EDILENE DE SOUZA COSTA

**Efeito da proteína dissulfeto isomerase na ativação do
receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR)
durante o desenvolvimento da hipertensão arterial.
Papel da Nox1 NADPH Oxidase**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção
do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2015

EDILENE DE SOUZA COSTA

**Efeito da proteína dissulfeto isomerase na ativação do receptor do
fator de crescimento epidermal (EGFR) durante o
desenvolvimento da hipertensão arterial. Papel da Nox1 NADPH
Oxidase**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa.Dra. Lucia Rossetti Lopes

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Costa, Edilene de Souza.

Efeito da proteína dissulfeto isomerase (PDI) na ativação do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) durante o desenvolvimento da hipertensão arterial. Papel da Nox1 NADPH oxidase / Edilene de Souza Costa. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Lucia Rossetti Lopes.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Sinalização redox.

Versão do título para o inglês: The effect of protein disulfide isomerase on the activation of epidermal growth factor receptor (EGFR) during the development of hypertension. Role of Nox1 NADPH oxidase.

1. Proteína dissulfeto isomerase (PDI) 2. Células musculares lisas vasculares (CMLV) 3. NADPH - oxidase 4. Receptor do fator de crescimento epidermal 5. Hipertensão arterial 6. Sinalização redox
I. Lopes, Profa. Dra. Lucia Rossetti II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB0177/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Edilene de Souza Costa.

Título da Dissertação: Efeito da proteína dissulfeto isomerase (PDI) na ativação do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) durante o desenvolvimento da hipertensão arterial. Papel da Nox1 NADPH oxidase.

Orientador(a): Profa. Dra. Lucia Rossetti Lopes.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

(☐) **Aprovado(a)**

(☐) **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB II - 05508-000
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icc.usp.br

Decl. CEUA.083/2015

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 111/14/CEUA, datado de 04/11/2014, e por solicitação da Profa. Dra. **Lúcia Rossetti Lopes**, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão da aluna **Edilene Costa** ao Projeto de Pesquisa "*Papel da proteína dissulfeto isomerase (PDI) na ativação do EGFR e regulação da expressão e atividade da NADPH oxidase em células musculares lisas vasculares*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 25 de setembro de 2015.

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
Coordenador da CEUA-ICB/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA.045.12

WTL/mcgn

São Paulo, 16 de maio de 2012.

REF.: Protocolo nº 013/09.

"Papel da proteína dissulfeto isomerase na regulação da atividade da NADPH oxidase em animais espontaneamente hipertensos (SHR)".

Prezada Professora,

Informo que a sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, **foi prorrogada até 20.02.2015.**

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA/ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador - CEUA-ICB/ /USP

Ilma.Sra.

Profa. Dra. Lucia Rossetti Lopes
Departamento de Farmacologia
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

O Senhor é meu pastor e nada me faltará.

(Salmo 23 – Bíblia Sagrada)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ser a base das minhas conquistas, ações e caminhos, e por estar sempre à minha frente.

A professora Lucia Rossetti Lopes, pelo suporte para que eu pudesse concluir meu mestrado, por abrir as portas do seu laboratório e por participar do meu crescimento profissional. Obrigada!

Aos meus pais Clarice e Salomão, aos meus irmãos Lucas, Felipe, Escarlet, Claudia e Edneia pelo apoio e carinho. MUITO OBRIGADA!

Ao meu marido Tanaka por estar sempre ao meu lado, me oferecendo sua compreensão, carinho, confiança e amor. Muito obrigada pelos sábios conselhos, por respeitar as minhas aflições e compartilhar os meus sonhos e vitórias. Agradeço a sua paciência e seu imenso incentivo, sempre.

Aos professores do departamento de farmacologia e Fisiologia do ICB I-USP pela atenção, contribuição acadêmica e por acompanharem o meu aprendizado. Obrigada pela disposição e compreensão.

Ao Sidney Verissimo Filho pela paciência e amizade. Suas palavras de incentivo e principalmente ao seu profissionalismo, pois fizeram uma grande diferença em minha caminhada!

Aos funcionários do departamento de farmacologia, agradeço o apoio quando necessário e principalmente pela paciência. Agradeço em especial a Mônica, Mirian, Camila e dona Tereza. Vocês são muito especiais!! Obrigada por tudo, de coração.

Em especial as minhas amigas, Josiane Nascimento, Priscilla Marys Costa dos Santos e Milene Rodrigues Malheiros Lima, pelo incentivo sempre presente e principalmente por aceitar o desafio de enfrentar comigo esta batalha, pois vocês fizeram parte de cada segundo. Obrigada!!!!!!

Ao prof. Vagner Antunes, por acompanhar o meu aprendizado, com muita competência, atenção e humildade.

Profa. Patrícia Pereira Coltri, por sua valiosa contribuição e por depositar confiança na minha pessoa.

Aos meus colaboradores:

Prof. Vagner Antunes, Profa. Patricia Pereira Coltri, Sidney Veríssimo Filho, Josiane Nascimento, Milene Rodrigues Malheiros Lima, Guilherme Henrique Gatti da Silva, por seus esclarecimentos e ajuda na análise deste trabalho.

A todos que contribuíram, fica expressa aqui a minha gratidão.

Dedicatória

Dedico esse trabalho a você *Masahiro Tanaka*, meu amor.

O mérito desta conquista também é seu, com certeza eu não conseguiria atingir este objetivo se você não me incentivasse como você incentiva, se não me fizesse rir em todos momentos em que estive triste, se não me acalmasse quando eu estive a ponto de explodir!!!!

É muito bom saber que, nesses 13 anos, os meus sonhos também foram os seus, e que você sempre esteve presente para aplaudir e admirar cada conquista.

Agradeço imensamente a sua paciência e compreensão e, principalmente, o seu amor em todos os segundos da minha vida.

Obrigada por fazer parte da minha vida. MEU AMOR!

RESUMO

Costa ES. Efeito da Proteína Dissulfeto Isomerase (PDI) na ativação do Fator de Crescimento Epidermal (EGFR) durante a hipertensão arterial. Papel da Nox-1 NADPH oxidase. estudos *in-vivo* e *in-vitro*. [dissertação (Mestrado em farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

Recentemente o nosso grupo identificou a proteína dissulfeto isomerase (PDI), uma ditiol dissulfeto oxidoreductase, chaperona do retículo plasmático, como uma proteína capaz de se associar e regular a ativação da NADPH oxidase vascular. Estudos anteriores do nosso grupo caracterizaram o envolvimento da PDI na modulação da geração de EROs pela Nox1 como moduladores da migração de células do músculo liso vascular (VSMC) mediados por fatores de crescimento derivados de plaqueta (PDGF). Outros estudos vêm demonstrando o envolvimento do fator de crescimento epidermal (EGFR) no remodelamento vascular, após a transativação via Angiotensina II. Entretanto o papel do PDI na ativação do EGFR modulado por Nox1 na hipertensão arterial ainda permanece desconhecido. O objetivo do presente estudo foi caracterizar o papel da proteína dissulfeto isomerase (PDI) sobre a expressão de Nox1 dependente do EGFR durante o desenvolvimento da hipertensão arterial. Os resultados demonstram um aumento da expressão de HB-EGF e ativação de ERK 1/2 na aorta de animais SHR com 8 semanas de idade e 12 semanas de idade, respectivamente, e no plasma de animais SHR com 12 semanas. Ainda, a transfecção da PDI acarretou em um aumento na expressão gênica de Nox-1 tanto na sua forma selvagem (OVXPDI) quanto na forma com as 4 cisteínas do sítio redox mutadas (OvxPDIMUT). Este efeito foi reduzido na presença do inibidor da Nox e do EGFR (AG1478). A expressão da Nox1 induzida pela PDI durante a ativação do EGFR foi reduzida pela mutação das cisteínas do sítio ativo da PDI. Desta forma, nossos resultados mostram um novo papel da PDI associado a modulação da expressão gênica de Nox-1 via EGFR e sugerem a participação desta tiol oxido redutase na disfunção vascular associada ao desenvolvimento da hipertensão arterial.

Palavras-chave: Proteína dissulfeto isomerase. Células musculares lisas vasculares. NADPH oxidase. Receptor do fator de crescimento epidermal EGFR. Hipertensão arterial. Sinalização redox.

ABSTRACT

Costa ES. The effect of Protein Disulfide Isomerase in the activation of the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) during arterial hypertension. Role of Nox-1 NADPH oxidase. studies or research *in-vivo* and *in-vitro*. [dissertation (Master's degree in pharmacology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

Recently, our group has identified a novel role for Protein Disulfide Isomerase (PDI), a Thiol-disulfide oxidoreductase, a chaperone of the endoplasmic reticulum, in the activation of NADPH vascular oxidase. Our group's previous studies featured the involvement of PDI, in regulating Nox1 activity and the migration of vascular smooth muscle cells (VSMC) mediated by growth factors, such as platelet derived growth factor (PDGF). Other studies have demonstrated the involvement of the epidermal growth factor (EGFR) in vascular remodeling induced by angiotensin II. However, the role of the PDI in the activation of EGFR and expression of Nox1 in arterial hypertension is still unknown. We therefore investigated the role of the protein disulfide isomerase (PDI) in the EGFR induced expression of Nox1 during the development of hypertension. Results show an increase of HB-EGF ligands and ERK 1/2 activation in the aorta of 8 and 12 week-old SHR. This was followed by an increase of this ligand in the plasma of 12-week-old SHR. Furthermore, the transfection of PDI caused an increase in the genic expression of Nox-1, in both groups PDI WT and PDI mutated in the 4 redox active site cysteines. This effect was reduced in the presence of the EGFR inhibitor AG1478. The transfection of the mutated PDI reduced the expression of Nox1 induced by PDI during EGFR activation. These results are suggestive of a role for PDI's redox active cysteines in the expression of Nox1 induced by EGFR activation. Altogether, our results show a novel role for PDI in the modulation of Nox1 gene expression by EGFR, which could contribute to vascular dysfunction and hypertension development.

Keywords: Protein Disulfide Isomerase. Vascular smooth muscle cells. NADPH oxidase. Epidermal Growth Factor Receptor EGFR. Arterial hypertension. Redox signaling.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Representação estrutural e molecular da família NADPH oxidase.....	17
Figura 2 Diagrama estrutural da PDI.....	19
Figura 3 Estrutura molecular do EGFR.....	22
Figura 4 Possível papel da PDI na ativação do EGFR na vasculatura.....	23
Figura 5 Fotomicrografias da cultura de CMLV.....	29
Figura 6 Identificação do sítio de clonagem da PDI.....	30
Figura 7 Ensaio experimental para quantificação da expressão gênica de Nox-1 induzida pela PDI e PDI MUT.....	31
Figura 8 Análise de medida direta de pressão arterial dos animais wistar e SHR.....	36
Figura 9 Expressão do HB-EGF na aorta torácica e no plasma de ratos Wistar e SHR durante o desenvolvimento da hipertensão arterial.....	38
Figura 10 Efeito da ang II nas alterações vasculares moduladas pela transativação do EGFR.....	40
Figura 11 Análise da superexpressão da PDI e PDIMUT em CMLV de aorta torácica de ratos Wistar.....	42
Figura 12 Efeito da superexpressão da PDI e PDIMUT sobre a expressão gênica de Nox1 em CMLV de aorta torácica de ratos Wistar.....	44
Figura 13 Efeito da ativação do EGFR e da NADPH oxidase sobre a expressão gênica de Nox1 após a superexpressão da PDI em CMLV da aorta torácica de ratos Wistar.....	45
Figura 14 Efeito da inibição do EGFR sobre a expressão gênica de Nox1 após a superexpressão da PDI em CMLV da aorta torácica de ratos Wistar.....	46
Figura 15 Papel das cisteínas do sítio ativo da PDI na expressão gênica de Nox1 durante a inibição do EGFR.....	47
Figura 16 Papel das cisteínas do sítio ativo da PDI na expressão gênica de Nox1 durante a ativação do EGFR.....	49

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Participação da NADPH na ativação do EGFR.....	15
1.2 Envolvimento da PDI na regulação da Nox.....	18
1.3 Participação das EROS na ativação do EGFR.....	19
2 OBJETIVO.....	24
2.1 Objetivo Geral.....	25
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1 Animais.....	27
<i>3.1.1 Procedimentos com anestésicos.....</i>	<i>27</i>
3.2 Valores basais da pressão arterial média, PAM mmHg (A) e frequência cardíaca, FC bpm (B), de animais Wistar e SHR com 12 semanas de idades.....	27
3.3 Determinação das concentrações do ligante HB-EGF no plasma dos animais Wistar (controle) e SHR 6, 8 e 12 semanas de idade.....	28
3.4 Manutenção das culturas de células da musculatura lisa vascular.....	28
3.5 Indução de super expressão da PDI e PDI Mut.....	29
3.6 Efeito da Super expressão de PDI e PDI Mut sobre a ativação do EGFR e expressão gênica de Nox1.....	30
3.7 Determinação da expressão gênica de Nox1 por Reação de Polimerase em Cadeia em Tempo real (RT-PCR).....	31
3.8 Determinação da expressão de PDI.....	32
3.9 Ensaio de Imunofluorescência.....	33
3.10 Análise Estatística.....	33
4 RESULTADOS.....	34
4.1 Determinação da pressão arterial de ratos Wistar e SHR com 12 semanas de idade.....	35
4.2 Níveis plasmáticos e expressão proteica do ligante de EGFR na aorta durante o desenvolvimento da hipertensão arterial.....	37
4.3 Efeito da ativação do EGFR pela Angiotensina II (Ang II) em células musculares lisas da aorta torácica de ratos Wistar com 12 semanas de idade.....	39

4.4 Efeito da super expressão da PDI e PDI mut em CMLV de aorta de ratos Wistar.....	41
4.5 Efeito da super expressão da OvxPDI e OvxPDIMUT e da ativação do EGFR sobre a expressão de Nox1 em CMLV da aorta torácica de ratos Wistar.....	43
4.6 A super expressão de PDI aumenta de forma redox dependente a expressão de Nox1 durante a ativação do EGFR.....	50
5 DISCUSSÃO.....	52
6 CONCLUSÕES.....	56
REFERÊNCIAS.....	58

1 INTRODUÇÃO

A parede das artérias normais é constituída por três camadas, íntima, média e adventícia (van Varik et al., 2012), cada qual é composta por um tipo celular específico: células endoteliais (túnica íntima), células da musculatura lisa vascular (túnica média) e fibroblastos (túnica adventícia) (Mulvany, 2002). Alterações nestas camadas contribuem para o desenvolvimento de patologias como a hipertensão.

A hipertensão arterial está associada ao remodelamento das artérias de resistência, provocada pelas alterações funcionais, estruturais e mecânicas. Estas alterações reduzem o tamanho do lúmen e aumentam a resistência periférica total. As principais características dessas alterações são decorrentes da proliferação, migração, crescimento celular, inflamação, alteração do fenótipo das células do músculo liso vascular (VSMC), fibrose, apoptose celular e deposição de componentes da matriz extracelular, fatores que iniciam uma série de doenças cardiovasculares (Intengan, Schiffrin, 2001; Mulvany, 2002; Newby, 2006). Estes eventos podem ser mediados pela ativação do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) (Burgess et al., 2003).

No âmbito celular, estas alterações são ocasionadas em resposta a diversos estímulos, como por exemplo, a produção de superóxido produzido pela NADPH-oxidase (Pendyala, Natarajan, 2010). Nesse contexto, em especial a migração e proliferação de células da musculatura lisa vascular (CMLV) podem contribuir para o remodelamento vascular, uma vez que muitos elementos no processo de migração e proliferação celular são considerados redox sensíveis, tais como a ativação do receptor tirosina quinase ou as alterações dos filamentos de actina do citoesqueleto (Dalle-Donne et al., 2001).

Em relação a CMLV sua principal função é manter a contração da parede vascular. Estas células possuem diversas características fenotípicas (Frid et al., 1997). Em especial, o fenótipo contrátil em vasos maduros é observado em CMLV diferenciadas que regulam o fluxo sanguíneo, vasodilatação ou vasoconstrição (Zalewski et al., 2002).

A mudança do fenótipo contrátil para o sintético, fenótipo proliferativo e fenótipo migratório ocorre devido à lesão vascular. A resposta a essa lesão é multicelular e envolve diversos fatores de crescimento, tais como, fatores de

crescimento derivados de fibroblastos, fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF), e fatores de crescimento endoteliais (VEGF), além da angiotensina II (Ang II) (Ridley et al., 2003; Wolf et al., 1998). Estes agonistas participam da transativação do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR). No entanto, esta transativação requer a produção de superóxido como segundo mensageiro (Touyz, Schiffrin, 1999). A principal fonte enzimática produtora de superóxido é a NADPH oxidase (Rey et al., 2001), que tem como alvo as metaloproteinases responsáveis pela liberação dos ligantes do EGFR da membrana para o meio extracelular. Além disso, estudos anteriores do nosso grupo caracterizaram o envolvimento da proteína dissulfeto isomerase na modulação da geração de superóxido pela NOX1/NADPH oxidase como moduladores da migração de CMLV (Pescatore et al., 2012). Por outro lado, estudos sugerem a participação da PDI na regulação da pressão arterial mediada pela ang II (Androwiki, et al., 2015). Além disso, estudos do nosso grupo, em especial em células musculares lisas que super expressam PDI apresentam aumento da expressão gênica da subunidade Nox1 da NADPH oxidase, bem como aumento da atividade da enzima (Fernandes et al., 2009). Esta associação pode estar envolvida na gênese da hipertensão, por participar da sinalização redox em resposta a ang II, consequentemente, na ativação do EGFR responsável por modular diversas vias envolvidas nas alterações vasculares, tais como, proliferação, apoptose, angiogenese e migração celular. Desta forma, torna-se importante investigar os efeitos da PDI sobre a Nox1 na ativação do receptor (EGFR), durante o desenvolvimento da hipertensão arterial.

1.1 Participação da NADPH oxidase na ativação do EGFR

A NADPH oxidase é a principal fonte geradora de EROs no sistema cardiovascular. Esta enzima é capaz de produzir superóxido utilizando NADPH e consequentemente diminuir a biodisponibilidade do óxido nítrico (NO), além de atuar como precursora de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e peroxinitrito (ONOO⁻) (Rey; Cifuentes et al., 2001).

A Família NADPH oxidase é composta por cinco isoformas: Nox1, Nox2 (gp91PHOX), Nox3, Nox4, Nox5, além de Duox1 e Duox2. A NADPH oxidase possui subunidades catalíticas de membrana e subunidades citosólicas p47 PHOX, p67 PHOX, Noxo1 e Noxa1 (Brandes, Schroder, 2008) e uma GTPase, a Rac 2 e sua

ativação por ocorre por meio do acoplamento e ativação em algumas isoformas da enzima tais como NOx1 e Nox2 (Babior et al., 2002). Além de possuírem mecanismos reguladores, padrões de expressão subcelular e funções celulares distintas (Lassegue, Clempus, 2003).

Todas as isoformas NADPH oxidase são proteínas transmembrana capazes de gerar espécies reativas do oxigênio (EROs) e são caracterizadas a partir do tipo celular, associação com subunidades regulatórias, tipo de EROS produzidas e mecanismo de ativação (Brandes, Schroder, 2008). Essas características distintas da Nox são responsáveis pelas diferentes funções e especificidade da ação do superóxido como segundos mensageiros. Sendo assim, o superóxido produzidos pela Noxes são capazes de regular a proliferação, migração, hipertrofia de CMLV, diferenciação celular e angiogênese no sistema cardiovascular (Cave et al., 2006; Garrido, Griendling, 2009).

As principais isoformas da família NADPH oxidase envolvidas no remodelamento vascular são Nox1, Nox2 e Nox4. O superóxido gerado via Nox1, por exemplo, contribui para o desenvolvimento de doenças vasculares tais como, aterosclerose, hipertensão e proliferativas como o câncer (Chrissobolis et al., 2012). Esta isoforma está presente na camada íntima, média e adventícia da vasculatura (Helmcke et al., 2009). Sua ativação requer p22phox, Nox01 (ou p47phox), e sua principal função está relacionada com a manutenção da função vascular modulando a proliferação, migração e angiogênese (Arbiser et al., 2002).

A Nox2 por sua vez, também está presente em células do músculo liso vascular (VSMCs), além de fibroblastos, células endoteliais e adipócitos perivasculares. Nas células endoteliais, por exemplo, o superóxido derivado de Nox2 está envolvido no mecanismo de proliferação mediado por p38-MAPK e na migração induzida por fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), além da regulação de várias outras funções. Uma vez ativada a Nox2 afeta a biodisponibilidade de NO e modula a expressão de moléculas de adesão durante a inflamação e angiogênese (Van Buul et al., 2005), devido ao aumento da produção do ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), responsável por diminuir a biodisponibilidade do $NO^{\bullet}$ em razão, principalmente, da reação direta entre ambos, para formar peroxinitrito ($ONOO^-$). O peroxinitrito é um intermediário reativo particularmente lesivo, uma vez que é capaz de gerar o radical hidroxila ($\bullet OH$), independentemente da presença de metal de transição.

a enzima forma um complexo na membrana com o p22phox e sua ativação pode ou não depender de subunidades citosólicas (Karen Block & Yves Gorin 2012).

Enzimas do tipo tiol óxido redutases são capazes de catalisar as reações de troca tiol-dissulfeto, estas reações podem desempenhar um importante papel na sinalização redox. A família das proteínas dissulfeto isomerase (PDI), por exemplo, é capaz de realizar esta função, através da interação com seus substratos efetuando a oxidação, redução ou isomerização de grupos tióis em proteínas (Laurindo et al., 2012).

1.2 Envolvimento da PDI na regulação da Nox

Originalmente, a PDI foi identificada no lúmen do retículo endoplasmático; e subsequentemente observada em diversos compartimentos celulares como a membrana, o endossomo e o citosol. Esta proteína possui três atividades catalíticas: 1) *chaperona (independe das cisteínas do sítio redox ativo)*; 2) dissulfeto isomerase (*requer os quatros domínios da proteína para ser realizada*); 3) redutase/oxidase (depende das cisteínas do sítio redox ativo). Sua configuração estrutural, é composta por 5 domínios a-b-b'-a' e c seguido por uma extensão C terminal que contém o sinal de retenção no retículo K-DEL (Freedman et al., 1998). De acordo com a sequência dos domínios a-b-b'-a', a estrutura da PDI pode ser classificada em 4 domínios semelhantes aos da tioredoxina, sendo dois cataliticamente ativos e dois inativos, associados à ligação com o substrato como mostrado na figura abaixo **“Figura” 2** (Tian et al., 2006).

Apesar da PDI ser encontrada no retículo endoplasmático, estudos indicam a sua localização na membrana de diversas células tais como linfócitos (Tager et al., 1997), neutrófilos (Bennett et al., 2000) e hepatócitos (Terada et al., 1995), plaquetas (Essex et al., 1995) e células endoteliais (Swiatkowska et al., 2008), onde atua como uma redutase, reduzindo os tióis de superfície (Jiang et al., 1999) incluindo moléculas de adesão como as integrinas (Lahav et al., 2003).

Além disso, a PDI exibe uma associação redox dependente com p47(phox) modulando a migração das subunidades citosólicas para a membrana plasmática regulando o acoplamento da forma ativa da enzima. (de et al., 2011).

Figura 2 Diagrama estrutural da PDI. A PDI é composta por 5 domínios: a, b, b', a', e c. Os sítios ativos redox “WCGHC” estão localizados nos domínios a e a'. Os domínios b e b' compõem o principal sítio de ligação de substratos e o domínio C possui a sequência KDEL. A estrutura inferior representa a estrutura molecular da PDI de levedura (Laurindo et al., 2008).

A PDI possui a capacidade de se associar as diferentes isoformas da NADPH oxidase, tais como, Nox1, Nox2, Nox4 e p22phox em células vasculares e células HEK 293 transfectadas com as isoformas da Nox (Santos et al., 2009; Verissimo-Filho et al., 2011).

Esta capacidade de associar as diferentes isoformas da NADPH oxidase, sugere que a PDI/oxidase exerça efeitos diferentes em células vasculares leucócitos (Santos; Stolf et al., 2009; Verissimo-Filho et al., 2011) e células endoteliais (Laurindo; Fernandes et al., 2008), e que estes efeitos finais variam de acordo com a isoforma da NOX envolvida.

Além disso, em 2009 Fernandes e colaboradores demonstraram que a super expressão da PDI pode acarretar um aumento na expressão de Nox1 e consequentemente na produção de EROs, mesmo na ausência de estímulos como a Angiotensina II em células do músculo liso vascular da aorta de coelho (RASM), sugerindo um efeito da PDI no aumento da expressão gênica e atividade da Nox1 (Fernandes et al., 2009).

1.3 Participação das EROS na ativação do EGFR

No sistema cardiovascular as EROs atuam como moléculas de sinalização intracelular regulando a contração, crescimento e a diferenciação das CMLV (Griendling et al., 2000; Rao, Berk, 1992). Além de quando em excesso, atuarem

como intermediários na ativação de vias patológicas, devido a uma perda na homeostase redox e estresse oxidativo resultando em alterações estruturais na vasculatura como no remodelamento vascular (Griendling; Sorescu et al., 2000). Um dos mecanismos envolvidos nesse processo é a degradação e reorganização da matriz extracelular do vaso, devido à ativação das metaloproteinases da matriz (MMPs) (Galis, Khatri, 2002).

As MMPs contêm um sítio catalítico ligado ao Zn^{2+} e um pró-peptídeo que contém uma ponte dissulfeto (NagaseRaffetto, Khalil, 2008). As MMPs são sintetizadas como uma pró-enzima, enzimaticamente inativa e denominada de zimogênio (Nagase, Woessner, 1999). Estas enzimas são responsáveis por degradar diversas proteínas da matriz extracelular (fibronectina, laminina, trombospondina, colágenos I, II, III, IV e V, elastina, heparan sulfato, condroitim e sulfato), por meio da quebra de suas ligações peptídicas específicas (NagaseRaffetto, Khalil, 2008), e são produzidas por vários tipos celulares, tais como, leucócitos polimorfonucleares, queratinócitos, macrófagos, fibroblastos e as células mesenquimais. Estas células quando ativadas liberam MMPs de grânulos específicos para o meio extracelular (Birkedal-Hansen, 1993).

A atividade das MMPs no substrato da matriz extracelular é regulada por diferentes vias: tais como, regulação na sua expressão gênica; ativação de precursores; diferenças de especificidade pelo substrato; e por inibidores de MMPs (Birkedal-Hansen, 1993). Estes inibidores são pequenas proteínas classificados como inibidores teciduais de MMPs (TIMPs), capazes de regular suas funções, bem como, sua ativação e habilidade de hidrolisar um determinado substrato (Birkedal-Hansen, 1993).

O controle entre a produção de MMPs e a regulação dos TIMPs possui um importante papel na homeostase da matriz extracelular. Entretanto, o desequilíbrio deste mecanismo resulta em um processo patológico devido ao excesso de atividade das MMPs nos tecidos (Birkedal-Hansen, 1993), favorecendo o desenvolvimento de câncer, inflamação e remodelamento cardiovascular (Lehoux et al., 2004). Estas MMPs ativadas podem, por sua vez levar a ativação do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) por meio da clivagem dos seus ligantes, tais como, fatores de crescimento transformante alfa ($TGF-\alpha$), EGF de ligação à heparina (HB-EGF), amphiregulin (AREG), betacellulin (BTC) e epiregulin (EREG) (Massague e Pandiella, 1993).

Outro mecanismo de ativação do EGFR envolve a sua transativação por agonistas de receptores acoplados a proteína G (GPCRs), como por exemplo, angiotensina II, endotelina-1 e fenilefrina (Burgess; Cho et al., 2003). A ativação do EGFR por estes agonistas, em especial a sinalização via Ang II utiliza as EROs como segundos mensageiros (Griendling et al., 1994; Touyz, Schiffrin, 1999). Estes são responsáveis pela ativação de várias vias de sinalização envolvidas nas alterações vasculares, incluindo tirosinas quinases como a c-Src e MAP quinases (p38MAP, ERK1/2, ERK-5) importantes no crescimento, migração e diferenciação celular; além de fatores de transcrição como NFkB e AP-1, que induzem a expressão de genes pró-inflamatórios e da própria NADPH oxidase (Miller et al., 2010; Nguyen Dinh Cat et al., 2013).

O EGFR é um membro da família ErbB ou HER1 (1-receptor do fator de crescimento epidermal humano), possui um domínio transmembrana alfa-helicoidal, um domínio intracelular tirosina quinase e uma região carboxi (C)-terminal que contém os sítios de autofosforilação (Beltowski, Lowicka, 2009) (Figura 3). Sua principal função é mediar a proliferação, migração e diferenciação celular (Nakata et al., 1996).

A ativação do EGFR pode ocorrer de duas formas distintas, por meio da sua transativação, mediada por vasoconstritores, após a ligação aos receptores acoplados à proteína G (GPCRs) (Hao et al., 2004), dependente da fosforilação do EGFR mediada pela tirosina quinase c-Src. No entanto, o mecanismo predominante parece envolver a liberação de fatores semelhantes ao EGF da superfície celular mediado por proteases da família ADAMs (Hassan et al., 2004) ou por metaloproteinases, ativando o EGFR de forma parácrina e ou autócrina (Stirnweiss et al., 2006).

A ativação do EGFR ativa a tirosina quinase (TK) presente na sua porção intracelular, desencadeando a sua fosforilação nas tirosinas Tyr⁹⁹², Tyr¹⁰⁶⁸, Tyr¹⁰⁸⁶, Tyr¹¹⁴⁸ e Tyr¹¹⁷³. Uma vez estimulado, o EGFR ativa diversas vias de sinalização, tais como as quinases reguladas por sinais extracelulares (ERKs), a fosfatidil inositol 3-quinase (PI3-K) - a proteína quinase B / Akt, e a fosfolipase Cy (PLCy) (Beltowski, Lowicka, 2009). Estas vias podem estar envolvidas no remodelamento das artérias de resistência, uma resposta adaptativa para normalizar a tensão na parede do vaso (Fridez et al., 2003). Esta resposta adaptativa envolve a degradação e reorganização da matriz extracelular (Nagase, Raffetto, Khalil, 2008), que possibilita

a migração de células do músculo liso vascular (VSMC) (Castro et al., 2008; Galis, Khatri, 2002). Além disso, as espécies reativas do oxigênio (EROs) produzidas pela NADPH oxidase aumentam a clivagem dos ligantes do EGFR (Stanic et al., 2010).

Figura 3 Estrutura molecular do EGFR. (A) domínio extracelular: domínio I: L1; domínio II: CR1; domínio III: L2; domínio IV: CR2. **(B)** Na estrutura dos domínios (I-V) do EGFR (não ligado ao ligante), é possível observar uma alça saliente no domínio II (CRI) dirigido para fora da região C-terminal da zona de ligação ao ligante, formado por ligantes I, II, e III. **(C)** O domínio tirosina quinase do EGFR porção (C)-terminal e (N)-terminal envolvidos na ativação do circuito e sitio ativo (John F. Flynn, Christina Wong, and Joseph M. Wu 2009).

Paralelamente, a super expressão da Nox1 está associada com o aumento da produção de superóxido em modelos animais hipertensos dependente de Ang II, no qual, contribui para a hipertrofia (Dikalova et al., 2005). Estas evidências sugerem a modulação da Nox1 pela PDI como um possível fator que contribui para o remodelamento das artérias de resistência. No entanto, o papel da PDI na ativação do EGFR e sua contribuição no remodelamento e desenvolvimento de doenças cardiovasculares, como a hipertensão arterial permanece desconhecido (Figura 4).

Figura 4 Possível papel da PDI na ativação do EGFR na vasculatura. A fosforilação do EGFR ocorre via Nox-1 ativada pela angiotensina II, endotelina ou trombina e por ativação direta dos ligantes específicos do fator de crescimento epidermal. A ativação do EGFR resulta na ativação de uma cascata de sinalização envolvida no desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Caracterizar o papel da proteína dissulfeto isomerase (PDI) sobre a expressão gênica da Nox1 dependente da ativação do receptor (EGFR) durante o desenvolvimento da hipertensão arterial.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Modelos experimentais são amplamente utilizados em estudos sobre as alterações que ocorrem no sistema cardiovascular induzidas pela hipertensão arterial (HA). O rato SHR é o modelo que mais se aproxima da HA essencial humana, pois apresenta características similares, como aumento da resistência periférica total, do débito cardíaco e hipertrofia ventricular esquerda. Assim, ratos SHR podem constituir bons modelos para os estudos de hipertensão e suas consequências no sistema cardiovascular.

Para a realização dos experimentos foram utilizados ratos Wistar machos (controle) e SHR (machos), com 6, 8 e 12 semanas, provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP). Os animais foram mantidos em grupos de cinco animais por caixa no Biotério do Departamento de Farmacologia, com temperatura e ciclo de iluminação controlada (22 °C; claro/escuro, 12/12 h) e acesso à água e ração *ad libitum*. Os experimentos foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais - ICB/USP; nº13 fls. 62 livro 02).

3.1.1 Procedimentos com anestésicos

Os animais foram anestesiados intraperitonealmente com uma mistura anestésica de quetamina (80 mg/kg) e xilazina (7 mg/kg). Em seguida os volumes de sangue (punção cardíaca) foram colhidos (anticoagulante Heparina) e centrifugados a 1200 RPM por 10 minutos para a separação do plasma. O plasma foi coletado e estocado em -80°C para futura análise. Paralelamente, as aortas torácicas ascendentes foram retiradas e dissecadas, removendo-se todo o tecido conectivo e adiposo.

3.2 Determinação dos valores basais da pressão arterial média, PAM mmHg (A) e frequência cardíaca, FC bpm (B), de animais Wistar e SHR com 12 semanas de idade

Os registros da pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e da frequência cardíaca (FC, bpm) foram realizadas após a canulação da artéria femoral e conexão a um transdutor de pressão (Modelo CDX

III, Cobe Labs, Lakewood, CO, USA), acoplado a um amplificador (ML224 Quad Bridge Amp, ADInstruments, New South Wales, Austrália) conectado a um sistema de aquisição de dados digital (PowerLab ADInstruments, New South Wales, Austrália). A frequência de aquisição dos sinais foi de 1000 Hertz. Os valores da PAP (sistólica e diastólica), PAM e FC e não foram analisados em tempo real.

3.3 Determinação das concentrações do ligante HB-EGF no plasma dos animais Wistar (controle) e SHR 6, 8 e 12 semanas de idade

A concentração dos ligantes presentes no plasma de animais SHR e Wistar com 6, 8 e 12 semanas de idade foi determinada utilizando-se Kit-Elisa (MyBioSorce). A Placa de microtitulação foi pré-revestidas com anticorpo monoclonal específico para HB-EGF. Inicialmente, 50 µl dos padrões(0-50pg) e 50 µl das amostras foram adicionadas. Em seguida, 100 µl do anticorpo conjugado foi adicionado aos poços, e então a placa foi incubada por 1 hora a 37°C. Após esse período, os poços foram lavados. Em seguida, adicionou-se 50µl do substrato, e novamente as placas foram incubadas a 37°C por 30 minutos, evitando-se a presença de luz. Ao final, adicionou-se 50µl da solução stop. Por fim, a quantificação foi realizada pela leitura da densidade óptica (DO) a 450 nm por meio do leitor de Elisa. Os resultados foram expressos em picogramas de antígeno por miligramas de proteína. A concentração de HB-EGF presente em cada amostra foi calculada a partir de uma curva padrão.

3.4 Manutenção das culturas de células da musculatura lisa vascular

Para a realização da cultura de células as aortas foram isoladas e em seguida o tecido adiposo foi removido com o auxílio de uma pinça em ambiente estéril. Após esse procedimento as aortas foram incubadas em meio de cultura DMEM pH 7,3 contendo gentamicina 10 mg/dL, Hepes 47,6 g/100mL, penicilina/estreptomicina 10000 UI/mL e 10000 µg/mL respectivamente, L-glutamina 2,92 g/100mL e bicarbonato de sódio 1,176 g/L na presença de colagenase (3 mg/mL), por 30 minutos, a 37 °C, para pré-digestão. Após este período a suspensão de células foi centrifugada a 2000 rpm, por 5 min, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspenso em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM). Em seguida as células foram mantidas em cultura por 24 h para a obtenção das CMLV.

Figura 5 Fotomicrografias da cultura de CMLV. Primeira passagem das células da musculatura lisa vascular da aorta torácica de ratos Wistar **(A)** e SHR **(B)** com 12 semanas de idade.

3.5 Indução de super expressão da PDI e PDI Mut

As CMLV foram transfectadas com DNA plasmidial contendo a sequência para PDI wild type ou PDI mutada em suas quatro cisteínas dos sítios redox ativos (PDI Mut), gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Francisco Laurindo (Laboratório de Biologia Vascular do Instituto do Coração). Como controle negativo (MOCK) foi utilizado um plasmídeo contendo apenas o vetor vazio (pcDNA 3.1). Para a transfecção de DNA plasmidial, foram cultivadas $8 \cdot 10^4$ células por cm^2 em placas de cultura. Após 24 h, 50 μg de DNA foi transfectado, na presença de Hi-perfect® (Qiagen) em meio DMEM na ausência de soro e antibióticos, por 8 h. Em seguida, as células foram incubadas com meio acrescido de soro e antibióticos por 48 h. Após este período, superexpressão da enzima foi confirmada por western blotting com anticorpo anti PDI.

Figura 6 Identificação do sítio de clonagem da PDI. Mapa plasmidial contendo a sequência para PDI wild type ou PDI mutada em suas quatro cisteínas dos sítios redox ativos (PDI Mut).

3.6 Efeito da super expressão de PDI e PDI Mut sobre a ativação do EGFR e expressão gênica de Nox1

A fim de verificar o envolvimento do EGFR na expressão de Nox1 induzida pela PDI, em alguns experimentos após a transfecção as células foram incubadas com 10 μ M de AG1478 (inibidor específico de tirosina quinase seletivo para EGFR) ou 5 ng/ml de HB-EGF (fator de crescimento epidérmico ligado a heparina) em meio suplementado com soro e antibióticos (penicilina/estreptomicina 10000 UI/mL), na presença ou ausência de 10 μ M de difeniliodonium (DPI, inibidor da Nox) por 24 h. Após esse período, determinou-se a expressão gênica de Nox1 por meio da técnica de qPCR.

Figura 7 Ensaio experimental para quantificação da expressão gênica de Nox-1 induzida pela PDI e PDI MUT.

3.7 Determinação da expressão gênica de Nox1 por Reação de Polimerase em Cadeia em Tempo real (RT-PCR)

O RNA celular foi extraído utilizando-se o reagente Trizol[®] (Invitrogen Co., USA). O RNA foi precipitado com acetato de sódio 3 M (pH 5.2) e etanol 100%. O RNA obtido foi quantificado por absorbância a 260 nm e sua integridade confirmada pela análise do RNA em gel de agarose contendo brometo de etídio (0.8%). Este material foi em seguida utilizado para síntese de cDNA, utilizando-se o sistema Superscript (Invitrogen) e *primers* randômicos, conforme instruções do fabricante. Estes cDNAs foram utilizados em reações de RT-PCR quantitativo utilizando-se o reagente SYBR Green (Fermentas) e os seguintes primers específicos:

Nox-1

- Sense 5'-TTCCCTGGAACAAGAGATGG-3'
- Antisense 5'-GACGTCAGTGGCTCTGTCAA-3'

GAPDH:

- Sense 5'-GGTGCTGAGTATGTCGTGGA-3'
- Antisense 5'-ACTGTGGTCATGAGCCCTTC-3'

As reações de qPCR foram realizadas e analisadas usando o sistema Applied Biosystems 7300 Real Time PCR. As condições do qPCR utilizadas para amplificação

dos genes foi: 2 min a 95 °C seguindo-se 50 ciclos na seguinte sequencia: 95 °C por 16 seg, 60 °C por 1min e 72 °C por 20 s. A especificidade da reação com SYBR® Green foi confirmada pela análise da curva de dissociação tomando como base a temperatura de dissociação – “melting point”. A expressão gênica foi quantificada utilizando o cálculo do ΔC_t (“cycle threshold”). O gene GAPDH foi utilizado para normalizar a expressão de Nox1 em todas as amostras de CMLV. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias relativas à variação da expressão da Nox1 nos grupos OvxPDI e OvxPDIMUT normalizados pela expressão de Nox1 no grupo Mock.

3.8 Determinação da expressão de PDI

As células foram lavadas com PBS e lisadas com tampão de lise (contendo 50 mM de pirofosfato de sódio, 50 mM de fosfato de sódio, 5 mM de cloreto de sódio, 5 mM de EDTA, 5mM de EGTA, 10 mM de HEPES, 0.5% de Triton X100, 2 mM de ortovanadato de sódio, 1 mM de PMSF e 1 ug/ml de aprotinina). O homogenato coletado foi sonificado, centrifugado e realizada a dosagem de proteínas pelo método de Bradford.

As amostras foram preparadas em tampão de corrida na concentração de 30µg de proteína e submetidas ao método de separação por eletroforese em gel de poliacrilamida, contendo lauril sulfato de sódio (SDS – PAGE) e, posteriormente transferidas para uma membrana de nitrocelulose. A membrana foi incubada em tampão TBS-t (TRIS 20 mM + NaCl 137 mM contendo 0,1% de Tween 20) contendo 3% albumina bovina (BSA) para bloqueio dos sítios de ligação inespecíficos. Posteriormente, a membrana foi incubada com anticorpos primários específicos para as proteínas de interesse em solução bloqueadora (BSA 3%). Após apropriado ciclo de lavagens, as membranas foram incubadas com os anticorpos secundários infravermelhos. Após período de incubação e novo ciclo de lavagem, as membranas foram escaneadas no leitor de infravermelho Odyssey (Li-Cor, USA).

A intensidade das bandas foi determinada por análise densitométrica através do programa Image J, e utilizada como medida de expressão proteica. Os resultados foram normalizados pela expressão de β -actina ou da forma total da proteína em caso de análise da expressão de proteínas fosforiladas, e expressos como porcentagem do controle de cada experimento

3.9 Ensaio de Imunofluorescência

As CMLV foram lavadas com tampão fosfato (PB 0,1 M) e fixadas por meio de incubação com paraformaldeído 2% por 5 min. Em seguida, as células foram lavadas com PB durante 10 min, este procedimento foi repetido três vezes. Após o ciclo de lavagem, foi realizado o bloqueio com PB contendo albumina 1% por 1 h. Após este período as células foram incubadas durante 24 h com anticorpos primários contra beta actina. Em seguida, após novo ciclo de lavagens, foi realizada incubação por 2 h com anticorpo secundário alexa 488 anticorpo secundário específico. Adicionalmente, as células foram incubadas com o marcador específico de núcleo 4,6-diamina-2-fenilindol (DAPI 10 ug/ml, Sigma). As células foram examinadas em microscópio de fluorescência (Axio Observer A1, Zeiss).

3.10 Análise Estatística

Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m. (erro padrão da média) e analisados estatisticamente por ANOVA de uma via seguido de teste de Tukey-Kramer. As diferenças foram consideradas significativas para o nível de $p < 0.05$ (5%).

4.1 Determinação da pressão arterial de ratos Wistar e SHR com 12 semanas de idade

Animais SHR não apresentam aumento da pressão arterial até seis semanas de vida, apresentando níveis considerados hipertensivos a partir décima segunda e atingindo um nível máximo por volta da vigésima até a vigésima oitava semana. A hipertensão arterial do SHR adulto está associada a alterações cardiovasculares determinantes na pressão arterial sistêmica, como aumento da resistência periférica total (RPT) acompanhada de débito cardíaco normal ou reduzido. Com o desenvolvimento da HA, o SHR desenvolve uma progressiva hipertrofia cardíaca, a que com o avançar da idade do animal, resulta em uma insuficiência cardíaca, o que promove uma marcada redução do débito cardíaco. Outras características deste modelo é a redução da densidade espacial de vasos de pequeno calibre, como arteríolas e capilares, em vários tecidos, incluindo músculo esquelético, coração etc. Esta diminuição na densidade microvascular pode ocorrer como resultado da destruição vascular, pelo menos em parte, devido à apoptose de células endoteliais causada pelo estresse oxidativo. Baseado nestas informações com o intuito de caracterizar o nosso modelo optamos por verificar os valores de pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e da frequência cardíaca (FC, bpm) dos animais Wistar e SHR com 12 semanas de idade, após a canulação femoral. Os resultados demonstraram que os animais SHR (N=5) apresentaram nível basal de PAM significativamente maior que ratos Wistar (**Figura 1A**). Entretanto, os valores da FC não diferiram entre os grupos (**Figura 1B**).

Figura 8 Análise de medida direta de pressão arterial dos animais Wistar e SHR. Valores basais da pressão arterial média, PAM mmHg (**A**) e frequência cardíaca, FC bpm (**B**), de animais Wistar e SHR com 12 semanas de idades. Os dados são expressos como a média + EPM para um mínimo de 2 animais por grupo experimental. * $P < 0.05$ quando comparado com Wistar.

4.2 Níveis plasmáticos e expressão proteica do ligante de EGFR na aorta durante o desenvolvimento da hipertensão arterial

A expressão de EGF um dos ligantes do receptor EGFR na forma precursora (Pró-HB-EGF) e na forma madura (HB-EGF) encontra-se aumentada na aorta de animais SHR com 8 semanas de idade. Após este período os níveis de HB-EGF encontram-se diminuídos na aorta. Por outro lado, observamos um aumento da concentração deste ligante no plasma de animais SHR com 12 semanas de idade.

A

B

Figura 9 Expressão do HB-EGF na aorta torácica e no plasma de ratos Wistar e SHR durante o desenvolvimento da hipertensão arterial. Expressão proteica do HB-EGF na aorta torácica de ratos Wistar e SHR com 8 e 12 semanas de idade **(A)**. Quantificação da forma madura do HB-EGF no plasma de ratos Wistar e SHR durante o desenvolvimento da hipertensão (6, 8 e 12 semanas de idade) **(B)**. As barras representam média $\pm$ erro padrão das amostras biológicas (n=5) pertencente a cada grupo sendo: * $p < 0.05$ vs respectivo Wistar e vs SHR 6 e 8 semanas.

4.3 Efeito da ativação do EGFR pela Angiotensina II (Ang II) em células musculares lisas da aorta torácica de ratos Wistar com 12 semanas de idade

A Angiotensina II é um dos fatores capazes de ativar o EGFR. Com o intuito de investigar os efeitos da ativação do EGFR sobre a morfologia de CMLV, estimulamos estas células com Ang II e fizemos uma marcação para citoesqueleto. Os resultados demonstram filamentos do tipo estresse fibrilar em todos os grupos tratados com a AngII (10^{-7}), diferentemente dos controles que apresentaram padrão normal de distribuição dos filamentos do citoesqueleto. (Figura 11).

Figura 10 Efeito da ang II nas alterações vasculares moduladas pela transativação do EGFR. Fotomicrografias do efeito da ang II na polimerização do citoesqueleto de CMLV da aorta torácicas de ratos Wistar. A **Figura B** representa a marcação da subunidade β -actina (verde), após a estimulação das células da musculatura lisa vascular da aorta torácica de ratos Wistar com 12 semanas de idade com AngII (10^{-7}) por 4 horas. A **Figura A** representam as células controles. Os núcleos foram marcados com DAPI (azul). As imagens foram feitas em microscópio de fluorescência (LSM510 – Carl Zeiss). A seta na **Figura A** aponta o estresse fibrilar.

4.4 Efeito da super expressão da PDI e PDI mut em CMLV de aorta de ratos Wistar

Para analisarmos as possíveis alterações na super-expressão da PDI e PDI Mutada (em suas quatro cisteínas dos sítios redox ativos), após a transfecção em CMLV da aorta de ratos Wistar com 12 semanas de idade, utilizamos a técnica de *Western blotting*. Os nossos resultados demonstraram um aumento na expressão de ambas as proteínas, quando comparada ao plasmídeo contendo o apenas o vetor vazio (pcDNA 3.1 - Mock) (Figura 12).

Figura 11 Análise da superexpressão da PDI e PDIMUT em CMLV de aorta torácica de ratos Wistar. A expressão proteica da MOCK, PDI e PDIMUT foi detectada por Western Blotting após 48 h da superexpressão em CMLV de Wistar com 12 semanas de idade. Os valores obtidos foram normalizados pela expressão de β -actina. Os dados foram apresentados como média + EPM para N=5 e comparado ao controle. * $p < 0.05$ vs Mock.

4.5 Efeito da super expressão da OvxPDI e OvxPDIMUT e da ativação do EGFR sobre a expressão de Nox1 em CMLV da aorta torácica de ratos Wistar

A super expressão da PDI e da PDI mut aumentou a expressão gênica de Nox1 quando comparado ao grupo controle (Mock) (Figura 13). Este efeito foi ainda maior quando as células foram incubadas com o ligante do EGFR HB-EGF, efeito este inibido pela adição de DPI, inibidor da Nox (Figura 14). A incubação das células com o AG1478 inibidor específico da ativação do EGFR reduziu a expressão da Nox1 induzida pela PDI, numa via dependente da ativação da Nox (Figura 15). A mutação das cisteínas do sítio redox não modificou este efeito (Figura 16).

Figura 12 Efeito da super expressão da PDI e PDIMUT sobre a expressão gênica de Nox1 em CMLV de aorta torácica de ratos Wistar. Os níveis de RNAm foram analisados e normalizados pela expressão de RNAm de GAPDH. Para quantificar os resultados o método $\Delta\Delta ct$ foi utilizado. As barras de erro padrão foram calculadas a partir dos resultados de triplicatas da mesma amostra $n=1$.

Figura 13 Efeito da ativação do EGFR e da NADPH oxidase sobre a expressão gênica de Nox1 após a super expressão da PDI em CMLV da aorta torácica de ratos Wistar. A expressão gênica de Nox1 foi detectada pela análise dos níveis de RNAm de Nox1 em CMLV da aorta torácica de ratos wistar com 12 semanas de idade, após a superexpressão da OvxpPDI (50 $\mu\text{g/ml}$) na presença do HB-EGF (5 ng/ml), e/ou DPI (10 μM). Os níveis de RNAm foram analisados e normalizados pela expressão de RNAm de GAPDH. Para quantificar os resultados o método $\Delta\Delta\text{ct}$ foi utilizado. As barras de erro padrão foram calculadas a partir dos resultados de triplicatas da mesma amostra $n=1$.

Figura 14 Efeito da inibição do EGFR sobre a expressão gênica de Nox1 após a super expressão da PDI em CMLV da aorta torácica de ratos Wistar. As células foram incubadas na presença ou ausência do inibidor do EGFR, AG1478 (10 μ M), com ou sem o inibidor da NADPH oxidase DPI (10 μ M). Os níveis de RNAm foram analisados e normalizados pela expressão de RNAm de GAPDH. Para quantificar os resultados o método $\Delta\Delta$ ct foi utilizado. As barras de erro padrão foram calculadas a partir dos resultados de triplicatas da mesma amostra n=1.

Figura 15 Papel das cisteínas do sítio ativo da PDI na expressão gênica de Nox1 durante a inibição do EGFR. Expressão gênica de Nox1 - detectada pela análise dos níveis de RNAm de Nox1 em CMLV da aorta torácica de ratos wistar com 12 semanas de idade, após a superexpressão da OvxpDI (50 $\mu\text{g/ml}$) e OvxpDIMUT (50 $\mu\text{g/ml}$) na presença ou não do AG1478 (10 μM). Os níveis de RNAm foram analisados e normalizados pela expressão de RNAm de GAPDH. Para quantificar os resultados o método $\Delta\Delta\text{ct}$ foi utilizado. As barras de erro padrão foram calculadas a partir dos resultados de triplicatas da mesma amostra $n=1$.

4.6 A super expressão de PDI aumenta de forma redox dependente a expressão de Nox1 durante a ativação do EGFR

A seguir avaliamos a expressão gênica de Nox1 em células musculares lisas vasculares transfectadas com Mock, PDI WT ou PDI MUT na presença ou não do HB-EGF. A super expressão da PDI nestas condições aumentou a expressão gênica de Nox1 em relação ao grupo sem HB-EGF. Este efeito foi revertido após a super expressão de PDI MUT, que na presença de HB-EGF diminuiu significativamente os níveis de RNAm da Nox1 quando comparado ao grupo sem HB-EGF (Figura 17).

Figura 16 Papel das cisteínas do sítio ativo da PDI na expressão gênica de Nox1 durante a ativação do EGFR. Expressão de RNAm de Nox1 em CMLV da aorta torácica de ratos Wistar com 12 semanas de idade, após a superexpressão da OvxPDI e OVXPDIMUT na presença ou não do HB-EGF (5 ng/ml). Os níveis de RNAm foram analisados e normalizados pela expressão de RNAm de GAPDH. Para quantificar os resultados o método $\Delta\Delta\text{ct}$ foi utilizado. As barras de erro padrão foram calculadas a partir dos resultados de triplicatas da mesma amostra $n=1$.

O aumento da geração de EROs e a disfunção vascular em animais SHR estaria relacionada com a hiperativação de vias de sinalização redox em resposta a Ang II (Endemann et al., 1999; Tabet et al., 2004; Zalba et al., 2000). De fato, dados anteriores do nosso grupo demonstraram que durante o desenvolvimento da hipertensão arterial existe um aumento da geração de EROs em artérias mesentéricas e aortas de ratos SHR (Androwiki et al., 2015). Neste contexto, com o intuito de caracterizar a participação do EGFR, neste efeito, inicialmente analisamos os níveis de HB-EGF no plasma de animais Wistar e SHR com 6, 8 e 12 semanas de idade. Resultados anteriores do nosso grupo demonstraram que a elevação na pressão arterial em animais SHR inicia-se a partir da oitava semana de idade (Androwiki; Camargo L et al., 2015). Neste mesmo período, observamos um aumento na expressão de ligantes do EGFR (HB-EGF) na aorta torácica dos animais SHR determinada pelo aumento tanto da sua forma precursora, ou seja, pro-HB-EGF quanto da forma madura do ligante. Dados de Miller e cols (2010) sugerem que esta liberação de HB-EGF estaria relacionada ao aumento de EROs que de fato encontra-se aumentada nas aortas neste mesmo período (Androwiki; Camargo L et al., 2015). De fato, quando a hipertensão já está estabelecida encontramos uma maior concentração destes ligantes no plasma devido, provavelmente à sua clivagem da aorta neste momento. Assim como na hipertensão arterial, o aumento das EROs, está correlacionado à ativação de vias de sinalização dependentes do EGFR em outras doenças vasculares como a arteriosclerose, por exemplo. De fato, Miller e colaboradores (2012) demonstraram que há uma relação direta entre a ativação do EGFR e o aumento da expressão gênica de Nox1 em um modelo de aterosclerose.

A ativação do EGFR pelo seu ligante HB-EGF é capaz de modular diferentes vias de sinalização entre elas a via das MAP quinases ERK 1/2 que mediarão respostas associadas a hipertensão arterial, tais como: crescimento, migração e diferenciação de células musculares lisas (Miller, Chu et al., 2010; Nguyen Dinh Cat, Montezano et al., 2013). Corroborando estes estudos, observamos um aumento na ativação da ERK em aorta torácica de ratos SHR com 12 semanas de idade. Em conjunto estes resultados sugerem um aumento da ativação do EGFR durante o desenvolvimento da hipertensão arterial.

Estes efeitos são corroborados pelos estudos de Androwiki e colaboradores (2015) que demonstraram um aumento da p-ERK 1/2 induzido por Ang II em artérias

mesentéricas de animais SHR. Neste mesmo estudo a inibição da PDI diminuiu a ativação da ERK 1/2 em artérias mesentéricas de ambos os grupo SHR e Wistar (Androwiki, Camargo L et al., 2015). Adicionalmente, o nosso grupo tem demonstrado a importância da PDI na ativação da Nox1 por ang II (Janiszewski et al., 2005). De fato a incubação com este peptídeo ocasionou modificações visíveis no citoesqueleto. Pudemos observar filamentos do tipo estresse fibrilar em todos os grupos tratados com a AngII (10^{-7}), diferentemente dos controles que apresentaram padrão normal de distribuição dos filamentos do citoesqueleto. Estas modificações possibilitam a migração de células do músculo liso vascular, um fenômeno essencial para o remodelamento do vaso após uma injúria (Castro, Rizzi et al., 2008; Galis, Khatri, 2002).

No presente estudo, as aortas de animais hipertensos apresentaram um aumento do shedding de ligantes do EGFR e uma aumento da ativação da ERK1/2 o que implica que o aumento na geração de EROs observado nestes vasos poderia estar levando a uma maior shedding dos ligantes do EGFR e ativação da ERK 1/2. De fato, dados da literatura têm demonstrado a participação do EGFR e seus ligantes nas doenças cardiovasculares moduladas pela Ang II como a hipertensão arterial (Wetzker, Bohmer, 2003). Adicionalmente, a ativação da Nox1 aumentaria a fosforilação da ERK 1/2 levando a migração de células musculares lisas. De fato, células musculares lisas vasculares de animais com deleção desta isoforma da Nox apresentam uma diminuição da ativação do EGFR e da capacidade migratória após estimulação com trombina. Estudos indicam que a oxidação de cisteínas nas críticas em metaloproteases contribuem para a ativação destas enzimas (Van Wart, Birkedal-Hansen, 1990). Paralelamente outros estudos demonstram que as espécies reativas do oxigênio (EROs) produzidas pela NADPH oxidase aumentam a clivagem dos ligantes do EGFR através da ativação de metaloproteases de membrana (Stanic, Katsuyama et al., 2010).

Desta forma, com o intuito de compreender melhor como a PDI estaria regulando a expressão gênica de Nox1 estudamos os efeitos da super expressão da PDI e da PDI MUT na ativação do EGFR e expressão de Nox-1 em CMLV da aorta torácica de ratos wistar com 12 semanas de idade. Observamos um aumento na expressão de RNAm de Nox1 tanto no grupo OvxPDI quanto no grupo OvxPDIMUT. Estes dados estão de acordo com dados anteriores do nosso grupo que demonstraram em células musculares lisas vasculares da aorta de coelhos o mesmo

efeito (Fernandes, Manoel et al., 2009). Nosso próximo passo foi investigar os efeitos da super expressão da PDI na ativação do EGFR e da NADPH oxidase sobre a expressão gênica de Nox1. Observamos, após a super expressão da PDI, um aumento significativo na expressão gênica de Nox1 em CMLV cultivadas na presença do HB-EGF recombinante responsável pela fosforilação do EGFR. Entretanto, este efeito foi reduzido quando utilizamos o inibidor DPI, sugerindo um papel das EROs produzidas pela Nox1 neste efeito. Assim, nossos resultados sugerem a participação da PDI na ativação da Nox1 como sendo importante para a ativação do EGFR e aumento da expressão gênica desta NADPH oxidase. Para confirmar estes achados, fomos investigar os efeitos da inibição do EGFR sobre a expressão gênica de Nox1 após a super expressão da PDI. Os grupos cultivados na presença do AG1478 (inibidor seletivo da fosforilação dos receptores de EGF) apresentaram uma diminuição da expressão de Nox1. O mesmo ocorreu com o grupo que recebeu o inibidor DPI. Desta forma, demonstramos que a superexpressão da PDI promove uma ativação do EGFR e fosforilação da ERK1/2 o que resulta no aumento da expressão gênica de Nox1. Ainda, demonstramos que estes efeitos são redox dependentes, pois a inibição das EROs reduziu ainda mais a expressão de Nox1. Este achado é corroborado pelo estudo de Fernandes e colaboradores (2009) que demonstraram que a super expressão da PDI aumenta a expressão gênica de Nox1 bem como, o aumento da atividade desta enzima mesmo na ausência de Angiotensina II, sugerindo um efeito direto da PDI no aumento da expressão gênica e atividade da Nox1. No entanto outros estudos do nosso grupo demonstraram que este efeito da PDI sobre a expressão gênica de Nox1 seria específico para a Nox1 uma vez, que não foi observado para Nox4, apesar desta isoforma estar presente na vasculatura (Androwiki; Camargo L et al., 2015; Fernandes, Manoel et al., 2009). Adicionalmente, dados recentes do nosso laboratório demonstraram a participação da Nox1 e o aumento de EROs em artérias mesentéricas de ratos SHR durante o desenvolvimento da hipertensão. Outros estudos demonstraram a participação do EGFR no aumento da expressão gênica de Nox1 em modelos de arteriosclerose e nas culturas de CMLV tratadas com HB-EGF, sugerindo uma participação do EGFR no controle da expressão gênica de Nox-1 (Stanic et al., 2012)

A participação da PDI na regulação de Nox1 tem sido evidenciada em diversos estudos (Androwiki; Camargo L et al., 2015; Fernandes, Manoel et al.,

2009), entretanto, não são conhecidos os efeitos das cisteínas do sítio ativo da PDI na ativação do EGFR. Por este motivo, investigamos os efeitos da mutação destes sítios sobre a expressão gênica de Nox1 em CMLV tratadas ou não com o inibidor AG1478. As células transfectadas com PDI na presença do AG1478 apresentaram uma redução da expressão gênica de Nox1 semelhante ao grupo PDI. Este resultado sugere um efeito da PDI na expressão gênica de Nox1 regulada pelo EGFR independente das cisteínas do seu sítio redox. Tais efeitos são apoiados pelas ações promovidas pela PDI no que diz respeito a sua atividade como chaperona, efeitos caracterizados como independentes de tióis (Meunier et al., 2002). Para confirmar o papel das cisteínas do sítio ativo da PDI na expressão gênica de Nox1 induzimos a super expressão da sua forma mutada durante a ativação do EGFR. Para isto analisamos os efeitos da estimulação do EGFR sobre a expressão gênica de Nox-1 em CMLV tratadas com HB-EGF. Diferentemente do efeito observado com o inibidor do EGFR, a incubação do grupo OvxPDIMUT com HB-EGF inibiu a expressão gênica de Nox1. Este efeito agora passou a ser dependente das cisteínas, pois o grupo OvxPDIMUT cultivado na presença do HB-EGF apresentou uma diminuição da expressão gênica de Nox-1, enquanto que o grupo OvxPDI apresentou um aumento ainda maior da expressão de Nox-1 na presença do ligante.

Estes efeitos podem estar relacionados a capacidade das EROs produzidos pela Nox1 ativarem diretamente os fatores de transcrição como o ATF-1 induzindo a expressão gênica da enzima (Katsuyama et al., 2005), em um processo dependente da ativação do EGFR (Stanic; Katsuyama et al., 2010). Este último estudo demonstrou que um ambiente celular oxidante como o que ocorre na hipertensão arterial, pode promover a clivagem dos ligantes e ativação do EGFR e subsequentemente de ERK 1/2 aumentando a expressão gênica de Nox1. O presente estudo sugere que este efeito pode ser modulado de maneira redox dependente pela PDI.

Analizados em conjunto, os resultados obtidos demonstraram que a PDI tem um importante papel na ativação do EGFR e expressão gênica de Nox1. Neste contexto, o aumento desta tiol oxidoreductase nesta patologia poderia contribuir para o estresse oxidativo e consequentemente para as alterações funcionais que resultam na disfunção vascular característicos da hipertensão arterial. Desta forma, nossos resultados mostram um novo papel da PDI na ativação do EGFR modulando

a expressão gênica de Nox-1, e contribuindo no desenvolvimento da hipertensão arterial.

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados podemos concluir que:

Existe um aumento da expressão do HB-EGF na aorta e da concentração deste ligante no plasma durante o desenvolvimento da hipertensão arterial.

Estes ligantes provocam a ativação do EGFR aumentando a expressão e atividade da Nox1.

A angiotensina II ativa o EGFR e contribui para as alterações no citoesqueleto de CMLV.

A PDI contribui para o aumento da expressão gênica de Nox-1 pelo EGFR.

EROs gerados pela Nox1 contribuem para a ativação do EGFR e expressão gênica desta enzima induzidos pela PDI.

O efeito da PDI na expressão gênica de Nox1 regulada pelo EGFR é dependente das cisteínas do sítio ativo da PDI.

Desta forma, nossos resultados mostram um novo papel da PDI associada a modulação da expressão gênica de Nox-1, contribuindo para a ativação do EGFR e consequentemente na disfunção vascular associados a gênese da hipertensão arterial.

REFERÊNCIAS*

- Androwiki AC, Camargo Lde L, Sartoretto S, Couto GK, Ribeiro IM, Verissimo-Filho S, et al. Protein disulfide isomerase expression increases in resistance arteries during hypertension development. Effects on nox1 nadph oxidase signaling. *Frontiers in chemistry*. 2015;3:24.
- Arbiser JL, Petros J, Klafter R, Govindajaran B, McLaughlin ER, Brown LF, et al. Reactive oxygen generated by nox1 triggers the angiogenic switch. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(2):715-20.
- Babior BM, Lambeth JD, Nauseef W. The neutrophil nadph oxidase. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2002;397(2):342-4.
- Bedard K, Krause KH. The nox family of ros-generating nadph oxidases: Physiology and pathophysiology. *Physiological reviews*. 2007;87(1):245-313.
- BelAiba RS, Djordjevic T, Petry A, Diemer K, Bonello S, Banfi B, et al. Nox5 variants are functionally active in endothelial cells. *Free radical biology & medicine*. 2007;42(4):446-59.
- Beltowski J, Lowicka E. Egf receptor as a drug target in arterial hypertension. *Mini reviews in medicinal chemistry*. 2009;9(5):526-38.
- Bennett TA, Edwards BS, Sklar LA, Rogelj S. Sulfhydryl regulation of l-selectin shedding: Phenylarsine oxide promotes activation-independent l-selectin shedding from leukocytes. *J Immunol*. 2000;164(8):4120-9.
- Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *Journal of periodontology*. 1993;64(5 Suppl):474-84.
- Brandes RP, Schroder K. Composition and functions of vascular nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases. *Trends in cardiovascular medicine*. 2008;18(1):15-9.
- Burgess AW, Cho HS, Eigenbrot C, Ferguson KM, Garrett TP, Leahy DJ, et al. An open-and-shut case? Recent insights into the activation of egf/erbB receptors. *Molecular cell*. 2003;12(3):541-52.
- Castro MM, Rizzi E, Figueiredo-Lopes L, Fernandes K, Bendhack LM, Pitol DL, et al. Metalloproteinase inhibition ameliorates hypertension and prevents vascular dysfunction and remodeling in renovascular hypertensive rats. *Atherosclerosis*. 2008;198(2):320-31.
- Cave AC, Brewer AC, Narayanapanicker A, Ray R, Grieve DJ, Walker S, et al. Nadph oxidases in cardiovascular health and disease. *Antioxidants & redox signaling*. 2006;8(5-6):691-728.
- Chrissobolis S, Banfi B, Sobey CG, Faraci FM. Role of nox isoforms in angiotensin ii-induced oxidative stress and endothelial dysfunction in brain. *Journal of applied physiology*. 2012;113(2):184-91.
- Dalle-Donne I, Rossi R, Milzani A, Di Simplicio P, Colombo R. The actin cytoskeleton response to oxidants: From small heat shock protein phosphorylation to changes in the redox state of actin itself. *Free radical biology & medicine*. 2001;31(12):1624-32.
- de APAM, Verissimo-Filho S, Guimaraes LL, Silva AC, Takiuti JT, Santos CX, et al. Protein disulfide isomerase redox-dependent association with p47(phox): Evidence for an organizer role in leukocyte nadph oxidase activation. *Journal of leukocyte biology*. 2011;90(4):799-810.
- Dikalov SI, Dikalova AE, Bikineyeva AT, Schmidt HH, Harrison DG, Griendling KK. Distinct roles of nox1 and nox4 in basal and angiotensin ii-stimulated superoxide and hydrogen peroxide production. *Free radical biology & medicine*. 2008;45(9):1340-51.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

- Dikalova A, Clempus R, Lassegue B, Cheng G, McCoy J, Dikalov S, et al. Nox1 overexpression potentiates angiotensin ii-induced hypertension and vascular smooth muscle hypertrophy in transgenic mice. *Circulation*. 2005;112(17):2668-76.
- Endemann D, Touyz RM, Li JS, Deng LY, Schiffrin EL. Altered angiotensin ii-induced small artery contraction during the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *American journal of hypertension*. 1999;12(7):716-23.
- Essex DW, Chen K, Swiatkowska M. Localization of protein disulfide isomerase to the external surface of the platelet plasma membrane. *Blood*. 1995;86(6):2168-73.
- Fernandes DC, Manoel AH, Wosniak J, Jr., Laurindo FR. Protein disulfide isomerase overexpression in vascular smooth muscle cells induces spontaneous preemptive nadph oxidase activation and nox1 mrna expression: Effects of nitrosothiol exposure. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2009;484(2):197-204.
- Freedman RB, Gane PJ, Hawkins HC, Hlodan R, McLaughlin SH, Parry JW. Experimental and theoretical analyses of the domain architecture of mammalian protein disulphide-isomerase. *Biological chemistry*. 1998;379(3):321-8.
- Frid MG, Dempsey EC, Durmowicz AG, Stenmark KR. Smooth muscle cell heterogeneity in pulmonary and systemic vessels. Importance in vascular disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1997;17(7):1203-9.
- Fridez P, Zulliger M, Bobard F, Montorzi G, Miyazaki H, Hayashi K, et al. Geometrical, functional, and histomorphometric adaptation of rat carotid artery in induced hypertension. *Journal of biomechanics*. 2003;36(5):671-80.
- Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: The good, the bad, and the ugly. *Circulation research*. 2002;90(3):251-62.
- Garrido AM, Griendling KK. NADPH oxidases and angiotensin II receptor signaling. *Molecular and cellular endocrinology*. 2009;302(2):148-58.
- Goettsch C, Goettsch W, Muller G, Seebach J, Schnittler HJ, Morawietz H. Nox4 overexpression activates reactive oxygen species and p38 mapk in human endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2009;380(2):355-60.
- Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circulation research*. 1994;74(6):1141-8.
- Griendling KK, Sorescu D, Lassegue B, Ushio-Fukai M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2000;20(10):2175-83.
- Hao L, Du M, Lopez-Campistrous A, Fernandez-Patron C. Agonist-induced activation of matrix metalloproteinase-7 promotes vasoconstriction through the epidermal growth factor-receptor pathway. *Circulation research*. 2004;94(1):68-76.
- Hassan S, Dobner PR, Carraway RE. Involvement of map-kinase, pi3-kinase and egf-receptor in the stimulatory effect of neurotensin on DNA synthesis in pc3 cells. *Regulatory peptides*. 2004;120(1-3):155-66.
- Hatahet F, Ruddock LW. Protein disulfide isomerase: A critical evaluation of its function in disulfide bond formation. *Antioxidants & redox signaling*. 2009;11(11):2807-50.
- Helmcke I, Heumüller S, Tikkanen R, Schröder K, Brandes RP. Identification of structural elements in Nox1 and Nox4 controlling localization and activity. *Antioxidants & redox signaling*. 2009;11(6):1279-87.
- Intengan HD, Schiffrin EL. Vascular remodeling in hypertension: Roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension*. 2001;38(3 Pt 2):581-7.

- Janiszewski M, Lopes LR, Carmo AO, Pedro MA, Brandes RP, Santos CX, et al. Regulation of nad(p)h oxidase by associated protein disulfide isomerase in vascular smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(49):40813-9.
- Jiang XM, Fitzgerald M, Grant CM, Hogg PJ. Redox control of exofacial protein thiols/disulfides by protein disulfide isomerase. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(4):2416-23.
- Katsuyama M, Fan C, Arakawa N, Nishinaka T, Miyagishi M, Taira K, et al. Essential role of atf-1 in induction of nox1, a catalytic subunit of nadph oxidase: Involvement of mitochondrial respiratory chain. *The Biochemical journal*. 2005;386(Pt 2):255-61.
- Kuroda J, Nakagawa K, Yamasaki T, Nakamura K, Takeya R, Kuribayashi F, et al. The superoxide-producing nad(p)h oxidase nox4 in the nucleus of human vascular endothelial cells. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*. 2005;10(12):1139-51.
- Lahav J, Wijnen EM, Hess O, Hamaia SW, Griffiths D, Makris M, et al. Enzymatically catalyzed disulfide exchange is required for platelet adhesion to collagen via integrin $\alpha 2 \beta 1$. *Blood*. 2003;102(6):2085-92.
- Lassegue B, Clempus RE. Vascular nad(p)h oxidases: Specific features, expression, and regulation. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2003;285(2):R277-97.
- 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. *Antioxidants & redox signaling*. 2008;10(6):1101-13.
- Laurindo FR, Pescatore LA, Fernandes Dde C. Protein disulfide isomerase in redox cell signaling and homeostasis. *Free radical biology & medicine*. 2012;52(9):1954-69.
- Lehoux S, Lemarie CA, Esposito B, Lijnen HR, Tedgui A. Pressure-induced matrix metalloproteinase-9 contributes to early hypertensive remodeling. *Circulation*. 2004;109(8):1041-7.
- Martyn KD, Frederick LM, von Loehneysen K, Dinanuer MC, Knaus UG. Functional analysis of nox4 reveals unique characteristics compared to other nadph oxidases. *Cellular signalling*. 2006;18(1):69-82.
- Meunier L, Usherwood YK, Chung KT, Hendershot LM. A subset of chaperones and folding enzymes form multiprotein complexes in endoplasmic reticulum to bind nascent proteins. *Molecular biology of the cell*. 2002;13(12):4456-69.
- Miller FJ, Jr., Chu X, Stanic B, Tian X, Sharma RV, Davisson RL, et al. A differential role for endocytosis in receptor-mediated activation of nox1. *Antioxidants & redox signaling*. 2010;12(5):583-93.
- Mulvany MJ. Small artery remodeling in hypertension. *Current hypertension reports*. 2002;4(1):49-55.
- Nagase H, Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(31):21491-4.
- NagaseRaffetto JD, Khalil RA. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochemical pharmacology*. 2008;75(2):346-59.
- Nakata A, Miyagawa J, Yamashita S, Nishida M, Tamura R, Yamamori K, et al. Localization of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in human coronary arteries. Possible roles of hb-egf in the formation of coronary atherosclerosis. *Circulation*. 1996;94(11):2778-86.

- Newby AC. Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates. *Cardiovascular research*. 2006;69(3):614-24.
- Nguyen Dinh Cat A, Montezano AC, Burger D, Touyz RM. Angiotensin ii, nadph oxidase, and redox signaling in the vasculature. *Antioxidants & redox signaling*. 2013;19(10):1110-20.
- Pendyala S, Natarajan V. Redox regulation of nox proteins. *Respiratory physiology & neurobiology*. 2010;174(3):265-71.
- Pescatore LA, Bonatto D, Forti FL, Sadok A, Kovacic H, Laurindo FR. Protein disulfide isomerase is required for platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell migration, nox1 nadph oxidase expression, and rhoGTPase activation. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(35):29290-300.
- Rao GN, Berk BC. Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. *Circulation research*. 1992;70(3):593-9.
- Rey FE, Cifuentes ME, Kiarash A, Quinn MT, Pagano PJ. Novel competitive inhibitor of nad(p)h oxidase assembly attenuates vascular o(2)(-) and systolic blood pressure in mice. *Circulation research*. 2001;89(5):408-14.
- Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, et al. Cell migration: Integrating signals from front to back. *Science*. 2003;302(5651):1704-9.
- Santos CX, Stolf BS, Takemoto PV, Amanso AM, Lopes LR, Souza EB, et al. Protein disulfide isomerase (pdi) associates with nadph oxidase and is required for phagocytosis of leishmania chagasi promastigotes by macrophages. *Journal of leukocyte biology*. 2009;86(4):989-98.
- Stanic B, Katsuyama M, Miller FJ, Jr. An oxidized extracellular oxidation-reduction state increases nox1 expression and proliferation in vascular smooth muscle cells via epidermal growth factor receptor activation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2010;30(11):2234-41.
- Stanic B, Pandey D, Fulton DJ, Miller FJ, Jr. Increased epidermal growth factor-like ligands are associated with elevated vascular nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase in a primate model of atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2012;32(10):2452-60.
- Stirnweiss J, Valkova C, Ziesche E, Drube S, Liebmann C. Muscarinic m2 receptors mediate transactivation of egf receptor through fyn kinase and without matrix metalloproteases. *Cellular signalling*. 2006;18(8):1338-49.
- Sturrock A, Cahill B, Norman K, Huecksteadt TP, Hill K, Sanders K, et al. Transforming growth factor-beta1 induces nox4 nad(p)h oxidase and reactive oxygen species-dependent proliferation in human pulmonary artery smooth muscle cells. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2006;290(4):L661-L73.
- Swiatkowska M, Szymanski J, Padula G, Cierniewski CS. Interaction and functional association of protein disulfide isomerase with alphavbeta3 integrin on endothelial cells. *The FEBS journal*. 2008;275(8):1813-23.
- Tabet F, Savoia C, Schiffrin EL, Touyz RM. Differential calcium regulation by hydrogen peroxide and superoxide in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2004;44(2):200-8.
- Tager M, Kroning H, Thiel U, Ansorge S. Membrane-bound protein disulfide isomerase (pdi) is involved in regulation of surface expression of thiols and drug sensitivity of b-ctl cells. *Experimental hematology*. 1997;25(7):601-7.

- Terada K, Manchikalapudi P, Noiva R, Jauregui HO, Stockert RJ, Schilsky ML. Secretion, surface localization, turnover, and steady state expression of protein disulfide isomerase in rat hepatocytes. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270(35):20410-6.
- Tian G, Xiang S, Noiva R, Lennarz WJ, Schindelin H. The crystal structure of yeast protein disulfide isomerase suggests cooperativity between its active sites. *Cell*. 2006;124(1):61-73.
- Touyz RM, Schiffrin EL. Ang ii-stimulated superoxide production is mediated via phospholipase d in human vascular smooth muscle cells. *Hypertension*. 1999;34(4 Pt 2):976-82.
- Van Buul JD, Fernandez-Borja M, Anthony EC, Hordijk PL. Expression and localization of nox2 and nox4 in primary human endothelial cells. *Antioxidants & redox signaling*. 2005;7(3-4):308-17.
- van Varik BJ, Rennenberg RJ, Reutelingsperger CP, Kroon AA, de Leeuw PW, Schurgers LJ. Mechanisms of arterial remodeling: Lessons from genetic diseases. *Frontiers in genetics*. 2012;3:290.
- Van Wart HE, Birkedal-Hansen H. The cysteine switch: A principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990;87(14):5578-82.
- Wetzker R, Bohmer FD. Transactivation joins multiple tracks to the erk/mapk cascade. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2003;4(8):651-7.
- Wolf C, Cai WJ, Vosschulte R, Koltai S, Mousavipour D, Scholz D, et al. Vascular remodeling and altered protein expression during growth of coronary collateral arteries. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 1998;30(11):2291-305.
- Zalba G, Beaumont J, San Jose G, Fortuno A, Fortuno MA, Diez J. Vascular oxidant stress: Molecular mechanisms and pathophysiological implications. *Journal of physiology and biochemistry*. 2000;56(1):57-64.
- Zalewski A, Shi Y, Johnson AG. Diverse origin of intimal cells: Smooth muscle cells, myofibroblasts, fibroblasts, and beyond? *Circulation research*. 2002;91(8):652-5.