LÍVIA DE LUCCA CAMARGO

**PAPEL DA PROTEÍNA DISSULFETO ISOMERASE NA
SINALIZAÇÃO REDOX EM CÉLULAS ENDOTELIAIS E
MUSCULARES LISAS VASCULARES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2013

LÍVIA DE LUCCA CAMARGO

Papel da Proteína Dissulfeto Isomerase na sinalização redox
em células endoteliais e musculares lisas vasculares

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Prof^a Dr^a Lúcia Rossetti
Lopes

Versão original

São Paulo
2013

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

© reprodução total

Camargo, Livia de Lucca.

Papel da Proteína Disulfeto Isomerase na sinalização redox de células endoteliais e musculares lisas vasculares / Livia de Lucca Camargo. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Lucia Rossetti Lopes.

Tese (Doutorado) – 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: Role of Protein Disulfide Isomerase in redox signaling in endothelial and vascular smooth muscle cells.

1. Proteína dissulfeto isomerase 2. Angiotensina II 3. TNF- α
4. NAPPH oxidase 5. Hipertensão arterial 6. Angiogênese I. Lopes, Profa. Dra. Lucia Rossetti II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB0195/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Livia de Lucca Camargo.

Título da Tese: Papel da Proteína Disulfeto Isomerase na sinalização redox de células endoteliais e musculares lisas vasculares.

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

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

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

*Aos meus pais Humberto e
Rosangela, pelo apoio
incondicional.*

AGRADECIMENTOS

A Profa. Lúcia Rossetti Lopes, pela orientação e, sobretudo por esta oportunidade.

Aos parceiros do Laboratório de Sinalização Redox, Aline Androwiki, Ana Alice Dias, Marcela Gimenes, Sidney Veríssimo Filho e ao nosso agregado mais querido Adilson da Silva Alves, pelo apoio técnico e moral sem o qual esta tese não teria sido realizada. E ainda mais importante, muito obrigada pela amizade!!!

I thank Prof. Dr. Ralf Brandes for giving me the opportunity to work in his lab and to really improve my skills in scientific research. Moreover, I thank you for the opportunity to know the beautiful Germany and to meet new and wonderful friends. I also like to thank your staff, especially Cindy Höper and Katalin Wandzioch for technical support in the time I was there and afterwards to finish the manuscript.

I would like to thank Andrea Babelova for all the support you provided me in the lab (and out of it) when I was in Frankfurt, and to work hard to finish the project we started. Most of all, thank you for your friendship.

A Profa Zuleica Bruno Fortes, que acompanhou a minha caminhada na vida científica desde o mestrado, pelas discussões científicas e acima de tudo pelo exemplo profissional que a senhora representa. Muito obrigada!

A Profa. Maria Helena Catelli de Carvalho e Profa Eliane Akamine e ao pessoal do Laboratório de Hipertensão, pela contribuição nos experimentos de reatividade vascular e sempre que precisei de uma “mãozinha”. Um agradecimento especial, a Ana Rita Araujo Gonçalves (Ritinha), a Maria Aparecida Oliveira e a Rosangela Escler, que sempre estiveram a disposição para ajudar.

Ao Prof. Francisco Laurindo pelas discussões científicas e pelo apoio durante o desenvolvimento desta tese. Ao pessoal do Laboratório de Biologia Vascular, em especial, a Dra. Denise Fernandes e ao Victor Debbas, pela ajuda nos protocolos experimentais.

A Profa. Graziela Ceravolo, pelos experimentos de reatividade vascular, e a Dra. Andreia Chignalia por ensinar, do seu jeitinho todo especial, a técnica da cultura de células musculares lisas vasculares. Muito obrigada à vocês pelas discussões e conselhos científicos e não científicos, pelos cafés filosóficos no lab, pelos momentos divertidos e de desabafo, enfim pela amizade!

Ao grande amigo Dr Alexandre Denadai-Souza por contribuir mais uma vez com meu trabalho, com o lindo experimento da avaliação do influxo de cálcio intracelular. E além do suporte técnico e científico, pelos bons drinks no Finnegans. Thanks for all the fish!

Aos amigos mais que especiais Paulo Henrique Braz da Silva, Caroline Fukushima, Carlos Paiola, Aline Maia Dantas e João Gimenes Jr por fazerem parte da minha vida. Sem a amizade de vocês as coisas seriam muito, muito mais difíceis!

Às companheiras de CEO Luciana Valério, Tatiane Pinheiro, Maria da Conceição Ramos, Mirian Sales, Fumika Ono e Eliana Berti pela ajuda, carinho, compreensão e por tornarem minhas tardes muito mais divertidas!

E por ultimo, mas nem de longe menos importante a minha família pela força, apoio, carinho e compreensão nos momentos de ausência. Muito obrigada por tudo, vocês são a força que me empurra para frente e não me deixa desistir!!

*Talvez não tenha conseguido fazer o
melhor, mas lutei para que o melhor fosse
feito. Não sou o que deveria ser, mas
Graças a Deus, não sou o que era antes”.*
(Marthin Luther King)

RESUMO

Camargo LL. Papel da Proteína Dissulfeto Isomerase na sinalização redox de células endoteliais e musculares lisas vasculares. [tese (Doutorado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

A proteína dissulfeto isomerase (PDI), uma oxidoreductase do retículo endoplasmático, tem ganhado destaque em processos de sinalização celular. Em células musculares lisas vasculares (CMLV), PDI foi identificada como uma proteína regulatória da atividade da NADPH oxidase. Adicionalmente, células endoteliais apresentam expressão preferencial de ERp46, outro membro da família PDI. No entanto, o papel destas proteínas na ativação de células endoteliais e CMLV ainda não foi elucidado. O objetivo deste trabalho foi investigar o papel da PDI na sinalização redox induzida por TNF- α em células endoteliais e por Ang II em CMLV. Em cultura de células endoteliais isoladas da veia umbilical de humano (HUVECs) os dados demonstraram que a PDI e a ERp46 regulam especificamente a fosforilação da ERK 1/2 induzida por TNF- α , possivelmente via alterações redox sobre a GTPase Ras. ERK 1/2 ativa o fator de transcrição AP-1, que controla a expressão de MMP-9 e catepsina B, proteinases necessárias no processo de angiogênese. Como consequência, a inibição da PDI e da ERp46 reduziram a angiogênese induzida por TNF- α , através da redução da expressão da metaloproteinase MMP-9 e catepsina B. Desta forma, demonstramos que a PDI participa da angiogênese induzida por TNF- α . Em CMLV de artérias de resistência, os resultados obtidos mostram que a PDI regula a expressão de Nox 1. Em CMLV de ratos hipertensos (SHR), a expressão de PDI e Nox 1 encontram-se aumentadas. A inibição da PDI está relacionada a uma diminuição na expressão de Nox1, na produção de EROs, da fosforilação da c-Src e da ERK 1/2 quinase, bem como da mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ em CMLV de animais Wistar e SHR, resultando em diminuição da resposta contrátil a Ang II. Os dados sugerem a participação da PDI na contração induzida por Ang II, bem como na disfunção vascular associada à hipertensão arterial, através da regulação da expressão e atividade da Nox1. Desta forma, podemos concluir que a PDI apresenta um papel na regulação da sinalização redox induzida por TNF- α e Ang II em células endoteliais e CMLV, respectivamente. Tais resultados apontam para um novo papel da PDI na fisiopatologia do sistema cardiovascular.

Palavras-chave: Proteína dissulfeto isomerase (PDI). Angiotensina II. TNF- α . NADPH oxidase. Hipertensão arterial. Angiogênese.

ABSTRACT

Camargo LL. Role of Protein Disulfide Isomerase in redox signaling in endothelial and vascular smooth muscle cells. [Ph. D. thesis (Pharmacology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

Protein disulfide isomerase (PDI), an oxidoreductase of endoplasmic reticulum, has emerged as a key player in cell signaling. In vascular smooth muscle cell (VSMC) PDI regulates NADPH expression and activity. Additionally, in endothelial cells Erp46, a PDI family member, is preferentially expressed. However the role of these proteins in endothelial cell or VSMC function is still unknown. The aim of the present study was to investigate the role of PDI in redox signaling induced by TNF- α in endothelial cells and by Ang II in VSMCs. In human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) ERp46 or PDI inhibition reduced specifically TNF- α -induced ERK1/2 phosphorylation, possibly via redox modifications in Ras GTPase. ERK activation influences gene expression by the transcriptional factor AP-1 which controls MMP-9 and cathepsin B, two proteases required for angiogenesis. ERp46 or PDI silencing decreased TNF- α induced MMP-9 and cathepsin B mRNA expression, and the formation of endothelial cell sprouts in the spheroid outgrowth assay, used as a model of angiogenesis. Our study establishes that ERp46 and PDI are required for TNF- α -induced angiogenesis. In VSMCs from resistance arteries, gain/loss of function experiments showed that Nox1 expression was regulated by PDI. In SHR cells, PDI and Nox1 expression were higher as compared to wistar cells. PDI inhibition reduced Ang II-induced ROS generation, c-Src and ERK 1/2 phosphorylation, $[Ca^{2+}]_i$ influx and mesenteric vasoconstriction in Wistar and SHR rats. Our results suggest that PDI positively regulates Nox1 dependent signaling and expression in VSMCs from resistance arteries and be could be a new player in the oxidative stress and vascular dysfunction observed in hypertension. Altogether, the results provide evidence for a role for PDI in cardiovascular pathophysiology.

Keywords: Protein disulfide isomerase (PDI). Angiotensin II. TNF- α . NADPH oxidase. Hypertension. Angiogenesis.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	As espécies reativas de oxigênio e a sinalização celular.....	18
1.2	NADPH oxidase.....	20
1.3	A sinalização redox induzida por TNF- α e suas implicações em patologias do sistema cardiovascular.....	22
1.4	A sinalização redox induzida por Ang II e suas implicações na hipertensão arterial.....	25
1.5	Proteína disulfeto isomerase.....	28
2	OBJETIVO.....	32
2.1	Objetivo Geral.....	33
2.2	Objetivos específicos.....	33
2.2.1	<i>Investigação do papel da ERp46 e da PDI sobre a sinalização induzida por TNF-α.....</i>	<i>33</i>
2.2.2	<i>Investigação do papel da PDI sobre a sinalização induzida por Ang II.....</i>	<i>33</i>
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.1	Cultura celular.....	35
3.1.1	<i>Cultura de células endoteliais.....</i>	<i>35</i>
3.1.2	<i>Cultura primária de CMLV provenientes do leito mesentérico.....</i>	<i>35</i>
3.2	Transfecção com RNA de interferencia (siRNA).....	36
3.3	Superexpressão de PDI.....	37
3.4	Western blot.....	37
3.5	Reação de Polimerase em Cadeia em tempo real (RT-PCR).....	38
3.6	Modelo tridimensional de esferoides de células endoteliais.....	39
3.7	Imunofluorescência.....	40
3.8	Determinação da geração de EROs por fluorescência derivada da oxidação da dihidroetidina.....	40
3.9	Avaliação da mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ em CMLV.....	41
3.10	Animais.....	42
3.11	Determinação da pressão arterial.....	42
3.12	Reatividade Vascular do Leito Arteriolar Mesentérico Isolado.....	43
3.13	Análise Estatística.....	43
4	RESULTADOS.....	44
4.1	Investigação do papel da ERp46 e da PDI sobre a sinalização induzida por TNF- α em células endoteliais.....	45
4.1.1	<i>Silenciamento da ERp46 em células endoteliais.....</i>	<i>45</i>

4.1.2 Silenciamento da PDI em células endoteliais.....	47
4.1.3 Efeito do silenciamento de ERp46 e PDI sobre a fosforilação da quinase ERK 1/2 induzidas por TNF- α em células endoteliais.....	49
4.1.4 Efeito da inibição da expressão de ERp46 sobre a fosforilação da quinase p38 induzida por TNF- α	51
4.1.5 Efeito do silenciamento de ERp46 e PDI sobre a fosforilação da quinase JNK induzida por TNF- α	53
4.1.6 Efeito do silenciamento de ERp46 e PDI sobre a degradação de kB α induzida por TNF - α	55
4.1.7 Participação da PDI de superfície celular na regulação da fosforilação da quinase ERK 1/2.....	57
4.1.8 Efeito do silenciamento de ERp46 e PDI sobre a expressão de ICAM induzida por TNF α	59
4.1.9 Efeito do silenciamento de ERp46 e PDI sobre a sinalização celular induzida por IL- 1 β	61
4.1.10 Efeito do silenciamento de ERp46 e PDI sobre a sinalização celular induzida por trombina.....	63
4.1.11 Efeito do silenciamento de ERp46 e PDI sobre a sinalização celular induzida por FGF.....	65
4.1.12 Participação da PDI de superfície celular na regulação da fosforilação da quinase ERK 1/2.....	67
4.1.13 Efeito de inibidores da PDI na regulação da fosforilação da quinase ERK 1/2.....	69
4.1.14 Participação do receptor do fator de crescimento epitelial (EGFR) sobre a fosforilação da ERK 1/2.....	71
4.1.15 Efeito do silenciamento de ERp46 e PDI sobre a expressão de MMP-9 e Catepsina B induzida por TNF- α em células endoteliais.....	73
4.1.16 Efeito da inibição da quinase MEK sobre a expressão de MMP-9 e induzida por TNF- α	75
4.1.17 Efeito do silenciamento de ERp46 sobre a angiogênese por TNF- α em células endoteliais.....	77
4.2 Papel da PDI na sinalização induzida por AngII em CMLV de ratos Wistar e SHR.....	79
4.2.1 Determinação da pressão arterial de animais Wistar e SHR.....	80
4.2.2 Isolamento de CMLV de artérias mesentéricas para cultura.....	80
4.2.3 Expressão de RNAm das subunidades Nox 1 e Nox 4 em CMLV de Wistar e SHR.....	82
4.2.4 Expressão Protéica de PDI em CMLV de ratos Wistar e SHR.....	84
4.2.5 Silenciamento da PDI em de CMLV de ratos Wistar e SHR.....	86

4.2.6 Efeito do silenciamento da PDI sobre a expressão de Nox1 e Nox4 em CMLV de ratos Wistar e SHR.....	88
4.2.7 Efeito do silenciamento da PDI sobre a ativação de ERK 1/2 induzida por Ang II em CMLV de Wistar e SHR.....	90
4.2.8 Super expressão de PDI em CMLV de Wistar.....	92
4.2.9 Efeito da super expressão de PDI em CMLV de Wistar e SHR.....	94
4.2.10 Efeito da super expressão de PDI em sobre a ativação de ERK 1/2 induzida por Ang II em CMLV de ratos Wistar.....	96
4.2.11 Efeito da inibição da PDI sobre a geração de EROs.....	98
4.2.12 Efeito da inibição da PDI sobre a ativação da c-Src quinase.....	100
4.2.13 Efeito da inibição da PDI sobre a ativação da ERK 1/2.....	102
4.2.14 Efeito da PDI sobre a mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ a Ang II em CMLV de animais Wistar e SHR.....	104
4.2.15 Efeito da PDI sobre a resposta vasoconstritora a Ang II no leito arteriolar mesentérico de animais Wistar e SHR.....	106
5 DISCUSSÃO.....	109
5.1 Participação da ERp46 e da PDI na angiogenese induzida por TNF-α.....	110
5.2 Papel da PDI na sinalização induzida por Ang II em CMLV. Implicações na disfunção vascular associada à hipertensão arterial.....	113
6 CONCLUSÕES.....	120
REFERÊNCIAS.....	122
APÊNDICE – Endo-PDI is required for TNFα-induced angiogenesis.....	128

1 INTRODUÇÃO

A sinalização redox está se mostrando uma parte importante de vários processos fisiológicos e patológicos, especialmente no sistema cardiovascular (Chung et al., 2013). Neste contexto, espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas em células após o estímulo com diversos agentes como o fator de necrose tumoral α (TNF- α) e a Angiotensina II (Ang II), com a finalidade de ativar cascatas de sinalização. Adicionalmente, o aumento destas espécies está relacionado à patologias como a hipertensão arterial, aterosclerose, hipertrofia cardíaca, infarto do miocárdio (Lassegue et al., 2012). Portanto, a elucidação dos mecanismos de sinalização redox vem se tornando alvo de muitos estudos que buscam o esclarecimento do papel das EROs na fisiopatologia de doenças do sistema cardiovascular.

1.1 EROs e sinalização redox

EROs é um termo utilizado para descrever espécies químicas formadas a partir da redução incompleta do oxigênio e incluem o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($HO^{\bullet}$). A redução do oxigênio na presença de um elétron livre gera ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), que é um radical instável, incapaz de atravessar membranas celulares, mas que pode agir como agente redutor. A dismutação do $O_2^{\bullet-}$, espontaneamente ou catalisado pela enzima superóxido dismutase (SOD), forma o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Esta espécie não radicalar é lipossolúvel, pode ultrapassar membranas celulares e tem meia-vida maior que seu precursor. O H_2O_2 pode ser degradado pela enzima catalase formando H_2O e O_2 , ou ainda, ser reduzido na presença de moléculas que contenham metais como ferro e cobre gerando radical hidroxila ($OH^{\bullet}$), que é extremamente reativo. Diferentemente do $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 que podem atuar em locais distantes da fonte geradora, o $OH^{\bullet}$ produz alterações somente de forma localizada. Conseqüentemente, o $O_2^{\bullet-}$ e o H_2O_2 podem ter vida média suficientemente longa, de modo compatível com o papel destas EROs na sinalização redox (Winterbourne, Hampton, 2008).

Os efeitos das EROs são modulados, pelo menos em parte, pela modificação de cisteínas, aminoácidos presentes em proteínas. Estes aminoácidos apresentam um grupo tiol (-SH) que pode ser oxidado por EROs levando à formação de diversas modificações como, por exemplo, oxidação a ácido sulfenico (SOH), sulfínico

(SO₂H), sulfônico (SO₃H), a S-nitrosação (SNO), a S-glutatioilação (RS-SG) e a formação de pontes dissulfeto (RS-SR). Estas reações podem ser reversíveis, pois as cisteínas oxidadas podem ser reduzidas por antioxidantes à tiol livre (SH). As reações redox provocam mudanças estruturais e funcionais em moléculas, modificando processos de sinalização (Chung et al., 2013).

Figura 1 – Exemplo de sinalização redox através da oxidação de grupos tiol e cisteínas

A oxidação de grupos tiol (-SH) por EROs provoca mudanças estruturais que levam a ativação de quinases, conseqüentemente permitindo a fosforilação de vias de sinalização. As cisteínas oxidadas podem ser reduzidas por antioxidantes formando tióis livres (SH). (Adaptado de Chung et al., 2013)

Em condições fisiológicas, a produção de EROs é fortemente regulada por sistemas antioxidantes enzimáticos que envolvem agentes ou enzimas sequestradoras de EROs como catalase e superóxido dismutase (SOD), vitamina C, E e moléculas contendo grupos tióis como a glutathiona (Winterbourne, Hampton, 2008). Desta maneira, o ambiente intracelular é mantido em estado redox controlado.

Em condições patológicas o excesso de espécies oxidantes dá origem ao fenômeno conhecido como estresse oxidativo. Neste contexto, o estresse oxidativo sempre foi definido como sendo um aumento de EROs devido a um desequilíbrio entre mecanismos celulares antioxidantes (i.e., superóxido dismutases, glutathiona

peroxidases, tioredoxinas, entre outros) e mecanismos pró-oxidantes (sistemas geradores de EROs). Porém, estudos mais recentes, sugerem que o desequilíbrio entre os sistemas pró e antioxidantes ocorre numa fase mais tardia. Em um estágio inicial alterações na geração de EROs restringem-se a compartimentos celulares específicos, como endossomo, cavéola, núcleo e, não implicam necessariamente na alteração do estado redox global da célula (Jones, 2006).

Assim, a visão atual do conceito de estresse oxidativo aponta um papel do aumento das EROs como desencadeador de uma ruptura dos circuitos de sinalização redox associado a uma ativação de vias patológicas por estas espécies (Jones, 2006). Um exemplo pode ser observado na regulação de tirosinas fosfatases, moléculas que realizam a defosforilação de substratos regulando as vias de sinalização ativadas por quinases. Estas proteínas possuem um grupo tiol em resíduo de cisteína que quando oxidado torna a proteína inativa (Ross et al., 2007). É o que demonstra Tabet et al. (2008) em ratos espontaneamente hipertensos, em que o aumento da geração de EROs resulta em aumento da oxidação da fosfatase SHP-2 com conseqüente ativação de vias de sinalização que resultam em crescimento e proliferação celular. Estes efeitos estão relacionados à disfunção vascular associada à doenças cardiovasculares como a hipertensão arterial.

1.2 NADPH oxidase

A NADPH oxidase é um complexo enzimático que produz $O_2^{\bullet-}$ a partir da redução do oxigênio molecular por um elétron doado pelo NADPH. A estrutura e função desta enzima foram caracterizadas primeiramente em neutrófilos. A NADPH oxidase fagocítica é constituída de dois componentes associados à membrana celular, gp91phox (Nox2) e p22phox, e subunidades citosólicas regulatórias, p47^{PHOX}, p67^{PHOX} e p40^{PHOX}, além de uma proteína G, Rac1 ou Rac2. Sob estímulo específico ocorre a fosforilação do p47^{PHOX} que coordena a migração para a membrana celular dos outros componentes citosólicos, com exceção da Rac. Assim, a oxidase fagocítica só é capaz de efetuar a transferência de elétrons nesta forma acoplada a membrana (Babior, 2004).

Figura 2 – Estrutura da NADPH oxidase de neutrófilos.

As subunidades citosólicas, p47^{PHOX}, p67^{PHOX} e p40^{PHOX} e Rac migram para a membrana celular onde associam-se às subunidades de membrana Nox 2 e p22^{PHOX}, ativando a enzima que desta forma realiza a transferência de elétrons utilizando NADPH como substrato e gerando O₂⁻.

Após a descoberta de homólogos do gp91^{PHOX}, foi identificada uma família de NADPH oxidases, nomeadas de acordo com a subunidade catalítica, Nox. Atualmente, a família é formada por 7 membros, Nox 1, Nox 2 (gp91^{PHOX}), Nox 3, Nox 4, Nox 5, Duox 1 e Duox 2. Além de homólogos das subunidades citosólicas p47^{PHOX}, p67^{PHOX}, NoxO1 e NoxA1, respectivamente (Brandes, Schröder, 2008).

Estas enzimas são expressas em muitos tecidos incluindo todas as camadas vasculares: células endoteliais expressam Nox 1, 2 e 4; CMLV apresentam Nox 1 e 4; fibroblastos da camada adventícia possuem Nox 2 e 4; e o tecido adiposo perivascular expressa Nox 4 (Lassegue et al., 2012). Em CMLV, a Nox 1 está localizada na cavéola e na membrana plasmática (Hilenski et al., 2004). Esta isoforma gera O₂^{•-} e para isso requer a associação as subunidades p47^{PHOX}, NOXA1 e Rac1.

A isoforma Nox 4 difere da Nox 1 em muitos aspectos. A Nox 4 esta localizada em adesões focais (Hilenski et al., 2004), reticulo endoplasmático e núcleo (Ambasta et al., 2004) e produz H₂O₂ (Takac et al., 2011). Esta isoforma requer apenas associação com a subunidade p22^{PHOX} e parece ser constitutivamente ativa (Ellmark et al., 2005). Tem sido implicada em processos como proliferação, angiogênese e migração celular (Lassegue et al., 2012).

Embora todas as isoformas de Nox sejam proteínas transmembrana capazes de gerar EROs, elas diferem quanto a distribuição e localização celular, associação com subunidades regulatórias, tipo de EROs gerado e mecanismos de ativação (Brandes e Schöreder, 2008). Estas diferenças provavelmente são responsáveis pelas diferentes funções das Nox e conferem especificidade a ação das EROs como segundos mensageiros, de modo que a geração destas espécies seja um evento controlado e compartimentalizado. De fato, diferentemente da NADPH oxidase fagocítica, a NADPH oxidase vascular pode ser regulada por transcrição gênica de suas subunidades. Assim a regulação da atividade da NADPH oxidase pode ocorrer pelo acoplamento das subunidades na fração de membrana ou através do aumento da expressão gênica das subunidades do complexo em si (Brandes e Schöreder, 2008).

As NADPH oxidase desempenham um papel importante na sinalização redox. Por exemplo, o TNF- α ativa vias de sinalização via ativação de Nox 2 em células endoteliais (Anilkumar et al., 2008). De maneira semelhante, muitas das ações celulares da Ang II são mediadas pela ativação de Nox 1 em CMLV (Miller et al., 2010).

1.3 A sinalização redox induzida por TNF- α e suas implicações em patologias do sistema cardiovascular

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória produzida por fagócitos mononucleares que tem como um dos principais alvos as células endoteliais. Nestas células, o TNF- α promove uma gama de ações celulares que incluem proliferação, diferenciação e apoptose (Madge, Pober, 2001). Os efeitos inflamatórios do TNF- α incluem aumento da permeabilidade celular, levando ao extravasamento plasmático e formação de edema, expressão de moléculas de adesão (ICAM-1, VCAM, E-selectina) que contribui para a adesão e migração de leucócito para os sítios inflamatórios, e da sua participação na coagulação induzindo a expressão do fator tecidual e do plasminogênio. Além disso, o TNF- α também é um agente pró-angiogênico, estimulando a angiogênese in vitro, in vivo e em condições patológicas (Frater-Schöreder et al., 1987).

O TNF- α exerce suas ações celulares através de dois receptores, TNFR1 (55 KDa) e TNFR2 (75 KDa). Ambos são expressos em células endoteliais, e são

caracterizados por possuírem quatro domínios ricos em cisteína em seu domínio extracelular (Banner et al., 1993). Estes domínios estão envolvidos na formação de trímeros entre estes receptores, pré-requisito para sua ativação, e estão sujeitos a regulação por reações redox. De fato, estudo de Dominici e colaboradores (2004) mostraram que condições pró-oxidantes são suficientes para modificar o número de grupos tióis extracelulares do TNFR1. Além disso, outro estudo mostrou que o estresse oxidativo promove o aumento da sinalização celular provocada pelo TNF- α (Ozzoy et al., 2008)

A variada gama de ações do TNF- α é possível pela capacidade do TNFR em ativar diversas vias de sinalização. Após a ligação com TNF- α , o TNFR1 ativa o domínio de morte celular (death domain DD) através da molécula adaptadora TRADD. Esta por sua vez recruta outras moléculas adaptadoras como TRAF2 e RIP1 que são capazes de degradar o inibidor do complexo NF κ B (I κ B α) e ativar MAP quinases. A degradação do I κ B α , que mantém o complexo NF κ B no citoplasma, permite sua translocação para o núcleo para iniciar a transcrição gênica. A MAP3K ativa a via que resulta na fosforilação de JNK, p38 e ERK 1/2. A ativação destas MAP quinases e do NF κ B resulta na transcrição de genes pro-inflamatórios e de sobrevivência. No entanto, se ativação do NF κ B é bloqueada, ocorre o recrutamento de FADD e caspase 8 formando um segundo complexo que leva a apoptose (Caballero, Lazo, 2012).

Figura 3 – Ativação do TNFR1 pelo TNF- α

A ligação com TNF- α ao TNFR1 recruta moléculas adaptadoras como TRAF2 e RIP1 que ativam MAP quinases e o NF κ B resultando na transcrição de genes pro-inflamatórios e de sobrevivência. No entanto, a sinalização via domínio de morte celular (*death domain* DD) leva a apoptose (Adaptado de Palladino et al., 2003).

Além destas moléculas sinalizadoras o TNF- α também ativa a NADPH oxidase e utiliza EROs como mediador de suas ações celulares (Frey et al., 2002). Em células endoteliais foi demonstrado que a sinalização aguda do TNF- α depende da fosforilação do p47 (Li et al., 2002). A ativação do NF κ B e a expressão de ICAM-1 também são dependentes da geração de EROs pela NADPH oxidase (Li et al., 2005, Li et al., 2009). Os mecanismos de ativação da NADPH oxidase pelo TNF- α ainda não estão completamente esclarecidos, porém estudos mostraram que a ativação da Nox 2 pelo TNF- α ocorre em endossomos, formados pela internalização do TNFR1 (Li et al., 2009). Esta geração compartimentalizada de EROS também foi demonstrada na ativação de Nox 1 pelo TNF em CMLV (Miller et al., 2010).

A ativação de células endoteliais pelo TNF- α é essencial para muitos processos patológicos. Nas doenças associadas com inflamação crônica, como aterosclerose, a ativação endotelial desempenha um papel tanto na iniciação como na exacerbação desta patologia (Rajashekhar et al., 2006). Esta ativação crônica é

acompanhada por disfunção endotelial, caracterizada por desequilíbrio na produção de mediadores que regulam o tônus vascular, agregação plaquetária, coagulação e fibrinólise pelo endotélio (Carvalho et al., 2006). A característica principal da disfunção endotelial é a redução no relaxamento dependente do endotélio, causado pela diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO). Estudos mostraram que o aumento da geração de $O_2^{\bullet-}$ diminui a disponibilidade de NO, reconhecido agente vasodilatador produzido pelas células endoteliais, devido a velocidade da reação entre estes dois radicais e formação de peroxinitrito ($ONOO^-$). Este por sua vez é capaz de oxidar a tetrahydrobiopterina, cofator da enzima NO sintase, resultando em desacoplamento desta enzima e disfunção endotelial, um processo comum a diversas doenças cardiovasculares (Montezano, Touyz, 2011).

1.4 A sinalização redox induzida por Ang II e suas implicações na hipertensão arterial

Um exemplo do importante papel das EROs nos processos de sinalização celular também pode ser observado nas ações da Ang II nas células musculares lisas da vasculatura (CMLV). Estas células representam um componente dinâmico da vasculatura e são responsáveis pelas características funcionais e estruturais da parede vascular incluindo contração-relaxamento, crescimento, desenvolvimento, remodelamento e reparo. O principal fator que regula a função das CMLV é a Ang II, que após a ligação ao seu receptor AT_1 ativa diversas vias de sinalização intracelulares (Nguyen et al., 2013).

Para promover a ativação das vias de sinalização, a Ang II utiliza as EROs como segundos mensageiros. A Ang II aumenta a geração de EROs em artérias intactas e em CMLV em cultura (Griendling et al., 1994; Touyz e Schiffrin, 1999). As EROs ativam várias moléculas de sinalização envolvidas nas ações vasculares mediadas pela Ang II, 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 et al., 2013).

A geração de EROs pela Nox 1 após estimulação com Ang II tem sido extensamente estudada e pode ser dividida em duas fases distintas, uma rápida e

transiente (segundos) e outra mais prolongada (que pode durar horas). Na fase inicial, a ligação da Ang II com o receptor AT₁ ativa a proteína quinase C (PKC) que fosforila a subunidade p47^{PHOX} ativando a enzima. A manutenção da ativação da Nox 1 requer a transativação do EGFR, mediada pela c-Src levando a ativação de Rac e da NADPH oxidase num ciclo de retroalimentação positiva dependente de EROs (Seshiah et al., 2002). Esta segunda fase de geração de EROs pode durar até 6 horas e é responsável pelos efeitos hipertróficos da Ang II resultando nas alterações estruturais e funcionais no sistema vascular (Brandes, Schröder, 2008).

Neste contexto, o papel das EROs é essencial na contração de CMLV pela Ang II. A ligação da Ang II ao receptor AT₁ ativa a fosfolipase C (PLC), que resulta na geração de inositol trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG). O IP₃ se liga ao seu receptor no retículo endoplasmático (IP₃R) e regula a liberação de cálcio deste compartimento celular para o citosol, causando rápido aumento da concentração de cálcio intracelular. Após este rápido influxo inicial segue-se uma fase de plateau com manutenção dos níveis de cálcio acima do nível basal, resultado da abertura de canais de cálcio na membrana plasmática. O alvo principal do cálcio intracelular é a proteína calmodulina, formando o complexo calmodulina-Ca²⁺ que ativa a quinase da cadeia leve da tirosina (MLCK). A ativação desta quinase resulta na fosforilação da cadeia leve da miosina, permitindo a interação com a actina e conseqüentemente a contração. A MLCK, por sua vez é regulada pela ação fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP), que é inibida pela Rho quinase responsável pela manutenção da contração (Wynne et al., 2009).

Estudos demonstraram que a produção de EROs via NADPH oxidase poderia modular a contração de CMLV em diversas etapas: i) modulando a afinidade de IP₃ pelo seu receptor (Torrecillas et al. 2004), ii) inativando canais de cálcio iii) inibindo a Ca²⁺/ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA), responsável pelo transporte de cálcio do citosol para o retículo endoplasmático e iv) ativando a Rho quinase. Desta forma, o excesso de EROs poderia levar a ativação patológica destas vias resultando em aumento da contratilidade vascular (Garrido e Griendling 2009).

Figura 4 – Papel das EROS nas vias de sinalização envolvidas na contração de CMLV induzida por Ang II.

As EROS produzidas pela NADPH oxidase podem atuar sobre a ligação de IP_3 ao seu receptor (IP_3R) no retículo endoplasmático, inibindo a recaptção de Ca^{2+} pela Ca-ATPase do retículo (SERCA), ativando canais de Ca^{2+} e ativando a via da Rho quinase pela modulação do fator de troca GTP/GDP (RhoGEF) que ativa RhoA e esta por sua vez ativa Rho quinase, desta forma promovendo a contração de CMLV (adaptado de Garrido e Griendling, 2009).

Nos últimos anos, o nosso entendimento sobre o papel das EROS na fisiopatologia de doenças cardiovasculares, como a hipertensão arterial tem aumentado consideravelmente. Definida classicamente como uma elevação crônica da pressão arterial, a hipertensão arterial tem como característica hemodinâmica principal o aumento da resistência vascular periférica que é associada com alterações estruturais, mecânicas e funcionais na vasculatura periférica (Folkow, 1990). Estas mudanças incluem redução no diâmetro da luz do vaso, espessamento da camada média (remodelamento vascular; Mulvany, 2002) e aumento da reatividade a agentes vasoativos, como a Ang II. Esta também parece estar envolvida no processo de remodelamento vascular, uma vez que alterações nas vias de sinalização dependentes de Ang II tem sido descritas em CMLV de animais hipertensos, tais como aumento do crescimento vascular, aumento da deposição de

matriz extracelular, inibição da apoptose, indução de migração celular e inflamação (Nguyen et al., 2013).

A participação da atividade da NADPH na fisiopatologia da hipertensão arterial tem sido descrita em modelos animais de hipertensão arterial, tais como ratos espontaneamente hipertensos (Tabet, 2008), e em estudos clínicos que demonstraram aumento da atividade da NADPH oxidase em tecidos provenientes de pacientes hipertensos (Fortuño et al., 2004; Touyz e Schiffrin, 2001). Adicionalmente, estudos mostram que a principal isoforma de NADPH oxidase envolvida na resposta hipertensiva da Ang II é a Nox 1. Em camundongos knockout para Nox 1, a geração de O_2^- e a resposta hipertensiva a Ang II encontram-se reduzidas (Matsuno et al., 2005), enquanto que camundongos que superexpressam Nox 1 apenas no músculo liso vascular apresentam aumento destes dois parâmetros (Dikalova et al., 2005).

1.5 Proteína dissulfeto isomerase

As reações de troca tiol-dissulfeto são importantes na formação de proteínas, e têm ganhado destaque em processos de sinalização celular. Assim, enzimas do tipo óxido redutases (tais como a tioredoxina) capazes de catalisar esta reação poderiam desempenhar papel importante na sinalização redox. Dentre as enzimas capazes de realizar esta função destacam-se a família das proteínas dissulfeto isomerase (PDI), capazes de interagir com diversas proteínas e efetuar a oxidação, redução ou isomerização de grupos tiol em membranas celulares (Laurindo et al., 2012).

A PDI é o arquétipo e membro mais abundante desta família de enzimas, que em humanos é constituída por mais de 20 membros (Hatahet e Ruddock, 2009). Desde sua descoberta há cerca de 40 anos atrás (Goldberger et al., 1964), a PDI tem sido extensamente estudada como uma enzima chave encontrada no retículo plasmático, onde está envolvida no correto enovelamento das pontes dissulfeto em proteínas o que envolve oxidação e múltiplas trocas tiol dissulfeto (atividade isomerase; Hatahet e Rudock, 2009). Estas propriedades derivam de sua configuração estrutural, que consiste de 5 domínios a-b-b'-a' e c seguido por uma extensão C terminal que contem o sinal de retenção no retículo K-DEL (Freedman et al., 1998). Com base na sequência dos domínios a-b-b'-a', a estrutura da PDI pode

ser descrita como composta por 4 domínios tioredoxina dos quais dois são cataliticamente ativos e dois são inativos, associados à ligação com o substrato (Tian et al., 2006; Figura 5).

Figura 5 – Representação esquemática da estrutura da PDI

No diagrama, a organização da PDI é vista como uma seqüência de 5 domínios: a, b, b', a', e c, onde os sítios ativos redox (WCGHC) estão localizados nos domínios a e a'. Os domínios b e b' constituem o principal sítio de ligação de substratos e o domínio C possui a seqüência KDEL. O diagrama inferior representa a estrutura cristalizada da PDI de levedura (Modificado de Laurindo et al., 2008).

Embora a principal função da PDI ocorra no retículo endoplasmático, numerosos estudos indicam que a troca tiol disulfeto também é importante em outros compartimentos celulares. A PDI é encontrada na membrana de diversas células tais como linfócitos (Täger et al., 1997), neutrófilos (Bennet et al., 2000) e hepatócitos (Terada et al., 1995), plaquetas (Essex et al., 1995) e células endoteliais (Swiatkowska et al., 2008). Nestas células a PDI desempenha diferentes funções. As células endoteliais expressam PDI na membrana plasmática, e secretam PDI em cultura (Jasuja et al., 2010). Em situações de hipóxia a PDI parece ter um papel protetor nas células endoteliais, uma vez que a inibição da PDI causa diminuição da migração celular e adesão em resposta a hipóxia (Tian et al., 2009). Adicionalmente, um outro estudo demonstrou que a PDI interage fisicamente com a integrina $\alpha_v\beta_3$ e que estas duas proteínas estão co-localizadas na superfície de células endoteliais

ativadas (Swiatkowska et al., 2008), onde a PDI promove uma reação de troca tiol-disulfeto com a integrina resultando em mudança conformacional desta proteína que possibilita a ligação com o seu substrato.

Curiosamente, outro membro da família PDI, a ERp46, apresenta expressão preferencial em células endoteliais (Sullivan et al., 2003). Diferente do principal membro desta família de enzimas, a ERp46 apresenta três domínios tipo a, que contém o sítio redox ativo e nenhum domínio b. A ERp46 também apresenta um papel protetor sobre as células endoteliais em hipóxia, no entanto mais estudos se fazem necessários para elucidar o papel desta proteína em células endoteliais (Sullivan et al., 2003).

Dessa forma, a participação da PDI e da ERp46 na troca tiol/dissulfeto e sua versatilidade celular que possibilita a sua ligação com diversos tipos de substratos nos levaram a investigar se estas enzimas poderiam regular outras proteínas na superfície celular. Proteínas contendo grupos tiol seriam possíveis candidatos a esse tipo de regulação, como por exemplo, os receptores do fator de necrose tumoral α (TNFR1 e 2) caracterizados por possuírem quatro domínios ricos em cisteína em seu domínio extracelular (Banner et al., 1993). De fato, em leucócitos foi demonstrada a associação entre a PDI e o TNFR1 (Söderberg et al., 2013). No entanto, esta interação não foi investigada em células endoteliais e pouco se sabe sobre o papel da ERp46 na ativação de células endoteliais.

Além deste papel direto sobre a alteração de proteínas, a PDI poderia atuar como reguladora de uma das principais fontes de EROs do sistema cardiovascular. Resultados do nosso grupo demonstraram que inibidores da PDI diminuem a ativação da NADPH oxidase vascular pela Ang II (Janiszewski et al., 2005). Além disso, mostramos que a PDI associa-se às subunidades Nox1, Nox2, Nox4 e p22phox da NADPH oxidase vascular e que a transfecção de CMLV com antisenso da PDI provoca a diminuição da fosforilação da Akt pela Ang II, uma via descrita na literatura como dependente de EROs geradas pela NADPH oxidase. Evidências mostram que a PDI também encontra-se associada com subunidades da NADPH oxidase em outros tipos celulares, como neutrófilos e células endoteliais (Laurindo et al., 2008, Paes et al., 2011). De maneira interessante estudos paralelos do nosso grupo, mostraram que células musculares lisas que superexpressam PDI apresentam aumento da expressão gênica da subunidade Nox1 da NADPH oxidase, bem como aumento da atividade da enzima (Fernandes et al., 2009, Pescatore et

al., 2012). Desta forma, o efeito regulatório da PDI sobre a geração de EROs pode se aplicar a diversos membros da família das NADPH oxidases.

O mecanismo pelo qual a PDI regula a atividade da NADPH oxidase ainda não foi esclarecido. Entre os possíveis mecanismos envolvidos estão a estabilização do complexo das subunidades da oxidase, uma reconhecida função da PDI como chaperona; ou ainda a distribuição, estabilização da ligação ou remoção de subunidades específicas da Nox, o que permitiria o controle de produção localizada de EROs (Laurindo et al., 2008). Desta forma, mais estudos se fazem necessários para elucidar a interação entre a PDI e a NADPH oxidase, bem como a participação da PDI em processos patológicos que envolvem o aumento da atividade da oxidase, como a hipertensão arterial.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Investigar o papel da PDI na sinalização redox induzida por TNF- α em células endoteliais e por Ang II em células musculares lisas vasculares.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 *Investigação do papel da ERp46 e da PDI sobre a sinalização induzida por TNF- α*

Em cultura de células endoteliais isoladas da veia umbilical de humanos (HUVECs) foram avaliados:

- O efeito do silenciamento de PDI e ERp46 sobre a ativação das quinases p38, JNK e ERK 1/2, e do complexo NF κ B após ativação com TNF- α ;
- A participação da PDI localizada na membrana plasmática na ativação de ERK 1/2 induzida por TNF- α ;
- O efeito da inibição da ERp46 e da PDI sobre a expressão de MMP-9 e Catepsina B induzida por TNF- α ;
- O efeito da inibição da ERp46 e da PDI sobre a angiogênese induzida por TNF- α .

2.2.2 *Investigação do papel da PDI sobre a sinalização induzida por Ang II*

Em cultura de células musculares lisas vasculares provenientes do leito mesentérico de animais Wistar e SHR foram avaliados:

- a expressão de PDI, Nox 1 e Nox 4;
- o efeito do silenciamento e superexpressão da PDI sobre a expressão de Nox1 e sobre a sinalização induzida por Ang II
- o efeito da inibição da PDI sobre a geração de EROs, fosforilação da c-Src e da ERK 1/2, e do influxo de cálcio induzido por Ang II.

Em preparações de leito mesentérico isolado de animais Wistar e SHR investigamos:

- o efeito da inibição da PDI e da geração de EROs sobre a contração vascular induzida por Ang II.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultura celular

3.1.1 Cultura de células endoteliais

Os experimentos foram realizados em células endoteliais primárias originadas de veia umbilical humana (human umbilical vein endothelial cells –HUVECs; Lonza Ltd, Basel, Suíça). As células foram cultivadas em meio endotelial de crescimento (endotelial growth media, EGM; Lonza) constituído de meio endotelial basal (endotelial basal media, EBM, Lonza) contendo 100U/ml de penicilina, 100µg de estreptomicina e suplementado com extrato de cérebro bovino, fator de crescimento epidérmico humano e soro fetal bovino (FBS, 8%). As células foram incubadas em estufa de CO₂ (5%) a 37 °C.

Para a realização dos experimentos as células em passagem P4 foram mantidas por 18-24 h em meio EBM acrescido de FBS (1%) . Após esse período, as células foram incubadas com EBM e estimuladas com TNF-α (10 ng/ml, PeproTech, Hamburgo, Alemanha) em intervalos de tempo determinados para cada experimento.

3.1.2 Cultura primária de CMLV provenientes do leito mesentérico

As CMLV foram isoladas de leitos mesentéricos de ratos Wistar e SHR conforme descrito previamente (Schiffrin et al., 1986). Os animais foram decapitados e ensanguinados. Os mesentérios foram isolados e incubados em meio de cultura F12 [pH 7,2 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] em presença de collagenase (3 mg/mL), por 15 minutos, a 37 °C, para pré-digestão. Em seguida, o tecido adiposo foi removido mecanicamente com o auxílio de uma pinça em ambiente estéril. Após o isolamento dos leitos mesentéricos, as artérias mesentéricas centrais foram descartadas, selecionando-se, dessa forma, vasos de pequeno diâmetro (arteríolas e vênulas). Estes foram incubados com 25 mL de meio F12 contendo albumina sérica bovina (50 mg, Sigma), collagenase (50 mg), elastase (3 mg) e inibidor tripsina

(9 mg) por 60 minutos, a 37 °C, para digestão enzimática. Após o período de incubação, a solução foi filtrada em filtro de nylon separando-se as células de músculo liso vascular. O produto final foi centrifugado a 2000 rpm, por 5 min, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o pellet celular foi ressuspensão em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM).

As células foram incubadas em estufa de CO₂ (5%) a 37 °C, para sedimentação e aderência. Após atingirem a confluência de 90 a 100%, as células foram desprendidas dos frascos utilizando-se solução de tripsina-EDTA (1x) e novamente cultivadas em frascos (150 cm³) até atingirem confluência, caracterizando tal procedimento, uma passagem. Para a realização dos experimentos foram utilizadas células nas passagens 5-7 em confluência de 90-100% com 6 a 8 dias de cultivo. Antes da realização dos experimentos as células foram mantidas por 18-24h em meio DMEM acrescido de FBS (1%) . Após esse período as células foram incubadas com DMEM e estimuladas com Ang II (100 nM, Calbiochem, EUA) em intervalos de tempo determinados para cada experimento.

3.2 Transfecção com RNA de interferencia (siRNA)

Para transfecção foram utilizadas dois diferentes siRNA para PDI e ERp46 humana em células endoteliais, e um siRNA para PDI de roedores em CMLV na concentração de 50nM (Invitrogen, EUA). Como controle negativo foi utilizado sequência sem homologia com nenhum gene de mamíferos conhecido (scrambled siRNA; 50 nM).

Foram cultivadas 2,5 10⁴ células por cm² em placas de cultura. Após 24 h foi realizada a transfecção com siRNA para PDI, ERp46 ou controle negativo utilizando como reagente de transfecção o reagente GeneTrans II (MoBiTec Göttingen, Germany, Alemanha) em células endoteliais e o Hiperfect (Invitrogen) em CMLV de acordo com as instruções do fabricante. Após a formação de complexos entre o siRNA e o respectivo reagente de transfecção, estes foram adicionados às células em cultura em meio sem soro e sem antibióticos por 4 h. Em seguida, as células foram incubadas com meio acrescido de soro e antibióticos por 48 h. Após este período, o silenciamento foi monitorado pela concentração das proteínas de interesse pelo método de western blot.

3.3 Superexpressão de PDI

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 Larindo (Laboratório de Biologia Vascular do Instituto do Coração). Como controle negativo foi utilizado um plasmídeo contendo apenas o vetor vazio (pcDNA 3.1).

Para a transfecção de DNA plasmidial, foram cultivadas $2,5 \times 10^4$ células por cm^2 em placas de cultura. Após 24h, 5 μg de DNA foram transfectados, na presença de Superfect® (Invitrogen) em meio DMEM na ausência de soro e antibióticos, por 8h. Em seguida, as células foram incubadas com meio acrescido de soro e antibióticos por 48 horas. Após este período, superexpressão da enzima foi confirmada por western blotting com anticorpo anti PDI.

3.4 Western blot

As células foram lavadas com PBS e lisadas com tampão de lise (contendo 50 mM de pirofosfato de sódio, 50mM de fosfato de sódio, 5mM de cloreto de sódio, 5 mM de EDTA, 5mM de EGTA, 10mM 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 30 μg 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 0,3%). Após apropriado ciclo de lavagens, as membranas foram incubadas com os anticorpos secundários fluorescentes. Após período de incubação e novo ciclo de lavagem, as membranas foram escaneadas no leitor de infravermelho Odyssey (LI-COR Biosciences, Bad Hamburg, Alemanha).

A intensidade das bandas foi determinada por análise densitométrica através do programa Image J, e utilizada como medida de expressão protéica. 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.

3.5 Reação de Polimerase em Cadeia em tempo real (RT-PCR)

O RNA celular total foi isolado utilizando o kit RNeasy (Invitrogen Co., USA), seguindo as orientações do fabricante. O RNA obtido foi quantificado por absorbância a 260nm e sua integridade confirmada pela análise do RNA em gel de agarose contendo brometo de etídio (0.8%). A síntese da fita simples de cDNA foi realizada a partir de 7 μ g do RNA total utilizando a enzima SuperscriptII (Invitrogen Co., USA), e adicionando RNaseOUT para proteger o RNA durante esse processo.

A amplificação do cDNA foi realizada usando os seguintes primers em CMLV de ratos:

- Nox 1 sense - 5'-TTCCCTGGAACAAGAGATGG-3', e antisense - 5'-GACGTCAGTGGCTCTGTCAA-3';
- Nox 4 sense - 5'-CTGGAAGAACCCAAGTTCCA-3', e antisense - 5'-CGGATGCATCGGTAAAGTCT-3';
- GAPDH: sense - GGTGCTGAGTATGTCGTGGA e antisense - ACTGTGGTCATGAGCCCTTC.

Em células endoteliais foram utilizados os seguintes primers:

- MMP-9 sense - 5'-TGAGTGCGTCTTCCCCTTCACTTTCCT-3', e antisense - 5'-GGAATGATCTAAGCCCAGCG-3',
- Catepsina B sense - 5'-TGGTTTCTGGTGGCCTCTATG-3', e antisense - 5'-CCGTAGTGCTTGTTCC TGTTTG-3';
- Polimerase 2A: sense - 5'-GCACCACGTCCAATGACAT-3'; e antisense - 5'-GTG CGGCTGCTTCCATAA-3'.

A quantidade de cDNA foi analisada por PCR em tempo real utilizando o reagente Platinum SYBR® Green qPCR SuperMIX UDG (Invitrogen). As reações de PCR foram realizadas e analisadas usando o sistema Corbett Research (Corbett Life Sciences, Austrália).

As condições do PCR utilizadas para amplificação dos genes foram: 2 min a 95°C seguindo-se 50 ciclos na seguinte sequência: 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 genes GAPDH e POLR2a foram utilizado para normalização em amostras de CMLV e células endoteliais, respectivamente. O resultado foi expresso em unidades arbitrárias relativas à variação da expressão de RNAm.

3.6 Modelo tridimensional de esferóides de células endoteliais

Esferóides de células endoteliais com número de células definido foram gerados conforme descrito anteriormente (Michaelis et al. 2013). Resumidamente, 12 h após a transfecção, as células foram ressuspensas em meio de cultura contendo 20% metilcelulose e foram semeadas em forma de gotas em uma placa de cultura de 75cm². A placa foi invertida de modo que as gotas de meio ficassem suspensas, e foram então incubadas por 24 h em incubadora de células. Sobre essas condições as células endoteliais formam um agregado celular de formato esferóide (Figura 6). Após o período de incubação, os esferóides foram coletados, embebidos em géis de colágeno que foram despositados em poços de placa de 24 poços. Após polimerização do colágeno por 30 min, 100 µl de meio de cultura na presença ou ausência de TNF- α (10 ng/ml) foi adicionado sobre o gel. Após 24 h, as imagens foram obtidas em microscópio óptico em aumento de 10x.

Figura 6 – Esquema da produção de esferóides de células endoteliais.

Uma placa de cultura de 75 cm² foi utilizada para cultivo de células endoteliais suspensas em meio EGM contendo metilcelulose, plaqueadas em gotas. A placa então foi invertida criando condições para a formação de agregados de células em formato esferóide.

3.7 Imunofluorescência

As CMLV foram lavadas com tampão fosfato (PB 0,1M) 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 α -actina, calponina, fator de ativação de fibroblastos (FAP- α), e fator de Von Willebrandt (VWF) e PDI. Em seguida, após novo ciclo de lavagens, foi realizada incubação por 2 h com anticorpo secundário conjugado com Rodamina para α -actina e FAP- α , e com FITC para calponina, VWF e PDI. 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).

3.8 Determinação da geração de EROs por fluorescência derivada da oxidação da dihidroetidina

As CMLV de animais Wistar e SHR foram distribuídas em placas de 24 poços contendo lamínula gelatinizada (gelatina 1% esterilizada). As células foram lavadas

com PBS estéril e incubadas com dihidroetidina (DHE, 10^{-5} M) por 30 minutos. A fluorescência foi visualizada com auxílio de microscópio (Axio Observer A1, Zeiss). Em alguns experimentos as CMLV foram pré incubadas com inibidor da PDI (bacitracina; 0.5 mM), da NADPH oxidase (apocinina 30 μ M) e oxidante de tióis (DTNB; 0.5 mM).

3.9 Avaliação da mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ em CMLV

A avaliação da mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ evocadas pelo estímulo com Ang II foi realizada por meio da utilização do indicador de Ca^{2+} fluorescente, Fura 3, na forma acetoximetil ester (Fura-3AM). O Fura-3AM é uma molécula hidrofóbica e assim capaz de entrar facilmente dentro das células, pela membrana plasmática. Uma vez dentro das células, esterases citoplasmáticas clivam os grupamentos acetoximetil da molécula de Fura-3, resultando em um componente que é altamente carregado e que não pode cruzar a membrana celular, e assim fica retido no citoplasma, se ligando com uma alta e específica afinidade a íons Ca^{2+} (Kao et al., 1989).

Desta forma, 10^4 células foram cultivadas em cada poço de placa de 8 poços, especial para utilização em microscópio confocal (LabTek II Chambered Coverglass system, Nunc, EUA). Após atingirem a confluência adequada (60%), as células foram incubadas com meio de cultura (DMEM) sem soro fetal bovino por 24h. As células foram, então, incubadas com Fluo-3AM (4,4 μ M) e ácido plurônico F-17 (0,17%) em solução de Hanks (HBSS) acrescida de albumina bovina (BSA, 1mg/ml) e probenecid (2,5mM), a pH 7,45 por 30 minutos, protegidas da luz. Após este período, as placas foram incubadas novamente com HBSS-BSA-probenecid por 30 minutos, protegidas da luz. Então, as células foram lavadas duas vezes com HBSS-BSA-probenecid e incubadas com bacitracina (0.5mM) ou PP2 (1mM) por 30 minutos neste mesmo tampão.

O influxo de cálcio citosólico foi medido utilizando microscopia de laser confocal (Zeiss Axiovert 100 M). O Fluo-3 foi excitado usando laser 488 nm tendo seu sinal de emissão de fluorescência medido em 510nm. A Ang II foi aplicada diretamente em cada poço (10^{-7} M; 50 μ L em 200 μ L) e em seguida foram captadas as imagens num total de 200 (uma por segundo). Utilizando o software do scanner de laser do microscópio confocal, foi possível mensurar a intensidade de

fluorescência de cada célula. Os dados foram expressos como medida da fluorescência em unidades arbitrárias.

3.10 Animais

Os experimentos foram realizados em ratos machos, das linhagens Wistar e SHR, entre 12 a 16 semanas, provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP). Os animais foram mantidos em grupos de, no máximo, 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 (CEEAA-ICB/USP), cujas normas estão de acordo com o Código de Experimentação Animal Canadense ("Canadian Council on Animal Care").

3.11 Determinação da pressão arterial

Uma semana antes dos experimentos a pressão arterial foi determinada por método indireto, através de pletismografia de cauda nos ratos de cada grupo experimental (Wistar e SHR). Os animais foram submetidos a um período de adaptação dois dias antes da primeira medida de pressão arterial, que consistia no aquecimento dos animais em estufa especial por 10 min a 40 °C e posterior contenção em um cilindro de contenção com abertura para o focinho e a cauda, por 5 min.

Após o período de adaptação a pressão arterial dos animais foi determinada. Para isso, os ratos foram aquecidos e colocados no cilindro de contenção, conforme descrito anteriormente. Um oclisor e um sensor foram ajustados à porção proximal da cauda do rato, acoplado ao esfigmomanômetro elétrico PE-399 conectado a um sistema de transdução (Powerlab, AD Instruments, Melbourne, Austrália). O valor final da pressão arterial caudal de cada animal representa a média aritmética de três medidas sequenciais.

3.12 Reatividade Vascular do Leito Arteriolar Mesentérico Isolado

Os ratos foram anestesiados com solução de pentobarbital sódico (45mg/kg) por via intraperitoneal. Posteriormente, foram submetidos a laparotomia e tiveram o mesentério cuidadosamente exposto. A artéria mesentérica superior foi canulada com cateter de polietileno (PE-10 Hemo Técnico® - São Paulo, Brasil) introduzido cerca de 1,5 a 2,0 cm distante da aorta abdominal e o leito mesentérico foi perfundido, com fluxo constante de 2 ml/min com solução de Krebs Henseleit (NaCl 113 M; KCl 4,7 M; CaCl₂ 2,5 M, NaHCO₃ 25 M; MgSO₄ 1,1 M; EDTA 0,03 M; glicose 5,5 M) em pH 7,4 e saturado com 95% de O₂ e 5% de CO₂, mantida a 37 °C (Mc Gregor 1965; Carvalho et al., 1987). O mesentério já perfundido foi removido e separado da alça intestinal e colocado em cuba de vidro aquecida a 37 °C. Alterações da pressão de perfusão foram medidas por transdutor de pressão (BP Transducer®, ADInstruments, EUA), registradas em um sistema de aquisição digital (Power Lab®, ADInstruments, EUA) e utilizadas como medida de contração (mmHg) induzidas pela Ang II sobre o leito arteriolar mesentérico de ratos Wistar e SHR.

Após o período de estabilização de 40 min, as preparações foram perfundidas com bacitracina (1 mM) ou apocinina (300 µM) por 30 min, para avaliar o papel da PDI na modulação da resposta contrátil a Ang II do leito arteriolar mesentérico dos ratos Wistar e SHR. Após este período, a preparação foi então perfundida com Ang II em concentrações crescentes, gerando uma curva concentração efeito (CCE), com intervalos de 5 min entre cada concentração, tempo necessário para estabilização da resposta contrátil.

3.13 Análise Estatística

Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média (E.P.M.) para valores absolutos ou porcentagem de n animais/amostras. Diferenças entre grupos foram analisadas pelo teste t ou ANOVA de 1 via, seguido do teste de Student-Newman-Keuls para comparações múltiplas. Valores de P<0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS

4.1 Investigação do papel da ERp46 e da PDI sobre a sinalização induzida por TNF- α em células endoteliais

4.1.1 Silenciamento da ERp46 em células endoteliais

A expressão de ERp46 (49 KDa) foi analisada por método de Western Blotting após transfeção das células endoteliais com dois diferentes siRNAs direcionados contra o RNAm desta proteína. Foi analisado o silenciamento da ERp46 utilizando para transfecção meio de cultura sem soro e sem antibióticos por um período de 4h ou meio de cultura com 0.1% BSA por 6h. Após o período de transfecção as células foram incubadas com meio de cultura contendo soro e fatores de crescimento por 48h (figura 7 A) ou 72h (figura 7 B). A transfecção das células com ambos siRNA resultou em redução significativa desta proteína quando comparada com a transfecção de siRNA controle (scrambled siRNA), sendo o melhor resultado obtido com 4h de transfecção (figura 7 C; $p < 0.001$). O silenciamento de ERp46 não alterou a expressão de PDI ou GRP78 nestas células. A expressão de β -actina foi utilizada como controle.

Figura 7 – Silenciamento da ERp46 através de transfecção com siRNA em células endoteliais

A) A expressão de ERp46 β -actina, PDI e GRP78 foram analisadas por western blotting 48h após a transfecção com scrambled siRNA (scb), ou siRNA para PDI (si1 e si2) em meio de cultura sem soro por 4h ou em meio de cultura com 0.1%BSA por 6h. B) A expressão das mesmas proteínas nas mesmas condições de transfecção após 72h de silenciamento. C) Quantificação da expressão de ERp46 em células transfectadas por 4h em meio sem soro após 48h de silenciamento. Os valores obtidos foram normalizados pela expressão de ERK 1/2 e expressos como porcentagem do controle (scb siRNA). Os dados foram apresentados como média $\pm$ EPM para n=3-4. **P<0.01 e comparado ao controle.

4.1.2 Silenciamento da PDI em células endoteliais

A expressão de PDI (55 KDa) também foi analisada por método de Western Blotting após transfeção das células endoteliais com dois diferentes siRNAs. Foram analisadas as mesmas condições de transfecção utilizadas na transfecção de ERp46, utilizando para transfecção meio de cultura sem soro e sem antibióticos por um período de 4h ou meio de cultura com 0.1% BSA por 6h. Após o período de transfecção as células foram incubadas com meio contendo soro e fatores de crescimento por 48h (figura 8 A) ou 72h (figura 8 B). O melhor resultado também foi obtido com 4h de transfecção, resultando em redução significativa da PDI nas células transfectadas quando comparadas com a transfecção de siRNA controle (scrambled siRNA; figura 8 C; $p < 0.01$). O silenciamento de PDI não alterou a expressão de ERp46 ou GRP78 nestas células. A expressão de α -actina foi utilizada como controle.

Figura 8 – Silenciamento da PDI através de transfecção com siRNA em células endoteliais.

A) A expressão de PDI β -actina, ERp46 e GRP78 foram analisadas por western blotting 48h após a transfecção com scrambled siRNA (scb), ou siRNA para PDI (si1 e si2) por 4h em meio sem soro ou 6h em meio com 0.1%BSA. B) A expressão das mesmas proteínas nas mesmas condições de transfecção após 72h de silenciamento. C) Quantificação da expressão de PDI em células transfectadas por 4h em meio sem soro após 48h de silenciamento. Os valores obtidos foram normalizados pela expressão de ERK 1/2 e expressos como porcentagem do controle (scb siRNA). Os dados foram apresentados como média $\pm$ EPM para n=3-4. **P<0.01 e comparado ao controle.

4.1.3 Efeito do silenciamento de ERp46 e PDI sobre a fosforilação da quinase ERK 1/2 induzidas por TNF- α em células endoteliais

Dentre as primeiras ações intracelulares desencadeadas pela citocina TNF- α em células endoteliais estão a fosforilação de MAP quinases, entre elas a quinase ERK 1/2, como observado após o tratamento das células endoteliais com 10 ng/ml de TNF- α por 15 minutos (figura 9). O silenciamento de ERp46, bem como de PDI resultou em uma redução significativa da fosforilação de ERK 1/2 (figura 9 A e 9 B, respectivamente; $P < 0.001$).

Figura 9 – Efeito do silenciamento de Erp46 e PDI sobre a fosforilação da quinase ERK1/2 induzida por TNF- α em células endoteliais.

Células endoteliais transfectadas com siRNA para Erp46 (A) ou para PDI (B) foram estimuladas com TNF- α (10ng/ml) por 15 minutos. A fosforilação da quinase ERK1/2 foi detectada por western blotting com uso de anticorpos secundários fluorescentes para as formas total (verde) e fosforilada (vermelho), resultando na cor amarela nas amostras em que houve fosforilação devido a sobreposição das imagens. Os valores obtidos foram normalizados pela expressão de ERK total e expressos como porcentagem do controle (scb siRNA). Os gráficos apresentam a média $\pm$ EPM para n=3-4. . **P<0.01 e comparado ao controle e aos siRNA 1 e 2 tratados com TNF- α .

4.1.4 Efeito da inibição da expressão de ERp46 sobre a fosforilação da quinase p38 induzida por TNF- α

Além da fosforilação da quinase ERK 1/2, o estímulo de células endoteliais com TNF- α resulta na ativação de p38. Desta forma, investigamos o efeito do silenciamento de ERp46 e PDI sobre a fosforilação desta quinase. O silenciamento de ERp46 (figura 10 A) ou PDI (figura 10 B) não alterou a ativação de p38.

Figura 10 – Efeito do silenciamento de Erp46 e PDI sobre a fosforilação p38 induzida por TNF- α em células endoteliais.

Células transfectadas com siRNA para Erp46 (A) ou para PDI (B) foram estimuladas com TNF- α (10 ng/ml) por 15 minutos. A fosforilação de p38 foi detectada por western blotting com uso de anticorpos secundários fluorescentes para as formas total (verde) e fosforilada (vermelho). Os valores obtidos foram normalizados pela expressão de p38 total e expressos como porcentagem do controle (scb siRNA). Os gráficos apresentam a média $\pm$ EPM para n=3-4. . **P<0.01 comparado ao controle.

4.1.5 Efeito do silenciamento de ERp46 e PDI sobre a fosforilação da quinase JNK induzida por TNF- α

Outra quinase ativada por TNF- α em células endoteliais é a quinase JNK. É possível observar na figura 4 que após 15 minutos do estímulo com TNF- α ocorre ativação das isoformas p42 e p44 desta quinase. No entanto, o silenciamento de ERp46 ou de PDI não foi capaz de alterar esta ativação desta quinase (figura 11 A e B, respectivamente).

Figura 11 – Efeito do silenciamento de Erp46 e PDI sobre a fosforilação de JNK induzida por TNF- α em células endoteliais.

Células transfectadas com siRNA para Erp46 (A) ou para PDI (B) foram estimuladas com TNF- α (10ng/ml) por 15 minutos. A fosforilação de JNK foi detectada por western blotting e os valores obtidos foram normalizados pela expressão de JNK total e expressos como porcentagem do controle (scb siRNA). Os gráficos apresentam a média $\pm$ EPM para n=3-4. . *P<0.05 comparado ao controle.

4.1.6 Efeito do silenciamento de ERp46 e PDI sobre a degradação de I κ B α induzida por TNF- α

A citocina TNF- α ativa o complexo NF κ B por meio da degradação da quinase inibitória do complexo I κ B α , entre outros mecanismos. Desta forma, investigamos o efeito da inibição da ERp46 e de PDI sobre a expressão de I κ B α por método de Western Blotting. Observamos que, de fato, o estímulo com TNF- α (10 ng/ml) por 15 minutos resulta na degradação do I κ B α . No entanto, o silenciamento de ERp46 ou de PDI não alterou este processo (figura 12 A e B, respectivamente).

Figura 12 – Efeito do silenciamento de Erp46 e PDI sobre a expressão de I κ B α após estímulo com TNF- α em células endoteliais.

Células transfectadas siRNA para Erp46 (A) ou para PDI (B) foram estimuladas com TNF- α (10ng/ml) por 15 minutos. A expressão de I κ B α foi detectada por western blotting e a expressão de β -actina foi utilizada como controle. Os gráficos apresentam a média $\pm$ EPM para n=3-4. . **P<0.01 comparado ao controle.

4.1.7 Efeito do silenciamento de ERp46 e PDI sobre a expressão de VCAM induzida por TNF- α

Uma das ações da citocina TNF- α sobre as células endoteliais consiste no aumento da expressão de moléculas de adesão como VCAM (vascular cell adhesion molecule). Este processo é mediado pela ativação do complexo NF κ B, e dependente da ativação de ERK 1/2, e foi investigado neste estudo como indicativo de ativação deste complexo. Como é possível observar na figura 7, após 4 horas de estímulo com TNF- α ocorre aumento na expressão destas moléculas de adesão. O silenciamento de ERp46 e PDI reduziu de maneira significativa o aumento de expressão de VCAM (figura 13, $P < 0.05$).

Figura 13 – Efeito do silenciamento de Erp46 e PDI sobre a expressão de VCAM e ICAM induzida por TNF- α em células endoteliais.

Células transfectadas siRNA para Erp46 (A e B) ou para PDI (C e D) foram estimuladas com TNF- α (10ng/ml) por 4h. A expressão de VCAM foi detectada por western blotting. Os valores obtidos foram normalizados pela expressão de β -actina e expressos como porcentagem do controle (scb siRNA). Os gráficos apresentam a média $\pm$ EPM para n=3-4. ***P<0.001 comparado ao controle; +P<0.05 vs Erp46 ou PDI siRNA TNF- α .

4.1.8 Efeito do silenciamento de ERp46 e PDI sobre a expressão de ICAM induzida por TNF- α

Outra molécula de adesão que apresenta expressão induzida por TNF- α em as células endoteliais é a ICAM (intercellular cell adhesion molecule). Este processo também é mediado pela ativação do complexo NF κ B, mas independente da ativação da ERK 1/2, e foi investigado neste estudo como indicativo de ativação deste complexo. Após 4 horas de estímulo com TNF- α ocorre aumento na expressão desta molécula de adesão. O silenciamento de ERp46 e PDI não interferiu neste processo (figura 14 A e B, respectivamente).

Figura 14 – Efeito do silenciamento de Erp46 e PDI sobre a expressão de ICAM induzida por TNF- α em células endoteliais.

Células endoteliais transfectadas siRNA para Erp46 (A e B) ou para PDI (C e D) foram estimuladas com TNF- α (10ng/ml) por 4h minutos. A expressão de VCAM foi detectada por western blotting com uso de anticorpos secundários fluorescentes. Os valores obtidos foram normalizados pela expressão de β -actina e expressos como porcentagem do controle (scb siRNA). Os gráficos apresentam a média $\pm$ EPM para n=3-4. . **P<0.01 e ***P<0.001 e comparado ao controle.

4.1.9 Efeito do silenciamento de ERp46 e PDI sobre a sinalização celular induzida por IL-1 β

Para determinar se o efeito do silenciamento da ERp46 e da PDI sobre a fosforilação da ERK 1/2 era específico para o estímulo com TNF- α , investigamos o papel da ERp46 e da PDI sobre a sinalização induzida por IL-1 β . Após 15 minutos de estímulo com IL-1 β (5 ng/ml) observamos a ativação de ERK 1/2, p38 e JNK (figura 15). Diferente do efeito observado com o estímulo por TNF- α , o silenciamento da ERp46 e da PDI reduziram a fosforilação não apenas da ERK 1/2, mas também de p38 e JNK (figura 15 A e B, respectivamente).

Figura 15 – Efeito do silenciamento de Erp46 e PDI sobre a sinalização induzida por IL-1 β em células endoteliais.

Células endoteliais transfectadas com siRNA para Erp46 (A) ou para PDI (B) foram estimuladas com IL-1 β (5 ng/ml) por 15 minutos. A fosforilação das quinase ERK1/2, p38 e JNK foi detectada por western blotting com uso de anticorpos secundários fluorescentes para as formas total (verde) e fosforilada (vermelho), resultando na cor amarela nas amostras em que houve fosforilação devido a sobreposição das imagens.

4.1.10 Efeito do silenciamento de ERp46 e PDI sobre a sinalização celular induzida por trombina

Também investigamos o efeito do silenciamento da ERp46 e da PDI sobre a sinalização induzida por trombina (1 U/ml). Após 15 minutos de estímulo, observamos a fosforilação de ERK 1/2, p38 e JNK. De maneira semelhante ao estímulo com IL-1 β , o silenciamento da ERp46 e da PDI causaram a ~~reção~~ ^{redução} da ativação de ERK 1/2, p38 e JNK. (figura 16 A e B, respectivamente).

Figura 16 – Efeito do silenciamento de Erp46 e PDI sobre a sinalização induzida por trombina em células endoteliais.

Células endoteliais transfectadas com siRNA para Erp46 (A) ou para PDI (B) foram estimuladas com trombina (1 U/ml) por 15 minutos. A fosforilação das quinase ERK1/2, p38 e JNK foi detectada por western blotting com uso de anticorpos secundários fluorescentes para as formas total (verde) e fosforilada (vermelho), resultando na cor amarela nas amostras em que houve fosforilação devido a sobreposição das imagens.

4.1.11 Efeito do silenciamento de ERp46 e PDI sobre a sinalização celular induzida por FGF

Além de IL-1 β e trombina, investigamos o efeito do silenciamento da ERp46 e da PDI sobre a sinalização induzida pelo fator de crescimento FGF (fibroblast growth factor). Após 15 minutos de estímulo com FGF (30 ng/ml) observamos uma acentuada ativação de ERK 1/2, mas não de p38 e JNK. No entanto, o silenciamento da ERp46 e da PDI não causou alteração na fosforilação de ERK 1/2, em resposta ao FGF (figura 17 A e B, respectivamente).

Figura 17 – Efeito do silenciamento de Erp46 e PDI sobre a sinalização induzida por trombina em células endoteliais.

Células endoteliais transfectadas com siRNA para Erp46 (A) ou para PDI (B) foram estimuladas com FGF (30 ng/ml) por 15 minutos. A fosforilação das quinase ERK1/2, p38 foi detectada por western blotting com uso de anticorpos secundários fluorescentes para as formas total (verde) e fosforilada (vermelho), resultando na cor amarela nas amostras em que houve fosforilação devido a sobreposição das imagens.

4.1.12 Participação da PDI de superfície celular na regulação da fosforilação da quinase ERK 1/2

As proteínas ERp46 e PDI são encontradas principalmente no retículo endoplasmático, porém também podem ser encontradas na membrana plasmática. Por este motivo investigamos se a PDI de membrana estava envolvida na redução da fosforilação da ERK 1/2. Para isso, foi utilizada PDI recombinante (500 nM) adicionada ao meio de cultura de células endoteliais transfectadas com scrambled siRNA, siRNA para ERp46 (figura 18A) e siRNA para PDI (figura 18 B), 10 minutos antes do estímulo com TNF- α (10 ng/ml). No entanto, a adição de PDI não foi capaz de reestabelecer a fosforilação de ERK1/2 nas células tratadas com siRNA.

Figura 18 – Participação da PDI de membrana sobre a fosforilação da quinase ERK1/2 induzida por TNF- α .

Células transfectadas com siRNA para Erp46 (A) ou para PDI (B) foram estimuladas com TNF- α (10 ng/ml) por 15 minutos na presença ou ausência de PDI (500 nM). C) A fosforilação da quinase ERK1/2 foi analisada em células tratadas com anticorpo inibitório para PDI (1:100 e 1:500) ou scrambled Rnase (100 μ g/ml). As proteínas foram detectadas por western blotting. Os valores obtidos foram normalizados pela expressão de ERK total e expressos como porcentagem do controle (scb siRNA). Os gráficos apresentam a média $\pm$ EPM para n=3-4. ***P<0.001 e comparado ao controle.

4.1.13 Efeito de inibidores da PDI na regulação da fosforilação da quinase ERK 1/2

Utilizamos inibidores de PDI que não atravessam a membrana plasmática para investigar a participação da PDI localizada na superfície celular sobre fosforilação de ERK1/2. As células endoteliais foram incubadas com anticorpo inibitório da PDI (RL90, concentração 1:100 e 1:500) e scrambled Rnase (100 µg/ml), substância capaz de inibir a atividade de PDI por competição por substrato. A adição destes inibidores não resultou em redução da fosforilação de ERK1/2 induzida por TNF- α , conforme observado na figura 19.

Figura 19 – Efeitos de inibidores da PDI sobre a fosforilação da quinase ERK1/2 induzida por TNF- α em células endoteliais.

A fosforilação da quinase ERK1/2 foi analisada em células tratadas com anticorpo inibitório para PDI (1:100 e 1:500) ou scrambled Rnase (100 μ g/ml) por western blotting. Os valores obtidos foram normalizados pela expressão de ERK total e expressos como porcentagem do controle (scb siRNA). Os graficos apresentam a média $\pm$ EPM para n=3-4. *P<0.05 comparado aos tratamentos.

4.1.14 Participação do receptor do fator de crescimento epitelial (EGFR) sobre a fosforilação da ERK 1/2

Em diferentes tipos celulares a transativação do EGFR por outro receptor pode ativar a cascata de sinalização que resulta em ativação da ERK 1/2 (Ras/Raf/MEK/ERK). Um dos mecanismos envolvidos nesta transativação ocorre por meio da ativação de metaloproteinases da família ADAM. Estas enzimas são responsáveis pela liberação de ligantes do EGFR, como o hb-EGF (heparin binding epithelial growth factor). O estímulo com TNF- α é capaz de ativar a metaloproteinase ADAM-17 que poderia estar envolvida neste processo. Para investigar se a transativação do EGFR estaria envolvida na ativação da ERK 1/2 induzida por TNF- α , utilizamos inibidores do EGFR, o composto AG1478 (100 nM) e o anticorpo inibitorio anti-EGFR (10 μ g/ml). Utilizamos também o inibidor de metaloproteinases, TAPI-1 (10 μ M). Como podemos observar na figura 20 A, a presença destes inibidores não reduziu a fosforilação de ERK 1/2.

Alem disso, utilizamos EGF como ativador do EGFR para investigar a participação deste receptor na regulação da fosforilação da ERK 1/2 pela ERp46 e pela PDI. Na figura 20 B, podemos observar que a incubação das células endoteliais com EGF (3 ng/ml) e TNF- α resultou na ativação da ERK 1/2 nas células transfectadas com siRNA para ERp46. Adicionalmente, a ativação da ERK 1/2 induzida pelo EGF não foi alterada pela presença do siRNA.

Figura 20 – Participação do EGFR sobre a fosforilação da quinase ERK1/2 induzida por TNF- α em células endoteliais.

A) Células endoteliais tratadas com TAPI-1 (10 μ M), AG1478 (100 nM) ou anti-EGFR (10 μ g/ml). foram estimuladas com TNF- α (10 ng/ml) por 15 minutos para detecção da ativação da ERK 1/2. B) A fosforilação da quinase ERK 1/2 foi analisada em células transfectadas com siRNA para ERP46 foram estimuladas com TNF- α (10ng/ml), EGF (3ng/ml) ou ambos por 15 minutos. As proteínas foram detectadas por western blotting com uso de anticorpos secundarios fluorescentes para as formas total (verde) e fosforilada (vermelho), resultando na cor amarela nas amostras em que houve fosforilação devido a sobreposição das imagens.

4.1.15 Efeito do silenciamento de ERp46 e PDI sobre a expressão de MMP-9 e Catepsina B induzida por TNF- α em células endotéliais

A fosforilação da ERK 1/2 resulta em ativação de fatores de transcrição como o AP-1 (activating protein 1), e este por sua vez pode induzir a expressão de metaloproteinase 9 (MMP-9) e catepsina B (CatB). Estas enzimas promovem a degradação de matriz extracelular e estão envolvidas no processo de angiogênese. Desta forma investigamos o efeito do silenciamento de ERp46 sobre a expressão de MMP-9 e CatB induzido por TNF- α . Conforme mostra a figura 15A, o estímulo com TNF- α por 4h aumenta significativamente a expressão de MMP-9 ($P < 0.01$, figura 21 A) e o silenciamento da ERp46 e PDI previnem este aumento ($P < 0.05$). O mesmo efeito pode ser observado na expressão de CatB (figura 21 B).

Figura 21– Expressão de RNAm de MMP-9 e Catepsina B realizada por PCR em tempo real em células endoteliais.

A) Efeito do silenciamento de Erp46 e PDI sobre a expressão de MMP-9 induzida por TNF- α (10ng/ml, 4h). ++P<0.01 comparado a Erp46 siRNA + TNF α e **P<0.001 comparado aos controles. B) Efeito do silenciamento de Erp46 e PDI sobre a expressão de Catepsina B induzida por TNF- α (10ng/ml, 4h). ++P<0.01 comparado a Erp46 siRNA + TNF α e **P<0.001 comparado aos controles. Os níveis de RNAm foram analisados e expressos como unidades arbitrárias, normalizados pela expressão de RNAm de polimerase 2a (POLR2a) e expressos como porcentagem do controle. Os gráficos apresentam a média $\pm$ EPM para n = 3-6.

4.1.16 Efeito da inibição da quinase MEK sobre a expressão de MMP-9 e induzida por TNF- α

Com o objetivo de investigar se o aumento de MMP-9 induzido por TNF- α é mediado pela quinase ERK 1/2, utilizamos os inibidores da quinase MEK, PD 98059 (50 μ M) e U0126 (10 μ M), responsável pela ativação da ERK1/2. A inibição da MEK foi eficiente em reduzir o aumento de expressão de MMP-9 provocada por TNF- α , uma vez que tanto o composto PD 98059 como o U0126 inibiram significativamente a indução desta metaloproteinase (figura 22).

Figura 22 – Efeito de inibidores da enzima MEK quinase sobre a expressão de MMP-9 realizada por PCR em tempo real em células endotélias.

Efeito de inibidores da enzima MEK quinase (PD95059, 50 μ M e U0126, 10 μ M) sobre a expressão MMP-9. ++P<0.01 comparado a PD e ***P<0.01 comparado a CTL e U0126. Os níveis de RNAm foram analisados e expressos como unidades arbitrárias, normalizados pela expressão de RNAm de polimerase 2a (POLR2a) e expressos como porcentagem do controle. Os gráficos apresentam a média $\pm$ EPM para n = 3-6.

4.1.17 Efeito do silenciamento de ERp46 sobre a angiogênese por TNF- α em células endoteliais

Sabendo-se que a MMP-9 desempenha um papel importante na angiogênese investigamos o papel da ERp46 sobre o sprouting de células endoteliais induzidos por TNF- α . Para isto foi utilizado um modelo de angiogênese tridimensional, o sprouting de células endoteliais a partir de esferóides celulares embebidos em uma matriz de colágeno. As células foram plaqueadas em uma solução de metilcelulose para formar os esferóides, após 24 horas os esferóides foram coletados, plaqueados em colágeno e tratados com TNF- α . Após 24 horas, as imagens foram obtidas. Nas células transfectadas com o siRNA controle o TNF- α provocou a ~~ger~~ção de diversos sprouts, confirmando seu papel pro angiogenico. O silenciamento de ERp46 e PDI reduziu significativamente este efeito (figura 23). De maneira semelhante o silenciamento de catepsina B com siRNA e sua inibição com CA074ME também resultaram em redução significativa da angiogênese induzida por TNF- α .

Figura 23 – Efeito da inibição da ERp46 e da PDI sobre a angiogênese avaliada em modelo tridimensional de esferóides de células endoteliais humanas embebidas em colágeno.

A) Esferóides de células endoteliais transfectadas com siRNA controle (scb), direcionados a ERp46, PDI, catepsina B (siCatB) ou tratadas com Ca074me e estimuladas com TNF- α (50 ng/ml). As imagens são representativas de três experimentos independentes. B) Quantificação do número de sprouts nos mesmos grupos. Os gráficos apresentam a média $\pm$ EPM para n=10 esferóides. ***P<0.001 comparado ao controle e aos grupos tratados e estimulados com TNF- α ; +P<0.05 comparado ao controle.

4.2 Papel da PDI na sinalização induzida por AngII em CMLV de ratos Wistar e SHR

4.2.1 Determinação da pressão arterial de ratos Wistar e SHR

Os valores de pressão arterial sistólica dos ratos Wistar e SHR foram determinados uma semana antes do início dos experimentos. Conforme ilustra a figura 4, os animais SHR apresentaram níveis pressóricos maiores em comparação com os ratos Wistar ($P < 0.001$).

Figura 24 – Determinação da pressão arterial sistólica dos grupos Wistar e SHR.

Valores da pressão média arterial sistólica de animais Wistar e SHR. Os dados são expressos como a média $\pm$ EPM para $n = 10-16$ animais. *** $P < 0.001$ comparado com Wistar.

4.2.2 Isolamento de CMLV de artérias mesentéricas para cultura

A caracterização das CMLV isoladas das artérias mesentéricas de ratos Wistar e SHR foi realizada pela análise da expressão de proteínas contráteis. Assim, a expressão de α -actina e calponina foi determinada por imunofluorescência (figura 25 A e B, respectivamente). Adicionalmente, as CMLV isoladas foram incubadas com anticorpo contra o fator de Von Willebrand (VWF, figura 25 C) e fator de ativação de fibroblastos α (FAP α , figura 25 D), proteínas específicas de células endoteliais e fibroblastos, respectivamente. As CMLV isoladas mostraram imunorreatividade negativa para ambos os anticorpos, excluindo contaminação por estes tipos celulares nas células cultivadas.

Figura 25 – Caracterização das CMLV isoladas de artérias mesentéricas de ratos da pressão arterial sistólica dos grupos Wistar

As CMLV foram incubadas com DAPI para marcação do núcleo (azul) e com um anticorpo de escolha. A) CMLV marcadas com anticorpo para α -actina (vermelho – rodamina). B) Imunorreatividade para calponina (verde – FITC). C) Marcação para FAP- α . D) Imunorreatividade negativa para VWF. As imagens são representativas de 3 experimentos independentes. As imagens foram feitas em microscópio de fluorescência (LSM510 – Carl Zeiss).

4.2.3 Expressão das subunidades Nox 1 e Nox 4 em CMLV de Wistar e SHR

Sabendo-se que a NADPH oxidase constitui uma das principais fontes de EROS no sistema vascular e participa de forma importante na fisiopatologia da hipertensão arterial, investigamos a expressão das subunidades Nox 1 (Figura 26 A) e Nox 4 (Figura 26 B) nas CMLV do leito mesentérico de ratos Wistar e SHR. Observamos maior expressão de RNAm tanto de Nox 1 ($P<0.01$) quanto de Nox 4 ($P<0.05$) nas CMLV de SHR quando comparadas as dos ratos Wistar.

Figura 26 – Expressão de RNAm de Nox 1 e Nox 4 realizada por PCR em tempo real em CMLV de ratos Wistar e SHR.

Os níveis de RNAm foram analisados e expressos como unidades arbitrárias, normalizados pela expressão de RNAm de GAPDH. Os dados são expressos como a média $\pm$ EPM da expressão relativa para n = 4-6. *P<0.05 e **P<0.01 vs. Wistar.

4.2.4 Expressão Proteica de PDI em CMLV de ratos Wistar e SHR

A análise da expressão proteica da PDI (55KDa), analisada por imunofluorescência (Figuras 27 A e B) e por método de Western Blotting (figura 27 C), em CMLV sem estímulo, mostra uma maior expressão desta proteína em animais SHR quando comparado com ratos Wistar ($P < 0.05$; Figura 27 C).

Figura 27 – Expressão da PDI em CMLV de ratos Wistar e SHR.

PDI foi detectada por imunofluorescência (verde) em CMLV de ratos Wistar (A) e SHR (B). Os núcleos das CMLV foram marcados por DAPI (azul). A expressão de PDI também foi detectada por Western Blotting (C). Os valores obtidos foram normalizados pela expressão de β-actina e expressos como porcentagem do controle (scb siRNA). Os gráficos apresentam a média $\pm$ EPM para n=6. **P<0.01 comparado com Wistar.

4.2.5 Silenciamento da PDI em de CMLV de ratos Wistar e SHR

A expressão de PDI (55 KDa) foi analisada por método de Western Blotting após transfeção das células com siRNA para PDI. Para transfecção foi utilizado meio de cultura sem soro e sem antibióticos por um período de 4h. Após o período de transfecção as células foram incubadas com meio contendo soro fetal bovino por 48h. A transfecção resultou em redução significativa da PDI nas células transfectadas quando comparadas com a transfecção de siRNA controle (scrambled siRNA; figura 28). A expressão de ERK 1/2 foi utilizada como controle.

Figura 28 – Silenciamento da PDI em CMLV de ratos Wistar e SHR.

A expressão de PDI também foi detectada por Western Blotting após transfecção com siRNA para PDI em CMLV de Wistar (A) e SHR (B). Os valores obtidos foram normalizados pela expressão de ERK 1/2 e expressos como porcentagem do controle (scb siRNA). Os gráficos apresentam a média $\pm$ EPM para $n=3-4$. *** $P<0.001$ e ** $P<0.01$ comparado ao controle.

4.2.6 Efeito do silenciamento da PDI sobre a expressão de Nox1 e Nox4 em CMLV de ratos Wistar e SHR

Após 48h de transfecção com o siRNA para PDI foi analisada a expressão de Nox1 e Nox4 pelo método de PCR tempo real nas células de ratos wistar e SHR. Nas células de ratos wistar o silenciamento da PDI resultou em redução significativa da expressão do mRNA para Nox1 (figura 29 A, $P<0.05$) e aumento da expressão de Nox 4 (figura 29 B, $P<0.05$). Em células de ratos SHR o silenciamento da PDI também resultou em redução da expressão de Nox1 (figura 29 C, $P<0.05$), no entanto não foi observado nenhuma alteração na expressão de Nox 4 (figura 29 D).

Figura 29 – Efeito do silenciamento da PDI sobre a expressão de Nox 1 e Nox 4 realizada por RT-PCR em CMLV de ratos Wistar e SHR.

Os gráficos mostram a expressão de Nox 1 e Nox 4 em CMLV de ratos Wistar (A e B) e SHR (C e D), respectivamente, transfectadas com siRNA para PDI (PDI siRNA) ou com 'scrambled' siRNA (scb siRNA) utilizado como controle. Os níveis de RNAm foram analisados e expressos como unidades arbitrárias, normalizados pela expressão de RNAm de GAPDH. Os dados são expressos como a média $\pm$ EPM para $n = 3$. * $P < 0.05$ comparado a scb siRNA.

4.2.7 Efeito do silenciamento da PDI sobre a ativação de ERK 1/2 induzida por Ang II em CMLV de Wistar e SHR

Para investigar o efeito do silenciamento da PDI sobre a sinalização redox induzida por Ang II, analisamos a ativação da quinase ERK 1/2. Após 48 h de transfecção com o siRNA para PDI as células foram privadas de soro por 24h e foram estimuladas com Ang II (100 nM) por 5 minutos. A fosforilação da ERK 1/2 foi analisada por western blotting. O silenciamento da PDI resultou em redução significativa da ativação da ERK 1/2 em células de ratos wistar (Figura 30 A, $P<0.05$) e SHR (Figura 30 B, $P<0.05$).

Figura 30 – Efeito do silenciamento da PDI sobre a ativação de ERK 1/2 induzida por Ang II em CMLV de ratos Wistar e SHR

Células de ratos Wistar (A) e SHR (B) transfectadas com siRNA para PDI foram estimuladas com Ang II (100nM) por 5 minutos. A fosforilação de ERK 1/2 foi detectada por western blotting e os valores obtidos foram normalizados pela expressão de ERK 1/2 total e expressos como porcentagem do controle (scb siRNA). Os gráficos apresentam a média $\pm$ EPM para $n=3-4$. . * $P<0.05$ comparado a scb siRNA, e PDI siRNA; *** $P<0.001$ comparado aos veículos; ** $P<0.01$ comparado ao Ang II PDI siRNA e # $P<0.05$ comparado ao veículo PDI siRNA.

4.2.8 Super expressão de PDI em CMLV de Wistar

Para investigar a modulação da PDI sobre a expressão de Nox1 e a sinalização para Ang II, foram realizados experimentos em células com aumento da expressão proteica de PDI. Para a super expressão, foi realizada a transfecção das CMLV de ratos wistar com plasmídeo contendo PDI wild type (PDI WT) ou PDI com mutações em suas quatro cisteínas dos sítios redox ativos (PDI MUT). Conforme podemos observar na figura 31 este procedimento resulta em aumento significativo da expressão de PDI nas células transfectadas.

Figura 31 – Efeito do super expressão da PDI sobre a expressão de Nox 1 e Nox 4 realizada por PCR em tempo real em CMLV de ratos Wistar.

A expressão de PDI foi detectada por Western Blotting após transfecção com PDI wild type (PDI WT) e PDI mutada em seus sítios redox ativos (PDI MUT). Os valores obtidos foram normalizados pela expressão de β-actina e expressos como porcentagem do controle (CTL). Os gráficos apresentam a média $\pm$ EPM para n=4. **P<0.01 comparado ao controle.

4.2.9 Efeito da super expressão de PDI em CMLV de Wistar e SHR

Após 48h de transfecção a expressão de Nox1 e Nox4 foi analisada em células com aumento da expressão proteica de PDI. Tanto a transfecção com plasmídeo contendo PDI wild type (PDI WT) ou PDI com mutações em suas quatro cisteínas dos sítios redox ativos (PDI MUT) resultou em aumento da expressão de Nox1 (figura 32 A, $P < 0.01$). Analisando a expressão de Nox 4 observamos uma redução na expressão desta isoforma da NADPH oxidase após a transfecção tanto com PDI WT como com a PDI mutada.

Figura 32 – Efeito do super expressão da PDI sobre a expressão de Nox 1 e Nox 4 realizada por RT-PCR em CMLV de ratos Wistar.

Os gráficos mostram a expressão de Nox 1 (A) e Nox 4 (B) em CMLV de ratos Wistar, transfectadas com PDI wild type (WT PDI) ou com PDI mutada em seus quatro sítios redox ativos (MUT PDI). Os níveis de RNAm foram analisados e expressos como unidades arbitrárias, normalizados pela expressão de RNAm de GAPDH. Os dados são expressos como a média $\pm$ EPM para $n = 5$. ** $P < 0.01$ e *** $P < 0.001$ comparado ao controle (CLT).

4.2.10 Efeito da super expressão de PDI sobre a ativação de ERK 1/2 induzida por Ang II em CMLV de Wistar e SHR

Após 48h de transfecção foi analisada a ativação da ERK 1/2 induzida por AngII em células com aumento da expressão de PDI. Tanto a transfecção com PDI wild type (PDI WT) ou PDI com mutações em seus sítios redox ativos (PDI MUT) resultou em aumento significativo da fosforilação da ERK 1/2 induzida por Ang II quando compara as células controle (figura 33, $P < 0.05$).

Figura 33 – Efeito do super expressão da PDI sobre a ativação de ERK 1/2 induzida por Ang II em CMLV de ratos Wistar.

Células de ratos Wistar transfectadas com PDI wild type (PDI WT) ou PDI mutada em seus sítios ativos (PDI MUT) foram estimuladas com Ang II (100nM) por 5 minutos. A fosforilação de ERK 1/2 foi detectada por western blotting e os valores obtidos foram normalizados pela expressão de ERK 1/2 total e expressos como porcentagem do controle (CTL). Os gráficos apresentam a média $\pm$ EPM para $n=4$. . ** $P<0.01$ e *** $P<0.001$ comparado aos veículos; * $P<0.05$ comparado a PDI WT e PDI MUT estimuladas com Ang II.

4.2.11 Efeito da inibição da PDI sobre a geração de EROs

A geração de EROs em CMLV de animais Wistar e SHR medida por fluorescência derivada da oxidação da DHE (10^{-5} M; Figura 34) mostrou um aumento da geração de EROs induzido pelo estímulo com Ang II (10^{-7} M) em células de animais Wistar (Figura 34C) e SHR (Figura 34D), comparadas com o respectivo controle (Figuras 9A e B). A inibição da PDI pela bacitracina (0,5 mM) diminuiu significativamente a geração de EROs dependente de Ang II em células de animais Wistar (Figura 34B) e SHR (Figura 34F). O uso de DTNB (1μ M ; Figuras 34C e G), oxidante de tióis, também inibiu a geração de EROs induzida por Ang II em ambos o grupos experimentais.

Figura 34 – Efeito da inibição da PDI sobre a geração de EROs

CMLV de ratos Wistar e SHR estimuladas com Ang II (100nM) na presença do inibidor da PDI, bacitracina (0.5M) ou do oxidante de tióis, DTNB (0.5M) foram incubadas com DHE (10^{-5} M) para determinação da geração de EROs. A) Imagens representativas de de 3 experimentos independentes. B) Quantificação da fluorescência emitida pela oxidação da DHE. A intensidade de fluorescência foi quantificada em unidades arbitrárias e os dados expressos como porcentagem do wistar veículo. O gráfico apresenta a média $\pm$ EPM para n=3. **P<0.01 e ***P<0.001 comparado aos veículos; #P<0.05 comparado a wistar estimulado com Ang II.

4.2.12 Efeito da inibição da PDI sobre a ativação da c-Src quinase

A tirosina quinase c-Src é um importante mediador nas ações contráteis e tróficas da Ang II em células musculares lisas vasculares (Touyz et al., 2001). Desta forma, foi realizada análise da ativação da c-Src em CMLV estimuladas com Ang II, com ou sem incubação prévia com bacitracina (0,5 mM), por método de Western Blotting. Os resultados obtidos demonstram aumento na fosforilação da c-Src em CMLV de animais Wistar e SHR, estimuladas com Ang II por um minuto (figura 35 A e B, respectivamente). A inibição da PDI (bacitracina 0.5 mM) resultou em redução significativa da ativação da c-Src em células de ratos Wistar e SHR.

Figura 35 – Efeito da inibição da PDI sobre a fosforilação da c-Src quinase em CMLV de ratos Wistar e SHR

Células de ratos Wistar e SHR foram estimuladas com Ang II (100nM) por 1 minuto. A fosforilação de Src foi detectada por western blotting e os valores obtidos foram normalizados pela expressão de Src total e expressos como porcentagem do veículo (V). Os gráficos apresentam a média $\pm$ EPM para n=4. . *P<0.05 e ***P<0.001 comparado aos veículos e ao grupo tratado com bacitracina e estímulo com Ang II.

4.2.13 Efeito da inibição da PDI sobre a ativação da ERK 1/2

Também foi realizada análise da ativação da ERK 1/2 em CMLV estimuladas com Ang II, com ou sem incubação prévia com bacitracina (0,5 mM), por método de Western Blotting. Após 5 minutos de estímulo com Ang II, os resultados demonstram aumento na fosforilação da ERK 1/2 em CMLV de animais Wistar e SHR (figura 36 A e B, respectivamente). A inibição da PDI (bacitracina 0.5 mM) resultou em redução significativa da ativação da ERK 1/2 em células de ambas as linhagens.

Figura 36 – Efeito da inibição da PDI sobre a fosforilação da ERK 1/2 em CMLV de ratos Wistar e SHR

Células de ratos Wistar e SHR foram estimuladas com Ang II (100nM) por 1 minuto. A fosforilação de ERK 1/2 foi detectada por western blotting e os valores obtidos foram normalizados pela expressão de ERK 1/2 total e expressos como porcentagem do veículo (V). Os gráficos apresentam a média $\pm$ EPM para $n=4$. . * $P<0.05$ e *** $P<0.001$ comparado aos veículos e ao grupo tratado com bacitracina e estímulo com Ang II.

4.2.14 Efeito da PDI sobre a mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ a Ang II em CMLV de animais Wistar e SHR

Analizamos a mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ em resposta a Ang II por meio da utilização da sonda fluorescente Fura-3AM na presença de inibidores da PDI e do inibidor da c-Src quinase. O tratamento com anti-PDI (1:1000) e com bacitracina (0,5mM) resultou na redução significativa do influxo de Ca^{2+} nas CMLV de ratos Wistar e SHR quando comparado ao grupo estimulado com Ang II ($P < 0.001$, figura 37). Foi utilizado o anticorpo anti-IgG (1:1000) como controle em relação ao anticorpo anti-PDI, e este não apresentou efeito sobre a mobilização de Ca^{2+} pela Ang II.

A tirosina quinase c-Src é um importante mediador nas ações contráteis e tróficas da Ang II em células musculares lisas vasculares (Touyz et al., 2001). Desta forma, investigamos se esta quinase está envolvida no influxo de $[Ca^{2+}]_i$ de CMLV de ratos SHR. Observamos que o inibidor da c-Src quinase, PP2 ($10^{-5}M$), foi capaz de reduzir parcialmente a mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ em CMLV de ratos Wistar, de forma diferente dos inibidores da PDI ($P < 0,05$ comparado com bacitracina; Figura 37 B). No entanto, em CMLV de animais SHR o tratamento com PP2 foi capaz de reduzir marcadamente a resposta a Ang II, de maneira semelhante a redução ocasionada pelos inibidores da PDI (Figura 37 D)

Figura 37 - Efeito da PDI sobre a mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ a Ang II em CMLV de animais Wistar e SHR.

Traçados representativos da concentração de $[Ca^{2+}]_i$ em resposta a Ang II em CMLV de animais Wistar (A) e SHR (C). Fluorescência máxima obtida em unidade de fluorescência arbitrária em CMLV de ratos Wistar (B) e SHR (D). Os dados são expressos como a média $\pm$ EPM para n 10-20 células. ***P<0.001 vs. Veículo, bacitracina, anti-PDI e PP2. #P<0,05 vs bacitracina.

4.2.15 Efeito da PDI sobre a resposta vasoconstritora a Ang II no leito arteriolar mesentérico de animais Wistar e SHR

A perfusão com Ang II causou um aumento da pressão de perfusão de maneira dependente da dose em leito arteriolar mesentérico isolado de ratos Wistar (Figura 38 A) e SHR (Figura 38 B). Esta resposta foi maior em animais SHR quando comparados com Wistar, como podemos observar comparando a resposta máxima ($P < 0,05$; figura 39). Na presença de bacitracina, a resposta vasoconstritora à Ang II foi reduzida significativamente em leito arteriolar mesentérico de animais Wistar ($P < 0,01$) e SHR ($P < 0,001$). Na presença de apocinina, esta resposta também foi reduzida em ambas as linhagens ($P < 0,05$ e $P < 0,01$ quando comparado com o grupo que recebeu apenas a perfusão com Ang II nos animais Wistar e SHR, respectivamente).

Figura 38 – Curva concentração efeito para Ang II em leito arteriolar mesentérico de ratos Wistar.(A) e SHR (B).

Resposta máxima a Ang II em leito arteriolar mesentérico de ratos Wistar e SHR (C). Os dados são expressos como a média $\pm$ EPM para 4 a 6 animais em cada grupo experimental. * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ e *** $P < 0.001$ vs. Ang II.

Figura 39 – Resposta máxima a Ang II em leito arteriolar mesnterico de ratos Wistar e SHR

Os dados são expressos como a média $\pm$ EPM para 4 a 6 animais em cada grupo experimental. *P<0.05 **P<0.01 e ***P<0,001 vs. Ang II. +P<0.05 comparado com Wistar.

5 DISCUSSÃO

5.1 Participação da ERp46 e da PDI na angiogênese induzida por TNF- α

A investigação do papel da ERp46 e da PDI na sinalização induzida por TNF- α resultou em evidências de que estas proteínas desempenham um importante papel na angiogênese de células endoteliais induzidas por esta citocina. Neste estudo demonstramos que a PDI e a ERp46 regulam a ativação da ERK 1/2 induzida por TNF- α . Como consequência, ambas as enzimas estão envolvidas na ativação do fator de transcrição AP-1 e na produção de MMP-9 e catepsina B, envolvidas na degradação de matriz extracelular necessária para o início do processo de angiogênese.

Estudos prévios mostraram que o TNFR apresenta regiões ricas em cisteína em seu domínio extracelular e que, portanto, poderia ser regulado por reações redox. A PDI e os membros dessa família de enzimas são capazes de realizar trocas tiol disulfeto e foram implicadas na regulação de proteínas de membrana como a integrina $\alpha_v\beta_3$ (Swiatkowska et al., 2008). Por este motivo investigamos o efeito do silenciamento da PDI e ERp46 em células endoteliais sobre a sinalização induzida por TNF- α .

A ligação do TNF- α ao seu receptor TNFR desencadeia a ativação das quinases p38, JNK e ERK 1/2 (Cabal-Hierro e Lazo, 2012), mediadores de suas ações celulares. Por meio do silenciamento da PDI e da ERp46 observamos a inibição da fosforilação apenas da quinase ERK 1/2, enquanto as outras vias de sinalização permaneceram inalteradas. Adicionalmente, investigamos a ativação do complexo NF κ B, que medeia uma das principais respostas inflamatórias em células endoteliais, a expressão das moléculas de adesão VCAM e ICAM. As proteínas componentes do complexo NF κ B não encontradas no citosol ligadas a moléculas inibidoras I κ B α . O estímulo com TNF- α provoca a fosforilação e degradação deste inibidor, o que promove a translocação do complexo para o núcleo. O silenciamento da PDI e da ERp46 não alterou a degradação do I κ B α , e a atividade do NF κ B pode ser constatada pelo aumento da expressão de VCAM e ICAM 4 horas após o estímulo com TNF- α .

O efeito do silenciamento tanto da PDI e da ERp46 sobre a ERK 1/2 se mostrou específico para ativação das células endoteliais com TNF- α , já que o silenciamento de PDI provocou uma redução generalizada da sinalização por IL-1 β e

trombina ou não apresentou efeito algum como no caso do estímulo com FGF. Desta forma, investigamos os possíveis mecanismos pelo qual a PDI poderia regular a fosforilação da ERK 1/2.

Conforme observamos, a PDI e a ERp46 regulam especificamente a fosforilação da ERK1/2, e, portanto este efeito não pode ser atribuído à regulação do receptor TNFR ao nível de membrana plasmática. No entanto, estudos mostraram que ativação do TNFR provoca a transativação do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR), e este ativa a via de sinalização que leva a fosforilação de ERK 1/2. Este efeito parece ser mediado pela clivagem de hb-EGF induzido pela enzima ADAM-17, também conhecida como enzima conversora de TNF- α (TACE). Esta enzima é ativada por TNF- α e regulada pela PDI em outros tipos celulares (Willems et al., 2010). Assim, através da regulação da ADAM-17, a PDI e a ERp46 localizadas na membrana plasmática poderiam regular a fosforilação da ERK 1/2.

Para investigar este mecanismo, primeiramente utilizamos a PDI recombinante adicionada ao meio das células em que a PDI e a ERp46 foram silenciadas, porém a adição de PDI não foi capaz de reverter o efeito provocado pelo silenciamento. Adicionalmente, investigamos se a ativação do EGFR estava envolvida na fosforilação da ERK 1/2 induzida pelo TNF- α em células endoteliais. Constatamos que esta via não participa da ativação da ERK induzida por TNF- α , uma vez que a utilização de inibidores do EGFR não foram capazes de inibir a fosforilação desta quinase. Também utilizamos um inibidor da ADAM-17, e mais uma vez não observamos efeito sobre a fosforilação da ERK 1/2 após o estímulo com TNF- α . Portanto podemos concluir que ~~em~~ células endoteliais, o TNF- α não promove a ativação da ERK 1/2 via EGFR e que a PDI e a ERp46 de membrana não esta envolvidas no efeito observado.

A fosforilação da ERK 1/2 é desencadeada pela ativação de uma cascata de sinalização que envolve as proteínas Ras/Raf/MEK/ERK. A ativação de receptores de membrana promove a ativação da GTPase Ras, e esta por sua vez ativa a quinase Raf, que fosforila a MEK, que por sua vez é responsável pela fosforilação da ERK 1/2. Portanto, a PDI poderia atuar em uma dessas moléculas alterando então a ativação da ERK 1/2. No entanto, utilizando o estímulo com EGF nas células em que a PDI foi silenciada observamos a fosforilação da ERK 1/2, o que mostra que a via Raf/MEK/ERK não é afetada pelo silenciamento de PDI. Isso nos leva a hipótese de

que a regulação ocorra sobre a GTPase Ras, ou ainda sobre moléculas que promovem a interação entre o TNFR e a Ras.

De fato, a Ras possui cisteínas redox sensíveis em sua estrutura e a modificação destas cisteínas por reações redox é capaz de alterar sua atividade (Wu, Terada, 2009). Um outro mecanismo pelo qual Ras poderia ser modificada, seria via EROs produzidos pela NADPH oxidase, a qual é regulada pela PDI (Janiszewski et al., 2005). De fato, o TNF- α reconhecidamente ativa a oxidase bem como vias de sinalização redox (Frey et al., 2002). Desta forma, experimentos adicionais realizados pelo laboratório do Prof. Ralf Brandes em continuidade a este trabalho demonstraram que o silenciamento tanto da PDI quanto da Erp46 reduziram a atividade da oxidase induzida por TNF- α . Adicionalmente, também foi observado que a fosforilação de Raf-1 também foi inibida pelo silenciamento da Erp46 e da PDI, sugerindo que o efeito da PDI sobre esta via seja sobre a Ras (ver apêndice).

A quinase ERK 1/2 é uma molécula chave em processos de crescimento e migração celular, que são críticos para o desenvolvimento e progressão de lesões vasculares (Goetze et al., 2001). A ativação desta quinase pelo TNF- α resulta na ativação da metaloproteinase MMP-9 e catepsina B, via ativação dos fatores de transcrição AP-1 (Moon et al., 2004). Estas proteinases tem sido apontadas como agentes importantes no processo de angiogênese, uma vez que são responsáveis pela degradação de colágeno que compõe a matriz extracelular, permitindo assim a migração celular (Nguyen et al., 2001). Desta forma, investigamos se o silenciamento da PDI e da Erp46 estaria envolvido na regulação da angiogênese induzida pelo TNF- α , através da redução destas proteinases. Os resultados obtidos mostram que o TNF- α é um potente indutor de MMP-9 e que a Erp46 participa da regulação da expressão de MMP-9, uma vez que o silenciamento da Erp46 reduziu consideravelmente a expressão de MMP-9 induzida pelo TNF- α .

Também observamos que aumento de MMP-9 induzido por TNF- α é mediado pela quinase ERK 1/2, pois a inibição da MEK quinase foi eficiente em reduzir o aumento de expressão de MMP-9 provocada por TNF- α . Em células musculares lisas vasculares, o aumento de MMP-9 induzido por TNF- α também é regulado pelo complexo NF κ B (Moon et al., 2004), por este motivo investigamos se este fator de transcrição também estaria envolvido neste efeito em células endoteliais. Com a utilização do inibidor PTDC também observamos uma redução na expressão de MMP-9, o que poderia explicar a redução parcial na expressão desta

metaloproteinase após o silenciamento da ERp46 já que o complexo NFκB não é regulado por esta enzima.

Sabendo-se que a MMP-9 desempenha um papel importante na angiogênese investigamos o papel da ERp46 sobre o *sprouting* de células endoteliais induzidos por TNF-α. A formação de novos vasos capilares a partir de células endoteliais é essencial ao desenvolvimento de órgãos, cicatrização de ferimentos e nos processos inflamatórios. O processo de angiogênese envolve uma série de etapas, uma das primeiras etapas envolve a degradação da lâmina basal pela ação de proteases da matriz extracelular e liberadas pelo endotélio. As células endoteliais migram para o estroma perivascular, proliferam e iniciam o brotamento capilar. Os brotos formados assumem uma forma tubular e uma nova lâmina basal se desenvolve. A proliferação endotelial permite a extensão dos túbulos microvasculares que se unem por anastomose e dão origem à cadeia circulatória funcional (Korf et al., 1999). Para isto foi utilizado um modelo de angiogênese tridimensional, no qual um aglomerado de células endoteliais em formato esferoide foi imerso em uma matriz de colágeno, possibilitando o brotamento capilar pela invasão da matriz extracelular, reproduzindo uma das etapas iniciais da angiogênese e para a qual a MMP-9 é essencial. Os resultados demonstraram que a ERp46 tem um papel fundamental na angiogênese induzida pelo TNF-α, pois o silenciamento desta proteína reduziu consideravelmente o surgimento de brotamentos capilares em resposta ao TNF-α.

Assim, os dados obtidos até o momento permitem concluir que a ERp46 e a PDI estão envolvidas na angiogênese induzida por TNF-α em células endoteliais, através da regulação da expressão de MMP-9 dependente de ERK 1/2.

5.2 Papel da PDI na sinalização induzida por AngII em células musculares lisas vasculares. Implicações na disfunção vascular associada à hipertensão arterial

Diversos estudos demonstram que a produção de EROs pela NADPH oxidase não é um processo acidental e sim controlado enzimaticamente, entretanto, os mecanismos que regulam a ativação deste complexo enzimático ainda não estão completamente esclarecidos. Resultados prévios do nosso grupo identificaram a PDI como uma nova proteína reguladora da NADPH oxidase (Janiszewski et al., 2005).

No entanto, o papel da PDI em patologias associadas ao aumento da atividade da NADPH oxidase, como a hipertensão arterial ainda não foram investigados. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar o papel da PDI sobre a regulação da ativação da NADPH oxidase e sua implicação na disfunção vascular associado à hipertensão arterial.

Estudos anteriores demonstraram que apesar de apresentar interação com diversas subunidades da NADPH oxidase, a PDI regula a expressão de Nox 1 em CMLV de maneira específica, uma vez que não foram observados efeitos sobre a expressão de Nox 4 (Fernandes et al., 2009; Pescatore et al., 2012). Estes estudos foram realizados em CMLV de linhagem imortalizada, provenientes de aorta de coelho (RASM). Sabendo que um dos mecanismos que contribui para o aumento da pressão arterial é o aumento da resistência periférica, e que este aumento está relacionado a alterações funcionais e estruturais das CMLV de artérias de resistência, utilizamos no presente estudo CMLV isoladas de artérias mesentéricas de ratos Wistar e SHR. Adicionalmente, estudos demonstraram que a expressão e regulação das Noxes podem variar de acordo com o leito vascular. Portanto, primeiramente investigamos se esta regulação da Nox 1 pela PDI também ocorria em artérias de resistência. Os experimentos com silenciamento e superexpressão da PDI em CMLV de ratos Wistar confirmaram os efeitos observados sobre a expressão de Nox 1. No entanto, nestas células foi observado um efeito inverso na expressão de Nox 4, em que a superexpressão de PDI diminuiu enquanto que o silenciamento aumentou a expressão de Nox 4. Este efeito oposto na expressão de Nox 1 e Nox 4 poderia ser devido a um mecanismo compensatório, da mesma forma que ocorre entre Nox 2 e Nox 4 em células endoteliais (Pendyala et al., 2009).

Os mecanismos envolvidos na regulação da expressão da Nox 1 pela PDI podem ser múltiplos, devido a sua versatilidade funcional e a sua localização em diversos compartimentos celulares. Uma das maneiras de aumentar a atividade da oxidase consiste no aumento da expressão de suas subunidades, dessa forma a própria ativação oxidase leva a um aumento da expressão de Nox1 num mecanismo de *feedback* positivo dependente de EROs (Brandes, Schröder, 2008). Sendo a PDI capaz de regular a atividade da oxidase, ela também poderia estar regulando sua expressão. Outros estudos mostraram que a mudança do estado redox para oxidante ativa o EGFR o que leva ao aumento da expressão de Nox 1, via ativação do fator de transcrição ATF-1 (Stanic et al., 2010). Devido a localização da PDI na

membrana plasmática e sua interação com a metaloproteínase ADAM 17 (Willems et al., 2010) ela poderia ativar esta via de sinalização. Ainda, não podemos descartar a possibilidade de interação direta com fatores de transcrição, uma vez que a PDI também foi encontrada no núcleo celular e alguns destes fatores como o NFkB e AP-1 são redox sensíveis. Foi demonstrado que a PDI aumenta a ligação ao DNA de NFkB e AP-1, ambos implicados na expressão genica de Nox 1 (Clive, Greene, 1996).

Dentre os mecanismos mencionados acima, muitos se referem à capacidade de realização de reações redox da PDI. Para investigar se este efeito era redox dependente utilizamos nos experimentos de superexpressão além da PDI wild type, uma PDI mutada tornando seus sítios redox inativos. Os resultados obtidos com a transfecção destes dois tipos de PDI foram idênticos, sugerindo que o mecanismo de regulação da Nox 1 pela PDI não é redox dependente. Mais estudos são necessários para que possamos descartar totalmente esta hipótese, no entanto, a PDI também apresenta atividade chaperona independente dos sítios redox ativos (Quan et al., 1994), que poderia contribuir para a montagem e estabilização de complexos proteicos como a NADPH oxidase e o complexo NFkB.

Posteriormente, investigamos o efeito funcional da regulação da Nox 1 pela PDI nestas células. Está bem estabelecido na literatura que a Ang II promove a ativação de vias de sinalização utilizando EROs produzidos pela Nox 1 (Nguyen et al., 2012). De fato, o silenciamento e a superexpressão de PDI resultaram em alteração da ativação da ERK 1/2 induzida por Ang II.

A regulação da expressão da Nox 1 pela PDI poderia ter implicações na hipertensão arterial. Estudos mostram que a principal isoforma de NADPH oxidase envolvida na resposta hipertensiva da Ang II é a Nox 1. Em camundongos knockout para Nox 1 a geração de O_2^- e a resposta hipertensiva a Ang II encontram-se reduzidas (Matsuno et al., 2005), enquanto que camundongos que superexpressam Nox 1 apenas no músculo liso vascular apresentam aumento destes dois parâmetros (Dikalova et al., 2005).

Para investigar o papel da PDI na hipertensão arterial, utilizamos como modelo experimental ratos espontaneamente hipertensos (SHR), que reconhecidamente apresentam maior geração de EROs no desenvolvimento da hipertensão arterial. Estes animais apresentam aumento da geração de EROS decorrente do aumento da NADPH oxidase (Zalba et al., 2000; Cruzado et al., 2005),

aumento da ativação de vias de sinalização redox em resposta a Ang II (Tabet et al., 2008) e disfunção vascular associada ao aumento da resposta a Ang II (Endemann et al., 1999; Zalba et al., 2000).

Nas células isoladas destes animais observamos uma maior expressão de PDI, Nox 1 e Nox 4 comparado aos animais normotensos (wistar). De maneira semelhante, as células com superexpressão de PDI, as CMLV de SHR apresentaram maior expressão de Nox 1 e maior fosforilação da ERK 1/2 induzida por Ang II. Obviamente, no modelo experimental utilizado, diversos outros fatores estão associados ao aumento da pressão arterial bem como ao aumento do estresse oxidativo. Por exemplo, outros fatores como o TGF β e a endotelina-1 poderiam estar regulando a expressão de Nox 4 (Touyz, Montezano 2012), motivo pelo qual no SHR não observamos o efeito sobre a Nox 4 após o silenciamento da PDI. Da mesma forma, outros fatores podem ser responsáveis pelo aumento da Nox 1 no SHR, entretanto o silenciamento da PDI foi capaz de reduzir a expressão de Nox 1 bem como a resposta a Ang II, sugerindo a participação da PDI no estresse oxidativo associado a disfunção vascular na hipertensão arterial.

Além do aumento da expressão de Nox 1 observamos que a superexpressão de PDI resultou em aumento significativo da fosforilação basal de ERK 1/2, sugerindo um aumento da atividade da NADPH oxidase na ausência de Ang II. De fato, resultados prévios do nosso grupo demonstraram a ativação espontânea da NADPH oxidase após aumento da expressão de PDI em RASM. Estes resultados indicam que a PDI pode regular a atividade da oxidase independentemente de regular sua expressão. Por este motivo, investigamos também o efeito da PDI sobre a atividade da oxidase e suas implicações na sinalização celular induzida por Ang II em CMLV de Wistar e SHR. Para isto utilizamos inibidores que atuam na superfície celular capazes de modificar a atividade redutase da PDI, sendo eles a bacitracina (Dickerhof et al., 2011) e em alguns experimentos o anticorpo inibitório anti-PDI.

Sabendo-se que a NADPH oxidase é a principal geradora de EROS em CMLV, analisamos a geração de EROs nas CMLV de ratos SHR e Wistar por meio de fluorescência derivada da oxidação da DHE. Como esperado, observamos uma maior geração de EROs em células de SHR após estímulo com a Ang II, corroborando resultados de Cruzado et al. (2005). Na presença do inibidor da PDI, esta geração foi significativamente reduzida tanto em células de SHR como de Wistar. Adicionalmente, utilizamos o DTNB, um oxidante de tióis, e obtivemos

resultados semelhantes aos resultados obtidos com a inibição da PDI. Desta forma, os resultados apresentados são indicativos de que assim como demonstrado previamente em CMLV de aorta de coelho, (Janiszewski et al., 2005) a PDI é capaz de modular a atividade da NADPH oxidase também em CMLV de artérias de resistência de ratos Wistar e SHR.

Estudos realizados por Touyz et al, (2003) demonstram que a migração e fosforilação do $p47^{\text{PHOX}}$ e conseqüente ativação da NADPH oxidase pela Ang II em CMLV são reguladas pela tirosina quinase c-Src. Esta quinase pertence a família de tirosinas quinases não receptores, que é amplamente expressa em CMLV e rapidamente ativada pela Ang II (Oda et al., 1999), e por ser redox sensível (Touyz et al., 2003; Ushio-Fukai et al., 2001), representa também um alvo importante das EROs geradas pela NADPH oxidase. Nossos resultados mostraram que a inibição da PDI provocou uma significativa diminuição na fosforilação da c-Src em ambos os grupos experimentais.

A Ang II estimula a geração de EROs via ativação da NADPH oxidase em duas fases. A primeira é rápida, atingindo pico em 30 segundos, e é dependente da fosforilação da $p47^{\text{PHOX}}$ mediada por PKC. Acredita-se que as EROs produzidas nesta fase ativam a c-Src, e esta por sua vez participa da segunda fase de ativação da NADPH oxidase via ativação de Rac mediada pela transativação de EGFR. A geração de EROS nesta fase é de maior magnitude e prolongada o que aumenta a ativação de c-Src e da NADPH oxidase num mecanismo de retroalimentação positivo (Seshiah et al., 2002).

Este mecanismo é particularmente importante em CMLV de SHR, em que o aumento da atividade da NADPH oxidase resulta na maior ativação da c-Src. Como conseqüência a transativação do EGFR e das vias de sinalização ativadas por este receptor, como a ativação de ERK 1/2 também estão aumentadas e são frequentemente envolvidas nos efeitos mediados pela Ang II (Li et al., 2010). Desta maneira a c-Src constitui um mediador importante das ações da Ang II na hipertensão arterial e, portanto, os nossos dados sugerem que a ativação da NADPH oxidase pela PDI exerceria um papel importante nos efeitos tróficos e contráteis mediados por esta tirosina quinase. Neste trabalho observamos que a inibição da PDI resulta em diminuição da ativação de c-Src e ERK 1/2 tanto em CMLV de Wistar quanto de SHR.

As tirosinas quinases como a c-Src estão envolvidas no aumento de $[Ca^{2+}]_i$ pela Ang II, um fator determinante da contração vascular (Touyz et al., 2005). Assim, como a inibição da PDI levou a uma inibição da ativação de c-Src e ERK 1/2 nestas células, nós investigamos se a inibição da PDI poderia diminuir o influxo de cálcio em CMLV. Corroborando estudos anteriores, a mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ em resposta a Ang II foi significativamente maior nos animais SHR (Tabet et al., 2004). Este efeito foi significativamente reduzido após inibição da PDI com anticorpo anti-PDI e bacitracina. Em CMLV de ratos Wistar, ambos inibidores apresentaram efeitos semelhantes quanto a fluorescência máxima, no entanto os traçados representativos do influxo de cálcio mostraram que enquanto a bacitracina aboliu a mobilização de $[Ca^{2+}]_i$, o anticorpo anti-PDI provocou uma redução parcial. Esta diferença pode estar relacionada ao fato de a bacitracina não ser um inibidor específico da PDI, uma vez que ela é capaz de inibir outras chaperonas in vitro (Karala e Ruddock 2010). Por outro lado, não foram encontradas diferenças entre a ação da bacitracina e do anticorpo anti-PDI, em CMLV de SHR, o que indica ação semelhante destes inibidores sobre a mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ nesta linhagem.

Touyz et al. (2001), demonstrou que a ativação da c-Src quinase é necessária para a ativação de fosfolipase C geração de IP_3 e conseqüente aumento de $[Ca^{2+}]_i$ em CMLV estimuladas pela Ang II. Assim, analisamos o efeito da inibição da c-Src sobre a mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ induzida por Ang II. De maneira semelhante a Touyz et al. (2001), observamos uma redução parcial de $[Ca^{2+}]_i$ nas células de animais Wistar tratadas com inibidores desta tirosina quinase. Esta redução na mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ foi maior quando utilizamos inibidores de PDI, o que sugere que a PDI também estaria modulando vias de sinalização redox independentes desta tirosina quinase.

De maneira interessante, em CMLV de SHR a redução da mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ pelo PP2 foi mais pronunciada, apresentando efeito semelhante a inibição da PDI. Este resultado sugere que o aumento de $[Ca^{2+}]_i$ observada nas CMLV da linhagem SHR poderia ser decorrente do aumento da ativação da c-Src mediada pelo excesso de EROs. Além disso, a ativação da ERK 1/2 dependente da transativação do EGFR pela c-Src também participa da mobilização de $[Ca^{2+}]_i$ e da contração vascular induzida por Ang II (Touyz et al., 1999).

Assim analisados em conjunto, a maior expressão de PDI associada a um aumento na geração de EROs, fosforilação de c-Src, ERK 1/2 e influxo de cálcio nos

animais SHR indicam uma papel da PDI no estresse oxidativo e na disfunção vascular associada a hipertensão arterial. Para investigar esta hipótese analisamos a resposta vasoconstritora a Ang II em leito arteriolar mesentérico isolado na presença de bacitracina. Observamos uma redução significativa da resposta contrátil em leito arteriolar mesentérico isolado de animais Wistar e uma redução mais pronunciada desta resposta em animais SHR sugerindo, de fato, uma maior participação da PDI na resposta contrátil vascular nestes animais.

Em resumo, os resultados obtidos demonstram que a PDI tem um papel importante na sinalização redox da Ang II, provavelmente via ativação da NADPH oxidase e conseqüente ativação das vias de sinalização mediadas por EROs como a c-Src tirosina quinase e influxo de cálcio. Assim o aumento da expressão da PDI em situações patológicas poderia contribuir para o estresse oxidativo e as alterações funcionais que resultam na disfunção vascular associada à hipertensão arterial.

6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados apresentados podemos concluir que a PDI apresenta um papel na regulação da sinalização redox induzida por TNF- α e Ang II em células endoteliais musculares lisas vasculares. Demonstramos que a PDI participa da angiogênese induzida por TNF- α , através da regulação redox da ERK 1/2. Além disso, os dados sugerem a participação da PDI na contração induzida por Ang II, bem como na disfunção vascular associada à hipertensão arterial, através da regulação da expressão e atividade da Nox1. Desta forma, tais resultados mostram um novo papel da PDI no estresse oxidativo e na disfunção vascular associados a patologias como a hipertensão arterial e a aterosclerose.

REFERÊNCIAS*

- Ambasta RK, Kumar P, Griendling KK, Schmidt HH, Busse R, Brandes RP. Direct interaction of the novel Nox proteins with p22phox is required for the formation of a functionally active NADPH oxidase. *J Biol Chem*. 2004 Oct 29;279(44):45935-41.
- Anilkumar N, Weber R, Zhang M, Brewer A, and Shah AM. Nox4 and nox2 NADPH oxidases mediate distinct cellular redox signaling responses to agonist stimulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:1347–54.
- Babior BM. NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol*. 2004 Feb;16(1):42-7.
- Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood*. 1999 Mar 1;93(5):1464-76.
- Banner DW, D'Arcy A, Janes W, Gentz R, Schoenfeld HJ, Broger C, Loetscher H, Lesslauer W. Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell*. 1993 May 7;73(3):431-45.
- 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 Apr 15;164(8):4120-9.
- Brandes RP, Schröder K. Composition and functions of vascular nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases. *Trends Cardiovasc Med*. 2008 Jan;18(1):15-9.
- Cabal-Hierro L, Lazo PS. Signal transduction by tumor necrosis factor receptors. *Cell Signal*. 2012 Jun;24(6):1297-305.
- Carvalho MH, Colaço AL, Fortes ZB. [Cytokines, endothelial dysfunction, and insulin resistance]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2006 Apr;50(2):304-12.
- Chung HS, Wang SB, Venkatraman V, Murray CI, Van Eyk JE. Cysteine oxidative posttranslational modifications: emerging regulation in the cardiovascular system. *Circ Res*. 2013 Jan 18;112(2):382-92.
- Clive DR, Greene JJ. Cooperation of protein disulfide isomerase and redox environment in the regulation of NF-kappaB and AP1 binding to DNA. *Cell Biochem Funct*. 1996 Mar;14(1):49-55.
- Cruzado MC, Risler NR, Miatello RM, Yao G, Schiffrin EL, Touyz RM. Vascular smooth muscle cell NAD(P)H oxidase activity during the development of hypertension: Effect of angiotensin II and role of insulinlike growth factor-1 receptor transactivation. *Am J Hypertens*. 2005 Jan;18(1):81-7.
- Dickerhof N, Kleffmann T, Jack R, McCormick S. Bacitracin inhibits the reductive activity of protein disulfide isomerase by disulfide bond formation with free cysteines in the substrate-binding domain. *FEBS J*. 2011 Jun;278(12):2034-43.

* 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, Lassègue B, Cheng G, McCoy J, Dikalov S, San Martin A, Lyle A, Weber DS, Weiss D, Taylor WR, Schmidt HH, Owens GK, Lambeth JD, Griendling KK. Nox 1 overexpression potentiates angiotensin II-induced hypertension and vascular smooth muscle hypertrophy in transgenic mice. *Circulation*. 2005 Oct 25;112(17):2668-76.

Dominici S, Pieri L, Paolicchi A, De Tata V, Zunino F, Pompella A. Endogenous oxidative stress induces distinct redox forms of tumor necrosis factor receptor-1 in melanoma cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2004 Dec;1030:62-8.

Ellmark SH, Dusting GJ, Fui MN, Guzzo-Pernell N, Drummond GR. The contribution of Nox4 to NADPH oxidase activity in mouse vascular smooth muscle. *Cardiovasc Res*. 2005 Feb 1;65(2):495-504.

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. *Am J Hypertens*. 1999 Jul;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 Sep 15;86(6):2168-73.

Fernandes DC, Manoel AHO, Wosniak J, Laurindo FR. Protein disulfide isomerase overexpression in vascular smooth muscle cells induces spontaneous preemptive NADPH oxidase activation and Nox 1 mRNA expression: effects of nitrosothiol exposure. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2009 Apr 15;484(2):197-204.

Folkow B. "Structural factor" in primary and secondary hypertension. *Hypertension*. 1990 Jul;16(1):89-101.

Fortuño A, Oliván S, Belouqui O, San José G, Moreno MU, Díez J, Zalba G. Association of increased phagocytic NADPH oxidase-dependent superoxide production with diminished nitric oxide generation in essential hypertension. *J Hypertens*. 2004 Nov;22(11):2169-75.

Fràter-Schröder M, Risau W, Hallmann R, Gautschi P, Böhlen P. Tumor necrosis factor type alpha, a potent inhibitor of endothelial cell growth in vitro, is angiogenic in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Aug;84(15):5277-81.

Freedman RB, Gane PJ, Hawkins HC, Hlodan R, McLaughlin SH, Parry JW. Experimental and theoretical analyses of the domain architecture of mammalian protein disulfide isomerase. *Biol Chem*. 1998 Mar;379(3):321-8.

Frey RS, Rahman A, Kefer JC, Minshall RD, and Malik AB. PKCzeta regulates TNF-alpha-induced activation of NADPH oxidase in endothelial cells. *Circ Res* 2002 May 17;90(9):1012-9.

Garrido AM, Griendling KK. NADPH oxidases and angiotensin II receptor signaling. *Mol Cell Endocrinol*. 2009 Apr 29;302(2):148-58. Folkow B. "Structural factor" in primary and secondary hypertension. *Hypertension*. 1990 Jul;16(1):89-101.

Goetze S, Kintscher U, Kim S, Meehan WP, Kaneshiro K, Collins AR, Fleck E, Hsueh WA, Law RE. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands inhibit nuclear but not cytosolic extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase-regulated steps in vascular smooth muscle cell migration. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2001 Dec;38(6):909-21.

Goldberger RF, Epstein CJ, Anfinsen CB. Purification and properties of a microsomal enzyme system catalyzing the reactivation of reduced ribonuclease and lysozyme. *J Biol Chem*. 1964 May;239:1406-10.

Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 1994 Jun;74(6):1141-8.

Hatahet F, Ruddock LW, Ahn K, Benham A, Craik D, Ellgaard L, Ferrari D, Ventura S. Protein disulfide isomerase: a critical evaluation of its function in disulfide bond formation. *Antioxid Redox Signal*. 2009 Nov;11(11):2807-50.

Hilenski LL, Clempus RE, Quinn MT, Lambeth JD, Griendling KK. Distinct subcellular localizations of Nox 1 and Nox 4 in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004 Apr;24(4):677-83.

Janiszewski M, Lopes LR, Carmo AO, Pedro MA, Brandes RP, Santos CX, Laurindo FR. Regulation of NAD(P)H oxidase by associated protein disulfide isomerase in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 2005 Dec 9;280(49):40813-9.

Jasuja R, Furie B, Furie BC. Endothelium-derived but not platelet-derived protein disulfide isomerase is required for thrombus formation in vivo. *Blood*. 2010 Nov 25;116(22):4665-74.

Jones DP. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. 2006 Sep-Oct;8(9-10):1865-79.

Karala AR, Ruddock LW. Bacitracin is not a specific inhibitor of protein disulfide isomerase. *FEBS J*. 2010 Jun;277(11):2454-62.

Korff T, Augustin HG. Tensional forces in fibrillar extracellular matrices control directional capillary sprouting. *J Cell Sci*. 1999 Oct;112 (Pt 19):3249

Lassègue B, San Martín A, Griendling KK. Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. *Circ Res*. 2012 May 11;110(10):1364-90.

Laurindo FR, de Souza HP, Pedro Mde A, Janiszewski M. Redox aspects of vascular response to injury. *Methods Enzymol*. 2002;352:432-54.

Laurindo FR, Pescatore LA, Fernandes Dde C. Protein disulfide isomerase in redox cell signaling and homeostasis. *Free Radic Biol Med*. 2012 May 1;52(9):1954-69.

Li JM, Fan LM, Christie MR, Shah AM. Acute tumor necrosis factor alpha signaling via NADPH oxidase in microvascular endothelial cells: role of p47phox phosphorylation and binding to TRAF4. *Mol Cell Biol*. 2005 Mar;25(6):2320-30.

Li JM, Mullen AM, Yun S, Wientjes F, Brouns GY, Thrasher AJ, Shah AM. Essential role of the NADPH oxidase subunit p47(phox) in endothelial cell superoxide production in response to phorbol ester and tumor necrosis factor-alpha. *Circ Res*. 2002 Feb 8;90(2):143-50.

Li Q, Spencer NY, Oakley FD, Buettner GR, Engelhardt JF. Endosomal Nox2 facilitates redox-dependent induction of NF-kappaB by TNF-alpha. *Antioxid Redox Signal*. 2009 Jun;11(6):1249-63.

Li Y, Lévesque LO, Anand-Srivastava MB. Epidermal growth factor receptor transactivation by endogenous vasoactive peptides contributes to hyperproliferation of vascular smooth muscle cells of SHR. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010 Dec;299(6):H1959-67.

Madge LA, Pober JS. TNF signaling in vascular endothelial cells. *Exp Mol Pathol*. 2001 Jun;70(3):317-25.

Matsuno K, Yamada H, Iwata K, Jin D, Katsuyama M, Matsuki M, Takai S, Yamanishi K, Miyazaki M, Matsubara H, Yabe-Nishimura C. Nox 1 is involved in angiotensin II-mediated hypertension: a study in Nox 1-deficient mice. *Circulation*. 2005 Oct 25;112(17):2677-85.

Miller FJ Jr., Chu X, Stanic B, Tian X, Sharma RV, Davisson RL, Lamb FS. A differential role for endocytosis in receptor-mediated activation of nox1. *Antioxidant Redox Signal*. 2010;12:583–93.

Montezano AC, Touyz RM. Reactive oxygen species and endothelial function--role of nitric oxide synthase uncoupling and Nox family nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2012 Jan;110(1):87-94.

Moon SK, Cha BY, Kim CH. ERK1/2 mediates TNF-alpha-induced matrix metalloproteinase-9 expression in human vascular smooth muscle cells via the regulation of NF-kappaB and AP-1: Involvement of the ras dependent pathway. *J Cell Physiol*. 2004 Mar;198(3):417-27.

Mulvany MJ. Small artery remodeling in hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 2002 Feb;4(1):49-55.

Nguyen Dinh Cat A, Montezano AC, Burger D, Touyz RM. Angiotensin II, NADPH oxidase, and redox signaling in the vasculature. *Antioxid Redox Signal*. 2013 Oct 1;19(10):1110-20.

Nguyen M, Arkell J, Jackson CJ. Human endothelial gelatinases and angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2001 Oct;33(10):960-70.

Oda Y, Renaux B, Bjorge J, Saifeddine M, Fujita DJ, Hollenberg MD. c-Src is a major cytosolic tyrosine kinase in vascular tissue. *Can J Physiol Pharmacol*. 1999;77:606-617.

Ozsoy HZ, Sivasubramanian N, Wieder ED, Pedersen S, Mann DL. Oxidative stress promotes ligand-independent and enhanced ligand-dependent tumor necrosis factor receptor signaling. *J Biol Chem*. 2008 Aug 22;283(34):23419-28.

Palladino MA, Bahjat FR, Theodorakis EA, Moldawer LL. Anti-TNF-alpha therapies: the next generation. *Nat Rev Drug Discov*. 2003 Sep;2(9):736-46.

Paes AM, Veríssimo-Filho S, Guimarães LL, Silva AC, Takiuti JT, Santos CX, Janiszewski M, Laurindo FR, Lopes LR. Protein disulfide isomerase redox-dependent association with p47(phox): evidence for an organizer role in leukocyte NADPH oxidase activation. *J Leukoc Biol*. 2011 Oct;90(4):799-810.

Pendyala S, Usatyuk PV, Gorshkova IA, Garcia JG, Natarajan V. Regulation of NADPH oxidase in vascular endothelium: the role of phospholipases, protein kinases, and cytoskeletal proteins. *Antioxidant Redox Signal*. 2009;11:841–60.

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. *J Biol Chem*. 2012 Aug 24;287(35):29290-300.

Pettit AI, Wong RK, Lee V, Jennings S, Quinn PA, Ng LL. Increased free radical production in hypertension due to increased expression of the NADPH oxidase subunit p22(phox) in lymphoblast cell lines. *J Hypertens*. 2002 Apr;20(4):677-83.

Quan H, Fan G, Wang CC. Independence of the chaperone activity of protein disulfide isomerase from its thioredoxin-like active site. *J Biol Chem* 1994; 269:7764-7771.

Rajashekhar G, Willuweit A, Patterson CE, Sun P, Hilbig A, Breier G, Helisch A, Clauss M. Continuous endothelial cell activation increases angiogenesis: evidence for the direct role of endothelium linking angiogenesis and inflammation. *J Vasc Res*. 2006;43(2):193-204.

Ross SH, Lindsay Y, Safrany ST, Lorenzo O, Villa F, Toth R, Clague MJ, Downes CP, Leslie NR. Differential redox regulation within the PTP superfamily. *Cell Signal*. 2007 Jul;19(7):1521-30.

Seshiah PN, Weber DS, Rocic P, Valppu L, Taniyama Y, Griendling KK. Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. *Circ Res*. 2002 Sep 6;91(5):406-13.

Söderberg A, Hossain A, Rosén A. A protein disulfide isomerase/thioredoxin-1 complex is physically attached to exofacial membrane tumor necrosis factor receptors: overexpression in chronic lymphocytic leukemia cells. *Antioxid Redox Signal*. 2013 Feb 1;18(4):363-75.

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. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010 Nov;30(11):2234-41.

Sullivan DC, Huminiecki L, Moore JW, Boyle JJ, Poulsom R, Creamer D, Barker J, Bicknell R. EndoPDI, a novel protein-disulfide isomerase-like protein that is preferentially expressed in endothelial cells acts as a stress survival factor. *J Biol Chem*. 2003 Nov 21;278(47):47079-88.

Swiatkowska M, Szymański J, Padula G, Cierniewski CS. Interaction and functional association of protein disulfide isomerase with α V β 3 integrin on endothelial cells. *FEBS J*. 2008 Apr;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. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2004 Aug;44(2):200-8.

Tabet F, Schiffrin EL, Callera GE, He Y, Yao G, Ostman A, Kappert K, Tonks NK, Touyz RM. Redox-sensitive signaling by angiotensin II involves oxidative inactivation and blunted phosphorylation of protein tyrosine phosphatase SHP-2 in vascular smooth muscle cells from SHR. *Circ Res*. 2008 Jul 18;103(2):149-58.

Täger M, Kröning 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-CLL cells. *Exp Hematol*. 1997 Jul;25(7):601-7.

Takac I, Schroder K, Zhang L, Lardy B, Anilkumar N, Lambeth JD, Shah AM, Morel F, Brandes RP. The E-loop is involved in hydrogen peroxide formation by the NADPH oxidase Nox 4. *J Biol Chem*. 2011 Feb 22.

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. *J Biol Chem*. 1995 Sep 1;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 Jan 13;124(1):61-73.

Tian F, Zhou X, Wikström J, Karlsson H, Sjöland H, Gan LM, Borén J, Akyürek LM. Protein disulfide isomerase increases in myocardial endothelial cells in mice exposed to chronic hypoxia: a stimulatory role in angiogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009 Sep;297(3):H1078-86.

Torrecillas G, Boyano-Adánez MC, Medina J, Parra T, Grier M, López-Ongil S, Arilla E, Rodríguez-Puyol M, Rodríguez-Puyol D. The role of hydrogen peroxide in the contractile response to angiotensin II. *Mol Pharmacol*. 2001 Jan;59(1):104-12.

Touyz RM, Briones AM. Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension. *Hypertens Res*. 2011 Jan;34(1):5-14.

Touyz RM, Schiffrin EL. Ang II-stimulated superoxide production is mediated via phospholipase D in human vascular smooth muscle cells. *Hypertension*. 1999 Oct;34(4 Pt 2):976-82.

Touyz RM, Schiffrin EL. Increased generation of superoxide by angiotensin II in smooth muscle cells from resistance arteries of hypertensive patients: role of phospholipase D-dependent NAD(P)H oxidase-sensitive pathways. *J Hypertens*. 2001 Jul;19(7):1245-54.

Touyz RM, Yao G, Schiffrin EL. c-Src induces phosphorylation and translocation of p47phox: role in superoxide generation by angiotensin II in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003 Jun 1;23(6):981-7.

Touyz RM, Montezano AC. Vascular Nox4: a multifarious NADPH oxidase. *Circ Res*. 2012 Apr 27;110(9):1159-61.

Touyz RM. Reactive oxygen species as mediators of calcium signaling by angiotensin II: implications in vascular physiology and pathophysiology. *Antioxid Redox Signal*. 2005 Sep-Oct;7(9-10):1302-14.

Ushio-Fukai M, Griending KK, Becker PL, Hilenski L, Halleran S, Alexander RW. Epidermal growth factor receptor transactivation by angiotensin II requires reactive oxygen species in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001 Apr;21(4):489-95.

Winterbourn CC, Hampton MB. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Radic Biol Med*. 2008 Sep 1;45(5):549-61.

Wu RF, Terada LS. Ras and Nox: Linked signaling networks? *Free Radic Biol Med*. 2009 Nov 1;47(9):1276-81.

Wynne BM, Chiao CW, Webb RC. Vascular Smooth Muscle Cell Signaling Mechanisms for Contraction to Angiotensin II and Endothelin-1. *J Am Soc Hypertens*. 2009 Mar-Apr;3(2):84-95.

APÊNDICE

Publicação: Endo-PDI is required for TNF α -induced angiogenesis.

Original Contribution

Endo-PDI is required for TNF α -induced angiogenesis

Livia de Lucca Camargo^{a,b,1}, Andrea Babelova^{a,1}, Anja Mieth^a, Andreas Weigert^c,
Juliane Mooz^d, Krishnaraj Rajalingam^d, Heinrich Heide^e, Ilka Wittig^e,
Lucia Rossetti Lopes^b, Ralf P. Brandes^{a,*}

^a Institut für Kardiovaskuläre Physiologie, Goethe-Universität, 60590 Frankfurt am Main, Germany

^b Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^c Institute for Biochemistry I, Goethe-Universität, 60590 Frankfurt am Main, Germany

^d Institute for Biochemistry II, Goethe-Universität, 60590 Frankfurt am Main, Germany

^e Functional Proteomics, SFB815 Core Unit, Goethe-Universität, 60590 Frankfurt am Main, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 May 2013

Received in revised form

8 September 2013

Accepted 29 September 2013

Available online 5 October 2013

Keywords:

Thiol

NADPH oxidase

Inflammation

Endothelium

MAP kinases

Free radicals

ABSTRACT

Protein disulfide isomerase (PDI) and its homologs are oxidoreductases facilitating protein folding in the ER. Endo-PDI (also termed Erp46) is highly expressed in endothelial cells. It belongs to the PDI family but its physiological function is largely unknown. We studied the role of Endo-PDI in endothelial angiogenic responses. Stimulation of human umbilical vein endothelial cells (with TNF α (10 ng/ml) increased ERK1/2 phosphorylation. This effect was largely attenuated by Endo-PDI siRNA, whereas JNK and p38 MAP kinase phosphorylation was Endo-PDI independent. Similarly, TNF α -stimulated NF- κ B signaling determined by I κ B α degradation as well as TNF α -induced ICAM expression was unaffected by Endo-PDI siRNA. The action of Endo-PDI was not mediated by extracellular thiol exchange or cell surface PDI as demonstrated by nonpermeative inhibitors and PDI-neutralizing antibody. Moreover, exogenously added PDI failed to restore ERK1/2 activation after Endo-PDI knockdown. This suggests that Endo-PDI acts intracellularly potentially by maintaining the Ras/Raf/MEK/ERK pathway. Indeed, knockdown of Endo-PDI attenuated Ras activation measured by G-LISA and Raf phosphorylation. ERK activation influences gene expression by the transcriptional factor AP-1, which controls MMP-9 and cathepsin B, two proteases required for angiogenesis. TNF α -stimulated MMP-9 and cathepsin B induction was reduced by silencing of Endo-PDI. Accordingly, inhibition of cathepsin B or Endo-PDI siRNA blocked the TNF α -stimulated angiogenic response in the spheroid outgrowth assays. Moreover ex vivo tube formation and in vivo Matrigel angiogenesis in response to TNF α were attenuated by Endo-PDI siRNA. In conclusion, our study establishes Endo-PDI as a novel, important mediator of AP-1-driven gene expression and endothelial angiogenic function.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

Cellular function is critically determined by the correct folding and oxidation of proteins. Protein misfolding limits the availability of correctly functioning proteins, reduces the secretory capacity of the cell, and leads to aggregate formation within the cytosol or the endoplasmic reticulum (ER)². The last process contributes to a variety of diseases including cystic fibrosis, Alzheimer presenile dementia, and Kreutzfeld-Jacob disease [1]. In the ER, the site of maturation of secreted and membrane proteins, the folding

process almost invariably involves the oxidation of cysteine residues to allow the formation of disulfide bridges [2]. Several enzymes are involved in this oxidative protein maturation, such as the flavoprotein endoplasmic reticulum oxidase ERO-1 or peroxiredoxin IV [3]. Disulfide bridge formation during protein maturation in part is a random process and thus does not necessarily lead to correctly folded proteins. Therefore, specialized ER chaperones with disulfide isomerase activity are required to rearrange the disulfide bridges continuously and thus refold the protein until eventually correct folding is achieved [4,5]. This task is handled by protein disulfide isomerases (PDIs), an enzyme family of about 20 members, of which almost all contain cysteine residues in their active site [6]. PDIs are capable of rearranging disulfide bridges as well as oxidizing or reducing cysteines in proteins [5]. These catalytic functions in part require different domains within the PDIs and thus, depending on their architecture, individual PDI homologs differ in their oxidase/isomerase and reductase activity

Abbreviations: ER, endoplasmic reticulum; AP-1, transcription factor activator protein-1; MMP, matrix metalloproteinase; TNF α , tumor necrosis factor α ; ERK1/2, extracellular-regulated kinase; MAP kinase, mitogen-activated protein kinase; MEK, MAP kinase; PDI, protein disulfide isomerase

* Corresponding author. Fax: +49 69 6301 7668.

E-mail addresses: r.brandes@em.uni-frankfurt.de,
brandes@vrc.uni-frankfurt.de (R.P. Brandes).

¹ These authors contributed equally to this work.

[6]. On such a basis, a certain substrate specificity of the PDI homologs was postulated, but still too little is known regarding this aspect [7]. Reconstitution experiments in yeast suggested that tasks of an individual PDI can often also be carried out by another homolog, albeit less efficiently, and specific substrates for the various PDIs are still rare [8]. Similarly, specific PDI inhibitors or even isoform-selective inhibitors have not been developed [6,9].

Stabilization of the tertiary structure by disulfide bridges is particularly frequent for proteins secreted into the extracellular space, i.e., into an oxidizing environment [5]. In fact, PDIs are also externalized and contribute to the modification of the activity of proteins in the extracellular space [6]. This feature, for example, contributes to the activation of proteins during blood clotting [10] but also maintains cell surface receptors in their right conformation to allow receptor-mediated signaling. From this aspect an important function of PDIs in signal transduction could be inferred, which, however, seems not to be restricted just to the extracellular compartment. Although the cytosol is a rather reducing environment and disulfide bridges are less common, PDIs have been associated with intracellular cytosolic signaling [11]. PDIs contain an ER-retention signal [5] and thus it is certainly debatable how they should exit the ER, although other sites of expression have been reported [12].

PDIs in total are highly abundant in all cells, but they are particularly well expressed in secretory active cells such as plasma cells or the insulin-producing β cell of the pancreas [5]. Owing to the generation of autacoids the vascular endothelium also falls into this category and thus expresses high levels of PDI and several PDI homologs. One of these is Endo-PDI [13], also termed ERp46 [8], plasma cell thioredoxin-related protein, or thioredoxin domain-containing protein 5 precursor, which is expressed in several cells such as pancreatic β cells [14] and plasma cells [15], but is most prominent in the vascular endothelium [13]. Because of the high endothelial expression, the protein was first discovered in these cells. It confers resistance to hypoxia-induced apoptosis by facilitating the secretion of endothelial survival factors such as endothelin and adrenomedullin as observed in a microvascular endothelial cell line [13]. In line with the protective function of Endo-PDI in hypoxia, the protein has thioreductase activity [8] and is massively induced by a lack of oxygen [13]. In contrast, little is known regarding its function under normoxic conditions. We hypothesized that Endo-PDI is involved in the signal transduction of endothelial cells during angiogenic processes under normoxia. To address this we studied the effects of small interfering RNA (siRNA) against Endo-PDI in the proangiogenic signaling of tumor necrosis factor- α (TNF α) in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) in culture and on the angiogenic response in mice.

Material and methods

Materials

Human fibronectin and type I collagen were purchased from BD Biosciences (Heidelberg, Germany); DAPI, chloroquine, and recombinant PDI were from Sigma-Aldrich (München, Germany); MG132 was from Merck (Darmstadt, Germany); leupeptin, pepstatin, and phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) were from Applichem (Darmstadt, Germany); thrombin was from Affymetrix (Santa Clara, CA, USA); TNF α , interleukin 1 β (IL-1 β), fibroblast growth factor (FGF), and epidermal growth factor (EGF) were all from PeproTech (Hamburg, Germany); TNF α receptor 1 (TNFR1) agonistic antibody and TNFR1 and TNF α receptor 2 (TNFR2) antagonistic antibodies were all from R&D Systems; TNFR2 agonistic antibody was from Abcam; and PD98059 and U0126 were both from Promega (Mannheim, Germany).

Cell culture

HUVECs were purchased from Lonza (Walkersville, MD, USA). Cells were cultured in EBM (Lonza) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), bovine brain supplement, and human recombinant EGF; penicillin (50 U/ml); and streptomycin (50 μ g/ml). First- to third-passage endothelial cells were used throughout. For experiments cells were kept in EBM containing 1% FCS overnight before stimulation.

SiRNA and plasmid transfection

For siRNA treatment, endothelial cells (80–90% confluent) were transfected with siRNA using GeneTrans II according to the instructions provided by MoBiTec (Göttingen, Germany). Two different PDI and Endo-PDI siRNAs were used for the experiments together with negative control scrambled siRNA (Invitrogen, Darmstadt, Germany). Plasmid overexpression was achieved with the Neon electroporation system (Invitrogen).

Quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted with the RNA Mini Kit (Bio&Sell). cDNA was prepared with SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen) and random hexamer primers. Semiquantitative real-time PCR was performed with Fast Plus EvaGreen Master Mix and ROX as reference dye (Biotium) in an Mx4000 cyclor (Stratagene) with primer sequences as follows: VCAM forward primer, 5'-TGTCATCATCTCTGTACATGTGG-3', and reverse primer, 5'-GTTTCTCTTCCTTGAACATCAAG-3'; ICAM forward primer, 5'-CAGTGGGCAAGAACCTTACCCTAC-3', and reverse primer, 5'-GTTTCAGTGCAGCACGAGAAATTGG-3'; matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) forward primer, 5'-TGAGTGGCTCTCCCTTCACITTCCT-3', and reverse primer, 5'-GGAATGATCTAAGCCACCG-3'; and cathepsin B forward primer, 5'-TGGTTTCTGCTGGCTCTATG-3', and reverse primer, 5'-CCGTAGTGCTGTCTGTTT-3'. Relative expression of target genes was normalized to polymerase (RNA) II (DNA-directed) polypeptide A (POLR2A) with the primer pair 5'-GCACCACGTCATGACAT-3' and 5'-GTGCGGCTGCTCCATAA-3', analyzed by the $\Delta\Delta C_T$ method, and is given as a ratio compared to control experiments.

Ras GTPase activity assay

Active Ras was measured using the G-LISA Ras Activation Assay Biochem kit (colorimetric assay; Cytoskeleton, Denver, CO, USA) as instructed by the manufacturer. The signal was measured at 490 nm with a microplate reader (MRX; Dynatech Laboratories, Chantilly, VA, USA). Results are expressed as fold increase in activity of stimulated in relation to unstimulated controls.

Thioredoxin reductase activity

The thioredoxin reductase activity was determined using a thioredoxin reductase assay kit (BioVision Research Products, Mountain View, CA, USA) according to the manufacturer's recommendations. Results are shown as a percentage of the thioredoxin reductase activity in the sample, compared to control set to 100%.

NADPH oxidase activity

NADPH oxidase activity was measured by NADPH-stimulated lucigenin-enhanced chemiluminescence. Cell homogenates of cell prestimulated with or without TNF α (1 h) were centrifuged (1000 g, 4 °C, 10 min), the protein concentration was determined by Bradford assay, and 10 μ g of supernatant was used for the assay.

Lucigenin (Sigma–Aldrich) was added to a final concentration of 10 μ M. NADPH (100 μ M) was added and chemiluminescence was recorded in 500 μ l Hepes-modified Tyrode's solution in a Berthold Biolumat LB9505.

Activator protein-1 (AP-1) reporter gene assay

AP-1 activity was determined by an AP-1-luciferase enzyme reporter vector for transcriptional activity. Cells were treated with siRNA against Endo-PDI or PDI or scrambled control. Then, the cells (7×10^5) with 7 μ g pAP-1-Luc vector (Stratagene) were electroporated with the Neon system (Life Technologies). After 4 h stimulation with or without TNF α cells were lysed and measurements of reporter luciferase activity were made in a Berthold LB9505 chemiluminescence reader using a luciferase assay substrate kit (Promega). Results were normalized to protein content and are expressed as a percentage of luciferase activity.

Western blotting

Cells were lysed in buffer containing 50 mmol/L Tris–HCl, pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L NaPP_i, 20 mmol/L NaF, 1% Triton X-100, 2 mmol/L orthovanadate, 10 nmol/L okadaic acid, 40 mg/L PMSF, supplemented with protease inhibitor mix (antipain, aprotinin, leupeptin, chymostatin, pepstatin, trypsin inhibitor; 2 mg/ml each; all from AppliChem). After determination of protein concentration by Bradford assay equal amounts of proteins were boiled in Laemmli buffer and separated on a 10% acrylamide SDS–PAGE gel. After transfer of proteins onto nitrocellulose membranes the following primary antibodies were used: anti-PDI (Dianova); anti-Endo-PDI (Erp46), VCAM, and ICAM (all from Santa Cruz Biotechnology); cathepsin B (Calbiochem); P-ERK, ERK, P-p38, p38, P-AKT, AKT, P-JNK, JNK, P-c-Raf (Ser338), and I κ B α (all from Cell Signaling). Secondary fluorescence-coupled antibodies CF770 goat anti-rabbit IgG (Biotium) and Alexa Fluor 680 donkey anti-mouse IgG (Invitrogen) were visualized by a LICOR infrared laser scanner. Densitometry was done with the Odyssey package and results were normalized to total nonphosphorylated protein content and data are given as the mean $\pm$ SEM.

In vitro angiogenesis assays

Assays were performed as described [16] with minor modifications.

Tube formation

For the Matrigel assay, HUVECs were transfected with scrambled siRNA or PDI or Endo-PDI siRNA and seeded onto Matrigel (1×10^4 cells/cm²) 72 h after transfection and stimulated with TNF α (10 ng/ml). Tube formation was assessed after 24 h.

Endothelial cell spheroids

HUVECs transfected with scrambled siRNA or PDI, Endo-PDI, or cathepsin B siRNA for 48 h were used to generate spheroids containing 400 cells as described [6]. For the cathepsin inhibitors study, HUVECs were treated with CA0745ME (10 μ M) and used to generate spheroids. After stimulation with TNF α (50 ng/ml), TNFR1 and TNFR2 agonists (both 10 μ g/ml), or TNFR1 and TNFR2 antagonists (both 50 μ g/ml) for 4 h, or being left alone, angiogenic sprouting was quantified by measuring mean tube number and mean tube length by computer-assisted microscope. At least four spheroids per data point and experiment were analyzed.

In vivo Matrigel plug recruitment assay

The assay was modified from a version described in [17]. Matrigel (growth factor-reduced basement membrane matrix; BD Biosciences) was mixed with 10 IU/ml heparin–sodium (Ratio-pharm) and 80 ng/ml murine recombinant TNF α (PeproTech) together with siRNA (2 μ M; Invitrogen) against murine Endo-PDI or a scrambled control siRNA (Negative Control Medium GC Duplex; Invitrogen). Eight-week-old male C57BL/6J mice were anesthetized with intraperitoneal injection of 4% chloral hydrate, and 500 μ l Matrigel was implanted subcutaneously into the left and right flanks at the lower part of the back. After 14 days, the

Fig. 1. Role of PDI and Endo-PDI in TNF α -induced ERK1/2 activation in HUVECs. Western blots for (A) Endo-PDI and (B) PDI proteins produced by various cell lines. (C) Western blots for P-ERK, ERK, PDI, and Endo-PDI after siPDI or siEndo-PDI treatment and 15 min stimulation with TNF α (10 ng/ml) in HUVECs. Numbers on the left of the blots indicate the size of the molecular weight standards.

plugs were explanted, washed in phosphate-buffered saline (PBS), and cut into halves. One half was weighed, directly digested by dispase II and collagenase II for 1 h at 37 °C, and filtered through a 70- μ m cell strainer. Cells were collected by 800 g centrifugation for 10 min at 4 °C, washed twice with PBS containing 0.5% bovine serum albumin (BSA) and 2 mM EDTA, and resuspended in 100 μ l PBS containing 2% BSA. Non-antigen-specific binding was blocked by addition of rat anti-mouse Fc Block (BD Biosciences) and 15 min incubation at 4 °C. Cells were stained with PE-Cy7-coupled anti-mouse CD31 (eBiosciences), mixed with Flow-Count fluorospheres (Beckman Coulter), and analyzed by flow cytometry using the FACSARIA III and FACSDiva. The amount of infiltrated cells per milligram of Matrigel was calculated based on the number of Flow-Count fluorospheres per microliter of cell suspension. The other half of the explanted Matrigel was directly embedded in Tissue Tek (Sakura) and deep-frozen on dry ice. Cryosections were stained with anti-VE cadherin (Santa Cruz Biotechnology) antibody. After incubation with fluorescent secondary antibody (Alexa Fluor 647) counterstaining was done with DAPI. Images were acquired by confocal microscopy (LSM 510; Zeiss).

Statistics

Data are expressed as the mean $\pm$ SEM. Statistical analyses were performed using Student's *t* test or one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test, where appropriate. Values of *P* < 0.05 were considered statistically significant.

Results

ERK1/2 signaling requires Endo-PDI

Comparison of epithelial cell lines, a smooth muscle cell line, and HUVECs indicated that a significant expression of Endo-PDI was detectable only in HUVECs, whereas PDI was present to similar extents in all cell types (Fig. 1A and B). To study the functional relevance of Endo-PDI we tested two different specific siRNAs against this gene and compared them to the effects of PDI siRNA. Knockdown of Endo-PDI and PDI resulted in a pronounced attenuation of the protein abundance of the target gene without

Fig. 2. Characterization of the effect of siRNA against PDI and Endo-PDI on TNF α -induced signaling. Western blots for P-p38, p38, I κ B α , P-JNK, JNK, P-AKT, and AKT in (A) siPDI- or (B) siEndo-PDI-treated HUVECs stimulated with TNF α (10 ng/ml) for 15 min. (C) Western blots for VCAM and ICAM in HUVECs treated with siPDI or siEndo-PDI and stimulated with TNF α for 24 h. (D) RT-PCR analysis of VCAM and ICAM expression in the HUVECs after 12 h of TNF α stimulation. **P* < 0.05 vs scrambled siRNA-treated control (*n* $\geq$ 3); #*P* < 0.05 vs TNF α -stimulated scrambled siRNA-treated control (*n* $\geq$ 3) \$*P* < 0.001 vs. TNF α stimulated siPDI treated sample; *n* $\geq$ 3.

affecting that of the respective other gene (Fig. 1C). The siRNA was subsequently used to determine the role of Endo-PDI and PDI in the response of HUVECs to TNF α . Interestingly, TNF α -induced ERK phosphorylation was blocked by siRNA against Endo-PDI or PDI (Fig. 1C), whereas only a minor effect of the siRNAs on TNF α -stimulated p38 MAP kinase phosphorylation or I κ B α degradation was observed (Fig. 2A and B). To demonstrate the consequences of this on gene expression, we focused on VCAM and ICAM. TNF α massively induced the expression of the two adhesion molecules on the protein and mRNA levels (Fig. 2C and D). SiRNA against PDI or Endo-PDI had no inhibitory effect on TNF α -induced ICAM-1 expression but attenuated VCAM induction. Importantly, ERK1/2 is considered upstream of VCAM but not ICAM, whereas both genes are NF- κ B dependent. Thus, Endo-PDI and PDI limit TNF α -induced signaling via ERK1/2 but not NF- κ B.

Although TNF α increases ERK1/2 phosphorylation in endothelial cells, it is not primarily considered a growth factor but rather an inflammatory cytokine. Therefore, it was determined whether the selective attenuation of ERK1/2 stimulation by siRNA against Endo-PDI is specific for TNF α or also occurs in response to other stimuli. Interestingly, downregulation of Endo-PDI or PDI expression largely attenuated responses to thrombin and interleukin 1 β , without, however, having a selective effect on ERK activation. FGF signaling was PDI independent, and EGF-dependent signaling was also only slightly affected (Fig. 3). Thus, of the stimuli tested, the selective attenuation of ERK signaling was restricted to TNF α .

TNF α -induced ERK activation does not involve extracellular Endo-PDI

PDI expression is particularly high in the endoplasmic reticulum and from there a physiologically significant fraction of the enzyme pools is externalized to the cell surface or the extracellular space. We therefore tested whether TNF α -induced ERK activation

requires extracellular PDIs. Recombinant PDI administered to the culture medium, however, failed to restore TNF α -induced ERK phosphorylation in cells treated with either siEndo-PDI or siPDI (Fig. 4A and B). Moreover, inhibition of extracellular PDIs by the competitive inhibitor scrambled RNase or by a previously established neutralizing anti-PDI antibody had no effect on TNF α -induced ERK activation (Fig. 4C). These findings indicate that Endo-PDI and PDI in TNF α signaling of HUVECs act within the cell in a compartment not accessible by extracellular enzyme or inhibitors.

Endo-PDI is required for TNF α -induced Ras activation

So far, the present observations suggest that Endo-PDI acts on the intracellular signaling of TNF α in a pathway not involving NF- κ B or p38-MAP kinase activation. Given that knockdown of Endo-PDI limited TNF α -induced ERK phosphorylation, we studied the Ras-Raf pathway, which via MEK leads to ERK phosphorylation. c-Raf phosphorylation paralleled TNF α -induced ERK phosphorylation (Fig. 4D), and importantly, knockdown of either Endo-PDI or PDI prevented TNF α -induced c-Raf phosphorylation (Fig. 4E). As this indicates that the effect of Endo-PDI occurs upstream of c-Raf, we determined Ras activity by G-LISA. The activation of Ras in response to TNF α occurred transiently and peaked 15 min after stimulation (data not shown). SiRNA for either PDI or Endo-PDI completely prevented Ras activation (Fig. 4F), demonstrating that either Ras itself or the guanine nucleotide exchange factors between the TNF receptor and Ras require Endo-PDI. To provide evidence for a potential redox-dependent control of Ras by the PDIs, two parameters having an impact on the cellular redox state were measured: thioredoxin reductase activity and NADPH oxidase activity. In line with Endo-PDI and PDI containing thioredoxin-like domains, thioredoxin reductase activity was significantly lower after treatment with siRNA

Fig. 3. Effects of PDI and Endo-PDI siRNA on thrombin-, EGF-, IL-1 β -, and FGF-2-induced signaling. Western blots for P-ERK, ERK, P-p38, p38, P-AKT, and AKT in HUVECs treated with a set of two different siRNAs against PDI or Endo-PDI and stimulated (A) with EGF (3 ng/ml) or thrombin (1 U/ml) or (B) with IL-1 β (5 ng/ml) or FGF-2 (30 ng/ml) for 15 min.

Fig. 4. Determination of the site of action of Endo-PDI in TNF α signaling. (A–C) Role of exogenous PDI on TNF α -induced stimulation of ERK1/2. Western blots for P-ERK and ERK in HUVECs preincubated with or without exogenous PDI (500 nM) for 10 min, stimulated with TNF α (10 ng/ml) for 15 min, and treated with a set of two different siRNAs against (A) PDI or (B) Endo-PDI. (C) Western blot for P-ERK and ERK in HUVECs preincubated with anti-PDI antibody (1:100, 1:500) or scrambled RNase (100 μ g/ml) for 30 min and subsequently stimulated with TNF α for 15 min. (D–F) Effect on Ras-mediated signaling. (D and E) Western blots for P-c-Raf_{Ser338}, P-ERK, and ERK in HUVECs stimulated with TNF α (10 ng/ml) for the indicated time points and treated with or without siRNA against PDI and Endo-PDI. (F) Effect of siRNA against PDI and Endo-PDI on TNF α -stimulation Ras activation. * $P < 0.05$ vs unstimulated scrambled siRNA-treated control; # $P < 0.05$ vs TNF α -stimulated scrambled siRNA-treated control ($n \geq 3$).

against Endo-PDI or PDI (Fig. 5A). PDI also has been shown to control NADPH oxidase activity [18], and in line with this, TNF α increased Nox activity and this effect was blocked by siRNA against Endo-PDI or PDI (Fig. 5B).

Endo-PDI is required for TNF α -mediated induction of proangiogenic proteases

ERK1/2-mediated growth and angiogenic signaling involves activating the transcription factor AP-1. Indeed, TNF α increased activity of AP-1 and this was decreased upon siEndo-PDI treatment (Fig. 5C). The expression of several proangiogenic proteases such as cathepsin B and MMP-9 is AP-1 driven and indeed the TNF α -induced increase in MMP-9 was blocked by the ERK1/2 kinase inhibitors PD98059 and U0126 (Fig. 5D). In keeping with our previous findings that TNF α -induced ERK1/2 activation requires Endo-PDI as well as PDI, siRNA against either of the two prevented the TNF α -mediated induction of MMP-9 (Fig. 5E) and cathepsin B mRNA (Fig. 5F). As HUVECs express little MMP-9 protein we focused our further analysis on cathepsin B. Similar to what was observed for mRNA expression, the TNF α -mediated induction of

active cathepsin B protein was also lost after knockdown of Endo-PDI or PDI (Fig. 5G).

Endo-PDI is involved in the TNF α -induced endothelial angiogenic response

To address the functional relevance of our findings we performed assays to determine the angiogenic capacity of endothelial cells. In the spheroid outgrowth assay, TNF α stimulated outgrowth from spheroids in a dose-dependent manner (Supplementary Fig. S1). Experiments with agonistic and antagonistic antibodies revealed that this response was predominantly mediated by TNF α receptor 1, whereas TNF α receptor 2 was of minor relevance (Supplementary Fig. S1). Pharmacological inhibition of cathepsin B as well as cathepsin B siRNA prevented the TNF α -induced outgrowth from spheroids. SiRNA against Endo-PDI as well as PDI had a similar inhibitory effect (Fig. 6A and B). As a second angiogenic assay, tube formation on Matrigel was studied, with similar results. Both the siRNA against Endo-PDI and that against PDI greatly attenuated tube formation (Fig. 6C). Thus, Endo-PDI

Fig. 5. Role of Endo-PDI in TNF α -stimulated ROS and protease induction. (A) Thioredoxin reductase activity (%TRX red.) assay in HUVECs with or without siEndo-PDI (Endo) and siPDI (PDI) is shown relative to the activity in scrambled siRNA-transfected cells (scb). * $P < 0.05$ vs control ($n = 4-6$). (B) Lucigenin assay in HUVECs treated with or without siEndo-PDI or siPDI and stimulated with TNF α for 15 min. * $P < 0.05$ vs scrambled control ($n = 2$ or 3). (C) AP-1 activity assay in HUVECs with or without siEndo-PDI or siPDI and stimulated with TNF α for 4 h. * $P < 0.05$ vs scrambled control; # $P < 0.05$ vs TNF α -stimulated scrambled control ($n = 3$). (D and E) RT-PCR analysis of MMP-9 expression in HUVECs after 4 h of TNF α stimulation with and without co-incubation with (E) the MAP kinase inhibitors PD98059 (50 μ mol/L) or U0126 (10 μ mol/L) or (D) scrambled siRNA (scb) or siRNA against PDI or Endo-PDI. * $P < 0.05$ vs unstimulated scrambled siRNA-treated control ($n \geq 3$); # $P < 0.05$ vs TNF α -stimulated scrambled siRNA-treated control ($n = 3$). (F and G) (F) RT-PCR and (G) Western blot analysis for cathepsin B expression in the HUVECs treated with or without siRNAs against PDI or Endo-PDI and TNF α (12 h mRNA and 24 h protein). * $P < 0.05$ vs unstimulated scrambled siRNA-treated control ($n \geq 3$); # $P < 0.05$ vs TNF α -stimulated scrambled siRNA-treated control.

and PDI are required for the angiogenic response of endothelial cells to TNF α .

Angiogenesis in vivo is a complex process, which is incompletely mimicked in cell culture assays. Unfortunately, knockout mice for Endo-PDI have not been generated yet and specific Endo-PDI inhibitors are not reported. In the absence of better alternatives, siRNA in the Matrigel plaque assay is an option to determine the contribution of a protein to angiogenesis in vivo. siRNA against murine Endo-PDI was generated, which effectively downregulated the protein in cultured murine cells by more than 90%. TNF α and either Endo-PDI or scrambled control siRNA was added to Matrigel, which was subsequently injected subcutaneously into mice. When capillarization was measured after 14 days, a significant reduction in Matrigel angiogenesis as determined by histology (Fig. 6D) and FACS counting (Fig. 6E) in the Matrigels containing Endo-PDI was observed. These findings suggest that in vivo angiogenesis also requires Endo-PDI.

Discussion

In this study we identified a novel function of Endo-PDI in the angiogenic function of endothelial cells. We demonstrate that proinflammatory TNF α signaling via NF- κ B was largely Endo-PDI-independent, whereas growth-associated signaling via Ras requires the enzyme. The action of Endo-PDI did not involve the extracellular or cell surface compartment and was required for the proangiogenic function of endothelial cells. Endo-PDI controlled TNF α -induced cathepsin B expression, which was required for endothelial sprouting from spheroids and tube formation in culture as well as Matrigel angiogenesis in vivo.

Although highly abundant in endothelial cells, little is known concerning the function of Endo-PDI in the vasculature, and thus, this study largely focused on this enzyme. In all experiments, downregulation of Endo-PDI and PDI, however, had very similar effects although the siRNA used was demonstrated to act

Fig. 6. Contribution of Endo-PDI to TNF α -induced angiogenic response. (A) Exemplary photographs and (B) statistics of spheroid outgrowth assay of HUVECs stimulated with TNF α (50 ng/ml) for 4 h and treated with siPDI, siEndo-PDI, siCTSB (siRNA against cathepsin B), or CA074ME (cathepsin B inhibitor). * $P < 0.05$ vs unstimulated scrambled siRNA-treated control ($n = 8-10$); # $P < 0.05$ vs TNF α -stimulated scrambled siRNA-treated control ($n = 4-10$). (C) Tube formation assay of HUVECs stimulated with TNF α (50 ng/ml) for 24 h and treated with siPDI or siEndo-PDI. (D and E) In vivo Matrigel plug assay 2 weeks after implantation. (D) VE-cadherin staining of Matrigel plugs and (E) FACS analysis for CD31-positive cells recruited into Matrigel plugs containing TNF α with either scrambled or siEndo-PDI siRNA. $n = 6$, * $P < 0.05$.

specifically. The uniform response to the downregulation of any of the two isomerases was very unexpected as the enzymes greatly differ in structure [6] and as individual substrate preferences have been demonstrated for proteins of the PDI family [14]. Also, differences with respect to their catalytic activity have been reported: Endo-PDI is a better thiol reductase than PDI, whereas PDI has higher isomerase activity [19]. It can therefore only be

speculated why functionally the two proteins were so equally important. Despite the considerations mentioned above, the substrates of PDI and Endo-PDI overlap significantly [14]. It may therefore be that some reductase or isomerase threshold activity has to be reached to maintain activity of the pathway. Although PDI is highly abundant and makes up to 1% of the total cellular protein [6], it is possible that at the signaling sites relevant here,

little PDI is present. This is well illustrated by the fact that specifically the Ras/ERK pathway was a target of downregulation of the two proteins, whereas very different responses were reported for other signaling pathways. For example, it was previously noted that high thiol reductase activity limits, rather than facilitates, NF- κ B signaling in response to inflammatory signaling in cultured cells as well as in vivo [20–22]. These publications are in line with our present observation that TNF α -induced NF- κ B activation was not affected by downregulation of Endo-PDI or PDI.

Another alternative for the selective effect of PDI and Endo-PDI downregulation on the Ras/Raf/MAP kinase pathway is based on the high redox sensitivity of some of the molecules involved in this signaling cascade. Ras is redox-sensitive and nitrosation and glutathionylation of Ras^{C118} have been linked to increased Ras activation [23,24]. If PDIs would act on this particular modification, it would reduce Ras^{C118}, which should limit Ras activation. Obviously, this model is incompatible with the present observations. Very recently, it was, however, suggested that not glutathionylated Ras but rather the Ras^{C118}-thiyl radical intermediate is the Ras species with increased activity, whereas the subsequently formed glutathionylated Ras had an activity identical to the native protein [25]. In such a model, PDIs could help to restore native Ras and re-allow the formation of the radical intermediate. Lowering the PDI abundance would lead to an accumulation of the modified Ras, which could then no longer be reduced and thus not be activated anymore. Although this concept is compatible with the present observations, it is speculative, as we could not enrich native Ras to sufficient levels to perform the required mass-spectrometry analysis to address this question. It therefore has to be acknowledged that it is a major shortcoming of the present study that we could not map the site of interaction between Ras and PDI family members.

Following the concept of redox-mediated Ras activation, it should be considered also that the activity of NADPH oxidases of the Nox family heavily depends on PDIs [11,18,26,27], an observation also confirmed in this study. As these proteins are the most important source of signaling ROS in cells [28], lowering NADPH oxidase activity by downregulation of PDIs should reduce ROS-mediated signaling. Indeed, TNF α strongly activates Nox enzymes in endothelial cells [29] and downregulation of Nox subunits limits TNF α signaling [30]. As Nox proteins are also involved in activation of the Ras pathway [31] this pathway may also contribute to the effects observed in this study. Furthermore, PDI was reported, in PDGF-exposed vascular smooth muscle cells, to be required for activation of RhoGTPases [32], which are known to mediate the close interplay between Nox NADPH oxidases and Ras signaling [33]. Finally, involvement of Nox could also address the localization of Endo-PDI signaling in the cells. Redox-mediated TNF α signaling in vascular cells occurs in the endosomal compartment, a site of potential PDI expression where Nox signaling also takes place [34–36]. Endosomes are probably not affected by our attempts to alter extracellular PDI activity and, indeed, changing extracellular PDI activity had no influence on the TNF α -stimulated readouts used in this study. These findings were nevertheless at variance with the reported role of extracellular PDI for TNF α signaling that was previously noted in lymphocytes [37]. Moreover, endothelial cells secrete substantial amounts of PDI, which is physiologically important for thrombus formation [10]. Interestingly, Endo-PDI has also been detected in the ER and the extracellular space [38], suggesting that it may also contribute to extracellular signaling. Despite this, a role for PDI in intracellular signaling was also reported. With the aid of phosphate-binding columns and 2D-DIGE followed by MALDI-TOF, a transient alteration in PDI recovery from fibroblasts stimulated with TNF α was previously observed [39], and similar results were obtained with

respect to PDI abundance and phosphorylation in a liver cell line in response to TNF α stimulation [40]. These data suggest that intracellular PDI is subject to acute regulation in TNF α signaling and that the enzyme interacts with proteins of this signaling cascade.

Although we could demonstrate that Endo-PDI as well as PDI is very much involved upstream of TNF α signaling, we could not further narrow our analysis to individual docking sites of the receptors or the signaling intermediates such as Gab-2 or Sos because of limitations of the cell system used. Obviously, these adaptor proteins, in addition to Ras, are potential targets of PDIs. Endo-PDI expression is high in endothelial cells, which are, however, also difficult to transfect. In contrast, cell lines, such as HEK293 or Cos, express very little Endo-PDI and thus cannot be used to study the function of this protein. When we transfected endothelial cells with plasmids a loss in their TNF α response frequently occurred. This problem greatly complicated and limited the mechanistic analysis of the pathways upstream of ERK1/2 in this study. Our study was therefore substantially limited in the in-depth analysis of the Endo-PDI interaction partners. We also could not enrich sufficient proteins to determine potential changes in the thiol state in response to Endo-PDI and thus could not specifically identify Endo-PDI-interacting proteins. Obviously, these may be manifold, and preliminary experiments suggest that constitutively active c-Raf in part restored ERK1/2 activation after PDI siRNA but not after Endo-PDI siRNA, suggesting that Endo-PDI has multiple substrates in the ERK1/2 pathway (A. Babelova, unpublished observation).

Conclusion

In this study, we identified a novel function for Endo-PDI. Endo-PDI seems to be equally as important as PDI in endothelial cells and is required for TNF α -induced Ras activation. Through this pathway, Endo-PDI governs AP-1-dependent gene expression and facilitates endothelial cell angiogenic responses to this cytokine.

Acknowledgments

We are grateful for the excellent technical assistance of Cindy Höper, Katalin Wandzioch, and Susanne Schütz. The authors thank Professor Francisco R. Laurindo, School of Medicine, University of São Paulo, for helpful suggestions and critical input during the preparation of the manuscript. The study was supported by the Goethe University Frankfurt as well as the DFG Excellence Cluster “Cardiopulmonary System–ECCPS” (R.P.B.) and the SFB815 (TP A1&Z1) and SFB 834 (TP A2). L.L.C. is the recipient of a fellowship from the CAPES Foundation (Proc. 6806-10-4). L.R.L. is supported by the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo 2013/03520-5 and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.09.028>.

References

- [1] Ong, D. S.; Kelly, J. W. Chemical and/or biological therapeutic strategies to ameliorate protein misfolding diseases. *Curr. Opin. Cell Biol.* **23**:231–238; 2011.
- [2] Narayan, M. Disulfide bonds: protein folding and subcellular protein trafficking. *FEBS J.* **279**:2272–2282; 2012.

- [3] Tavender, T. J.; Springate, J. J.; Bulleid, N. J. Recycling of peroxiredoxin IV provides a novel pathway for disulphide formation in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* **29**:4185–4197; 2010.
- [4] Appenzeller-Herzog, C.; Ellgaard, L. The human PDI family: versatility packed into a single fold. *Biochim. Biophys. Acta* **1783**:535–548; 2008.
- [5] Wilkinson, B.; Gilbert, H. F. Protein disulfide isomerase. *Biochim. Biophys. Acta* **1699**:35–44; 2004.
- [6] Hatahet, F.; Ruddock, L. W. Protein disulfide isomerase: a critical evaluation of its function in disulfide bond formation. *Antioxid. Redox Signaling* **11**:2807–2850; 2009.
- [7] Jessop, C. E.; Watkins, R. H.; Simmons, J. J.; Tasab, M.; Bulleid, N. J. Protein disulphide isomerase family members show distinct substrate specificity: P5 is targeted to BiP client proteins. *J. Cell Sci.* **122**:4287–4295; 2009.
- [8] Knoblauch, B.; Keller, B. O.; Groenendyk, J.; Aldred, S.; Zheng, J.; Lemire, B. D.; Li, L.; Michalak, M. ERp19 and ERp46, new members of the thioredoxin family of endoplasmic reticulum proteins. *Mol. Cell Proteomics* **2**:1104–1119; 2003.
- [9] Hatahet, F.; Ruddock, L. W. Modulating proteostasis: peptidomimetic inhibitors and activators of protein folding. *Curr. Pharm. Des.* **15**:2488–2507; 2009.
- [10] Jasuja, R.; Furie, B.; Furie, B. C. Endothelium-derived but not platelet-derived protein disulfide isomerase is required for thrombus formation in vivo. *Blood* **116**:4665–4674; 2010.
- [11] Laurindo, F. R.; Pescatore, L. A.; Fernandes, D. C. Protein disulfide isomerase in redox cell signaling and homeostasis. *Free Radic. Biol. Med.* **52**:1954–1969; 2012.
- [12] Turano, C.; Coppari, S.; Altieri, F.; Ferraro, A. Proteins of the PDI family: unpredicted non-ER locations and functions. *J. Cell. Physiol.* **193**:154–163; 2002.
- [13] Sullivan, D. C.; Huminiecki, L.; Moore, J. W.; Boyle, J. J.; Poulsom, R.; Creamer, D.; Barker, J.; Bicknell, R. EndoPDI, a novel protein-disulfide isomerase-like protein that is preferentially expressed in endothelial cells acts as a stress survival factor. *J. Biol. Chem.* **278**:47079–47088; 2003.
- [14] Alberti, A.; Karamessinis, P.; Peroulis, M.; Kypreou, K.; Kavvadas, P.; Pagakis, S.; Politis, P. K.; Charonis, A. ERp46 is reduced by high glucose and regulates insulin content in pancreatic beta-cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **297**:E812–E821; 2009.
- [15] Wrammert, J.; Kallberg, E.; Leanderson, T. Identification of a novel thioredoxin-related protein, PC-TRP, which is preferentially expressed in plasma cells. *Eur. J. Immunol.* **34**:137–146; 2004.
- [16] Michaelis, U. R.; Chavakis, E.; Kruse, C.; Jungblut, B.; Kaluza, D.; Wandzioch, K.; Manavski, Y.; Heide, H.; Santoni, M. J.; Potente, M.; Eble, J. A.; Borg, J. P.; Brandes, R. P. The polarity protein scrib is essential for directed endothelial cell migration. *Circ. Res.* **112**:924–934; 2013.
- [17] Webler, A. C.; Michaelis, U. R.; Popp, R.; Barbosa-Sicard, E.; Murugan, A.; Falck, J. R.; Fisslthaler, B.; Fleming, I. Epoxyeicosatrienoic acids are part of the VEGF-activated signaling cascade leading to angiogenesis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **295**:C1292–C1301; 2008.
- [18] Janiszewski, M.; Lopes, L. R.; Carmo, A. O.; Pedro, M. A.; Brandes, R. P.; Santos, C. X.; Laurindo, F. R. Regulation of NAD(P)H oxidase by associated protein disulfide isomerase in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **280**:40813–40819; 2005.
- [19] Funkner, A.; Parthier, C.; Schutkowski, M.; Zerweck, J.; Lilie, H.; Gyrych, N.; Fischer, G.; Stubbs, M. T.; Ferrari, D. M. Peptide binding by catalytic domains of the protein disulfide isomerase-related protein ERp46. *J. Mol. Biol.* **425**:1340–1362; 2013.
- [20] Jeong, W.; Jung, Y.; Kim, H.; Park, S. J.; Rhee, S. G. Thioredoxin-related protein 14, a new member of the thioredoxin family with disulfide reductase activity: implication in the redox regulation of TNF- α signaling. *Free Radic. Biol. Med.* **47**:1294–1303; 2009.
- [21] Higuchi, T.; Watanabe, Y.; Waga, I. Protein disulfide isomerase suppresses the transcriptional activity of NF- κ B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **318**:46–52; 2004.
- [22] Zhou, M.; Jacob, A.; Ho, N.; Miksa, M.; Wu, R.; Maitra, S. R.; Wang, P. Downregulation of protein disulfide isomerase in sepsis and its role in tumor necrosis factor- α release. *Crit. Care* **12**:R100; 2008.
- [23] Davis, M. F.; Vigil, D.; Campbell, S. L. Regulation of Ras proteins by reactive nitrogen species. *Free Radic. Biol. Med.* **51**:565–575; 2011.
- [24] Mitchell, L.; Hobbs, G. A.; Aghajanian, A.; Campbell, S. L. Redox regulation of Ras and Rho GTPases: mechanism and function. *Antioxid. Redox Signaling* **18**:250–258; 2013.
- [25] Hobbs, G. A.; Bonini, M. G.; Gunawardena, H. P.; Chen, X.; Campbell, S. L. Glutathiolated Ras: characterization and implications for Ras activation. *Free Radic. Biol. Med.* **57**:221–229; 2013.
- [26] Laurindo, F. R.; Fernandes, D. C.; Amanso, A. M.; Lopes, L. R.; Santos, C. X. Novel role of protein disulfide isomerase in the regulation of NADPH oxidase activity: pathophysiological implications in vascular diseases. *Antioxid. Redox Signaling* **10**:1101–1113; 2008.
- [27] de A. Paes, A. M.; Verissimo-Filho, S.; Guimaraes, L. L.; Silva, A. C.; Takiuti, J. T.; Santos, C. X.; Janiszewski, M.; Laurindo, F. R.; Lopes, L. R. Protein disulfide isomerase redox-dependent association with p47(phox): evidence for an organizer role in leukocyte NADPH oxidase activation. *J. Leukocyte Biol.* **90**:799–810; 2011.
- [28] Brandes, R. P.; Weissmann, N.; Schroder, K. NADPH oxidases in cardiovascular disease. *Free Radic. Biol. Med.* **49**:687–706; 2010.
- [29] Li, J. M.; Fan, L. M.; Christie, M. R.; Shah, A. M. Acute tumor necrosis factor α signaling via NADPH oxidase in microvascular endothelial cells: role of p47phox phosphorylation and binding to TRAF4. *Mol. Cell. Biol.* **25**:2320–2330; 2005.
- [30] Li, J. M.; Mullen, A. M.; Yun, S.; Wientjes, F.; Brouns, G. Y.; Thrasher, A. J.; Shah, A. M. Essential role of the NADPH oxidase subunit p47(phox) in endothelial cell superoxide production in response to phorbol ester and tumor necrosis factor- α . *Circ. Res.* **90**:143–150; 2002.
- [31] Wu, R. F.; Ma, Z.; Liu, Z.; Terada, L. S. Nox4-derived H₂O₂ mediates endoplasmic reticulum signaling through local Ras activation. *Mol. Cell. Biol.* **30**:3553–3568; 2010.
- [32] Pescatore, L. A.; Bonatto, D.; Forti, F. L.; Sadok, A.; Kovacic, H.; Laurindo, F. R. Protein disulfide isomerase is required for platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell migration, Nox1 NADPH oxidase expression, and RhoGTPase activation. *J. Biol. Chem.* **287**:29290–29300; 2012.
- [33] Wu, R. F.; Terada, L. S. Ras and Nox: linked signaling networks? *Free Radic. Biol. Med.* **47**:1276–1281; 2009.
- [34] Miller Jr F. J.; Filali, M.; Huss, G. J.; Stanic, B.; Chamseddine, A.; Barna, T. J.; Lamb, F. S. Cytokine activation of nuclear factor kappa B in vascular smooth muscle cells requires signaling endosomes containing Nox1 and C1C-3. *Circ. Res.* **101**:663–671; 2007.
- [35] Miller Jr F. J.; Chu, X.; Stanic, B.; Tian, X.; Sharma, R. V.; Davisson, R. L.; Lamb, F. S. A differential role for endocytosis in receptor-mediated activation of Nox1. *Antioxid. Redox Signaling* **12**:583–593; 2010.
- [36] Prinz, N.; Clemens, N.; Canisius, A.; Lackner, K. J. Endosomal NADPH-oxidase is critical for induction of the tissue factor gene in monocytes and endothelial cells: lessons from the antiphospholipid syndrome. *Thromb. Haemostasis* **109**:525–531; 2013.
- [37] Soderberg, A.; Hossain, A.; Rosen, A. A protein disulfide isomerase/thioredoxin-1 complex is physically attached to exofacial membrane tumor necrosis factor receptors: overexpression in chronic lymphocytic leukemia cells. *Antioxid. Redox Signaling* **18**:363–375; 2013.
- [38] Charlton, H. K.; Webster, J.; Kruger, S.; Simpson, F.; Richards, A. A.; Whitehead, J. P. ERp46 binds to AdipoR1, but not AdipoR2, and modulates adiponectin signalling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **392**:234–239; 2010.
- [39] Yanagida, M.; Miura, Y.; Yagasaki, K.; Taoka, M.; Isobe, T.; Takahashi, N. Matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry analysis of proteins detected by anti-phosphotyrosine antibody on two-dimensional gels of fibroblast cell lysates after tumor necrosis factor- α stimulation. *Electrophoresis* **21**:1890–1898; 2000.
- [40] Solomon, S. S.; Buss, N.; Shull, J.; Monnier, S.; Majumdar, G.; Wu, J.; Gerling, I. C. Proteome of H-411E (liver) cells exposed to insulin and tumor necrosis factor- α : analysis of proteins involved in insulin resistance. *J. Lab. Clin. Med.* **145**:275–283; 2005.