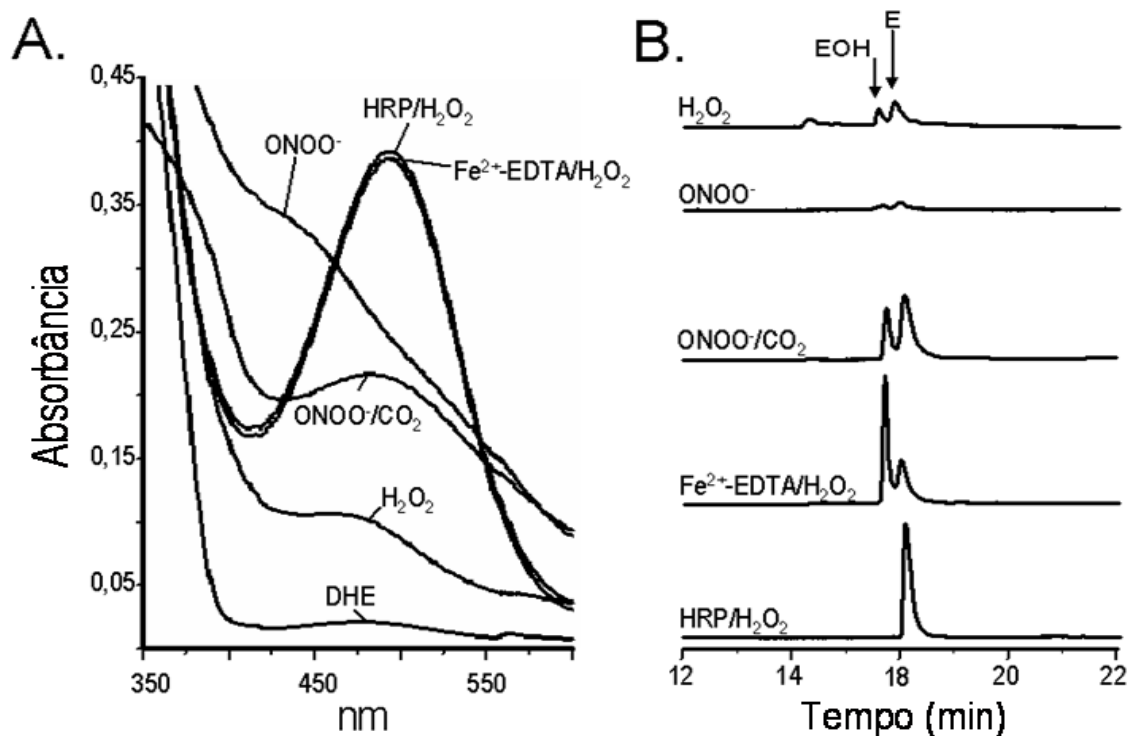
Desta forma, a fim de estabelecer bases metodológicas mais sólidas para análise de estresse oxidativo em sistemas vasculares, com ênfase na produção de radical ânion superóxido, cuja principal fonte em células musculares lisas é a NADPH oxidase, realizamos uma série de estudos destinada a validar esta técnica de análise dos produtos de oxidação da dihidroetidina por HPLC.

## 2. Resultados

### 2.1. Estudos *in vitro* da oxidação da DHE

Os mecanismos pelos quais a DHE é oxidada para EOH, etídio e possivelmente para outros compostos, ainda não são totalmente conhecidos. Ainda, compreender como a DHE pode ser oxidada por outras espécies reativas que não o radical ânion superóxido, pode trazer informações interessantes que complementem o entendimento da geração de espécies reativas *in situ*. Desta forma, iniciamos os estudos sobre a produção dos produtos de oxidação da DHE *in vitro*, por análise de absorção no visível e cromatografia líquida de alta performance (HPLC) com detecção por fluorescência (Figura 3). A oxidação da DHE por sistema gerador de ânion radical superóxido (xantina/xantina oxidase) gerou EOH com rendimento de 35% (Tabela 2), valor similar ao obtido por Fink e colaboradores (2004). Apesar de confirmarmos dados anteriores que tanto peroxinitrito quanto  $H_2O_2$  não são capazes de oxidar a DHE a produtos fluorescentes (Bindokas et al., 1996), observamos que o composto EOH pode ser formado também por peroxinitrito/ $CO_2$  e por sistema Fenton ( $Fe^{2+}$ -EDTA/ $H_2O_2$ ), em rendimentos de cerca de 5% e 12%, respectivamente (Figura 3A e Tabela 2). Bastante interessante, verificamos que o sistema envolvendo peroxidase (HRP/ $H_2O_2$ ) também é capaz de oxidar a DHE, porém quase exclusivamente para etídio. Este resultado está de acordo com trabalhos de fluorescência total que mostraram que tanto HRP/ $H_2O_2$

quanto mieloperoxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> são capazes de oxidar DHE a compostos fluorescentes (Papapostolou et al., 2004; Patsoukis et al., 2005).



**Figura 3: Oxidação da DHE in vitro.** A) Os espectros de absorção foram adquiridos após a oxidação da DHE (100 μM) por diferentes sistemas oxidantes: peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1 mM); peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>, 1 mM) em presença ou ausência de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>, 2,5 mM), peróxido de hidrogênio na presença de sulfato ferroso/EDTA (Fe<sup>2+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0,5 mM/0,5 mM/5 mM), e peroxidase em presença de peróxido de hidrogênio (HRP/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0,2 U/mL/ 5 mM). As incubações foram realizadas em tampão fosfato (100 mM, pH 7,4, contendo DTPA 0,1 mM) por 30 min ou 5 min (no caso das incubações com peroxinitrito). B) Perfil cromatográfico da separação de 2-hidroxietídio (EOH) e etídio (E) obtido por detecção por fluorescência (λ<sub>ex</sub> 510 nm, λ<sub>em</sub> 595 nm), para as mesmas incubações descritas acima.

Os espectros de absorção das diferentes incubações da DHE com sistemas oxidantes exibiram um perfil similar à absorção do etídio (com λ<sub>máx</sub> 470 nm, não mostrado). Entretanto, como ainda não são conhecidos todos os compostos

formados nestas incubações, é difícil correlacionar a quantificação do etídio por HPLC com a absorbância obtida a 470 nm. Um dado bastante interessante foi o espectro obtido quando usamos peroxinitrito, que apresentou uma banda em 430 nm (Figura 3A). Esta banda sugere a formação de um produto nitrado derivado da DHE, e de fato, a reação gerou uma coloração amarelada pode ser observada no tubo de reação. Ainda, a adição de urato (1 mM) inibiu a formação desta banda. O urato inibe a formação de produtos nitrados por reagir rapidamente tanto com o ânion peroxinitrito quanto com os radicais dele derivados ( $\cdot\text{NO}_2$  e  $\cdot\text{OH}$ ) (Santos et al., 1999).

Em resumo, os dados obtidos pela análise *in vitro* da oxidação da DHE, mostraram que a formação de EOH pode refletir a formação não apenas de ânion radical superóxido, mas também de peroxinitrito, se em presença de  $\text{CO}_2$  e, de forma bastante remota, de radical hidroxila (ver discussão). Entretanto, a relevância *in vivo* destes oxidantes (peroxinitrito e radical hidroxila) deve ser analisada com cautela em cada modelo experimental e sempre acompanhada de controles adequados. Mas, sem dúvida, estes dados confirmam a importância da separação dos compostos fluorescentes para o desenho de conclusões mais profundas, pois a fluorescência total observada em células ou tecidos reflete a soma de EOH, etídio e outros possíveis compostos fluorescentes formados (Figura 3, Papapostolou et al., 2004; Patsoukis et al., 2005).

**Tabela 2 - Quantificação de EOH e etídio a partir da incubação da DHE com diferentes sistemas oxidantes <sup>a</sup>**

| Sistema  | EOH ( $\mu\text{M}$ ) | E ( $\mu\text{M}$ ) |
|--|-----------------------|---------------------|
| Xantina/xantina oxidase                              | 34,1 $\pm$ 1,2        | ND*                 |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                        | ND                    | ND                  |
| ONOO <sup>-</sup>                                    | ND                    | ND                  |
| ONOO <sup>-</sup> /CO <sub>2</sub>                   | 5,3 $\pm$ 1,6         | 1,3 $\pm$ 0,1       |
| Fe <sup>2+</sup> -EDTA/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 12,3 $\pm$ 2,2        | 0,8 $\pm$ 0,1       |
| HRP/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                    | ND                    | 2,0 $\pm$ 0,1       |

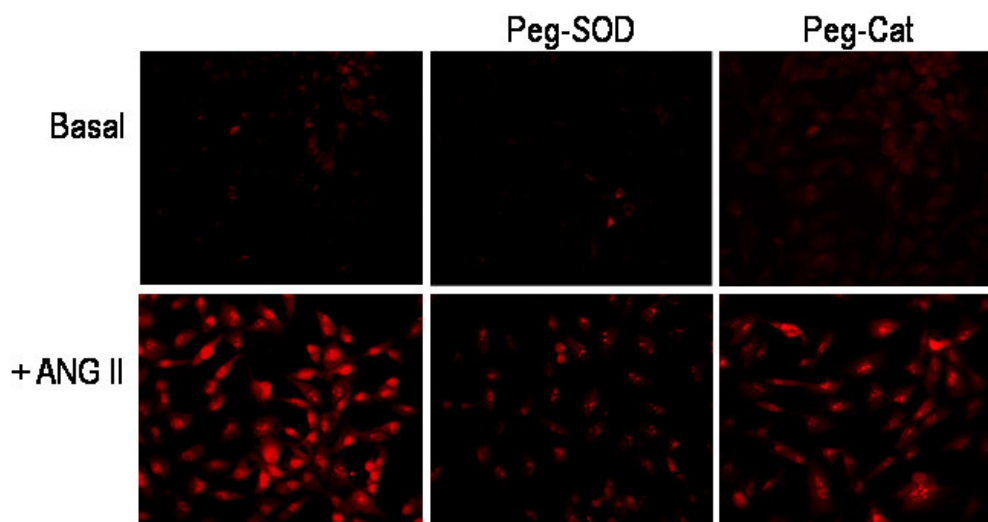
<sup>a</sup> Dihidroetidina (100  $\mu\text{M}$ ) foi incubada em tampão fosfato (100 mM, pH 7,4) contendo DTPA (100  $\mu\text{M}$ ) com: xantina/xantina oxidase (X/XO, 0,5 mM/0,05 U/mL), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1 mM), peróxido de hidrogênio na presença de sulfato ferroso/EDTA (Fe<sup>2+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0,5 mM/0,5 mM); peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>, 1 mM) na presença ou ausência de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>, 2,5 mM); e peroxidase/ peróxido de hidrogênio (HRP/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0,2 U/mL/5 mM). O tempo de incubação foi de 5 min para peroxinitrito e 30 min para as demais. A concentração de dióxido de carbono foi calculada a partir da concentração adicionada de bicarbonato, a partir do pKa 6.4 (Bonini et al., 1999). Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão da média (n = 4). \* não detectado (EOH < 1.5  $\mu\text{M}$  e E < 50 nM sob nossas condições cromatográficas).

## **2.2. Análise da produção de radical ânion superóxido em células musculares lisas**

Em células musculares lisas, a principal fonte de ânion radical superóxido é a enzima NADPH oxidase, que tem sua atividade aumentada em situações patológicas. Um dos seus principais agonistas é a angiotensina II (ANG II, Clempus e Griendling, 2006). Entretanto, trabalhos que empregam a medida de superóxido pela análise de EOH por HPLC basearam-se principalmente em incubação de células com compostos que geram superóxido via *redox cycling*, como menadiona e



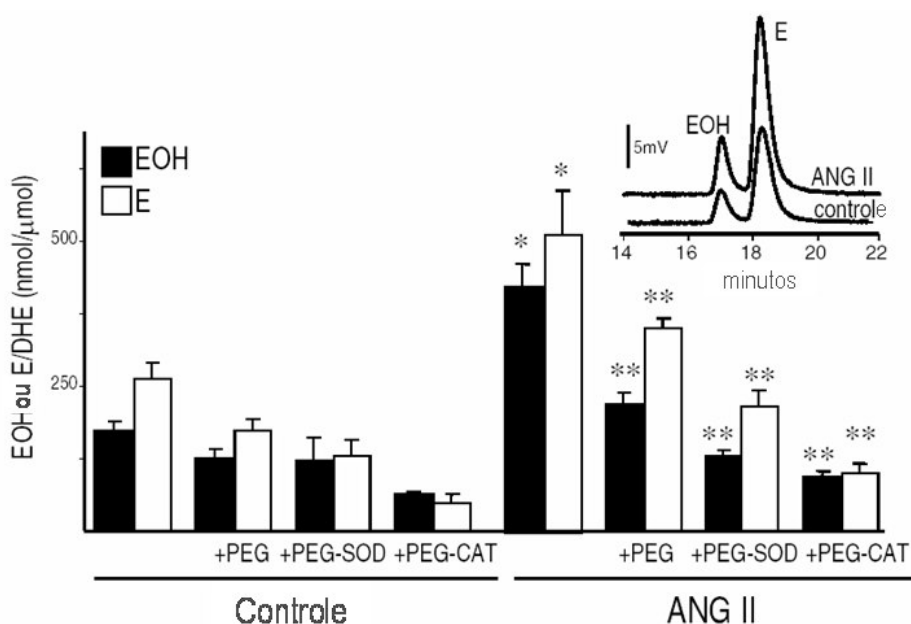
ceramida (Fink et al., 2004; Zhao et al., 2005). Para analisarmos se a oxidação da DHE poderia refletir os aumentos de superóxido após um estímulo fisiológico, células estimuladas com ANG II (100 nM, 4h) foram incubadas com DHE por 15 min e verificamos que há forte aumento da fluorescência total derivada da DHE em relação às células não estimuladas (Figura 4). Ainda, a pré-incubação das células com Peg-Cat e principalmente com Peg-SOD, inibiu esta fluorescência (Figura 4). A fim de analisarmos qual a contribuição parcial dos produtos fluorescentes, etídio e EOH, otimizamos as condições de extração destes compostos das amostras bem como sua manipulação. Inicialmente, verificamos que 98% da DHE adicionada exogenamente foi incorporada às células não estimuladas (dado não mostrado). Em seguida, comparamos a capacidade de dois solventes, metanol e acetonitrila, em extrair os compostos fluorescentes de DNA comercial por análise por HPLC.



**Figura 4: Angiotensina aumenta fluorescência total em células musculares lisas.** As imagens de fluorescência total foram obtidas após estímulo das VSMC com ANG II (100 nM, 4h). Depois do tratamento com ANG II, as células foram lavadas com PBS e incubadas com DHE (5  $\mu$ M, 10min). Em alguns casos, as antes da incubação com DHE, as células foram pré-incubadas com Peg-SOD (50U/mL) ou Peg-Cat (200U/mL) por 15 min.

Observamos que, enquanto os níveis de etídio se mantiveram similares entre os dois solventes, a acetonitrila aumentou a quantidade de EOH em 4 vezes (dado não mostrado); portanto, as extrações foram realizadas com acetonitrila. Basicamente, após estímulo, as células foram lavadas para retirada do meio de cultura, e incubadas com DHE em PBS/DTPA; após 30 min as células foram raspadas em acetonitrila e o lisado obtido foi seco, ressuspendido em PBS, e analisado por HPLC. Durante a separação cromatográfica, a quantificação de DHE remanescente (que não reagiu durante a incubação) foi utilizada como controle interno da extração orgânica. Desta forma, os dados foram expressos como a razão de EOH por DHE consumida (EOH/DHE) e razão de etídio por DHE consumida (E/DHE). A DHE consumida foi calculada como a diferença entre a concentração inicial adicionada às células e a DHE remanescente quantificada por HPLC. Assim, verificamos que VSMC estimuladas com ANG II apresentaram duas vezes mais EOH que as células não estimuladas, com aumento similar nos níveis de etídio (Figura 5). Para verificarmos a formação específica de superóxido<sup>-</sup> durante o estímulo com ANG II, as células foram incubadas por 15 min com Peg-SOD antes da adição de DHE. Entretanto, a adição de Peg-SOD aumentou em 40% os níveis de EOH nas células sem estímulo (dado não mostrado). Entretanto, incubações de células apenas com polietilenoglicol por 15 min, em concentração análoga à adicionada quando empregamos Peg-SOD (2,4 nmol/mL), exibiram também um aumento nas razões EOH/DHE e E/DHE, enquanto que em células estimuladas com ANG II, apenas polietilenoglicol diminuiu estas razões (dados não mostrados). De fato, o tempo de incubação de 15 min parece ser crítico para a incorporação de polietilenoglicol em

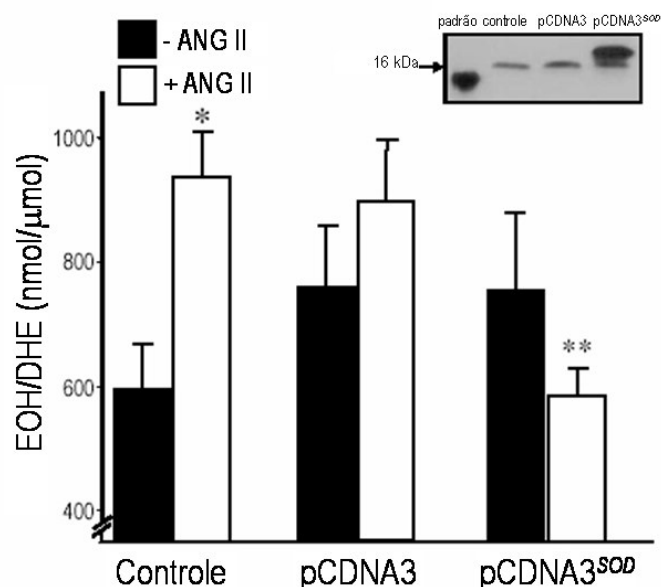
células, por causar distúrbios na membrana plasmática, como demonstrado anteriormente por Beckman e colaboradores (1988). Para minimizarmos estes efeitos, incubamos as células com Peg-SOD e Peg-Cat por tempos maiores (1h e 4h) e verificamos que, como esperado, a adição de ambos os compostos diminuiu as razões de EOH/DHE e E/DHE em células estimuladas ou não com ANG II (Figura 5). Nestas condições, a adição de polietilenoglicol não alterou a



**Figura 5: Análise dos produtos derivados da oxidação da DHE por HPLC.** A quantificação das razões EOH/DHE e E/DHE foram feitas em extratos de células musculares lisas; após estímulo com ANG II (100 nM, 4h), as células foram incubadas com DHE (50 μM, 30 min) em PBS/DTPA, lisadas em acetonitrila, os extratos secos e analisados por HPLC. Em alguns casos, adicionou-se polietilenoglicol (Peg, 2,4 nmol/mL), Peg-SOD (25 U/mL) ou Peg-Cat (200 U/mL) após 3h de estímulo com ANG II. Inseto: Cromatograma representativo da separação de EOH e etídio em extratos de células musculares lisas estimuladas ou não com ANG II. Os valores são média ± desvio padrão da média (n = 4). \* P < 0,05 versus controle; \*\* P < 0,05 versus ANG II.

formação tanto de EOH quanto de etídio nas células controle, porém, inibiu em 40% o aumento de EOH/DHE observado nas células estimuladas com ANG II. Entretanto, como as inibições obtidas com os compostos conjugados ao polietilenoglicol, Peg-SOD e Peg-Cat, foram maiores que os 40% do polietilieglicol em si, pode-se concluir que a diferença (cerca de 30%) corresponde à inibição da SOD e da catalase. Em resumo, apesar do polietilieglicol não ser um bom controle dos compostos conjugados (possivelmente por apresentar mais grupos glicol expostos que os compostos conjugados), nossos resultados contribuíram para um melhor entendimento do papel da SOD durante o estímulo com ANG II, por distinguir os efeitos do polietilenoglicol dos efeitos dos seus compostos conjugados.

Para confirmarmos a formação de EOH especificamente a partir do ânion radical superóxido, transfectamos as células com o plasmídeo que codifica a SOD1, que aumentou sua expressão (Figura 6, inserto) e a atividade total da SOD medida nos extratos celulares (controle =  $9,0 \pm 2,5$ , pCDNA =  $11,2 \pm 1,5$ , pCDNA<sup>SOD</sup> =  $15,4 \pm 1,1$  U/mg de proteína, n=3). Realmente, nas células que super-expressavam SOD1, houve uma diminuição da razão EOH/DHE aos níveis basais comparados às células transfectadas com plasmídeo sem inserto. Interessante, o procedimento de transfecção por si aumentou o estresse oxidativo das células, como pode ser observado pelo aumento de quase duas vezes de EOH (Figura 6), quando comparados aos valores basais de células não transfectadas (Figura 5). O mesmo foi observado para os níveis de etídio (dados não mostrados).



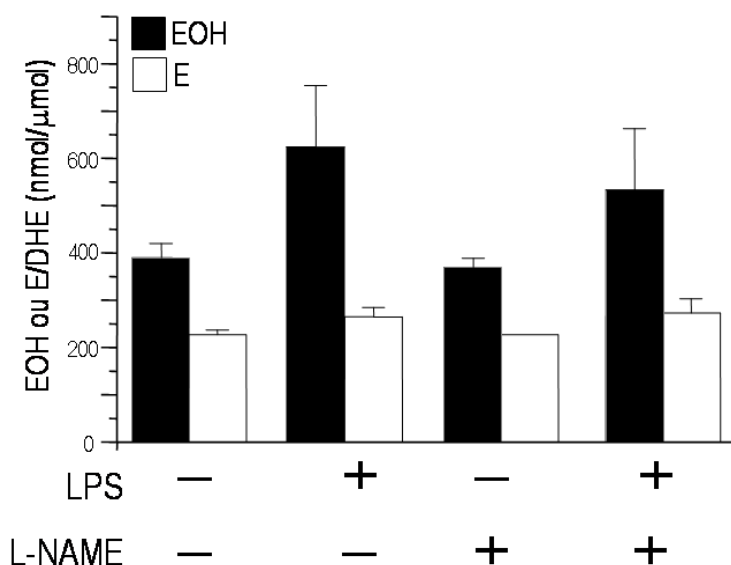
**Figura 6: Efeito do aumento da superexpressão SOD1 na quantificação de EOH após estímulo com ANG II.** A quantificação da razão EOH/DHE foi realizada em extratos de células musculares incubadas com lipofectamina somente (controle), ou transfectadas com o plasmídeo vazio (pCDNA3) ou com o plasmídeo que codifica a SOD1 (pCDNA3<sup>SOD</sup>). As células transfectadas apresentaram expressão da SOD1 aumentada (inserto), cujo maior peso molecular é devido à cauda c-myc. Após 24h da transfecção, as células foram incubadas com angiotensina II (100 nM, 4h), e seqüencialmente com DHE (100 μM, 30 min). A superexpressão da SOD diminuiu os níveis de EOH/DHE para os níveis basais, sem modificar as razões de E/DHE (dados não mostrados). Os valores são médias ± desvio padrão da média (n = 3). \* P < 0,05 versus controle sem ANG II, \*\* P < 0,05 versus estímulo com ANG II nas células controle.

Em relação ao efeito da Peg-Cat após estímulo com ANG II (Figura 5), a inibição dos dois produtos (EOH e etídio) pareceu contraditória em relação aos dados obtidos *in vitro*, que mostraram que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não é capaz de oxidar diretamente a DHE, mesmo quando usamos altas concentrações de oxidante (Tabela 2), ou ainda que, HRP/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidam a DHE preferencialmente para etídio. Desta forma, postulamos que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> poderia sustentar a ativação da NADPH oxidase, de acordo

com a ativação bifásica conhecida para alguns agonistas da oxidase, como é o caso da ANG II. Este perfil bifásico se caracteriza por uma produção inicial de  $H_2O_2$  importante para manter a atividade tardia da enzima (Djordjevic et al., 2005; Griending et al., 2000; Martyn et al., 2006). A fim de analisarmos esta hipótese, antes do estímulo com ANG II, as VSMC foram pré-incubadas com Peg-Cat por 1h. De fato, a pré-incubação da Peg-Cat preveniu completamente a atividade da NADPH oxidase estimulada por ANG II (dado não mostrado), que sugere um papel de regulação sustentada da atividade da oxidase. Este resultado foi também confirmado em VSMC transfectadas com plamídeo que codifica catalase (dado não mostrado). Portanto, os efeitos das incubações com Peg-Cat refletem principalmente uma regulação celular complexa, ao invés de indicarem a inibição da oxidação direta da DHE.

Uma observação recorrente foi em relação à concentração basal de etídio, que sempre foi maior (quase duas vezes mais) que de EOH; entretanto, observamos que esta relação variava em outros experimentos. Por exemplo, analisamos brevemente a oxidação da DHE por espécies reativas derivadas não somente de oxigênio, mas também de nitrogênio, e para isso estimulamos as células com lipopolissacarídeo (LPS, 10 ng/mL por 48h, Figura 7), que aumenta a atividade da NADPH oxidase (Muzaffar et al., 2004) e a expressão da NOS induzível (Fleming et al., 1991). A produção aumentada de  $^{\bullet}NO$  foi verificada pela quantificação de nitrito e nitrato no meio de cultura das células (Tabela 3). Neste caso, o estímulo com LPS aumentou a formação de EOH em relação a etídio, o que sugere maior participação das fontes geradoras de EOH (ânion radical superóxido e/ou peroxinitrito/ $CO_2$ ).

Particularmente neste sistema, é possível que peroxinítrito seja formado, pois o estímulo com LPS gera a produção concomitante dos precursores do peroxinítrito, superóxido e  $\bullet\text{NO}$  ( $k = (19) \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ; Radi et al., 2001). É interessante ressaltar que a incubação de  $\bullet\text{NO}$  com DHE não gera produtos fluorescentes (incubação de GSNO 1mM com DHE 50  $\mu\text{M}$  por 30 min a 37°C, dado não mostrado). O tratamento de VSMC com L-NAME (0,5 mM), inibidor competitivo da NO sintase, antes da adição de DHE, diminuiu a razão de EOH/DHE em 15% (Figura 7), o que sugere que parte do EOH formado durante o estímulo com LPS deve ser oriundo da oxidação da DHE por peroxinítrito.



**Figura 7: Análise dos produtos de oxidação da DHE após estímulo com LPS das células musculares lisas.** A quantificação das razões EOH/DHE e E/DHE foram feitas em extratos de células musculares lisas; após estímulo com lipopolissacarídeo (LPS 10 ng/mL, 48h), as células foram incubadas com DHE (50  $\mu\text{M}$ , 30 min) em PBS/DTPA, lisadas em acetonitrila, os extratos secos e analisados por HPLC. Em alguns casos, adicionou-se L-NAME (0,5 mM) 15 min antes da adição de DHE. Os valores são a média  $\pm$  desvio padrão da média de experimento realizado em triplicata.

**Tabela 3 - Quantificação das concentrações de nitrito e nitrato em meio de cultura em VSMC estimuladas com ANG II (100 nM, 4h) ou LPS (10 ng/mL, 48h)<sup>a</sup>**

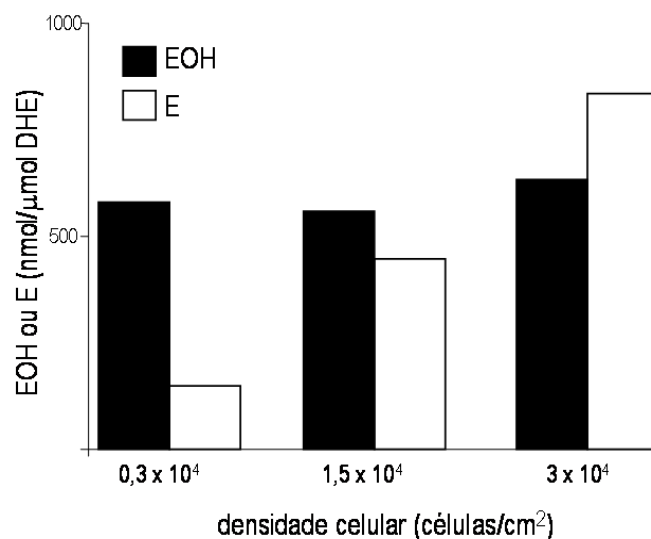
|          | Nitrito ( $\mu\text{M}$ ) | Nitrato ( $\mu\text{M}$ ) |
|----------|---------------------------|---------------------------|
| controle | $4,3 \pm 0,6$             | $7,7 \pm 1,6$             |
| ANG II   | $4,2 \pm 0,5$             | $7,3 \pm 1,0$             |
| LPS      | $7,6 \pm 1,2$             | $10,0 \pm 3,2$            |

Dosagens realizadas em analisador de NO. Valores são média  $\pm$  desvio padrão da média, n = 3.

Entretanto, o que mais nos chamou a atenção foi a inversão da relação basal EOH/etídio, ao se comparar os valores obtidos para as células não estimuladas no experimento com LPS (Figura 7) aos valores obtidos com ANG II (Figura 5). Um fator que observamos aumentar os níveis de EOH em VSMC incubadas com DHE foi a luz ambiente (que pode aumentar sua formação em até 4 vezes, dados não mostrados); entretanto, os experimentos foram sempre realizados sob pouca luz ambiente. Uma das diferenças entre os dois estímulos é o tempo de incubação (ANG II por 4h *versus* LPS por 48h) que culmina em grande diferença na confluência celular. A fim de verificarmos se, de fato, a confluência celular poderia interferir nos níveis basais de EOH e etídio, VSMC foram semeadas em diferentes concentrações iniciais,  $< 5 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> (baixa confluência) e  $> 1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> (alta confluência). Após 48h de crescimento, sem nenhum estímulo, as células foram incubadas com DHE (100  $\mu\text{M}$ ) por 30 min e prosseguimos o procedimento de extração com acetonitrila e análise por HPLC. Observamos que, enquanto a razão EOH/DHE não variava com a confluência celular, a razão E/DHE era maior em cultivos celulares com maior número de células (Figura 8). A formação de etídio



pode refletir vias de oxidação envolvendo peroxidases (Figura 3, Tabela 2 e Papapostolou et al., 2004) e heme-proteínas (Patsoulis et al., 2005). Para identificarmos alguma possível via que poderia contribuir para o aumento de etídio, medimos a atividade total peroxidásica nas células em cultura e quantificamos heme total no extrato das células (que refletem a quantidade de heme-proteínas). Enquanto foi observada uma menor atividade peroxidásica total (e também de glutaciona peroxidase, a principal peroxidase em células de mamíferos) nas culturas celulares de alta confluência, a quantidade de heme total medida foi maior nestes extratos (Tabela 4), o que sugere que o aumento de etídio basal observado (Figura 8) poderia ser, em parte, decorrente de heme-proteínas.



**Figura 8: Análise dos produtos de oxidação da DHE em células musculares lisas em diferentes densidades celulares.** As células foram semeadas em diversas densidades celulares ( $0,3-3 \times 10^4$  células por  $\text{cm}^2$ ), e após 48h em cultura, adicionou-se DHE ( $100 \mu\text{M}$ ) por 30 min. Após extração com acetonitrila, os produtos de oxidação da DHE foram analisados por HPLC. Os resultados são a média de experimento realizado em duplicata.

**Tabela 4 - Efeito da densidade celular nas atividades da SOD, glutatona peroxidase, e peroxidásica total e nos níveis de heme em células musculares lisas**

|   | Densidade celular <sup>a</sup>                         |   |
|---|--|---|
|   | Baixa<br>( $< 5 \times 10^3$ células/cm <sup>2</sup> ) | Alta<br>( $> 1 \times 10^4$ células/cm <sup>2</sup> ) |
| Atividade da SOD <sup>b</sup>             | 20,9 ± 4,6   | 32,7 ± 1,0  |
| Atividade da GPx <sup>c</sup>             | 137 ± 5  | 70 ± 3  |
| Atividade peroxidásica total <sup>d</sup> | 1,0 ± 2  | 0,2 ± 0,1   |
| Heme total <sup>e</sup>                   | 33 ± 3   | 49 ± 3  |

<sup>a</sup> densidade celular inicial, as medidas foram realizadas após 48h da semeadura; <sup>b</sup> U/mg de proteína (determinada pela inibição da redução do citocromo  $c^{3+}$ , Imlay & Fridovich, 1991); <sup>c</sup>  $\mu\text{M}$  NADPH consumido  $\times \text{min}^{-1} \times \text{mg}$  proteína (Takahashi, 2000); <sup>d</sup> % versus baixa densidade (determinada pela oxidação da orto-dianisidina, descrita em Métodos); <sup>e</sup>  $\mu\text{M}$  heme/mg proteína (determinada pela formação do cromógeno ferro-heme, Drabkin, 1971). Os valores correspondem às médias  $\pm$  desvio padrão da média (n = 4).

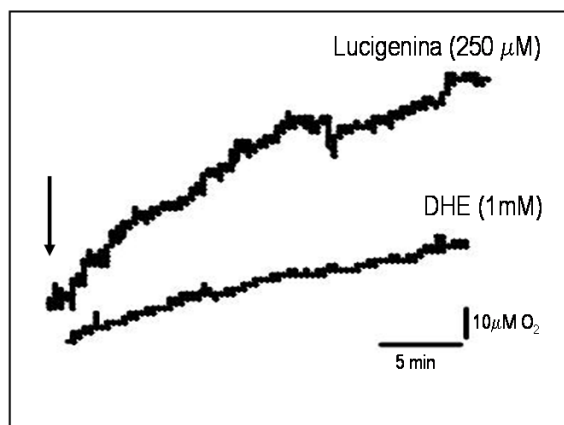
### **2.3. Estudo da atividade da atividade da NADPH oxidase pela oxidação da DHE**

A medida da atividade da NADPH oxidase é de grande relevância para estudos redox em sistemas vasculares uma vez que esta enzima é a principal fonte de ânion radical superóxido em células musculares lisas. Apesar da importância de se distinguir entre as isoformas da NADPH oxidase que contribuem para a geração total de superóxido, a medida da produção total ainda é muito informativa. O método mais utilizado é a incubação de fração enriquecida de membranas (obtida por ultracentrifugação) com NADPH em presença de lucigenina. A lucigenina, uma

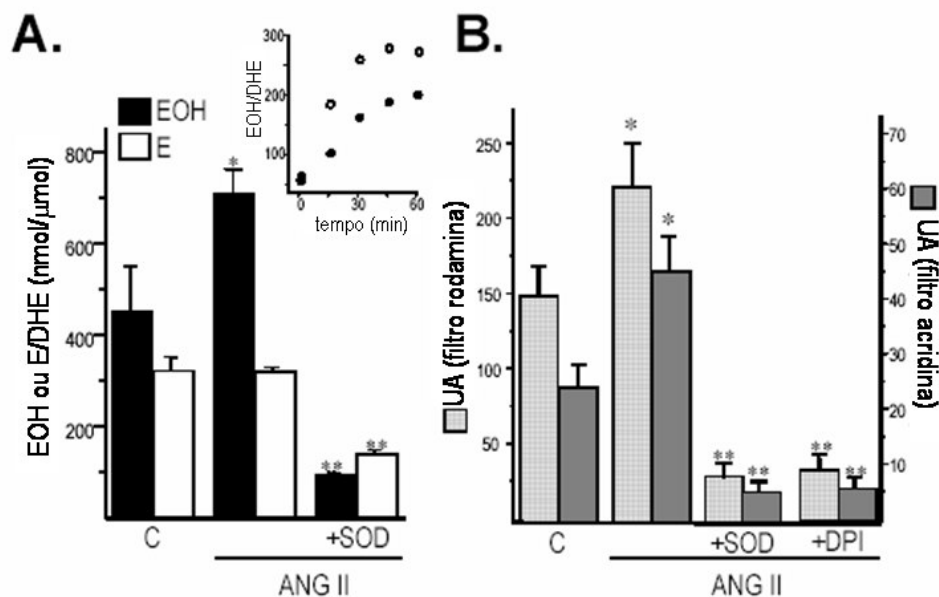
vez reduzida para o seu cátion-radical ( $\text{LucH}^+$ ) por uma redutase (principalmente flavoenzimas, que utilizam o NADH como substrato), sofre uma segunda redução ao reagir (especificamente) com ânion radical superóxido e gera o composto instável dioetano, que por sua vez decai espontaneamente para acridona liberando luz, que é quantificada. Entretanto, o cátion-radical formado ( $\text{LucH}^+$ ) pode ser oxidado pelo  $\text{O}_2$  do meio reacional (autooxidação) e gerar lucigenina e superóxido, processo denominado *redox cycling*. Uma alternativa para quantificar a produção de superóxido em frações de membrana incubadas com NADPH é o uso do EPR com captador de spin, mas que é menos sensível.

Ao contrário da lucigenina, a DHE não sofre *redox cycling* (Patsoukis et al., 2005), dado que confirmamos por experimentos de consumo de oxigênio em incubações de frações de membrana (100  $\mu\text{g}$ ) de células estimuladas com ANG II (100 nM) com concentrações variadas de NADPH (0,3 a 1 mM) em presença de DHE ou lucigenina (Figura 9). Nas frações de membrana de VSMC estimuladas, mesmo com a adição de altas concentrações de DHE (até 1mM) não observamos consumo de oxigênio por pelo menos 1h, ao contrário da incubação feita nas mesmas condições, mas em presença de lucigenina, que em concentração menor (250  $\mu\text{M}$ ) já apresentou consumo de  $\text{O}_2$  mensurável ( $40 \mu\text{M O}_2 \times \text{min}^{-1} \times \text{mg proteína}^{-1}$ ), conforme dados já reportados anteriormente (Janiszewski et al., 2002). A não geração de ânion radical superóxido pela DHE, aliado à geração exclusiva de superóxido pela NADPH oxidase da fração de membrana (em detrimento a outras fontes de espécies reativas de oxigênio encontradas na célula inteira), torna esta molécula bastante promissora na quantificação da atividade da enzima em questão.

De fato, a análise por HPLC dos produtos fluorescentes derivados da DHE das incubações de fração de membrana de VSMC estimuladas com ANG II, em presença de NADPH, mostra que é possível quantificar a NADPH oxidase. A cinética de formação de EOH pela fração de membrana estimulada com ANG II apresentou tempo ótimo de 30 minutos (Figura 10A, inserto); portanto, as incubações foram realizadas por 30 min a 37°C. Como pode ser observado na Figura 10A, a razão E/DHE manteve-se constante, enquanto que a razão EOH/DHE aumentou em 40-50% quando as células tinham sido estimuladas. A forte inibição da taxa de formação de EOH pela presença da SOD (20 µg/mL) demonstrou a especificidade da metodologia empregada. Desta forma, a análise de EOH por HPLC possibilita a quantificação da NADPH oxidase.



**Figura 9: A dihidroetidina não sofre redox cycling.** Análise de consumo de  $O_2$  da incubação de fração de membrana (100 µg) de células musculares lisas tratadas com ANG II (100 nM, 4h). Após 10 min para termostatização adicionou-se NADPH (300 µM). A flecha indica o momento da adição de lucigenina ou DHE após 10 min da adição de NADH. Figura representativa de experimento realizado em duplicata.



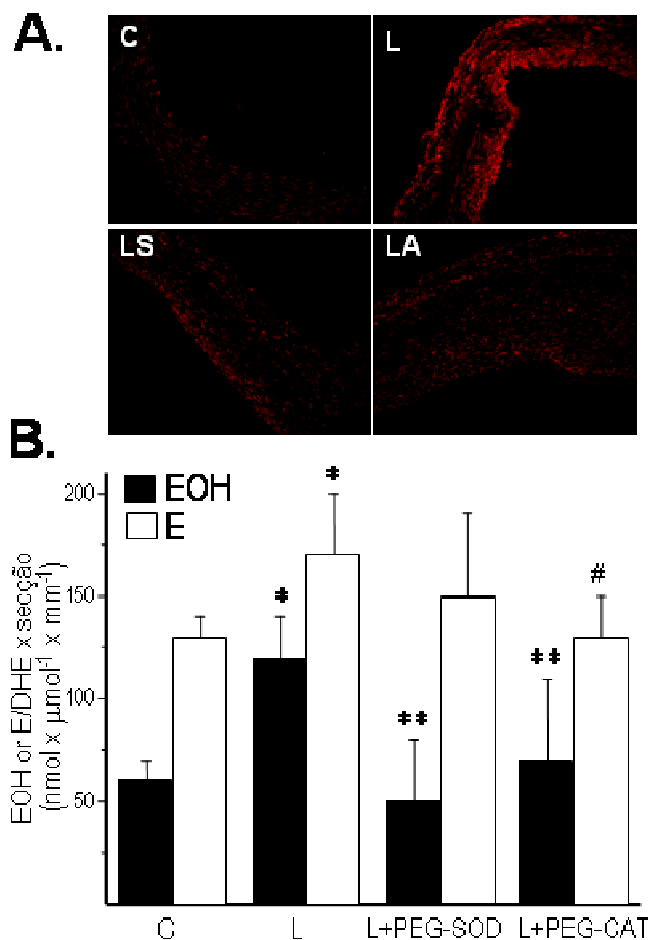
**Figura 10: Medida da atividade da NADPH oxidase empregando-se a fluorescência derivada da DHE.** A) Quantificação das razões EOH/DHE e E/DHE (por HPLC) em incubações de fração de membrana de células musculares lisas (20 μg) com DHE (50 μM) em PBS/DTPA na presença de NADPH (300 μM) por 30 min a 37°C, na ausência ou presença de SOD (25 U/mL). Inseto: cinética representativa da formação de EOH em fração de membrana de células estimuladas com ANG II (círculos fechados) ou não (círculos abertos). B) Atividade da NADPH oxidase medida pelo ensaio miniaturizado para microplaca. Fluorescência total medida com os filtros rodamina ( $\lambda_{ex}$  490 nm,  $\lambda_{em}$  590 nm) e acridina ( $\lambda_{ex}$  490 nm,  $\lambda_{em}$  570 nm) de incubações de fração de membrana (10 μg) com DHE (10 μM) em PBS/DTPA em presença de NADPH (50 μM) e DNA (1,25 μg/mL) por 30 min a 37°C, em ausência e presença de SOD (25 U/mL) e DPI (20 μM). Valores representam média  $\pm$  desvio padrão da média (n = 4). \* P < 0,05 versus controle, \*\* P < 0,05 versus estímulo com ANG II. UA, unidades arbitrárias.

Uma vez que a metodologia por HPLC é cara e demanda bastante tempo (cada corrida cromatográfica dura 35 min), buscamos a otimização da medida para microplaca de 96 poços com detecção em leitor por fluorescência. Isto foi possível pois o aumento observado no ensaio da NADPH oxidase por HPLC foi apenas da

razão EOH/DHE (Figura 10A); portanto, a fluorescência total deve refletir apenas a contribuição de EOH. Neste caso, com o intuito de otimizar as condições experimentais, incubamos 10 µg de fração de membrana com DHE (10 µM) em PBS/DTPA em presença de NADPH (50 µM) por 30 min a 37°C, no escuro, em ausência e presença de DNA (1,25 µg/mL). A presença do DNA aumenta bastante a sensibilidade da medida, tornando-se necessário para as concentrações baixas dos reagentes e amostra que utilizamos (dado não mostrado). De fato, as incubações contendo fração de membrana de células estimuladas com ANG II apresentaram fluorescência maior que a obtida com fração de membrana de células controles, e foram também fortemente inibidas pela SOD, mostrando uma clara correlação com os dados obtidos por HPLC (compare as Figuras 10A e 10B). As leituras foram realizadas nos dois filtros, rodamina e acridina, sendo o último reportado como mais específico para EOH (Zhao et al., 2003; Zhao et al., 2005). Ainda, a adição do composto cloreto de difenilenoiodônio (DPI, 20 µM), um inibidor de flavoproteínas, foi capaz de inibir a fluorescência de forma similar à SOD (Figura 10B), e o composto tiron (20 µM), um seqüestrador de superóxido, inibiu completamente a fluorescência nos dois filtros (dado não mostrado). Estes resultados validam os dois ensaios de medida de atividade da NADPH oxidase (por separação cromatográfica e em microplaca, ambos com detecção por fluorescência), em frações isoladas enriquecidas de membranas. É importante ressaltar que o ensaio em microplaca pode apresentar interferências em situações que há aumento de etídio (e portanto, da fluorescência total) ou pela geração de ânion radical superóxido por outra fonte que não a NADPH oxidase.

#### **2.4. Análise da fluorescência total derivada da oxidação da dihidroetidina em tecidos**

O maior emprego de DHE em trabalhos da literatura é a detecção *in situ* de superóxido em tecidos pela análise da fluorescência total derivada da DHE por microscopia. Em sistemas vasculares, é possível inclusive visualizar quais regiões especificamente produzem mais espécies reativas. No modelo experimental de lesão por catéter-balão em artéria ilíaca de coelho, já foi demonstrado que, após 14 dias da lesão, o tecido da artéria lesada apresenta expressiva fluorescência derivada da DHE na neoíntima (Figura 11A e Leite et al., 2004), extensiva marcação de proteínas nitradas (Leite et al., 2003) e diminuição em 30% da razão de GSH/GSSG (dado não mostrado) quando comparado ao tecido da artéria ilíaca controle. Estes dados mostram que a lesão mecânica gera estresse oxidativo e nitrativo no tecido, o que parcialmente deve ser decorrência da maior expressão proteica das subunidades do complexo NADPH oxidase encontrado principalmente na neoíntima (p22<sup>phox</sup>, Nox4 e Nox2) (Szocs et al., 2002). A fim de verificarmos se a análise por HPLC dos produtos derivados da oxidação da DHE poderia contribuir no entendimento redox da lesão vascular, procedemos de forma similar à extração realizada com as células musculares lisas. Em concordância com a microscopia de fluorescência aumentada na artéria lesada, as razões de EOH/DHE e E/DHE medidas foram maiores que as razões obtidas nas artérias ilíacas controle (respectivamente 100 e 40%, Figura 11B). Enquanto a adição de Peg-SOD inibiu principalmente a



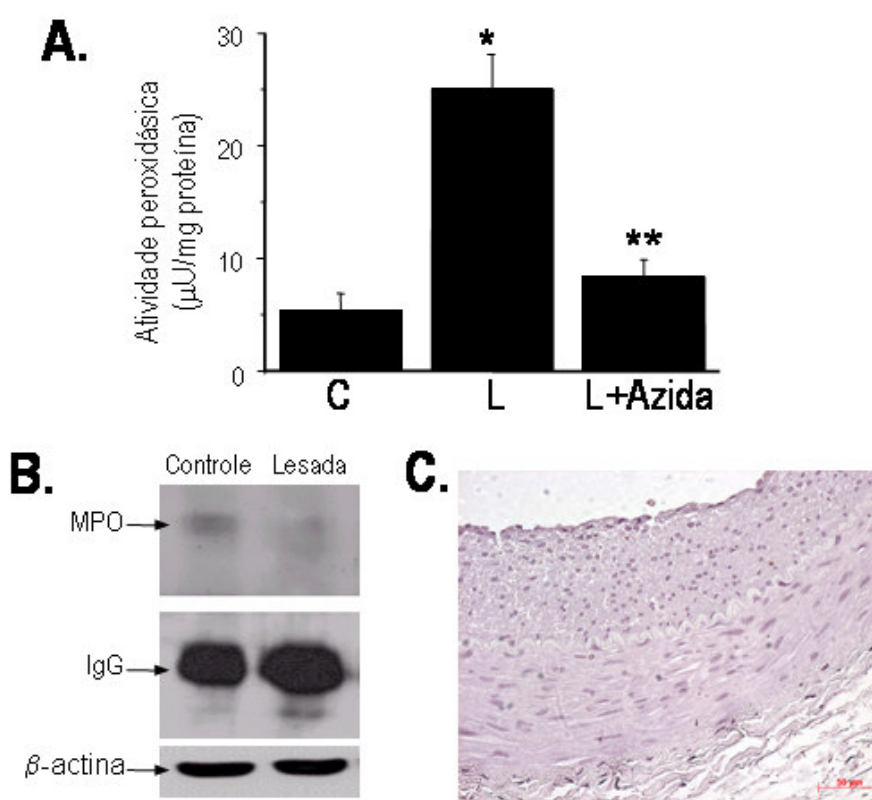
**Figura 11: Fluorescência derivada da oxidação da DHE em artérias ilíacas de coelhos após lesão por cateter-balão.** Após 14 dias da lesão, os coelhos foram sacrificados e as artérias esquerda (controle, C) e direita (lesada, L) foram analisadas imediatamente. A) Microscopia de fluorescência (filtro rodamina) de secções de tecido das artérias após incubação com DHE (2 μM, 20 min), em alguns casos, as secções foram incubadas previamente (15 min) com Peg-SOD (25 U/mL) (LS) ou azida (0,5%) (LA). B) Quantificação das razões EOH/DHE e E/DHE obtidas por HPLC dos extratos das artérias ilíacas. Os segmentos foram incubados com DHE (50 μM) em PBS/DTPA em ausência ou presença de inibidores (Peg-SOD 25 U/mL ou Peg-Cat 200 U/mL) por 15 min a 37°C, extraídos com acetonitrila, secos, ressuscitados em PBS e analisados por HPLC. Não foi possível realizar a análise com segmentos tratados com azida, pois azida interfere na análise por HPLC. Os valores representam média ± desvio padrão da média (n = 4). \* P < 0,05 versus controle, \*\* P < 0,05 versus lesada.



razão EOH/DHE, a adição de Peg-Cat inibiu as duas razões. Ainda, a relação etídio/EOH basal foi pronunciadamente maior nos tecidos em relação aos extratos celulares controles (Figuras 5 e 11). Estes dados sugerem uma importante participação de  $H_2O_2$  na lesão após 14 dias, possivelmente pelo envolvimento de peroxidases, que se mostraram eficientes oxidantes da DHE para etídio *in vitro* (Figura 3, Tabela 2).

Realmente, a atividade peroxidásica total medida nos segmentos intactos de artérias lesadas foi cerca de cinco vezes maior em relação às artérias controle, e a atividade foi fortemente inibida quando os segmentos de artéria foram pré-incubados com azida (0,5%) por 5 min (Figura 12A), que também foi capaz de inibir a fluorescência total derivada da DHE em seções de artérias lesadas (Figura 11A). Esta atividade poderia ser atribuída a infiltrados inflamatórios na lesão ou até mesmo à enzima mieloperoxidase remanescente no tecido. Entretanto, nestes tecidos lesados a expressão de mieloperoxidase não está aumentada no homogenato do tecido lesado em relação ao controle (Figura 12B) e a marcação de macrófagos por imunohistoquímica com RAM11 foi negativa (Figura 12C), este último dado em acordo com dados já reportados (Szocs et al., 2002). Uma outra possibilidade poderia ser a atividade peroxidásica da SOD, pois nesta fase da lesão há aumento da expressão da SOD extracelular, combinado à diminuição de sua atividade (Leite et al., 2003). Interessante, a atividade peroxidásica da SOD simulada *in vitro* (20  $\mu\text{g/mL}/H_2O_2$  1 mM/bicarbonato 25 mM; Bonini et al., 2004) é capaz de oxidar a DHE a etídio (dados não mostrados). Vale notar que a medida da atividade peroxidásica total não foi possível ser medida em homogenatos de artéria, apenas

em segmentos intactos, sugerindo que as possíveis peroxidases envolvidas devem se localizar na matriz extracelular (como é o caso da SOD extracelular) e/ou dependerem deste microambiente para estarem ativas. Independente de qual(is) for(em) a(s) peroxidase(s) envolvidas, estes dados mostram que a atividade de peroxidases é um importante fator na reparação redox da resposta vascular à lesão.



**Figura 12: Medida da atividade peroxidásica total em artérias após 14 dias da lesão por cateter-balão.** A) A atividade peroxidásica foi medida em segmentos intactos imediatamente após o sacrifício dos animais. Observou-se a oxidação de orto-dianisidina a 460 nm. B) Western blot de homogenatos de artérias controle e lesada revelado com anticorpo anti-mieloperoxidase (MPO), e anti-β-actina (controle de *loading*). A marcação de IgG serve também como controle de *loading* e é decorrente do anticorpo primário ter sido feito em coelho. C) Marcação de macrófagos por imunohistoquímica com RAM11. Os valores representam média ± desvio padrão da média (n = 3). \* P < 0,05 versus controle, \*\* P < 0,05 versus lesada.

### 3. Discussão

Os resultados descritos neste capítulo mostraram a validação da análise dos produtos derivados da oxidação da DHE para quantificar a produção de ânion radical superóxido em células musculares lisas em cultura e tecidos vasculares. Também descrevem uma nova metodologia para medir a atividade da NADPH oxidase em fração de membrana de células musculares lisas por HPLC (com detecção por fluorescência) ou fluorescência total em espectrofluorímetro. Estes resultados, aliados a trabalhos recentes publicados sobre a metodologia (Zhao et al., 2003; Fink et al., 2004; Zhao et al., 2005), estendem sua aplicação a sistemas vasculares como uma importante ferramenta para estimativas de produção de ânion radical superóxido *in vivo* mais precisas e exatas. Também identificamos alguns interferentes (endógenos ou exógenos) da técnica, além de tornarmos a análise mais completa, com a interpretação da contribuição do composto etídio formado. A análise deste produto, apesar de ser relativamente inespecífico, pode fornecer informações relevantes. Vale ressaltar que as condições utilizadas buscaram otimizar a separação/quantificação de EOH e etídio, mas poderiam ser adequadas para priorizar especialmente um dos dois compostos. Por exemplo, a faixa de  $\lambda$  ideal para EOH é 570 – 580 nm ( $\lambda_{ex}$  510 nm) e, se empregado, deve aumentar as diferenças observadas e tornar a quantificação mais precisa para superóxido, se comparada às condições que utilizamos. Ainda, outro comprimento de onda de excitação foi proposto recentemente (396 nm) por ser específico para

EOH e, neste caso, teria a grande vantagem de possibilitar a distinção entre os dois compostos em análises por microscopia de fluorescência total (Robinson et al., 2006). Mas vale ressaltar que, como em nossas análises por HPLC identificamos concomitantemente EOH e etídio, pudemos compreender melhor o estado redox celular e inferir sobre a contribuição de possíveis vias através da observação do etídio.

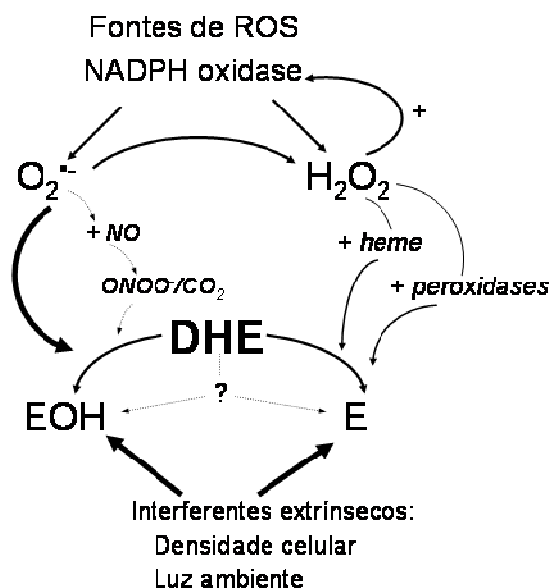
Os estudos *in vitro* de oxidação da DHE mostraram que, de fato, a formação de EOH ocorre preferencialmente pela oxidação da DHE por superóxido (Tabela 2, Zhao et al., 2003; Fink et al., 2004; Zhao et al., 2005), mas pode ocorrer, em menores rendimentos, em presença de peroxinitrito/CO<sub>2</sub> ou reagente de Fenton (Fe<sup>2+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Figura 3, Tabela 2). Enquanto a produção de peroxinitrito *in vivo* é considerada plausível, apesar de não ter sido ainda comprovada, a geração de radicais hidroxila por reagente de Fenton em sistemas biológicos está sob discussão. Por ser uma espécie muito reativa ( $k_{\bullet\text{OH}/\text{biomoléculas}} \sim 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), para haver formação de EOH derivado da oxidação de radical hidroxila em sistemas biológicos, p. ex. em VSMC, as concentrações de DHE utilizadas teriam que ser da ordem de molar, e não micromolar. Ainda, o mecanismo da reação envolvendo os reagentes de Fenton (reação de Haber-Weiss) não está claro e existe a possibilidade da formação de EOH ser decorrente da oxidação direta da DHE por um intermediário reativo (EDTA-Fe(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)<sup>2+</sup>) (Winterbourn, 1995). Como a DHE não é oxidada por peroxinitrito e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a produtos fluorescentes (Figura 3, Bindokas et al., 1994), nossos dados, somados aos já publicados (Zhao et al., 2003; Fink et al., 2004; Zhao et al., 2005),

mostram que a formação de EOH *in vivo* deve estar relacionada com produção de ânion radical superóxido e, em menor grau, peroxinitrito/CO<sub>2</sub>.

A produção de produto(s) de coloração amarelada pela oxidação da DHE por peroxinitrito *in vitro*, cujo  $\lambda_{\text{máx}}$  observado foi de 430 nm, comprimento de onda característico de compostos nitrados, sugere a formação de um nitro-composto derivado da DHE. Fortalece esta hipótese o fato de que a adição de urato (0,5 mM), que reage com o ânion peroxinitrito, e especialmente com seus radicais derivados (principalmente com o radical  $\cdot\text{NO}_2$ ) (Santos et al., 1999), inibiu tanto a coloração no tubo de ensaio quanto a banda em 430 nm (dado não mostrado). A análise deste hipotético composto nitrado, se caracterizado e quantificado, poderia contribuir no melhor entendimento da geração de RNS, principalmente peroxinitrito, radical  $\cdot\text{NO}_2$  e peroxidases (quando em presença de nitrito).

As vias de oxidação da DHE discutidas neste capítulo estão resumidas na Figura 13. Conforme corroborado por nossos dados, a formação de EOH parece ser fortemente dependente da produção de superóxido, com possibilidade de haver contribuição de peroxinitrito/CO<sub>2</sub>, em situações específicas que propiciem a formação deste oxidante. Por sua vez, a(s) via(s) de formação de etídio ainda não é(são) conhecida(s), mas os resultados apresentados, somados a outros trabalhos (Papapostolou et al., 2004; Patsoulis et al., 2005), sugerem a participação de heme-proteínas e peroxidases, que ainda precisam de evidências adicionais *in vivo*. Estes resultados mostram a importância de ser analisar os produtos derivados da DHE por HPLC, que aumenta a especificidade da análise, em detrimento da análise por fluorescência total. Nossos dados e de outros grupos (Bindokas et al., 1996; Zhao et

al., 2003) sugerem que  $H_2O_2$  deve ser o precursor principal da formação de etídio em sistemas biológicos; portanto, a observação por microscopia ou citometria de fluxo de diminuição na intensidade de fluorescência total derivada da DHE, pela adição de antioxidantes deve ser analisada com cautela ao se abordar a contribuição do ânion radical superóxido. Até mesmo resultados obtidos com a adição de SOD, pois é bem conhecido que sua presença diminui a concentração estacionária de  $H_2O_2$  em células (Teixeira et al., 1998). Nossos resultados também



**Figura 13: Representação esquemática de possíveis vias endógenas de oxidação da DHE, bem como de interferentes extrínsecos.** Basicamente, a formação de 2-hidroxi-etídeo (EOH) depende principalmente da geração de radical ânion superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ) e, em menor grau, da formação de peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>/CO<sub>2</sub>). Já a formação de etídio (E) parece correlacionar-se com a atividade de peroxidases e hemeproteínas, cujo substrato é peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ); portanto, em última instância, precursor da formação de etídio. Ambas as espécies reativas ( $O_2^{\bullet -}$  e  $H_2O_2$ ) podem ser geradas por diversas fontes; mas, no caso de sistemas vasculares, principalmente pela NADPH oxidase, cuja atividade sustentada depende dos níveis de  $H_2O_2$  intracelulares. Além da complexa cadeia de reações envolvendo a DHE, durante o processo de análise deve-se ser cauteloso com possíveis interferentes extrínsecos, como a densidade celular (que é diretamente proporcional à formação de etídio) e a luz ambiente (que aumenta os níveis de EOH em VSMC).

identificaram algumas interações intracelulares que poderiam ser interpretadas erroneamente, em especial o resultado aparente da inibição de EOH pela catalase (Figura 5), que reflete a ativação sustentada da NADPH oxidase por  $H_2O_2$ . Ainda, identificamos fatores extrínsecos que podem afetar de forma significativa a análise da oxidação da DHE em células e tecidos, principalmente a influência da confluência celular. Há raros artigos que abordam a relação entre estresse oxidativo e densidade celular, mas um deles detectou maior estresse oxidativo total em células neuronais de linhagem quando em maior confluência, ao contrário de células de cultura primária, cujo estresse oxidativo foi inversamente proporcional à confluência (Limoli et al., 2004). Ainda, verificamos a influência da luz ambiente principalmente nos níveis de EOH em extratos celulares, dado inverso ao reportado para sistemas *in vitro* onde se observou aumento de etídio com a incidência de luz (Zielonka et al., 2006). Provavelmente, a discrepância entre os dois estudos se deve às inúmeras vias de interconversão entre os produtos derivados da DHE, ainda não conhecidas, aliada à complexidade do sistema *in vivo*. Inclusive, alguns destes intermediários, se caracterizados, poderiam eventualmente contribuir com importantes informações sobre a geração de espécies reativas *in vivo*. Em suma, a análise por HPLC dos produtos derivados da oxidação da DHE pode ser empregada em inúmeros experimentos envolvendo tecidos/células vasculares, e confere especificidade e precisão na análise da formação de radical ânion superóxido ou da atividade da NADPH oxidase. Entretanto, como toda técnica que busca identificar e analisar ROS/RNS, é importante salientar a necessidade de se comparar os resultados obtidos através desta técnica com outras metodologias.

#### 4. Conclusão

Os resultados obtidos neste trabalho (capítulo I) podem ser sumarizados como segue.

1. A validação da análise por HPLC dos produtos fluorescentes derivados da oxidação da dihidroetidina em sistemas vasculares mostra sua aplicabilidade.
2. A metodologia pode ser adaptada para quantificar a atividade da NADPH oxidase vascular, tanto por HPLC como em microplaca, ambos por detecção fluorescente.
3. Outras possíveis fontes geradoras de ROS podem, em situações específicas, contribuir para a produção de EOH em sistemas biológicos (superóxido e peroxinitrito/CO<sub>2</sub>) e etídio (peroxidases e heme-proteínas).
4. Alguns importantes interferentes metodológicos (densidade celular, luz ambiente) podem influenciar a quantificação dos produtos derivados da oxidação da DHE.
5. Em conjunto, estes novos métodos permitem uma análise mais específica e representam um avanço na quantificação de ROS em sistemas vasculares. Estes resultados contribuem significativamente para fortalecer a base de nossos experimentos e podem ser aplicados a várias outras situações análogas na literatura.



## CAPÍTULO II:

### ***Envolvimento da Dissulfeto Isomerase Protéica na regulação redox associada à produção de óxido nítrico durante shear laminar em células endoteliais***

#### **1. Introdução**

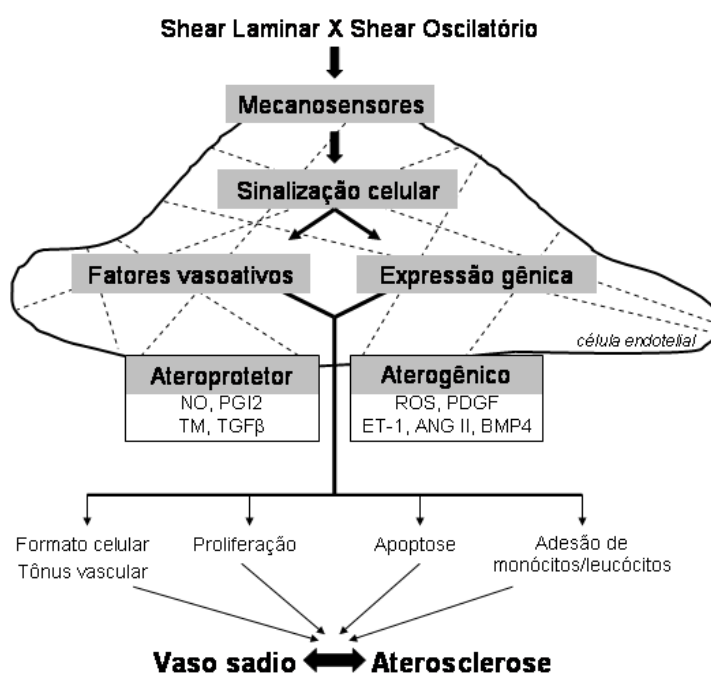
As células endoteliais da parede dos vasos sanguíneos estão constantemente submetidas a forças hemodinâmicas que geram três estresses mecânicos: compressivo (devido à pressão sanguínea), circunferencial (devido à natureza pulsátil da pressão arterial), e de cisalhamento (devido à força tangencial do fluxo sanguíneo sobre o endotélio). O estresse de cisalhamento (ou *shear stress*, do inglês) é particularmente importante para o endotélio vascular. Alterações do *shear stress* determinam alterações vasomotoras instantâneas cuja regulação batimento-a-batimento tende a manter o *shear stress* constante (Kamiya e Togawa, 1980) e a otimizar a distribuição do fluxo de artérias de condutância. Desta forma, aumentos de fluxo sanguíneo nesses vasos induzem vasodilatação e, inversamente, reduções de fluxo determinam vasoconstrição ou revertem um tônus vasodilatador. Estas alterações são fortemente dependentes da integridade da função endotelial, particularmente da produção de óxido nítrico ( $\bullet\text{NO}$ ) pela  $\bullet\text{NO}$  sintase endotelial (eNOS), uma vez que o endotélio é o sensor primário de alterações do *shear stress*

(De Keulenaer et al., 1998; Stéphanie e Tedgui, 2003) e que o *shear stress* é o principal mecanismo fisiológico de manutenção da ativação da eNOS (Hendrickson et al., 1999; Stéphanie e Tedgui, 2003).

Em geral, pode-se dizer que, enquanto o *shear stress* laminar arterial (15 dinas/cm<sup>2</sup>), que ocorre essencialmente em regiões retas dos vasos, apresenta papel ateroprotetor, o *shear stress* oscilatório resultante de um fluxo turbulento ou bi-direcional ( $\pm 5$  dinas/cm<sup>2</sup>), encontrado principalmente nas bifurcações de artérias, caracteriza-se como aterogênico (Gimbrone et al., 2000). De fato, a ocorrência de lesões ateroscleróticas em ramificações de vasos e sua associação com *shear stress* oscilatório e/ou baixo *shear stress* laminar (<15 dinas/cm<sup>2</sup>) é conhecida há décadas (Caro et al., 1969); entretanto, os mecanismos responsáveis por esta associação ainda estão sob investigação.

Os efeitos fisiológicos opostos de shear laminar e shear oscilatório estão descritos na Figura 14. A exposição de células endoteliais ao shear laminar traduz-se em respostas ateroprotetoras, tais como, inibição de trombose, inibição de adesão de plaquetas e recrutamento de monócitos, inibição de apoptose das células endoteliais (Traub e Berk, 1998) e redução da proliferação de células neointimais (Rajagopalan et al., 1996; Wentzel et al., 2001; Kohler et al., 1991). Em contraste, o shear oscilatório induz no endotélio respostas pró-inflamatórias e pró-aterogênicas, como trombose, adesão de leucócitos, e apoptose das células endoteliais (Traub e Berk, 1998). Várias são as modificações induzidas pelo *shear stress* em células endoteliais; resumidamente destacam-se, a curto prazo, a liberação de uma série de fatores vasoativos, que apresentam efeitos pronunciados na função das células

musculares lisas e a ativação de vários fatores de transcrição (como NFκB e Nrf2) e moléculas de sinalização (como as MAPKs e ERK1/2); e a médio prazo a transcrição de vários genes relacionados à sinalização intracelular, citoesqueleto, matriz extracelular, metabolismo e angiogênese (Cullen et al., 2002; Abumiya et al., 2002; Nagel et al., 1999).



**Figura 14: Os diferentes efeitos da shear laminar e shear oscilatório na função celular e aterosclerose.** As linhas pontilhadas simbolizam o citoesqueleto da célula endotelial. O shear laminar e o shear oscilatório são reconhecidos pela célula endotelial por sistemas mecanosensores como o citoesqueleto, integrinas, junções célula-célula, cavéolas, glicocálix da superfície celular, proteínas G, e canais iônicos. Os mecanosinais iniciam cascatas de sinalização que regulam a produção de fatores vasotivos. Enquanto o shear laminar estimula a produção de fatores ateroprotetores, o shear oscilatório estimula a produção de fatores aterogênicos; e o balanço destes fatores determina a propensão do vaso de se manter sadio ou desenvolver placas ateroscleróticas. PGI2, prostaciclina; TM, trombosmodulina; TGFβ, fator de crescimento de transformação β; PDGF, fator de crescimento derivado de plaquetas; ET-1, endotelina-1; BMP4, proteína morfogênica óssea 4 (adaptado de Jo et al., 2006).

Uma das principais vias moduladas pelo *shear stress* laminar, se não a principal, é a ativação da eNOS. Esta enzima localiza-se na membrana plasmática devido às suas alterações co/pós-transducionais (N-miristoilação e palmitoilação). Nas células endoteliais, esta ativação ocorre em microdomínios lipídicos específicos da membrana plasmática denominados cavéolas, que são enriquecidos com colesterol, esfingolípides e principalmente, com a proteína caveolina-1 (Gratton et al., 2004). Esta proteína regula negativamente a eNOS, e, após estímulos como o *shear* laminar, a eNOS dissocia-se da caveolina-1 e interage com a calmodulina e a chaperona Hsp90, e inicia a síntese de  $\bullet\text{NO}$  (Corson et al., 1996; Dimmeler et al., 1999; Garcia-Cardena et al., 1998). O importante papel do  $\bullet\text{NO}$  produzido pelas células endoteliais como mediador dos efeitos celulares e fisiológicos do *shear stress* sugere um papel geral de processos de oxi-redução na transdução de estímulos mecânicos em células endoteliais.

### ***1.1. Formação de espécies reativas durante o shear stress em células endoteliais: envolvimento da NADPH oxidase***

A produção de ROS em células vasculares é decorrente da atividade de vários sistemas enzimáticos (Halliwell e Gutteridge, 2000). Dentre estes, destaca-se o complexo NADPH oxidase, cujos produtos primário (ânion radical superóxido) e secundário ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , derivado da dismutação do superóxido pela enzima SOD) têm

sido relacionados a processos de sinalização redox (Clemens e Griendling, 2006), tanto em situações fisiológicas quanto em diversas patologias, particularmente a aterosclerose, hipercolesterolemia, diabetes e hipertensão (Guzik et al., 2000; Rajagopalan et al., 1996). O *shear stress* aumenta a produção de ROS quando o endotélio é submetido a aumentos do fluxo laminar, como inicialmente observado em vasos sanguíneos isolados por detecção indireta do radical superóxido por espectroscopia de ressonância paramagnética (Laurindo et al., 1994). Enquanto este aumento é transitório, o *shear stress* oscilatório produz maiores níveis de ROS (se comparado ao *shear* laminar) de forma sustentada (Hwang et al., 2003). Esta produção é dependente da subunidade p47<sup>phox</sup> da NADPH oxidase, como observado em células endoteliais de aorta de camundongos p47<sup>phox</sup> nocaute (Hwang et al., 2003).

O complexo NADPH oxidase compõe-se de diversas subunidades, e no sistema vascular apresenta, conforme o tipo celular, combinações de três isoformas distintas (Tabela 5). Devido ao papel central da NADPH oxidase vascular na transdução de sinais do vaso, inúmeros estudos buscam compreender as vias responsáveis por sua ativação e regulação frente aos diversos estímulos conhecidos (dentre eles o *shear stress*) e, objetivam responder algumas questões-chave: i) quais isoformas/subunidades (Tabela 5) estão envolvidas; ii) como ocorre a montagem da NADPH oxidase após determinado estímulo; iii) qual a compartimentalização celular e o tráfego subcelular das subunidades envolvidas; e, no caso deste trabalho em particular, iv) a regulação do complexo por tióis redox-sensíveis durante a ativação e manutenção da atividade da NADPH oxidase. Em particular, a localização

subcelular preferencial difere para as isoformas Nox1, que se distribui em cavéolas, e Nox4, que migra do retículo endoplasmático para complexos de adesão focal (Hilenski et al., 2004; Ushio-Fukai, 2006). Considerando que ambos os subcompartimentos têm papel específico conhecido na mecanotransdução (Ushio-Fukai, 2006), é possível que a interação destes com as correspondentes isoformas da Nox tenha papel na adaptação de células vasculares a distintos padrões de *shear stress*.

**Tabela 5 - NADPH oxidase vascular.**

| Subunidades Catalíticas             | Nox1                                  | Nox2   | Nox4                          |
|-------------------------------------|---------------------------------------|--|-------------------------------|
| Subunidades regulatórias associadas | p22 <sup>phox</sup><br>Noxo1<br>Noxa1 | p22 <sup>phox</sup><br>p47 <sup>phox</sup><br>p67 <sup>phox</sup><br>p40 <sup>phox</sup> (?) | p22 <sup>phox</sup><br>-<br>- |

Obs.: A dependência da presença da subunidade p40<sup>phox</sup> na atividade da NADPH oxidase ainda não está clara.

O processo de ativação das três isoformas do complexo NADPH oxidase vascular (Nox1, Nox2 e Nox4) tem sido intensamente investigado; estas isoformas dependem de diferentes subunidades regulatórias, e postula-se que apresentem diferentes perfis. A Nox4, isoforma predominantemente expressa em células endoteliais, é a isoforma de atividade basal, enquanto as isoformas Nox1 e Nox2 são ativadas em determinadas situações/estímulos, e parecem apresentar atividade enzimática maior que da Nox4 (Ushio-Fukai, 2006; Lassegue e Clempus, 2003). Neste contexto, a isoforma Nox4 tem sido associada à diferenciação e senescência,

enquanto que a Nox1 tem sido associada à proliferação e migração de células musculares lisas (Clempus et al., 2007; Ushio-Fukai, 2006).

### **1.2. Envolvimento da dissulfeto isomerase protéica na modulação redox em células vasculares**

Recentemente, nosso laboratório demonstrou outro tipo de regulação da atividade da NADPH oxidase, dependente de sua interação física/funcional com a dissulfeto isomerase proteica (PDI, Janiszewski et al., 2005). Além de subunidades da NADPH oxidase (Nox1, Nox2 e Nox4 e p22<sup>phox</sup>) co-localizarem e imunoprecipitarem com a PDI, a atividade do complexo é fortemente influenciada por esta tiol-proteína, já que o oligonucleotídeo antisense da PDI foi capaz de inibir em 60% a atividade do complexo NADPH oxidase induzida por angiotensina II em células musculares lisas (Janiszewski et al., 2005). A importância da interação entre PDI/p22<sup>phox</sup> na regulação da NADPH oxidase é reforçada pela sua ocorrência também em macrófagos e neutrófilos (Santos et al., 2006; Silva et al., 2006); entretanto, os mecanismos pelos quais a PDI regula a atividade da NADPH oxidase ainda estão sob investigação.

A regulação da NADPH oxidase vascular é mais uma entre as várias atividades da PDI, uma proteína ubíqua e essencial a células de mamíferos, e pertencente à super-família da tiorredoxina. A PDI é bastante conservada entre as espécies e abundante no lúmen do retículo endoplasmático, aonde pode alcançar

concentrações da ordem de mM (Zapun et al., 1992). Sua estrutura apresenta seis cisteínas, quatro pertencentes aos dois motivos tiorredoxina-símile redox-sensíveis (Cys-Gly-His-Cys), responsáveis por suas atividades isomerase/oxidoreductase. Em adição, a PDI apresenta atividade chaperona de proteínas nascentes como imunoglobulinas e pró-colágeno (Noiva, 1999). Ainda, a PDI pode migrar para a membrana plasmática, frente a determinados estímulos, como é o caso da angiotensina II (Janiszewski et al., 2005).

Na superfície celular, a PDI age principalmente como redutora de tióis protéicos (Jiang et al., 1999), e apresenta importante papel na internalização de  $\bullet$ NO exógeno (oriundo de nitrosotióis) via reações de transnitrosação (Zai et al., 1999). Neste caso, a redução dos níveis de PDI (após transfecção com antisenso da PDI) diminuiu em 70% a formação intracelular de GMP cíclico em células eritroleucêmicas, sugerindo ser esta via importante fisiologicamente para o transporte do  $\bullet$ NO (Zai et al., 1999; Ramachandram et al., 2001). Uma vez nitrosada, a PDI apresenta, pelo menos in vitro, redução de suas atividades isomerase e chaperona (Sliskovic et al., 2005; Uehara et al., 2006) e a formação da PDI nitrosada in vivo, especificamente em células neuronais, foi associada à neurotoxicidade (Uehara et al., 2006). O acúmulo de proteínas mal-formadas gera uma resposta de estresse do retículo endoplasmático, que por meio de uma cascata de sinais denominado “resposta a proteínas mal enoveladas” (ou UPR), culmina na inibição das vias de tradução de proteínas nascentes e super expressão de chaperonas residentes do retículo endoplasmático (grp78, grp94, calrreticulina), e pode evoluir para apoptose celular (Rutkowski et al., 2006).



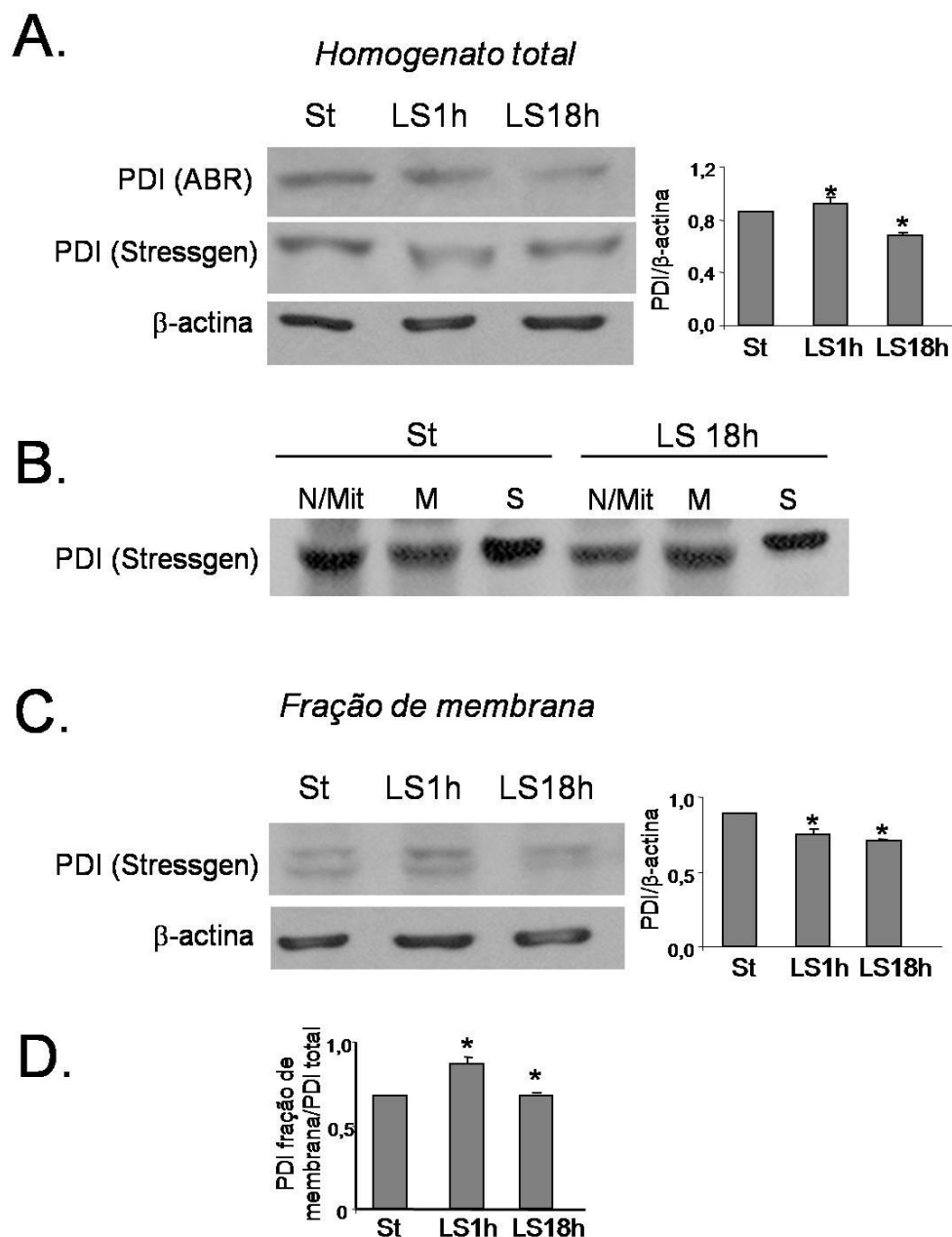
Dentro deste contexto, o shear laminar sustentado é uma situação de especial importância na modulação de espécies reativas, pois há produção concomitante de  $\bullet\text{NO}$  (pela eNOS) e ânion radical superóxido (pela NADPH oxidase). Estudar, em modelo de shear laminar qual o papel exercido pela PDI, que coopera com a NADPH oxidase e pode ter sua função alterada pela nitrosação, é o principal objetivo deste capítulo.

## 2. Resultados

Células endoteliais de aorta de coelho (RAEC), linhagem desenvolvida por Buonassissi e Venter (1975) foram submetidas a shear laminar em sistema cone-e-placa (Figura 1) (Go et al., 1998) desenvolvido no laboratório de Mecanobiologia Vascular do Prof. Hanjoong Jo (Emory University, EUA).

### ***2.1. Expressão e compartimentalização da PDI durante shear laminar***

Inicialmente verificamos em homogenatos de RAEC a expressão total da PDI, que diminuiu após 1h de shear laminar e permaneceu em níveis menores após 18h comparado às células em cultura estática (Figura 15A). Em frações celulares separadas por centrifugação (núcleo + mitocôndria, fração de membrana, ou fração solúvel) não houve variação da expressão da PDI após shear laminar sustentado (Figura 15B). Ao contrário, em fração de membrana observou-se um aumento da PDI em fração de membrana após 1h de shear laminar, e diminuição após shear laminar sustentado (Figura 15C). A razão PDI de fração membrana/PDI total não variou entre shear laminar de 18h e o controle estático, mas foi maior entre shear laminar de 1h vs. controle estático (Figura 15D), sugerindo uma eventual translocação da PDI para a fração de membrana no início do shear laminar, com

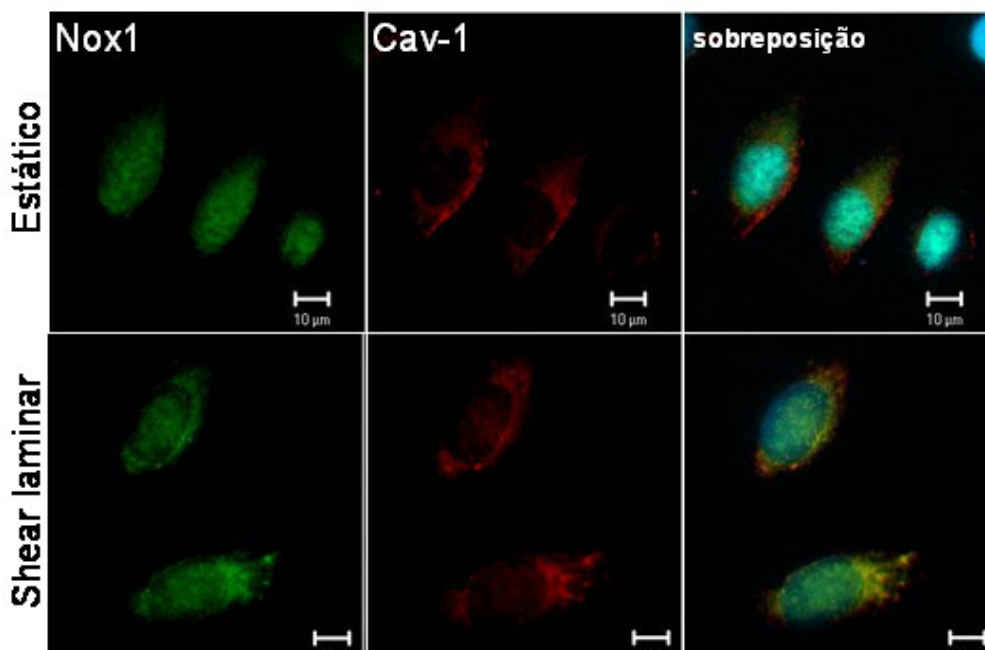


**Figura 15: Expressão e tráfego da PDI em RAEC após shear laminar sustentado.** Análise por western blot da expressão da PDI após shear laminar de 1h ou 18h em homogenatos celulares (A), em fração de membrana (B) ou em frações celulares (C) núcleo+mitocôndria (N/Mit), fração de membrana (M), e fração solúvel (S). Stressgen e ABR são duas marcas diferentes de anticorpos contra PDI, que reconhecem sítios diferentes da proteína. A quantificação da expressão proteica está exibida graficamente, a partir dos valores obtidos por densitometria e corrigidos pelo controle de carregamento,  $\beta$ -actina. (D) Razão PDI de fração membrana/PDI total. n=3.

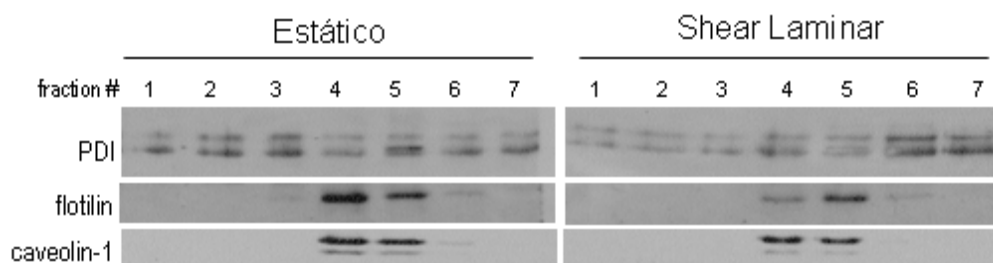
redução da expressão total da PDI após manutenção do shear. A migração da PDI tem sido observada em diversos tipos celulares como macrófagos durante a fagocitose (Santos et al., 2006) ou em células musculares lisas, após estímulo com angiotensina II (Janiszewski et al., 2005).

A mecanotransdução de sinal durante o shear laminar envolve plataformas lipídicas encontradas na membrana plasmática, como por exemplo a ativação da eNOS em cavéolas. Observamos por microscopia confocal co-localização da principal proteína de cavéolas, caveolina-1, com a isoforma Nox1, em condição estática e maior marcação após shear laminar sustentado (Figura 16). A interação física entre a isoforma Nox1 e caveolina-1 já foi descrita anteriormente em VSMC (Hilenski et al., 2004). Já o aumento da co-localização Nox1/caveolina-1 pode ser decorrente do aumento do número de cavéolas no lado abluminal da célula endotelial durante o shear laminar (Boyd et al., 2003).

Como a PDI assiste a NADPH oxidase e a isoforma Nox1 está presente em cavéolas, analisamos se a PDI estaria presente em cavéolas. Para isso, realizamos estudos de imunoprecipitação e fracionamento celular em gradiente de sacarose. Não realizamos experimentos de microscopia confocal entre PDI e caveolina-1 pois os anticorpos secundários para PDI e caveolina-1 são os mesmo, impossibilitando a análise de uma eventual co-localização. Enquanto não observamos interação física entre PDI/caveolina-1 por imunoprecipitação (IP: caveolina-1, IB: PDI; dado não mostrado), verificamos a presença da PDI tanto em frações enriquecidas com caveolina-1 quanto nas demais (Figura 17). Interessante, o padrão de distribuição da PDI variou após o shear laminar sustentado, de frações de baixa densidade de



**Figura 16: Co-localização de Nox1 (verde) e caveolina-1 (vermelho) em RAEC submetidas a shear laminar sustentado.** Após shear laminar, as RAEC foram fixadas com paraformaldeído, marcadas com anti-Nox1 e seqüencialmente com anti-caveolina-1. A sobreposição das imagens mostra a co-localização das duas proteínas (amarelo). Imagens obtidas em microscópio confocal Zeiss LSM510 Meta, aumento = 630x.

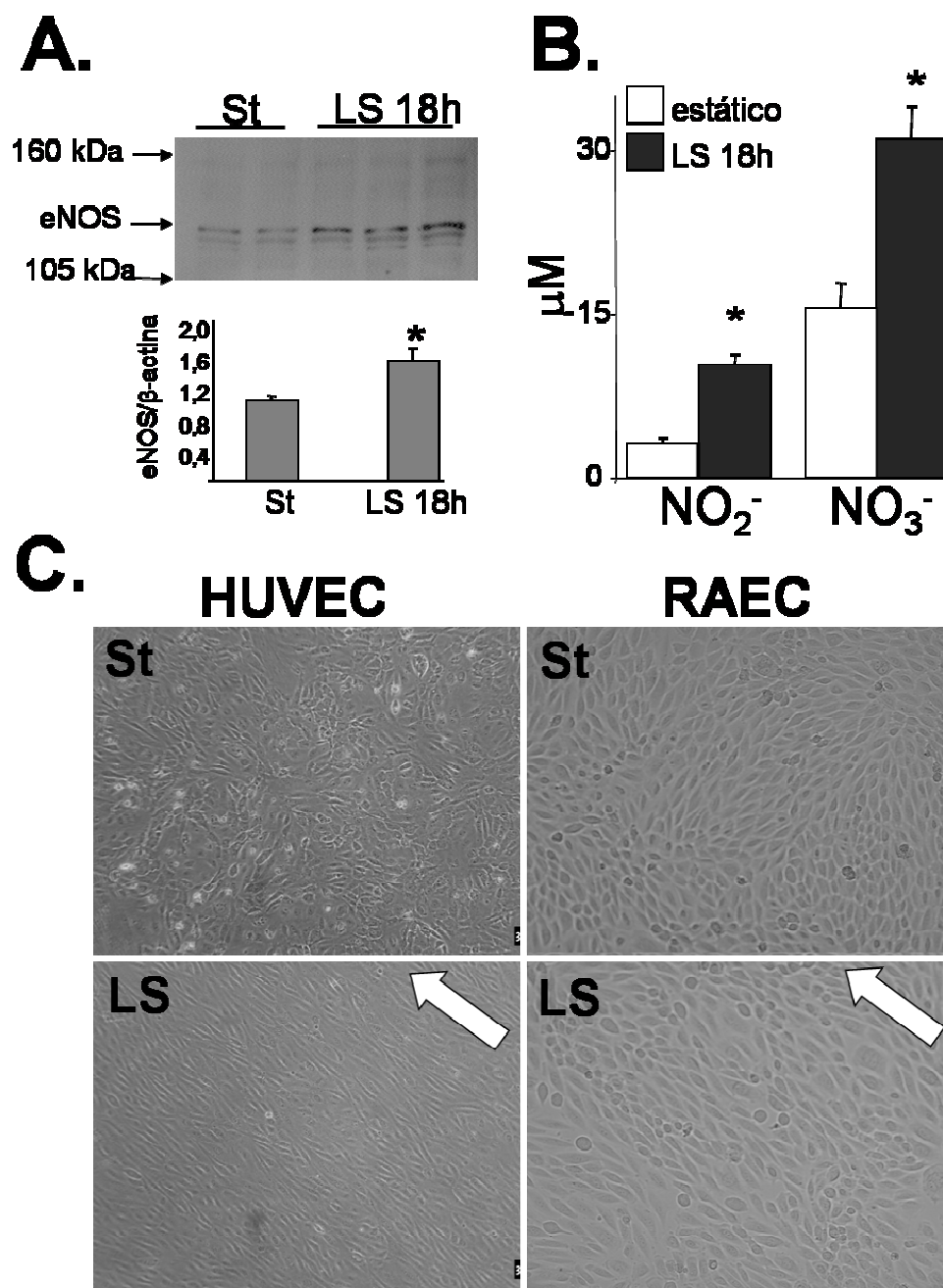


**Figura 17: Distribuição da PDI após fracionamento celular em gradiente de sacarose de homogenatos protéicos de RAEC submetidas a shear laminar sustentado.** Após shear laminar por 18h, RAEC foram lisadas e o extrato celular submetido a ultracentrifugação em gradiente de sacarose (5-45%). Das 12 alíquotas obtidas, as 7 primeiras foram dialisadas e secas sob vácuo, e ressuspendidas em tampão de amostra para análise por SDS-Page seguida de western blot. A PDI está presente em todas as frações, mas sua distribuição é diferente entre o controle estático e após shear laminar. Western blot representativo, n = 3.

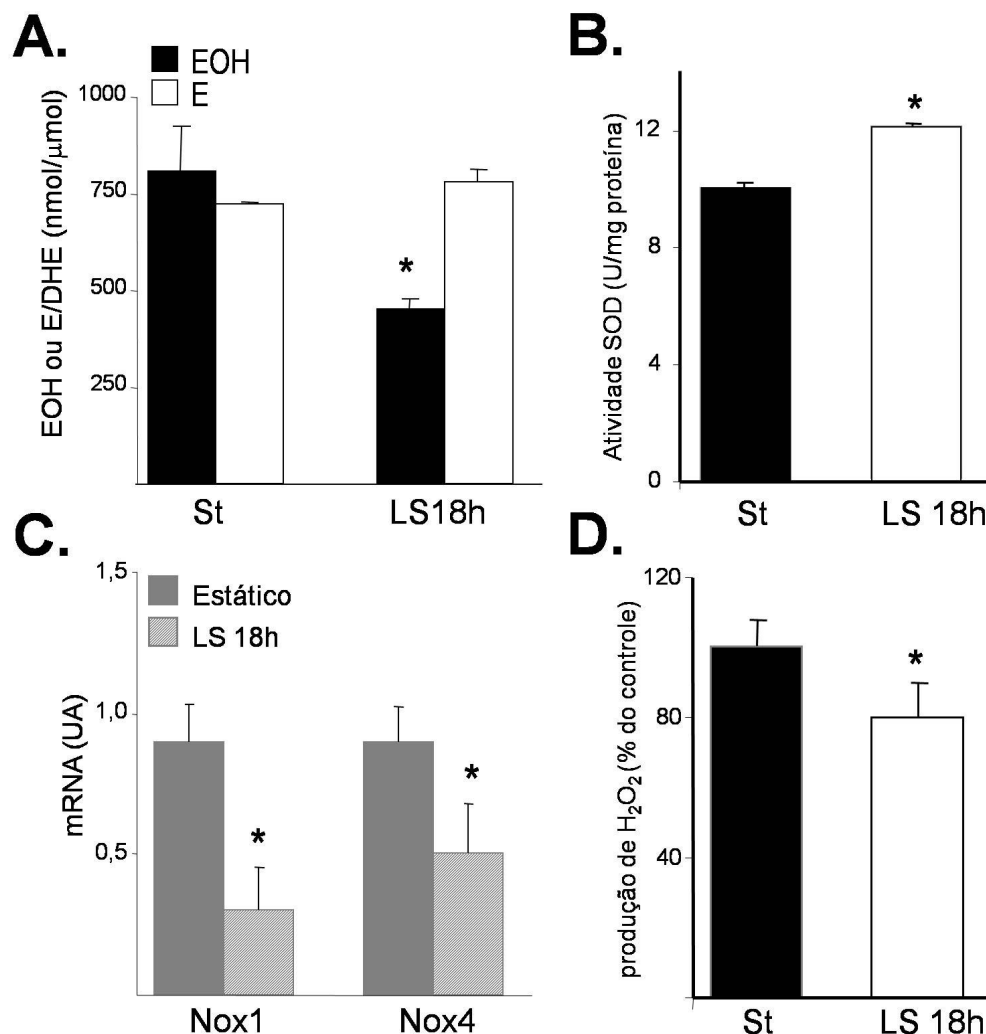
sacarose (frações #1-3) na condição estática para frações de alta densidade de sacarose (frações #6 e #7). Desta forma, durante o shear laminar, a PDI migraria de compartimentos celulares lipídicos de menor densidade que cavéolas e lipids rafts (encontrados nas frações #4 e #5) para microambiente lipídicos de maior densidade. A identidade destas frações ainda precisa ser confirmada, mas é possível que a PDI inicialmente esteja presente em corpos lipídicos (lipid bodies), estruturas que apresentam importante papel durante processos inflamatórios (Bozza e Bandeira-Melo, 2005), e migre durante o shear laminar para domínios como adesões focais, complexos protéicos que conectam o citoesqueleto à matriz extracelular, e estão envolvidos em eventos de mecanossinalização, tais como adesão, migração e motilidade celulares (Zamir e Geiser, 2001).

## ***2.2. Estado redox celular após shear laminar sustentado***

Após shear laminar sustentado as RAEC apresentaram maior expressão protéica da eNOS e aumento dos níveis de nitrito e nitrato no meio de cultura, comparado às células em condição estática (Figura 18A e B). Entretanto, estas células endoteliais não alinharam após 18h de shear, ao contrário de células de cultura primária de cordão umbilical humano (Figura 18C), mesmo alterando-se algumas condições experimentais, como concentração de soro fetal bovino e tempo



**Figura 18: Modulação da produção de óxido nítrico e expressão da eNOS após shear laminar sustentado em RAEC em sistema cone-e-placa.** A) Expressão da eNOS em homogenatos celulares, com a quantificação das bandas por densitometria (*abaixo*) B) Quantificação de nitrito e nitrato em meio de cultura (por analisador de NO). Os valores são média  $\pm$  desvio padrão da média (n = 3). \* P < 0,05 vs. controle estático (St). C) Comparação da organização celular após shear laminar sustentado entre HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*) e RAEC por microscopia óptica. As flechas brancas indicam a direção do fluxo.



**Figura 19: Estado redox das células endoteliais submetidas ao shear laminar sustentado.** A) Quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio totais após shear laminar por 18h, através da medida da produção de 2-hidroxietídio (EOH, medido como razão EOH/DHE) e etídio (E) por HPLC. Após o shear laminar, as células foram incubadas com DHE por 30 min a 37°C, extraídas com acetonitrila, secas e analisadas por HPLC. B) Atividade da SOD (medida por redução do citocromo  $c^{3+}$ ) medida no homogenato total; C) Quantificação do mRNA das subunidades Nox1 e Nox4 por real-time PCR; D) Produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em frações de membrana medida por oxidação da resorufina. Os valores são média  $\pm$  desvio padrão da média (n = 3). \* P < 0,05 vs. controle estático (St).

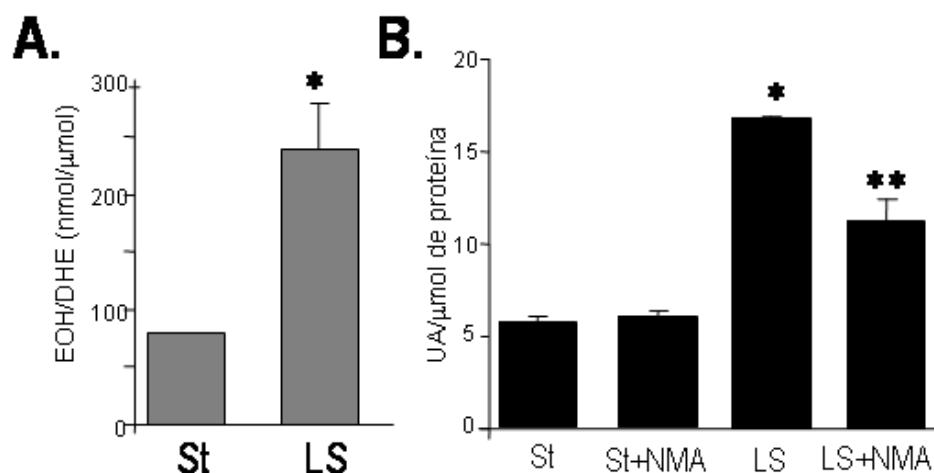


de shear laminar (dados não mostrados). O não alinhamento das RAEC já foi descrito anteriormente (Miyakawa et al., 2004).

A produção de ROS apresentou-se menor em 50% após shear laminar, principalmente do radical superóxido, medido pela formação de 2-EOH (Figura 19A) sem alteração da produção de etídio (vs. controle estático). A menor produção de superóxido também já foi observada em células endoteliais de cultura primária (MAEC, *mouse thoracic aorta endothelial cells*) por EPR indireto em extrato celular (Hwang et al., 2003). A menor produção de superóxido total durante o shear laminar sustentado deve ser uma conseqüência de diversos fatores, como: i) aumento da atividade da SOD (~20%; Figura 19B), conforme já demonstrado para HAEC (*human aortic endothelial cells*; Inoue et al., 1996); ii) menor quantidade de mRNA das subunidades Nox1 (67%) e Nox4 (45%) (Figura 19D), também conforme observado em MAEC (Jo et al., 2006), iii) e menor atividade da NADPH oxidase endotelial (~20%, medida pela produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em fração de membrana estimulada com NADPH; Figura 19C).

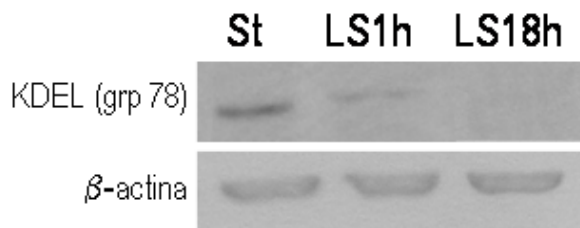
Intrigante, ao medirmos a atividade da NADPH oxidase pela oxidação da DHE nestas mesmas preparações de fração de membrana estimuladas com NADPH, observamos um aumento de ~2,5 vezes na razão EOH/DHE (Figura 19D vs. Figura 20A), o que sugere uma possível interferência de outra fonte de radical superóxido nestas condições experimentais. A fonte de superóxido mais provável seria a própria eNOS, proteína localizada na membrana plasmática, cuja expressão está aumentada após shear laminar sustentado (Figura 18A). A eNOS desacopla-se em situações de baixas concentrações de substrato e/ou co-fatores necessários para

sua atividade enzimática, i.e., conversão de L-arginina a citrulina e  $\cdot\text{NO}$  (Vásquez-Vivar et al., 1998). De fato, quando o shear laminar foi realizado em presença do inibidor da eNOS, N-metil-L-arginina (NMA,  $100\mu\text{M}$ ) observou-se uma diminuição em 30% da oxidação da DHE pela fração de membrana estimulada por NADPH, comparando-se ao shear laminar (Figura 20B). Portanto, o emprego de frações de membrana que contenham outras fontes de radical superóxido além da NADPH oxidase, pode gerar dados passíveis de interpretação incompleta ou mesmo superestimativas da atividade da NADPH oxidase.



**Figura 20: Interferência da eNOS desacoplada na medida de produção de superóxido em frações de membrana estimuladas com NADPH.** Medidas da produção de espécies reativas de oxigênio em fração de membrana incubadas com NADPH por 30 min a  $37^{\circ}\text{C}$ . A) Quantificação de 2-hidroxi-etídio por HPLC, B) Medida da oxidação da DHE (fluorescência total) por fração de membrana de células endoteliais estáticas ou submetidas a shear laminar em presença de inibidor da eNOS N<sup>o</sup>-Metil-L-arginina ( $100\mu\text{M}$ ). Os valores são médias  $\pm$  desvio padrão da média (n = 3). \* P < 0,05 vs. controle estático (St), \*\* P < 0,05 vs. LS 18h.

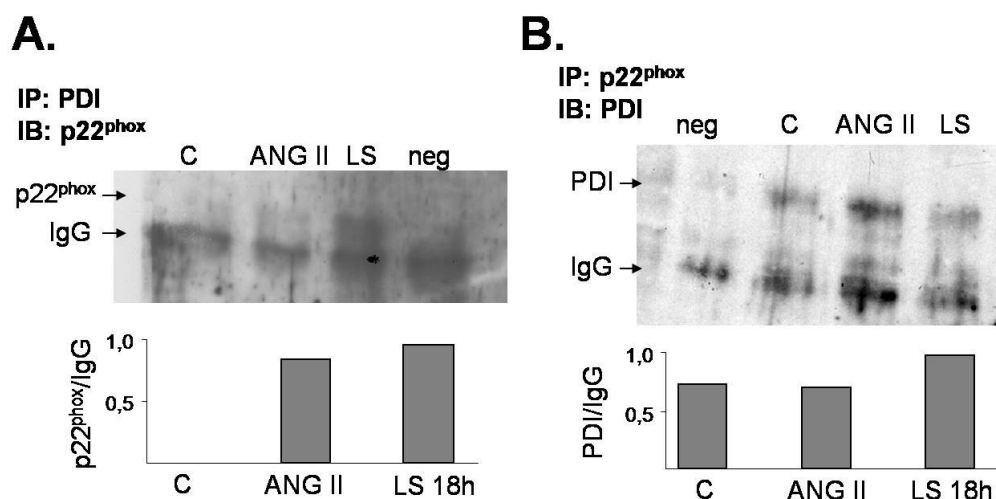
O menor estado oxidativo total das células endoteliais submetidas a shear laminar sustentado pode ser relacionado a menor estresse do retículo endoplasmático, uma vez que ambos estão associados em condições patológicas, como aterosclerose e resistência à insulina (Kaufman, 2002). Desta forma investigamos a expressão de marcadores de estresse do retículo endoplasmático, i.e., proteínas que contêm a seqüência de retenção no retículo endoplasmático (KDEL). De fato, a expressão da chaperona grp78, que apresenta papel central na resposta de proteínas mal enoveladas associadas ao estresse do retículo endoplasmático, apresentou expressão diminuída após o shear laminar, realizado tanto por 1h quanto por 18h (Figura 21), enquanto que a chaperona grp94, outra proteína residente do retículo endoplasmático, apresentou expressão inalterada após shear laminar (por 1h ou 18h, dado não mostrado). Portanto, durante o shear laminar sustentado, que apresenta menor estresse oxidativo (Figura 19 e Hwang et al., 2003), nossos dados sugerem que o estresse do retículo também está diminuído.



**Figura 21: Expressão da chaperona grp78 após shear laminar sustentado.** Análise por western blot da grp78, que apresenta papel central na resposta de proteínas mal enoveladas. A expressão da chaperona grp94, outra chaperona residente do retículo endoplasmático, apresentou-se inalterada após o shear laminar (dado não mostrado).

### 2.3. Modulação da atividade da NADPH oxidase vascular pela PDI

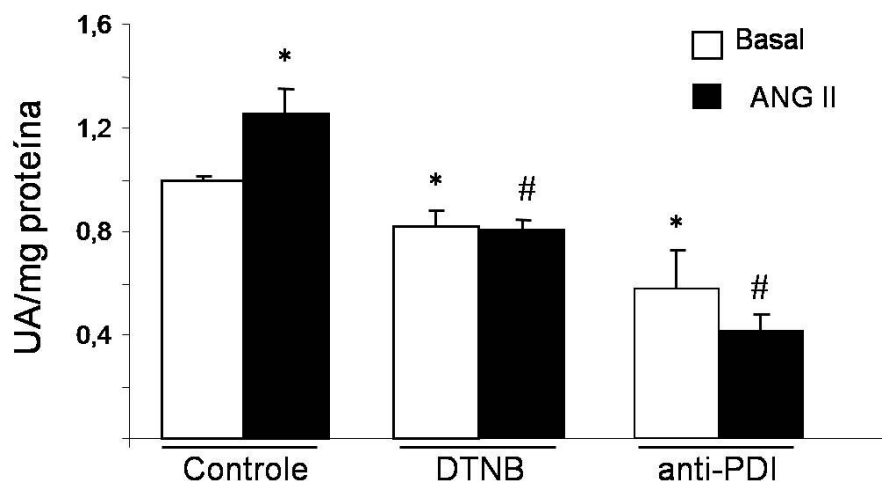
Durante o shear laminar sustentado, ocorre uma diminuição da expressão das isoformas das Noxes, e menor expressão da PDI (Figuras 15 e 19). Mesmo sendo menos expressa, a PDI interage fisicamente com a subunidade p22<sup>phox</sup> do complexo NADPH oxidase, como observado por co-imunoprecipitação (Figura 22). Esta interação já foi demonstrada em células musculares lisas estimuladas ou não com



**Figura 22: Co-imunoprecipitação de PDI com p22<sup>phox</sup> em células endoteliais.** Após shear laminar por 18h (LS) ou tratamento com angiotensina II (All, 100 nM, 4h), RAEC foram lisadas e o extrato total incubado com anticorpo anti-PDI ou anti-p22<sup>phox</sup> overnight, seguido de proteína G por 2h. Os imunocomplexos foram lavados, ressuspensos em tampão de amostra e aplicados em gel de poliácridamida 15% (à esquerda) ou 8% (à direita) para análise por western blot. Os gráficos mostram a quantificação das bandas por densitometria de p22<sup>phox</sup> ou PDI, corrigidas respectivamente pelas bandas de IgG cadeia leve ou pesada. Controle (C, RAEC sem tratamento, em condição estática), angiotensina II (All), shear laminar sustentado (LS), controle negativo (neg, incubações em ausência de extrato celular). n = 2.

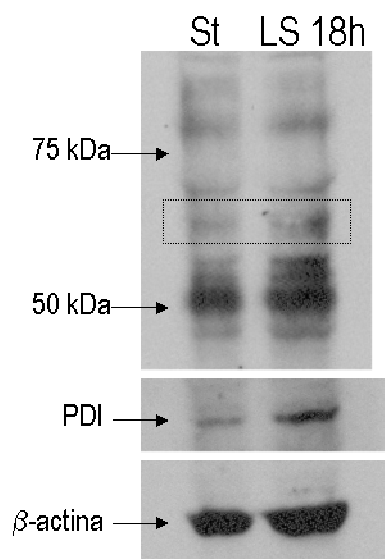
ANG II (Nox1, Nox4 e p22<sup>phox</sup>; Janiszewski et al., 2005), em neutrófilos humanos (Nox2, p22<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> e p67<sup>phox</sup> Silva et al., 2006) e macrófagos murinos J774 (p22<sup>phox</sup>, Santos et al., 2007), nestes dois últimos principalmente após ativação com acetato de forbol-miristato (PMA).

A interação física entre PDI e NADPH oxidase implica na possibilidade de regulação da atividade da NADPH oxidase pelos tióis da PDI, como já demonstrado em células musculares lisas (Janiszewski et al., 2005). O mesmo ocorre em células endoteliais; tanto as atividades da NADPH oxidase basal como estimulada por ANG II são diminuídas em presença de ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB), um oxidante de tióis, ou do anticorpo neutralizante anti-PDI (Figura 23).



**Figura 23: Efeito de diversos antagonistas da PDI na atividade da NADPH oxidase de RAEC.** Fração de membrana de RAEC estimuladas ou não com angiotensina (ANG II, 100 nM, 6h) foram incubadas com NADPH e mediu-se a atividade da NADPH oxidase pela oxidação total da DHE em microplaca. Em alguns poços, os homogenatos de fração de membrana foram incubados com DTNB (oxidante de tióis, 500  $\mu$ M) ou o anticorpo neutralizante anti-PDI (1:100) por 15 min antes da adição dos demais reagentes. Os valores são média  $\pm$  desvio padrão da média (n = 3). \* P < 0,05 vs. controle; # P < 0,05 vs. ANG II.

Desta forma, a PDI parece agir como um importante sensor do estado redox celular e/ou da própria produção de ROS, e alterar a produção de ROS pela NADPH oxidase, dependendo de sua conformação. As alterações redox às quais a PDI estaria submetida são oxidação, redução, glutatilação, e nitrosação. Durante o shear laminar sustentado, ocorre aumento da nitrosação basal de tiol-proteínas, como já demonstrado para caspase-3, tioredoxina e p21ras, com alteração de atividade das mesmas (Hoffmann et al., 2003). De fato, verificamos aumento de ~20% na nitrosação da PDI após shear laminar (razão PDI biotinilada (i.e., nitrosada)/PDI total vs. controle estático; Figura 24).

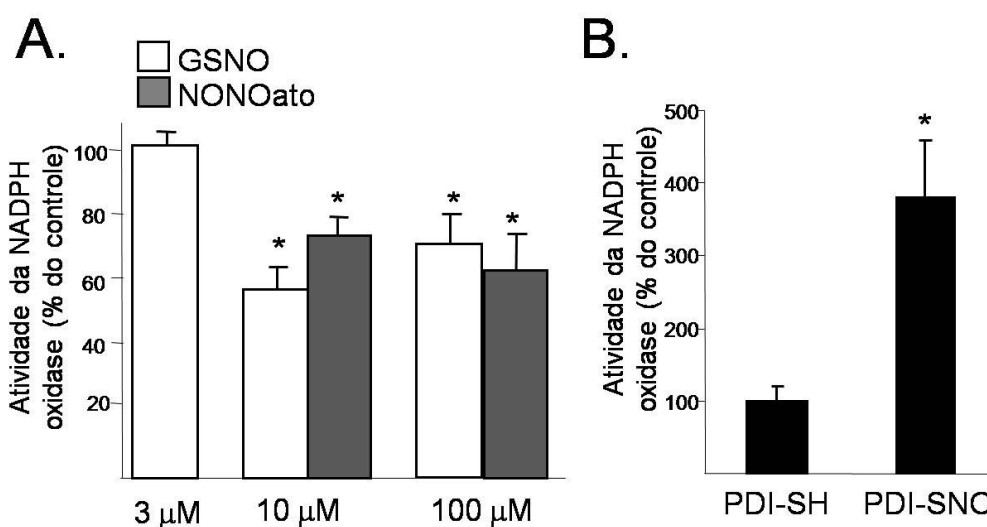


**Figura 24: Marcação de proteínas biotiniladas após shear laminar em RAEC.** *Acima:* Marcação de proteínas biotiniladas no homogenato total de RAEC submetidas ou não ao LS 18h (o quadro marca a banda reconhecida pelo anticorpo anti-PDI (*Meio*)). Como controle de carregamento, a mesma membrana foi marcada com anti- $\beta$ -actina. n=1.

In vitro, a nitrosação da PDI diminui sua atividade isomerase e chaperona (Ramachandran et al., 2001; Uehara et al., 2006); entretanto, ainda não há informações sobre como esta alteração física da PDI refletiria na atividade da NADPH oxidase. Para compreendermos melhor esta modulação, realizamos alguns experimentos em células musculares lisas. Conforme Figura 25A, a adição de óxido nítrico exógeno (por adição de SpermineNONOato ou GSNO) induziu uma inibição parcial porém sustentada, mesmo após serem retirados do meio de cultura, em cerca de 20-40% da atividade da NADPH oxidase. Entretanto, a inibição foi observada somente em concentrações  $\geq 10 \mu\text{M}$  dos compostos empregados, sugerindo que reações oxidativas secundárias oxidaram a PDI, resultando em comportamento análogo à adição de DTNB nas frações de membrana de VSMC (Janiszewski et al., 2005) e em células endoteliais (Figura 23). Ao contrário da adição de  $\bullet\text{NO}$  exógeno, a adição de PDI nitrosada à fração de membrana de VSMC aumentou significativamente a atividade basal da NADPH oxidase enquanto não houve alteração com a adição de PDI reduzida (Figura 25B).

Para compreendermos melhor como alterações redox da PDI poderiam interferir na atividade da NADPH oxidase, transfectamos VSMC com plasmídeos que codificavam PDI selvagem (PDI-wt) ou PDI mutada (PDI-mut) nos quatro tióis redox sensíveis (cisteínas 36, 39, 383, 386) (Uehara et al., 2006). Após isolarmos a fração de membranas, medimos a atividade da NADPH oxidase por dois métodos diferentes: a oxidação da DHE em microplaca, que quantifica preferencialmente superóxido, e a oxidação da resorufina, que quantifica a produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A superexpressão da PDI-wt ou PDI-mut aumentou fortemente a produção basal de

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pela NADPH oxidase, em maior intensidade que o estímulo com ANG II (Figura 26). Já a superexpressão da PDI gerou resultados antagônicos na produção de superóxido pela NADPH oxidase; enquanto a PDI-wt inibiu em ~50%, a PDI-mut aumentou atividade em ~30%.

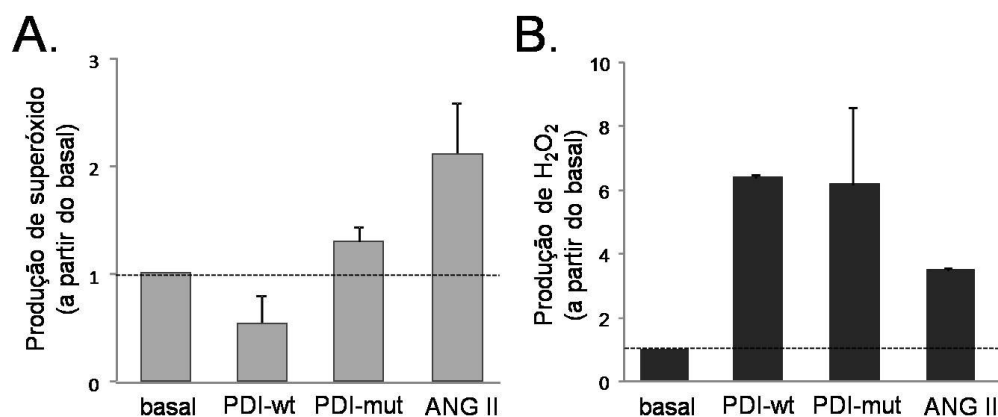


**Figura 25: Interferência do óxido nítrico na atividade da NADPH oxidase.** Fração de membrana (15 µg proteína total) de células musculares lisas foi incubada com NADPH (300 µM) por 30 min em presença de DHE (50 µM), e a mediou-se a formação do produto 2-hidroxietídeo por microplaca (A) ou HPLC (B). A) Após 2h da adição dos doadores de óxido nítrico ao meio de cultura, as células foram lavadas com PBS, e fração de membrana separada. B) Fração de membrana foi incubada com 1,5 µg de PDI reduzida (~ 6 -SH/PDI) ou nitrosada (~ 2,5 -SNO/PDI) por x minutos antes da adição dos demais reagentes para medida da atividade da NADPH oxidase. Os valores são média ± desvio padrão da média (n = 3). \* P < 0,05 vs. controle.

A partir dos resultados apresentados (Figuras 25 e 26), pode-se sugerir que o aumento da produção de superóxido pela NADPH oxidase observada com a superexpressão da PDI mutada ou pela adição de PDI nitrosada à fração de



membrana deve ocorrer por mecanismos análogos, pois a conformação de ambas as proteínas deve ser similar, comparando-se a mutação de cisteína por serina (PDI-SH por PDI-CH<sub>2</sub>OH) com a nitrosação da PDI (PDI-SNO). Em contrapartida, a PDI contendo os tióis reduzidos/preservados não alterou ou diminuiu a atividade da NADPH oxidase basal (produção de superóxido). Juntamente com a maior produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pela NADPH oxidase, estes dados podem sugerir que a maior expressão da PDI-wt poderia estar ligada a uma maior expressão e/ou montagem/migração da Nox4 para a membrana celular. Esta hipótese estaria de acordo com recentes

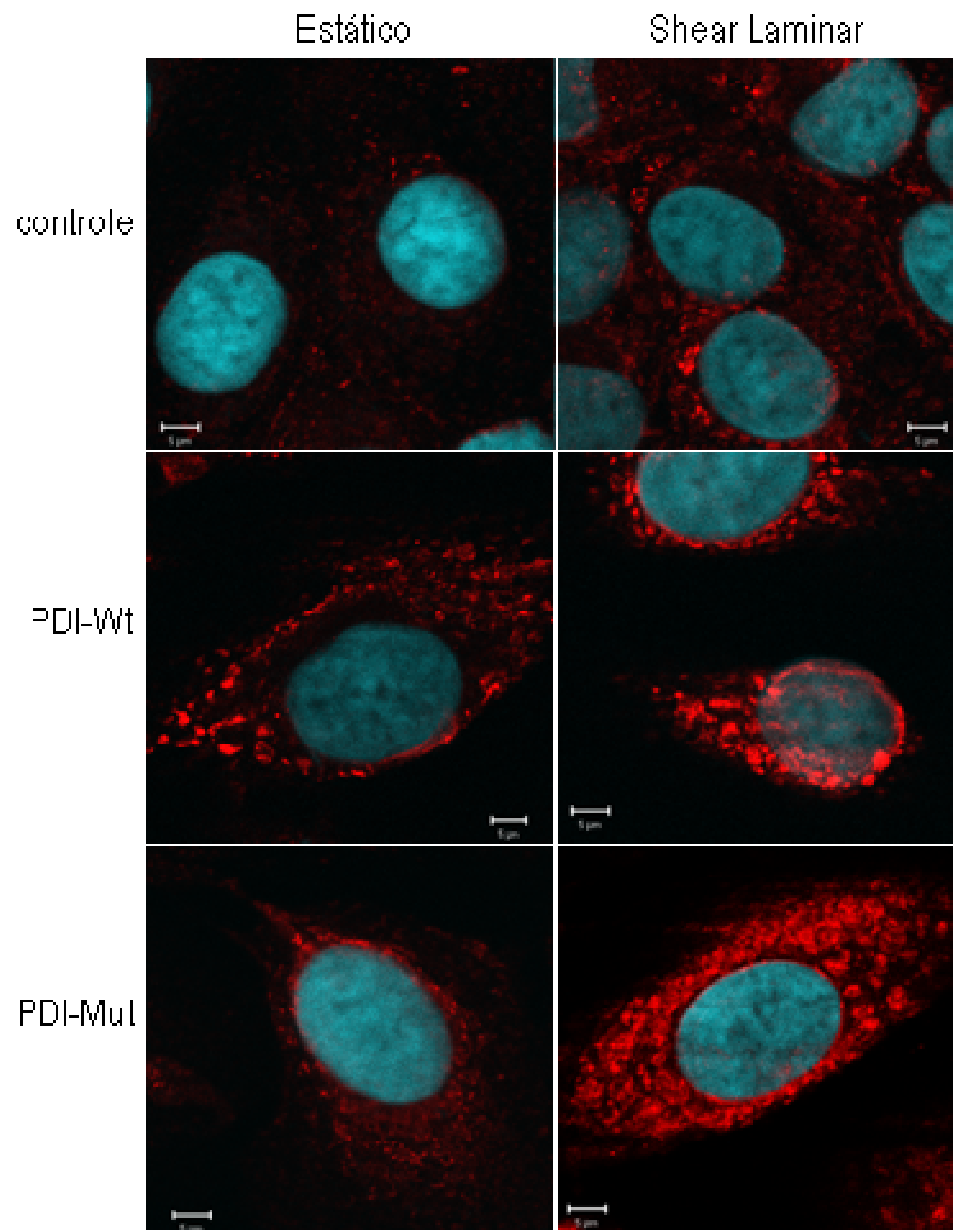


**Figura 26: Medida da atividade da NADPH oxidase após superexpressão de PDI selvagem (PDI-wt) ou mutada (PDI-mut).** VSMC transfectadas (transfecção transitória) foram estimuladas ou não com angiotensina II (ANG II, 100 nM, 4h). A fração de membrana (15 µg proteína total) destas células foi incubada com NADPH (300 µM) por 30 min em presença de DHE (50 µM), e a mediu-se a formação do produto 2-hidroxietídeo (A) ou em presença de reagente AmplexRed e acompanhou-se a absorbância a 575 nm (B), ambos em microplaca. O controle da transfecção foi analisado por expressão protéica da PDI e/ou c-myc (dado não mostrado). Os valores são média ± desvio padrão da média (n = 3).

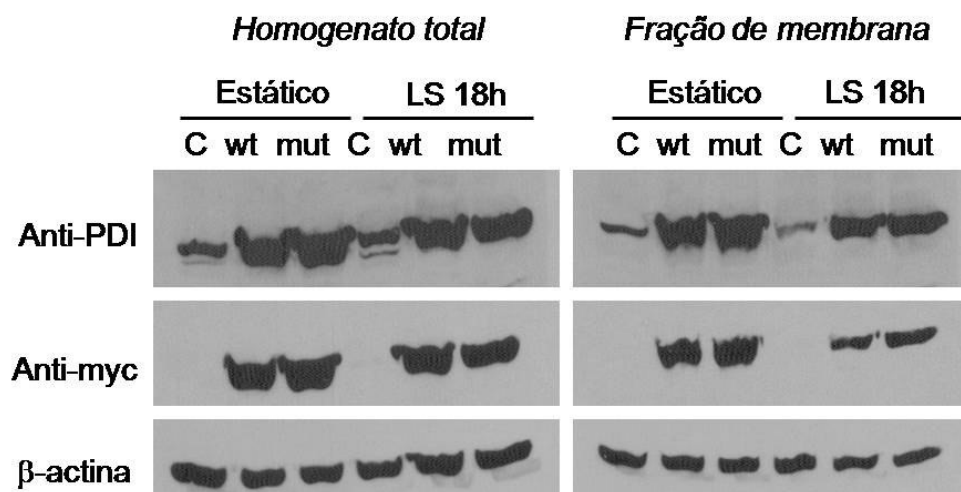
resultados do nosso laboratório, que mostram uma estreita relação entre PDI-Nox4, via migração da PDI para fração de membrana e aumento de estresse oxidativo em diferentes modelos de estudo em VSMC (Santos et al., 2006; Wosniak et al., 2006).

#### ***2.4. Envolvimento da PDI na manutenção dos níveis de óxido nítrico bioativo durante shear laminar***

Como parte da PDI está nitrosada durante o shear laminar sustentado, e esta modificação pós-traducional da PDI altera a atividade da NADPH oxidase vascular (Figuras 24 e 25B), investigamos o papel da PDI na produção de ROS durante o shear laminar. Para isso, transfectamos as RAEC com PDI-wt ou PDI-mut, e após 24h iniciamos o shear laminar. A microscopia confocal confirmou a eficiência da transfecção pela forte marcação da PDI nas células que foram transfectadas, tanto com anticorpo para PDI (Figura 27) quanto para c-myc, uma vez que as proteínas superexpressas contêm cauda c-myc na porção C-terminal (dado não mostrado). Importante, a distribuição celular da PDI superexpressa (wt ou mut) foi similar à da PDI endógena. A marcação difusa da PDI endógena na condição estática passou a granular após o shear laminar sustentado, principalmente após a superexpressão, o que sugere uma eventual translocação da PDI de regiões menos acessíveis a regiões mais expostas ao anticorpo, já que por western blot observamos uma menor expressão total da PDI após shear laminar sustentado (Figura 15), e/ou a perda da marcação da PDI que estaria presente em domínios lipídicos, que são perdidos



**Figura 27.** Distribuição da PDI após shear laminar em RAEC transfectadas com PDI selvagem (PDI-wt) ou PDI mutada (PDI-mut). Após shear laminar, as RAEC foram fixadas com paraformaldeído, marcadas com anticorpo anti-PDI e anticorpo secundário conjugado com o fluoróforo Alexa488 (Invitrogen). Imagens obtidas em microscópio confocal Zeiss LSM510 Meta, aumento = 400x, zoom = 4x.

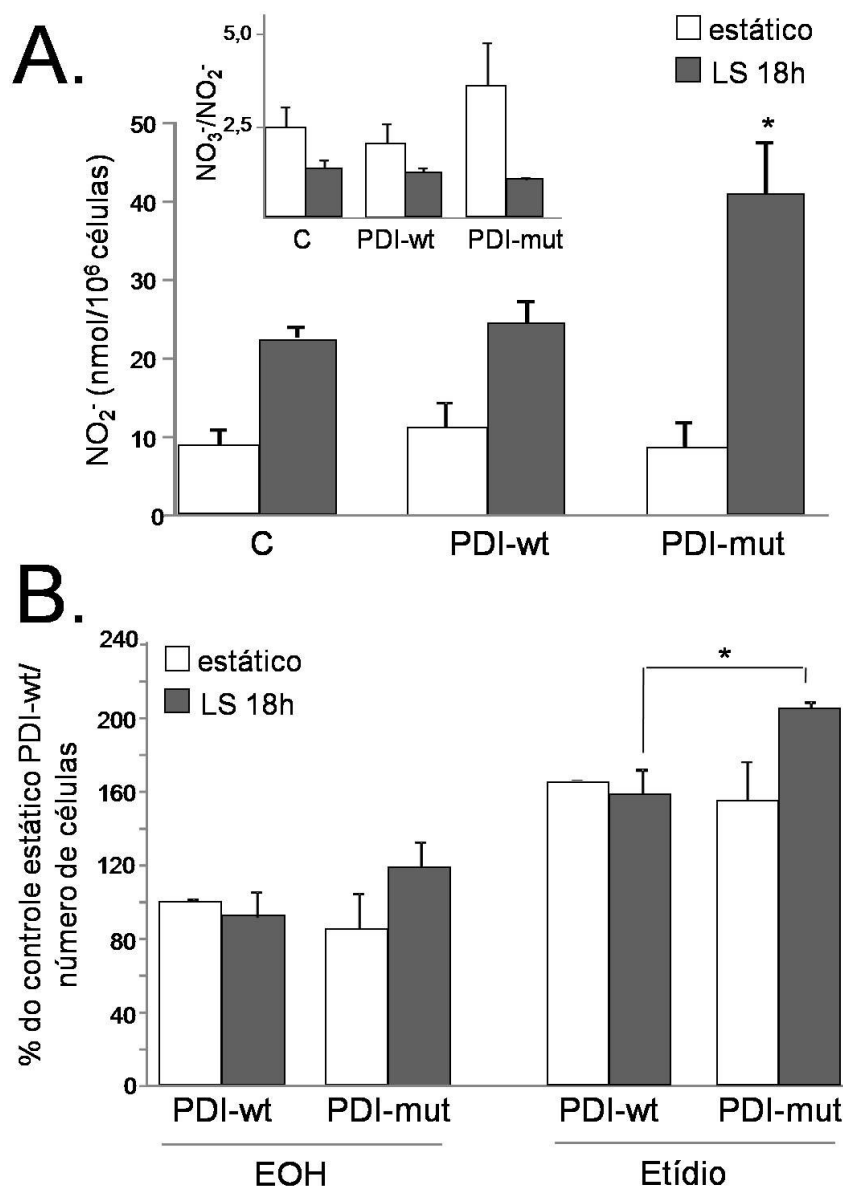


**Figura 28. Superexpressão da PDI selvagem (PDI-wt) ou PDI mutada (PDI-mut) nas RAEC após shear laminar sustentado.** Após 24h do procedimento de transfecção (por 8h em presença de 12 µg de plasmídeo) as RAEC foram submetidas a shear laminar por 18h e analisou-se a expressão da PDI nos extratos totais e na frações enriquecidas de membranas (fração “100.000 g”) por western blot.

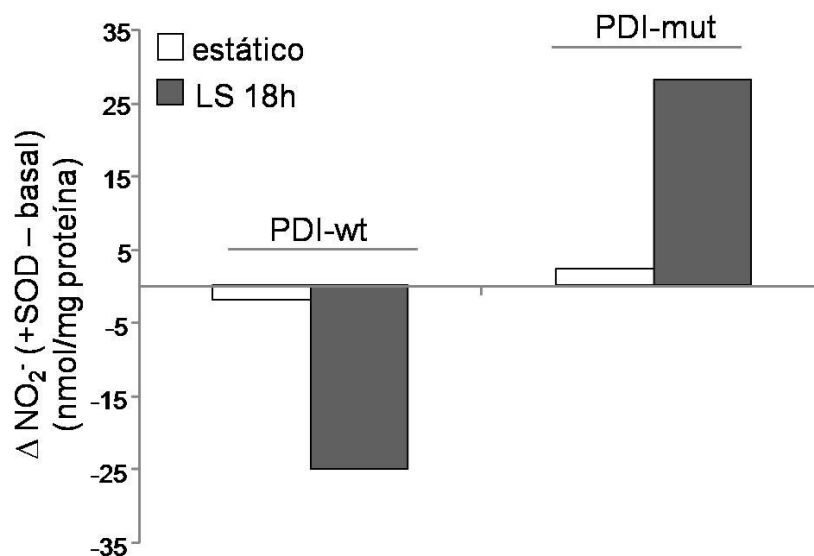
durante o processo de fixação para microscopia. Por western blot, também confirmamos a eficiência da transfecção pela análise da expressão da PDI, que aumentou cerca de duas vezes nas células transfectadas vs. células controle, tanto no extrato total quanto em fração de membrana (Figura 28).

O envolvimento da PDI na produção de  $\cdot\text{NO}$  durante o shear laminar fica claro na Figura 29. Com a superexpressão da PDI-mut observou-se maiores níveis de nitrito no meio de cultura, ao contrário das células transfectadas com PDI-wt, que não alterou a produção de  $\cdot\text{NO}$ . Como o óxido nítrico antagoniza os efeitos do radical superóxido *in vitro*, uma vez que a reação entre os dois radicais é da ordem de grandeza da difusão em soluções aquosas ( $k \sim 10^{10}$ , Radi et al., 2001), medimos a produção de ROS pela oxidação da DHE nestas células.

Surpreendentemente, ocorreu um aumento da produção de etídio nas células que superexpressavam PDI-mut vs. PDI-wt em cerca de 30% após shear laminar sustentado, enquanto observou-se uma tendência de aumento não significativa da produção de 2-EOH entre os mesmos grupos (Figura 29B). Um aumento simultâneo de ROS e  $\bullet$ NO implicaria na formação de espécies capazes de nitrar proteínas, especialmente peroxinitrito. É importante ressaltar que a PDI não parece modular a atividade da eNOS diretamente, uma vez que a PDI não formou complexos protéicos com a eNOS, conforme observado por experimentos de imunoprecipitação (IP: eNOS, IB: PDI) em condição estática e após shear laminar (dados não mostrado). Além disso, a adição de SOD (por co-transfecção ou adição das enzimas peguiladas horas antes de iniciar o shear laminar) resultou em efeitos opostos nos níveis de  $\bullet$ NO biativo entre PDI-wt e PDI-mut (Figura 30). O aumento dos níveis de nitrito em decorrência da presença de SOD observada nas células que superexpressavam PDI-mut era esperado, uma vez que a maior dismutação de superóxido, promoveria menor competição pelo  $\bullet$ NO. Entretanto, nas células tranfectadas com PDI-wt, a forte inibição promovida pela presença da SOD poderia sugerir um efeito potencial de ROS estimulando a fosforilação da eNOS e aumento da produção de óxido nítrico durante o shear laminar. Como este comportamento na produção de  $\bullet$ NO também foi observado em presença de catalase ou após 1h de shear laminar em presença de Peg-SOD (dados não mostrados), seria possível que o aumento nos níveis protéicos de PDI pela superexpressão teriam modulado indiretamente a produção de  $\bullet$ NO pela eNOS via fosforilação da eNOS mediada por ROS (ver Discussão do Capítulo II).



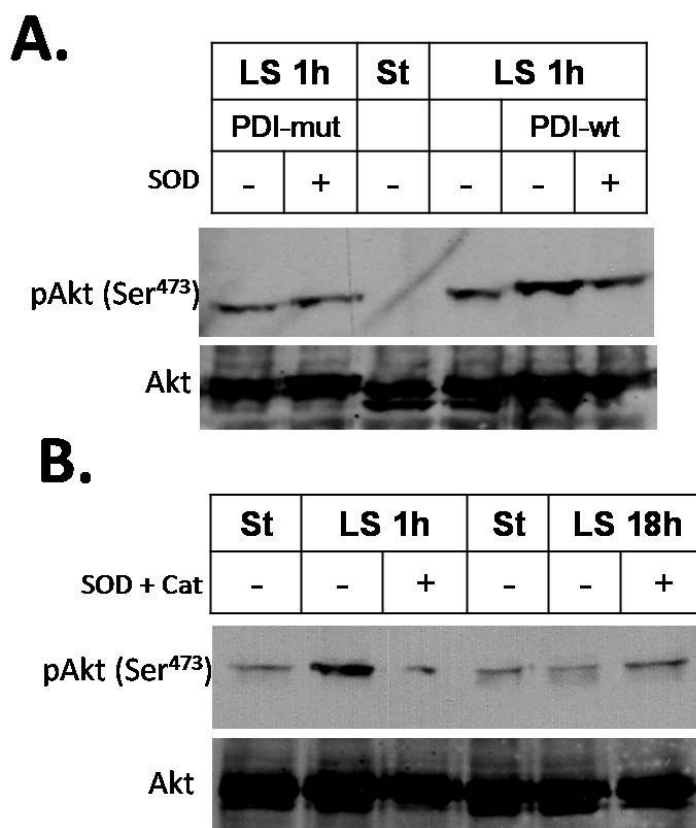
**Figura 29. Produção de óxido nítrico e ROS após shear laminar em RAEC transfectadas com PDI selvagem (PDI-wt) ou mutada (PDI-mut).** Após transfecção das RAEC (por 8h em presença de 12 µg de plasmídeo), as células foram submetidas ou não ao LS por 18h. A) Quantificação de nitrito no meio de cultura por analisador de NO. *Inserto:* Razão nitrato/nitrito. B) Quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio totais após shear laminar por 18h, através da medida da produção de 2-hidroxi-etídio (EOH) e etídio por HPLC. Após o shear laminar, as células foram incubadas com DHE por 30 min a 37°C, extraídas com acetonitrila, secas e analisadas por HPLC. Os valores são médias ± desvio padrão da média (n = 3). \* P < 0,05 vs. PDI-wt após shear; C = somente Lipofectamina®.



**Figura 30. Efeito da SOD na produção de óxido nítrico após shear laminar em RAEC transfetadas com PDI selvagem (PDI-wt) ou mutada (PDI-mut).** Quantificação de nitrito no meio de cultura por analisador de NO. Após co-transfecção das RAEC (por 8h em presença de 12  $\mu$ g de cada plasmídeo, PDI e SOD), as células foram submetidas ao LS por 18h. A eficiência da co-transfecção foi verificada por western blot (dado não mostrado).

A fim de medirmos de forma indireta a ativação da eNOS durante o shear laminar, escolhemos a clássica ativação da eNOS pelo shear laminar agudo da via PI3K/Akt/eNOS; a Akt uma vez fosforilada (Ser<sup>473</sup>), fosforila a eNOS (Ser<sup>1177</sup>) (Dimmler et al., 1999). Conforme Figura 31A, observamos um aumento da fosforilação da Akt nas células transfetadas com a PDI-wt enquanto que a PDI-mut não alterou a fosforilação da Akt em relação aos níveis basais das células não tranfectadas após 1h de shear laminar. Interessante, em presença de Peg-SOD houve redução da fosforilação da Akt promovida pela superexpressão da PDI-wt. Estes dados sugerem que, pelo menos durante o início do shear laminar, em que há aumento transiente da produção de ROS dependente da NADPH oxidase, as células

transfectadas com PDI-wt apresentam maior produção de  $\bullet$ NO, e possivelmente da atividade da NADPH oxidase, em linha com os dados obtidos com shear laminar sustentado para a PDI-mut (aumento concomitante de  $\bullet$ NO e ROS, Figura 29).



**Figura 31. Fosforilação da Akt após 1h de shear laminar.** A) Após transfecção das RAEC com PDI selvagem (PDI-wt) ou mutada (PDI-mut) (por 8h em presença de 12  $\mu$ g de plasmídeo), as células foram carenciadas por 12h, adicionou-se Peg-SOD (10 U/mL) 6h antes de iniciar o shear laminar. B) Após carenciamento (por 12h), adicionou-se Peg-SOD (10 U/mL) e Peg-Cat (50 U/mL) 6h antes de iniciar o shear. Em (A) e (B), após shear, as células foram lisadas e a fosforilação da Akt (Ser<sup>473</sup>) e a Akt total foram analisadas no homogenato protéico por western blot.



Entretanto, apesar de outros estímulos, como ANG II, ativarem a Akt via produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> via NADPH oxidase em células endoteliais (Cai et al., 2002), não há evidências sobre que regulação redox da fosforilação da Akt durante o shear laminar. Desta forma, realizamos o shear laminar em presença de SOD e catalase (ambas peguiladas) que de fato, inibiram a fosforilação da Akt observada após 1h do início do shear (Figura 31B). Conforme já reportado, é possível acompanhar a fosforilação da Akt até 1h após shear, que volta aos níveis basais com a manutenção do shear laminar (Go et al., 2001).

### 3. Discussão

Os resultados descritos neste capítulo mostram que a PDI exerce importante papel durante o shear laminar, controlando os níveis auto-regulados de  $\bullet$ NO. Esta atividade decorre do controle fino da regulação da atividade da NADPH oxidase, que por sua vez, exerce um balanço entre a atividade da eNOS e da produção de ROS. Os experimentos desenvolvidos inicialmente validaram o sistema cone-e-placa na aplicação de shear laminar em células endoteliais em cultura (Figuras 18 e 19), bem como confirmaram neste tipo celular importantes observações experimentais sobre a interação NADPH oxidase e PDI realizadas anteriormente em células musculares lisas e neutrófilos (Janiszewski et al., 2005; Silva et al., 2006) (Figuras 22 e 23).

A PDI parece estar associada diretamente à produção de ROS nas células endoteliais submetidas a shear laminar, uma vez que sua expressão é menor após 18h de shear, período em que há diminuição em 50% das ROS totais (Figura 19; Hwang et al., 2003), bem como migração da PDI para fração de membrana após 1h de shear, justamente quando ocorre maior produção de ROS, atribuída à isoforma Nox1 da NADPH oxidase (Figura 15; Hwang et al., 2003). É possível que a PDI durante o início do shear laminar se associe à Nox1 e promova sua migração à fração de membrana, ou que a PDI migre para regiões que contêm Nox1, como por exemplo, cavéolas (Hilenski et al., 2004; Ushio-Fukai, 2006), e se associe à Nox1, aumentando sua atividade. Experimentos de migração da PDI teriam que ser

realizados para confirmação destas hipóteses, mas este comportamento já foi descrito para a PDI durante a ativação da NADPH oxidase pela angiotensina II (Janiszewski et al., 2005). Quanto à mobilidade PDI durante o shear laminar sustentado, sua presença em frações mais densas que cavéolas (Figura 17) é sugestiva de microambientes da membrana plasmática como adesões focais, que em VSMC foram descritos contendo preferencialmente a isoforma Nox4 (Hilenski et al., 2004).

Em situação estática, verificamos a presença da PDI em frações menos densas que cavéolas (Figura 17), que podem ser corpos lipídicos, regiões ricas em lipídios sinalizadores. Durante o shear laminar sustentado é possível que ocorra mobilização dos corpos lipídicos, e desta forma a PDI migraria para outras regiões da membrana celular para desempenhar outras funções. Há uma forte associação entre a presença de corpos lipídicos e inflamação (Bozza e Bandeira-Melo, 2005), e, como o shear laminar sustentado diminui o estresse oxidativo (Figura 19; Hwang et al., 2003), pode ser que ocorra uma diminuição do eventual caráter inflamatório das células endoteliais; de qualquer maneira, o shear laminar também diminui a expressão de proteínas que contém a sequência KDEL, associadas ao estresse do retículo endoplasmático (Figura 21) (Sitia e Braakman, 2003; Schröder e Kaufman, 2005). Este último resultado em particular, está em linha com dados do grupo que mostram que em vasos submetidos a lesão por cateter balão, nos quais ocorre um acentuado estresse do retículo endoplasmático, há também um importante aumento de expressão proteica da PDI (dados não publicados).

Os dados obtidos *in vitro* com fração de membrana e células musculares lisas sugerem indiretamente que a interação funcional mais relevante da PDI ocorra com a isoforma Nox4 da NADPH oxidase; desta forma, regulando os níveis intracelulares de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. De fato, em diferentes modelos de estudo do nosso grupo nos quais ocorre migração da PDI para fração de membrana, existe um coincidente aumento do mRNA da Nox4 (Santos et al, 2006; Wosniak et al., 2006). Dentro deste raciocínio, a superexpressão induzida de PDI aumentaria o tráfego PDI/Nox4 para a fração de membrana, aumentando a atividade da NADPH oxidase (Figura 26). Aonde ocorre a associação PDI/Nox4, se no retículo endoplasmático ou na fração de membrana, ainda é desconhecido.

Os resultados obtidos com a superexpressão da PDI-mut e adição da PDI nitrosada à fração de membrana sugerem indiretamente que a regulação da NADPH oxidase por tióis redox seja mais relevante com a isoforma Nox1 (Figuras 25B e 26), cujo principal produto atribuído é o radical superóxido (Lassegue e Clempus, 2003). De fato, estudos *in vitro* realizados em paralelo aos descritos neste capítulo, mostraram efeitos opostos na atividade da NADPH oxidase basal vs. a atividade da NADPH oxidase estimulada por ANG II; tanto a adição de PDI nitrosada à fração de membrana quanto a superexpressão de PDI-mut em VSMC diminuíram a atividade da NADPH oxidase mediada por ANG II, um conhecido agonista da Nox1 em VSMC (dados não mostrados).

Ao iniciarmos os estudos em células, postulamos que a concentração intracelular de <sup>\*</sup>NO bioativo seria um balanço entre as atividades competitivas da eNOS e da NADPH oxidase, conforme o esquema abaixo (Figura 32). Entretanto, as

células transfectadas com PDI-wt não exibiram alterações nos níveis de  $\bullet\text{NO}$  bioativo em comparação às células não transfectadas (Figura 29A) e, apresentaram diminuição dos níveis de  $\bullet\text{NO}$  quando submetidas a shear laminar em presença de SOD (Figura 30). Estes dados, aliados a outros achados experimentais relacionados, sugerem uma regulação extremamente complexa e com forte potencial de ajustes controladores entre a produção de  $\bullet\text{NO}$  e ROS durante o shear laminar. Experimentos adicionais precisam ser realizados para o entendimento mecânico detalhado desta regulação, mas algumas hipóteses podem ser levantadas com base em trabalhos recentes e em linha com os resultados descritos. Interessante, o aumento simultâneo da produção de ROS e  $\bullet\text{NO}$ , via ativação da NADPH oxidase e da eNOS, já foi descrito em células endoteliais estimuladas com ANG II (Cai et al., 2002) e submetidas a shear oscilatório (Cai et al., 2004).



**Figura 32. Representação esquemática da hipótese inicial de estudo.** Durante o shear laminar, com aumento da atividade e expressão da eNOS, há aumento da produção de  $\bullet\text{NO}$ . Entretanto, os níveis de  $\bullet\text{NO}$  bioativo são determinados pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), de forma negativa. A PDI, por regular a atividade da NADPH oxidase (Nox), principal fonte de ROS em sistemas vasculares (Clempus e Griendling, 2006), contribuiria indiretamente na regulação do  $\bullet\text{NO}$  biodisponível.

O aumento de  $\bullet$ NO bioativo e de ROS associados à superexpressão da PDI-mut poderia ser conseqüência de um aumento da expressão/atividade da eNOS pela maior concentração intracelular de ROS, uma vez que a adição de  $H_2O_2$  exógena ou o aumento de  $H_2O_2$  intracelular durante o shear oscilatório aumentam a expressão de eNOS em células endoteliais (Drummond et al., 2000; Cai et al., 2004), apesar da maior expressão da eNOS durante o shear laminar ocorrer por vias independentes de  $H_2O_2$  (Drummond et al., 2000). Ainda, o estresse oxidativo crônico em camundongos transgênicos para  $p22^{phox}$  no músculo liso, causa aumento da expressão da eNOS, revertida quando estes animais são cruzados com camundongos transgênicos para catalase (Laude et al., 2004). O aumento da produção de  $\bullet$ NO nestes animais também aumentou a expressão da ecSOD; se o mesmo tiver ocorrido durante o shear laminar nas RAEC que superexpressavam a PDI-mut, talvez o aumento de etídio (Figura 29B) tenha sido reflexo do aumento de ROS e/ou da atividade peroxidásica da SOD (Capítulo I). Em tempo, como recentemente foi mostrado que a PDI associa-se à isoforma Cu,ZnSOD e inibe a formação de agregados protéicos in vivo (Atkin et al., 2006), talvez a superexpressão de PDI-mut tenha também alterado a atividade/conformação da SOD.

Em contrapartida, a mutação da PDI sustentaria a atividade da NADPH oxidase causando o aumento de ROS durante o shear laminar, em analogia ao efeito da PDI nitrosada exógena na atividade da NADPH oxidase in vitro (Figura 25B). A regulação da NADPH oxidase pela PDI durante o shear laminar deve ser complexa e envolver diversas vias de sinalização, que dependem do período do

estímulo mecânico (shear agudo vs. shear sustentado) (Hwang et al., 2003; Traub e Berk, 1998), do compartimento celular envolvido, uma vez que as isoformas Nox1 e Nox4 foram descritas em diferentes microambientes celulares (Hilenski et al., 2004; Ushio-Fukai, 2006), e da possível regulação diferenciada das Noxes pela PDI. Como já discutido acima, nossos dados sugerem indiretamente que a PDI deve regular funcionalmente a atividade basal da Nox4, e modular a atividade dependente de tióis redox da Nox1 (Figuras 25 e 26). Estudos recentes têm demonstrado que o complexo Nox4/p22<sup>phox</sup> produz constitutivamente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, enquanto que o produto da Nox1 seria o ânion radical superóxido (Ushio-Fukai, 2006; Lassegue e Clempus, 2003). Desta forma, a PDI poderia alterar, via regulação das duas isoformas da NADPH oxidase, a concentração estacionária de ROS com características bioquímicas bastante distintas, especialmente em relação à reatividade e difusibilidade, que são determinantes para a especificidade da ativação de vias de sinalização.

Outra hipótese para o aumento de <sup>•</sup>NO bioativo e de ROS pode ser uma eventual menor degradação e/ou maior transcrição gênica das Noxes associada à superexpressão da PDI-mut, e o acúmulo de ROS manteria a expressão/atividade da eNOS alta(s). Interessante, o óxido nítrico modula a atividade proteolítica do proteassoma em células endoteliais in vitro (Kotamraju et al., 2006), e a produção de <sup>•</sup>NO é necessária para a diminuição do mRNA das subunidades Nox2 e p47<sup>phox</sup> durante o shear laminar sustentado (Duerschmidt et al., 2006).

Finalmente, deve ser mencionado que sob certas situações, a produção de ROS pode induzir o desacoplamento da eNOS, com menor produção de <sup>•</sup>NO

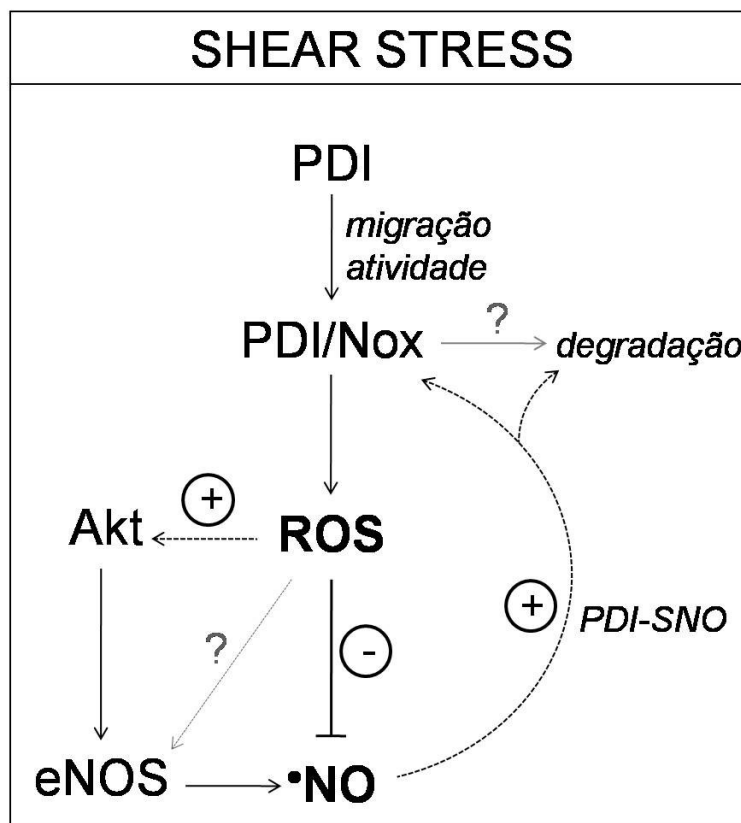
bioativo. A ocorrência deste fenômeno em nossos experimentos esta ainda em aberto.

A ativação da via PI3K/Akt/eNOS durante o shear laminar agudo é bem conhecida há anos; entretanto, é a primeira vez que se mostra que a regulação da Akt no início do shear é dependente de ROS (Figura 31B). Além do shear laminar, baixas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $\leq 100 \mu\text{M}$ ) ou estímulo com ANG II induzem a fosforilação da Akt em células endoteliais (Tanaka et al., 2005; Cai et al., 2002). A maior fosforilação da Akt nas células que superexpressam PDI-wt (Figura 31A) pode ser consequência de maior produção de ROS nesta primeira hora de shear laminar em relação à superexpressão da PDI-mut, especialmente pela PDI nitrosada (Figura 25). Ainda, como a fosforilação da Akt mediada pela H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é dependente de di-tióis reduzidos na superfície celular (Tanaka et al., 2005), e por ser a PDI uma das principais tiol proteínas expostas na membrana plasmática (Donoghue et al., 2000), a superexpressão da PDI-wt, ao contrário da PDI-mut, pode ter amplificado o sinal de ativação tiol-dependente da Akt. Vale notar que, durante a primeira hora de shear laminar, a PDI endógena transloca-se para a membrana celular (Figura 15); se esta migração relaciona-se com a ativação da Akt, ainda é desconhecido.

O papel da PDI nas vias de regulação da manutenção dos níveis de  $\bullet\text{NO}$  bioativo durante o shear laminar, discutido neste capítulo, está esquematizado na Figura 33. Em resumo, a PDI ao associar-se à(s) Nox(es), regula a atividade da NADPH oxidase, aumentando os níveis de ROS intracelulares. Em paralelo, o aumento de ROS aumenta a produção de  $\bullet\text{NO}$ , inicialmente via ativação redox da via Akt/eNOS e possivelmente pela nitrosação da PDI. Estes efeitos têm



provavelmente um curso temporal distinto, podem ocorrer em compartimentos diferentes da célula, podendo por sua vez envolver diferentes isoformas de Nox. Em conjunto terminam por constituir um sistema com duas alças de regulação opostas e balanceadas. A alça de regulação positiva envolve possivelmente a fosforilação de eNOS mediada via ROS. A alça de regulação negativa envolve possivelmente um aumento de ROS (talvez via PDI nitrosada), que compete pelo  $\bullet$ NO bioativo. Este modelo simplificado descreve um servo-mecanismo de controle fino dos níveis de  $\bullet$ NO bioativo durante o shear laminar, no qual a PDI tem um papel-chave em sua operação. A longo prazo, a PDI poderia ainda (talvez de modo dependente de  $\bullet$ NO) promover uma sub-regulação do sistema por meio da redução dos níveis de subunidades de Nox(es) e pela regulação da expressão da eNOS.



**Figura 33.** Representação esquemática de possíveis vias envolvidas mediadas pela PDI na manutenção dos níveis de óxido nítrico bioativo durante o shear laminar. Além das vias descritas neste diagrama, é importante considerar que diferentes Noxes implicam em diferentes compartimentos celulares, e possivelmente em envolvimento de ROS com diferentes reatividades/difusibilidades. Ainda, dependendo do tempo de shear laminar ao qual o endotélio for submetido, isto é, de forma aguda ( $\leq 1h$ ) ou sustentada ( $> 12h$ ), a produção de ROS pode ser decorrente da ativação de distintas Noxes.

#### 4. Conclusão

Nossos dados indicam um importante papel da PDI na regulação da biodisponibilidade do  $\bullet$ NO durante o shear laminar sustentado. Esta regulação é dependente dos tióis de seu sítio redox, da atividade do complexo da NADPH oxidase endotelial, e de vias de sinalização que ajustam o equilíbrio entre a produção de ROS e óxido nítrico (Figura 33). Ainda, nossos resultados sugerem o envolvimento preferencial da PDI na regulação da produção de  $H_2O_2$ . Durante o shear laminar sustentado, é possível que esta regulação ocorra em compartimentos celulares de densidade maior que cavéolas, como, por exemplo, adesões focais. Estes resultados levam à proposta um novo modelo de regulação do débito de  $\bullet$ NO durante shear stress, no qual a PDI tem papel central na operação de um servomecanismo envolvendo ROS derivadas do complexo NADPH oxidase.

## Referências bibliográficas

- Abrahamsson T, Brandt U, Marklund SL, Sjöqvist PO. Vascular bound recombinant extracellular superoxide dismutase type C protects against the detrimental effects of superoxide radicals on endothelium-dependent arterial relaxation. *Circ Res* 70: 264-271, 1992.
- Abumiya T, Sasaguri T, Taba Y, Miwa Y, Miyagi M. Shear Stress Induces Expression of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Flk-1/KDR Through the CT-Rich Sp1 Binding Site. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 907-913, 2002.
- Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 3203-3207, 1977.
- Atkin JD, Farg MA, Turner BJ, Tomas D, Lysaght JA, Nunan J, Rembach A, Nagley P, Beart PM, Cheema SS, Horne MK. Induction of the unfolded protein response in familial amyotrophic lateral sclerosis and association of protein-disulfide isomerase with superoxide dismutase 1. *J Biol Chem* 281: 30152-30165, 2006.
- Beckman JS, Minor RL Jr, White CW, Repine JE, Rosen GM, Freeman BA. Superoxide dismutase and catalase conjugated to polyethylene glycol increases endothelial enzyme activity and oxidant resistance. *J Biol Chem* 263: 6884-6892, 1988.
- Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1620-1625, 1990.
- Benov L, Szejnberg L, Fridovich I. Critical evaluation of the use of hydroethidine as a measure of superoxide anion radical. *Free Radic Biol Med*. 25:826-831, 1998.
- Berk C, Bradford C. Laminar Shear Stress. Mechanisms by Which Endothelial Cell Transduce an Atheroprotective Force. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18: 677-685, 1998.
- Bindokas VP, Jordan J, Lee CC, Miller RJ. Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine. *J Neurosci* 16:1324-1336, 1996.

- Bonini, MG, Radi R, Ferrer-Sueta G, Ferreira AM, Augusto O. Direct EPR Detection of the Carbonate Radical Anion Produced from Peroxynitrite and Carbon Dioxide J Biol Chem 274: 10802 – 10806, 1999.
- Bonini MG, Fernandes DC, Augusto O. Albumin oxidation to diverse radicals by the peroxidase activity of Cu,Zn-superoxide dismutase in the presence of bicarbonate or nitrite: diffusible radicals produce cysteinyl and solvent-exposed and -unexposed tyrosyl radicals. Biochemistry 43:344-51, 2004.
- Boyd NL, Park H, Yi H, Boo YC, Sorescu GP, Sykes M, Jo H. Chronic shear induces caveolae formation and alters ERK and AKT responses in endothelial cells. Am J Physiol Heart Circ Physiol 285: H1113-H1122, 2003.
- Bradley PP, Priebe DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. J Invest Dermatol 78: 206–209, 1982.
- Buonassisi V, Venter JC. Hormone and neurotransmitter receptors in an established vascular endothelial cell line. Proc Natl Acad Sci USA. 73:1612-1616, 1976.
- Cai H, Li Z, Dikalov S, Holland SM, Hwang J, Jo H, Dudley SC Jr, Harrison DG. NAD(P)H oxidase-derived hydrogen peroxide mediates endothelial nitric oxide production in response to angiotensin II. J Biol Chem 277: 48311-48317, 2002.
- Cai H, McNally JS, Weber M, Harrison DG. Oscillatory shear stress upregulation of endothelial nitric oxide synthase requires intracellular hydrogen peroxide and CaMKII. J Mol Cell Cardiol 37: 121-125, 2004.
- Caro CG, Fitz-Gerald JM, Schroter RC. Arterial wall shear and distribution of early atheroma in man. Nature 223: 1159-1160, 1969.
- Claiborne A, Yeh JI, Mallett TC, Luba J, Crane EJ 3rd, Charrier V, Parsonage D. Protein-sulfenic acids: diverse roles for an unlikely player in enzyme catalysis and redox regulation. Biochemistry 38: 15407-15416, 1999.

- Clempus RE, Griendling KK. Reactive oxygen species signaling in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 71: 216-225, 2006.
- Clempus RE, Sorescu D, Dikalova AE, Pounkova L, Jo P, Sorescu GP, Schmidt HH, Lassegue B, Griendling KK. Nox4 is required for maintenance of the differentiated vascular smooth muscle cell phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 42-8, 2007.
- Corson MA, James NL, Latta SE, Nerem RM, Berk BC, Harrison DG. Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circ Res* 79: 984-991, 1996.
- Cullen JP, Shariq S, Rebecca SS, Nicholas GT, Cahill PA, Sitzmann JV, Redmond EM. Pulsatile Flow-Induced Angiogenesis Role of Gi Subunit. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 1610-1616, 2002.
- De Keulenaer GW, Chappell DC, Ishizaka N, Nerem RM, Alexander RW, Griendling KK. Oscillatory and steady laminar shear stress differentially affect human endothelial redox state: role of a superoxide-producing NADH oxidase. *Circ Res* ;82: 1094-1101, 1998.
- Dimmeler S, Flemming I, Fisslthaler, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399: 601-605, 1999.
- Djordjevic T, Pogrebniak A, BelAiba RS, Bonello S, Wotzlaw C, Acker H, Hess J, Görlach A. The expression of the NADPH oxidase subunit p22phox is regulated by a redox-sensitive pathway in endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 38: 616-30, 2005.
- Donoghue N, Yam PT, Jiang XM, Hogg PJ. Presence of closely spaced protein thiols on the surface of mammalian cells. *Protein Sci* 9: 2436-2445, 2000.
- Drabkin D. Heme binding and transport – A spectrophotometric study of plasma glycoglobulin hemochromogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 68: 609-613, 1971.
- Drummond GR, Cai H, Davis ME, Ramasamy S, Harrison DG. Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by hydrogen peroxide. *Circ Res* 86: 347-354, 2000.
- Duerrschmidt N, Stielow C, Muller G, Pagano PJ, Morawietz H. NO-mediated regulation of NAD(P)H oxidase by laminar shear stress in human endothelial cells. *J Physiol* 576: 557-567, 2006.

- Facundo HT, Fornazari M, Kowaltowski AJ. Tissue protection mediated by mitochondrial K<sup>+</sup> channels. *Biochim Biophys Acta* 1762: 202-012, 2006.
- Fink B, Laude K, McCann L, Doughan A, Harrison DG, Dikalov S. Detection of intracellular superoxide formation in endothelial cells and intact tissues using dihydroethidium and an HPLC-based assay. *Am J Physiol Cell Physiol* 287: C895-C902, 2004.
- Fleming I, Gray GA, Schott C, Stoclet JC. Inducible but not constitutive production of nitric oxide by vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 200: 375-376, 1991.
- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376, 1980.
- Garbett NC, Hammond NB, Graves DE. Influence of the amino substituents in the interaction of ethidium bromide with DNA. *Biophys J* 87: 3974-3981, 2004.
- Garcia-Cardena G, Fan R, Shah V, Sorrentino R, Cirino G, Papapetropoulos A, Sessa WC. Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature* 392: 821-824, 1998.
- Gimbrone MA Jr, Topper JN, Nagel T, Anderson KR, Garcia-Cardena G. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Ann NY Acad Sci* 902: 230-239, 2000.
- Go YM, Park H, Maland MC, Darley-Usmar VM, Stoyanov B, Wetzker R, Jo H. Phosphatidylinositol 3-kinase gamma mediates shear stress-dependent activation of JNK in endothelial cells. *Am J Physiol* 275: H1898-1904, 1998.
- Go YM, Boo YC, Park H, Maland MC, Patel R, Pritchard KA, Fujio Y, Walsh K, Darley-Usmar V, Jo H. Protein kinase B/Akt activates c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase by increasing NO production in response to shear stress. *J Appl Physiol* 91: 1574-1581, 2001.
- Gratton JP, Bernatchez P, Sessa WC. Caveolae and caveolins in the cardiovascular system. *Circ Res* 94(11): 1408-1417, 2004.
- Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 86: 494-501, 2000.

- Guzik TJ, West NE, Black E, McDonald D, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM. Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. *Circ Res* 86: E85-90, 2000.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Londres, 2000, 3ª edição, Oxford University Press.
- Hendrickson RJ, Cappadona C, Yankah EN, Sitzmann JV, Cahill PA, Redmond EM. Sustained pulsatile flow regulates endothelial nitric oxide synthase and cyclooxygenase expression in co-cultured vascular endothelial and smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol* 31: 619-629, 1999.
- Heo J, Campbell SL. Ras Regulation by Reactive Oxygen and Nitrogen Species *Biochemistry*, 45: 2200-2210, 2006.
- Hilenski LL, Clempus RE, Quinn MT, Lambeth JD, Griending KK. Distinct subcellular localizations of Nox1 and Nox4 in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 677-683, 2004.
- Hoffman J, Dimmeler S, Haendeler J. Shear stress increases the amount of S-nitrosylated molecules in endothelial cells: important role for signal transduction. *FEBS Lett* 551: 153-158, 2003.
- Hwang J, Saha A, Boo YC, Sorescu GP, McNally JS, Holland SM, Dikalov S, Giddens DP, Griending KK, Harrison DG, Jo H. Oscillatory shear stress stimulates endothelial production of O<sub>2</sub><sup>-</sup> from p47phox-dependent NAD(P)H oxidases, leading to monocyte adhesion. *J Biol Chem* 278: 47291-47298, 2003.
- Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 9265-9269, 1987.
- Imlay JA, Fridovich I. Assay of metabolic superoxide production in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 266: 6957-6965, 1991.
- Inoue N, Ramasamy S, Fukai T, Nerem RM, Harrison DG. Shear stress modulates expression of Cu/Zn superoxide dismutase in human aortic endothelial cells. *Cir Res* 79: 32-37, 1996.



- Jaffrey SR, Erdjument-Bromage H, Ferris CD, Tempst P, Snyder SH. Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. *Nature Cell Biol* 3: 193–197, 2001.
- Janiszewski M, de Sousa HP, Liu X, Pedro Mde A, Zweier JL, Laurindo FR. Overestimation of NADH-driven vascular oxidase activity due to lucigenin artifacts. *Free Radic Biol Med* 32: 446-453, 2002.
- Janiszewski M, Lopes L, Carmo A, Lima T, Pedro M, Laurindo FR. Protein disulfide isomerase acts as a novel regulatory subunit of vascular smooth muscle cell NAD(P)H oxidase. *J Biol Chem* 280: 40813-40819, 2005.
- Jiang XM, Fitzgerald M, Grant CM, Hogg PJ. Redox control of exofacial protein thiols/disulfides by protein disulfide isomerase. *J Biol Chem* 274: 2416-2423, 1999.
- Jo H, Song H, Mowbray A. Role of NADPH oxidases in disturbed flow- and BMP4-induced inflammation and atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal* 8: 1609-1619, 2006.
- Kamiya A, Togawa T. Adaptive regulation of wall shear stress to flow change in the canine carotid artery. *Am J Physiol* 239: H14-21, 1980.
- Kohler TR, Kirkman TR, Kraiss LW, Zierler BK, Clowes AW. Increased blood flow inhibits neointimal hyperplasia in endothelialized vascular grafts. *Circ Res* 69: 1557-1565, 1991.
- Kotamraju S, Matalon S, Matsunaga T, Shang T, Hickman-Davis JM, Kalyanaraman B. Upregulation of immunoproteasomes by nitric oxide: potential antioxidative mechanism in endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 40: 1034-1044, 2006.
- Lassegue B, Clempus RE. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285: 277-297, 2003.
- Laude K, Cai H, Fink B, Hoch N, Weber DS, McCann L, Kojda G, Fukai T, Schmidt HH, Dikalov S, Ramasamy S, Gamez G, Griendling KK, Harrison DG. Hemodynamic and biochemical adaptations to vascular smooth muscle overexpression of p22phox in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288: H7-12, 2004.

- Laurindo F, Pedro MA, Barbeiro HV, Pileggi F, Carvalho MH, Augusto O, da Luz PL. Vascular free radical release. Ex vivo and in vivo evidence for a flow-dependent endothelial mechanism. *Circ Res* 74: 700-709, 1994.
- Laurindo F, Souza H, Pedro M, Janiszewski M. Redox aspects of vascular response injury. *Methods Enzymol* 37: 432-454. 2002.
- Leite PF, Danilovic A, Moriel P, Dantas K, Marklund S, Dantas AP, Laurindo FR. Sustained decrease in superoxide dismutase activity underlies constrictive remodeling after balloon injury in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 2197-2202, 2003.
- Leite PF, Liberman M, Sandoli de Brito F, Laurindo FR. Redox processes underlying the vascular repair reaction. *World J Surg* 28:331-336, 2004.
- Limoli CL, Rola R, Giedzinski E, Mantha S, Huang TT, Fike JR. Cell-density-dependent regulation of neural precursor cell function. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:16052-16057, 2004.
- Liu H, Colavitti R, Rovira II, Finkel T. Redox-dependent transcriptional regulation. *Circ Res* 97: 967-974, 2005.
- Martyn KD, Frederick LM, von Loehneysen K, Dianauer MC, Knaus UG. Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases. *Cell Signal* 18: 69-82, 2006.
- McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 244: 6049-6055, 1969.
- Miller FJ Jr, Gutterman DD, Rios CD, Heistad DD, Davidson BL. Superoxide production in vascular smooth muscle contributes to oxidative stress and impaired relaxation in atherosclerosis. *Circ Res* 82: 1298-1305, 1998.
- Miyakawa AA, de Lourdes Junqueira M, Krieger JE. Identification of two novel shear stress responsive elements in rat angiotensin I converting enzyme promoter. *Physiol Genomics* 17: 107-113, 2004.
- Muzaffar S, Shukla N, Angelini G, Jeremy JY. Nitroaspirins and morpholinonydonimine but not aspirin inhibit the formation of superoxide and the expression of gp91phox induced by

endotoxin and cytokines in pig pulmonary artery vascular smooth muscle cells and endothelial cells. *Circulation* 110: 1140-1147, 2004.

Nagel T, Resnick N, Dewey CF, Gimbrone MA. Vascular endothelial cells respond to spatial gradients in fluid shear stress by enhanced activation of transcription factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19: 1825-1834, 1999.

Noiva R. Protein disulfide isomerase: the multifunctional redox chaperone of the endoplasmic reticulum. *Semin Cell Dev Biol* 10: 481-493, 1999.

Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333: 664-666, 1988.

Papapostolou I, Patsoukis N, Georgiou CD. The fluorescence detection of superoxide radical using hydroethidine could be complicated by the presence of heme proteins. *Anal Biochem* 332: 290-298, 2004.

Patsoukis N, Papapostolou I, Georgiou CD. Interference of non-specific peroxidases in the fluorescence detection of superoxide radical by hydroethidine oxidation: a new assay for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Anal Bioanal Chem* 381: 1065-1072, 2005.

Quijano C, Alvarez B, Gatti RM, Augusto O, Radi R. Pathways of peroxynitrite oxidation of thiol groups. *Biochem J* 322: 167-173, 1997.

Radi R, Peluffo G, Alvarez MN, Naviliat M, Cayota A. Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Radic Biol Med* 30: 463-488, 2001.

Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, Harrison DG. Angiotensin II mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest* 97: 1916-1923, 1996.

Ramachandran N, Root P, Jiang XM, Hogg PJ, Mutus B. Mechanism of transfer of NO from extracellular S-nitrosothiols into the cytosol by cell-surface protein disulfide isomerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 9539-9544, 2001.

- Robinson J, Coope JM. Method of determining oxygen concentrations in biological media, suitable for calibration of the oxygen electrode. *Anal Biochem* 33: 390-399, 1970.
- Robinson KM, Janes MS, Pehar M, Monette JS, Ross MF, Hagen TM, Murphy MP, Beckman JS. Selective fluorescent imaging of superoxide in vivo using ethidium-based probes. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 15038-15043, 2006.
- Rutkowski DT, Arnold SM, Miller CN, Wu J, Li J, Gunnison KM, Mori K, Akha AA, Raden D, Kaufman RJ. Adaptation to ER Stress Is Mediated by Differential Stabilities of Pro-Survival and Pro-Apoptotic mRNAs and Proteins. *PLoS Biol* 4: e374, 2006.
- Santos CX, Anjos EI, Augusto O. Uric acid oxidation by peroxynitrite: multiple reactions, free radical formation, and amplification of lipid oxidation *Arch Biochem Biophys* 372: 285-294, 1999.
- Santos CX, Murata, V, Pescatore LA, Thiesen K, Laurindo FR. Protein disulfide isomerase (PDI)/NAD(P)H oxidase interaction is a pathway bridging the unfolded protein reaction (UPR) to oxidative stress in vascular smooth muscle cells (VSMC). In *Cold Spring Harb Mol Chaperones & Heat Shock Response* 162, 2006.
- Santos CX, Takemoto PVA, Lopes L, Amanso AM, Sousa EB, Pimenta D, Goto H, Laurindo FR. Protein disulfide isomerase (PDI) is required for efficient *Leishmania* phagocytosis. (em preparação)
- Saville B. A scheme for the colorimetric determination of microgram amounts of thiols. *Analyst* 83: 670– 672, 1958.
- Silva ACB, Veríssimo S, Frey GP; Janiszewski M, Carmo AO, Santos CXC, Laurindo FRM, Lopes LR. Protein disulfide isomerase: a novel regulatory protein of neutrophil NAD(P)H oxidase. Em *Programa e Resumos da XXXV Reunião Anual da SBBq*, 2006.
- Sitia R, Braakman I. Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory. *Nature* 426: 891-894, 2003.
- Sliskovic I, Raturi A, Mutus B. Characterization of the S-denitrosation activity of protein disulfide isomerase. *J Biol Chem* 280: 8733-8741, 2005.

- Song KS, Li Shengwen, Okamoto T, Quilliam LA, Sargiacomo M, Lisanti MP. Co-purification and direct interaction of Ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains. Detergent-free purification of caveolae microdomains. *J Biol Chem* 271: 9690-9697, 1996.
- Stéphanie L, Tedgui A. Cellular mechanics and gene expression in blood vessels. *J Biomech* 36: 631–643, 2003.
- Szocs K, Lassegue B, Sorescu D, Hilenski LL, Valppu L, Couse TL, Wilcox JN, Quinn MT, Lambeth JD, Griending KK. Upregulation of Nox-based NAD(P)H oxidases in restenosis after carotid injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 21-27, 2002.
- Tanaka T, Nakamura H, Yodoi J, Bloom ET. Redox regulation of the signaling pathways leading to eNOS phosphorylation. *Free Radic Biol Med* 38: 1231-1242, 2005.
- Taniyama Y, Griending KK. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension* 42: 1075-1081, 2003.
- Tarpey MM, Wink DA, Grisham MB. Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286: R431-444, 2004.
- Teixeira HD, Schumacher RI and Meneghini R. Lower intracellular hydrogen peroxide levels in cells overexpressing CuZn-superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7872 - 7875, 1998.
- Traub O, Berk BC. Laminar shear stress: mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18: 677-685, 1998.
- Uehara T, Nakamura T, Yao D, Shi ZQ, Gu Z, Ma Y, Masliah E, Nomura Y, Lipton SA. S-nitrosylated protein-disulphide isomerase links protein misfolding to neurodegeneration. *Nature* 441: 513-517, 2006.
- Ushio-Fukai M. Localizing NADPH oxidase-derived ROS. *Sci STKE* 22:re8, 2006.
- Vásquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martásek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, Tordo P, Pritchard KA Jr. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 9220-9925, 1998.

- Wentzel JJ, Kloet J, Andhyiswara I, Oomen JA, Schuurbiens JC, de Smet BJ, Post MJ, de Kleijn D, Pasterkamp G, Borst C, Slager CJ, Krams R. Shear-stress and wall-stress regulation of vascular remodeling after balloon angioplasty: effect of matrix metalloproteinase inhibition. *Circulation* 104: 91-6, 2001.
- Zai A, Rudd MA, Scribner AW, Loscalzo J. Cell-surface protein disulfide isomerase catalyzes transnitrosation and regulates intracellular transfer of nitric oxide. *J Clin Invest* 103: 393-399, 1999.
- Zamir E, Geiger B. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *Journal of Cell Science* 114: 3583-3590, 2001.
- Zapun A, Creighton TE, Rowling PJ, Freedman RB. Folding in vitro of bovine pancreatic trypsin inhibitor in the presence of proteins of the endoplasmic reticulum. *Proteins* 14: 10-15, 1992.
- Zhao H, Kalivendi S, Zhang H, Joseph J, Nithipatikom K, Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B. Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. *Free Radic Biol Med* 34: 1359-1368, 2003.
- Zhao H, Joseph J, Fales HM, Sokoloski EA, Levine RL, Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B. Detection and characterization of the product of hydroethidine and intracellular superoxide by HPLC and limitations of fluorescence. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 5727-5732, 2005.
- Zielonka J, Zhao H, Xu Y, Kalyanaraman B. Mechanistic similarities between oxidation of hydroethidine by Fremy's salt and superoxide: stopped-flow optical and EPR studies. *Free Radic Biol Med* 39: 853-863, 2005.
- Zielonka J, Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B. The confounding effects of light, sonication, and Mn(III)TBAP on quantitation of superoxide using hydroethidine. *Free Radic Biol Med* 41: 1050-1057, 2006.

## **CURRICULUM VITAE**

Denise de Castro Fernandes

Nascimento: 11 de maio de 1977, São Paulo

### **Formação**

Pós-Graduação – Doutorado (2004-2007)

Área: Ciências Biológicas – Cardiologia

Orientação: Prof. Dr. Francisco Rafael Martins Laurindo

Instituição: Faculdade de Medicina – Instituto do Coração – USP

Pós-Graduação – Mestrado (2001-2004)

Área: Ciências Biológicas – Bioquímica

Orientação: Profa. Dra. Ohara Augusto

Instituição: Departamento de Bioquímica – Instituto de Química – USP

Graduação (1995-1998)

Curso: Bacharelado em Química

Habilitação: Biotecnóloga

Instituição: Instituto de Química – USP

### **Ocupação**

Bolsista – Doutorado (início: 2004)

Agência Financiadora: FAPESP

Orientação: Prof. Dr. Francisco Rafael Martins Laurindo

Instituição: Faculdade de Medicina – Instituto do Coração – USP

Biotecnóloga, Seção Vacinas Aeróbias/Anaeróbias (2003-2004)

Fundação Butantan

Vacinas contra Coqueluche, Difteria e Tétano – Instituto Butantan

Bolsista – Mestrado (2001-2003)

Agência Financiadora: FAPESP

Orientação: Profa. Dra. Ohara Augusto

Instituição: Departamento de Bioquímica – Instituto de Química – USP

Analista Química, Unidade de Cromatografia (1999-2001)

FUNCAMP – Fundação de Desenvolvimento da UNICAMP

Laboratório Nacional de Análises Luiz Angerami

Bolsista – Iniciação Científica (1997-1999)

Agência Financiadora: FAPESP

Orientação: Profa. Dra. Martha Massako Tanizaki

Instituição: Centro de Biotecnologia – Instituto Butantan

### **Publicações**

Laurindo FR, Fernandes DC, Santos CX. Assessment of superoxide production and NADPH oxidase activity by HPLC analysis of dihydroethidium oxidation products. *Methods in Enzymology*, in press, 2007.

Laurindo FR, Fernandes DC, Amanso AM, Lopes LR, Santos CX. Novel role of protein disulfide isomerase in the regulation of NADPH oxidase activity: pathophysiological implications in vascular diseases. *Antiox Redox Signal*, in press, 2007.

Ceravolo GS, Fernandes L, Munhoz CD, Fernandes DC, Tostes RC, Laurindo FR, Scavone C, Fortes ZB, Carvalho MH. Angiotensin II chronic infusion induces B1 receptor expression in aorta of rats. *Hypertension* 50: 756-761, 2007.



Fernandes DC, Wosniak J, Pescatore LA, Bertoline MA, Liberman M, Laurindo F. Analysis of dihydroethidium-derived oxidation products by HPLC in the assessment of superoxide production and NADPH oxidase activity in vascular systems. *Am J Physiol Cell Physiol*, 292: 413-422, 2007.

Fernandes DC, Medinas DB, Alves MJ, Augusto O. Tempol diverts peroxyxynitrite/carbon dioxide reactivity toward albumin and cells from protein-tyrosine nitration to protein-cysteine nitrosation. *Free Radic Biol Med* 38: 189-200, 2005.

Bonini MG, Fernandes DC, Augusto O. Albumin oxidation to diverse radicals by the peroxidase activity of Cu,Zn-superoxide dismutase in the presence of bicarbonate or nitrite: diffusible radicals produce cysteinyl and solvent-exposed and -unexposed tyrosyl radicals. *Biochemistry* 43: 344-351, 2004.

### **Distinções**

Young Investigator – Travel Award, 14th Annual Meeting of Society for Free Radicals in Biology and Medicine, com o trabalho intitulado: “Protein Disulfide Isomerase is involved in the redox regulation of nitric oxide output during laminar shear stress in endothelial cells”, Washington, EUA, 2007.

Travel Award – V Meeting Society for Free Radicals in Biology and Medicine - South American Group, com o trabalho intitulado: “Protein Disulfide Isomerase is involved in the redox regulation of nitric oxide output during laminar shear stress in endothelial cells”, Montevideo, Uruguai, 2007.

Prêmio SBBq - XXXV Reunião Anual da SBBq, com o trabalho intitulado: “Protein disulfide isomerase modulates reactive oxygen species production in endothelial

cells submitted to laminar shear stress: role of NADPH oxidase and eNOS”, Lindóia, MG, 2006.

Young Investigator – Travel Award, 12<sup>th</sup> Annual Meeting of Society for Free Radicals in Biology and Medicine, com o trabalho intitulado “Assessment of superoxide production and NADPH oxidase activity in vascular cells or tissue: usefulness and confounding factors of HPLC analysis of DHE-derived oxidation products”, Austin, TX, 2005.

Young Investigator – Travel Award, 10<sup>th</sup> Annual Meeting of Society for Free Radicals in Biology and Medicine, com o trabalho intitulado “Tempol diverts peroxynitrite reactivity towards albumin and cells from protein nitration to protein nitrosation”, Seattle, WA, 2003.

#### **Apresentações orais em congressos**

14th Annual Meeting of SFRBM, com o trabalho intitulado: “Protein Disulfide Isomerase is involved in the redox regulation of nitric oxide output during laminar shear stress in endothelial cells”, Washington, EUA, 2007.

Scientific Session 2007, American Heart Association, com o trabalho intitulado: “Protein Disulfide Isomerase is involved in the redox regulation of nitric oxide output during laminar shear stress in endothelial cells”, Orlando, EUA, 2007.

IV South American SFRBM Meeting, com o trabalho intitulado: “Dihydroethidium oxidation by vascular NADPH oxidase: implications for assessment of ROS production in vascular systems”, Águas de Lindóia, Brasil, 2005.

# Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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