Renata de Castro Goncalves

A ativação da NADPH oxidase mediada pela
superexpressão da dissulfeto
isomerase proteica em células musculares lisas vasculares

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa de: Clínicas Médicas
Área de Concentração: Processos Inflamatórios e Alérgicos
Orientadora: Dr.^a Denise de Castro Fernandes

SÃO PAULO

2016

Renata de Castro Goncalves

A ativação da NADPH oxidase mediada pela
superexpressão da dissulfeto
isomerase proteica em células musculares lisas vasculares

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa de: Clínicas Médicas
Área de Concentração: Processos Inflamatórios e Alérgicos
Orientadora: Dr.^a Denise de Castro Fernandes

(Versão Corrigida)

SÃO PAULO

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Gonçalves, Renata de Castro

A ativação da NADPH oxidase mediada pela superexpressão da dissulfeto isomerase proteica em células musculares lisas vasculares / Renata de Castro Gonçalves. -- São Paulo, 2016.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Ciência Médicas. Área de Concentração: Processos Inflamatórios e Alérgicos.

Orientadora: Denise de Castro Fernandes.

Descritores: 1.Isomerase de dissulfetos de proteínas 2.NADPH oxidase 3.Miócitos de músculo liso 4.Oxidantes 5.Diferenciação celular 6.Movimento celular 7.Superóxidos 8.Espécies de oxigênio reativas

USP/FM/DBD-353/16

Dedicatória

À minha mãe, que sempre foi meu exemplo de vida, sucesso e determinação e sempre me fez acreditar no meu potencial.

Ao meu pai, que me incentiva a ser grande, sempre.

À minha irmã Marcela que sempre esteve ao meu lado me colocando pra cima em todos os momentos.

À minha família querida que me ajuda a enfrentar todos os desafios que a vida me coloca.

Agradecimentos

À Dra. Denise de Castro Fernandes, minha orientadora, que acreditou muito nesse trabalho, me acolheu e me ensinou a não desistir diante das dificuldades neste percurso, sempre com muita paciência.

Ao professor Dr. Francisco Raphael Martins Laurindo, que com todo o seu conhecimento e experiência, tornou este trabalho possível e muito importante para a ciência.

Ao Dr. João Wosniak Junior, que acompanhou de perto todas as dificuldades e sempre esteve disposto a ajudar.

À Dra. Thais Araújo, que contribuiu com excelentes discussões, ideias.

À Maria Bertoline, que sempre ofereceu muito apoio e toda a sua dedicação ao seu trabalho.

À todos os colegas alunos do Laboratório de Biologia Vascular que sempre contribuíram muito com ricas discussões e ótimas ideias. E por sempre terem muita paciência comigo na bancada.

Aos funcionários do Laboratório de Biologia Vascular do Instituto do Coração, por todo apoio e dedicação ao seu trabalho.

Ao Professor Dr. Bryan Strauss e à Dra Daniela Zanatta, que tornaram a linhagem de células que superexpressam PDIA1 induzíveis por doxíciclina uma realidade.

Aos Professores Heraldo Passolo, a professora Flavia Carla Meotti e a Doutora Mirian Helena Fonseca Alaniz pela rica discussão e orientações propostas durante o exame de qualificação da tese.

À minha eterna chefe, mestre e amiga Cris Carvalho que sempre me fez acreditar que eu era melhor do que eu mesma acreditava.

À minha família que sempre me deu um apoio incondicional. Eles que sempre me incentivaram a nunca deixar de estudar e aprender coisas novas. E claro, por sempre acreditarem no meu potencial.

Este projeto recebeu o apoio financeiro da FAPESP, CNPq, REDOXOMA e CEPID.

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

Sumário

LISTA DE ABREVIACÕES

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO PORTUGUES

RESUMO INGLES

1.0 INTRODUÇÃO.....	13
2.0 OBJETIVOS GERAIS.....	21
3.0 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
4.0 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
5.0 RESULTADOS	32
6.0 DISCUSSÃO	51
7.0 ANEXOS.....	59
8.0 REFERENCIAS	65

Lista de abreviações

ERK^{1/2} – quinase relacionada à sinalização extracelular (*extracellular signal-regulated kinases*)

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

Nox1 – NADPH Oxidase isoforma 1

Nox4 – NADPH Oxidase isoforma 4

Nrf2 - NF-E2-related factor-2

O₂^{•-} - ânion radical superóxido

PCNA – antígeno nuclear de proliferação nuclear (*proliferating cell nuclear antigen*)

PDGF – fator de crescimento derivado de plaquetas (*platelet –derived growth factor*)

PDGFR – receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (*platelet –derived growth factor receptor*)

PDIA1 – dissulfeto isomerase proteica A1 (*protein disulfide isomerase A1*)

Rac1 – (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*)

RE – retículo endoplasmático

RhoA – (*Ras homolog gene family, member A*)

ROS – espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species*)

Src – tirosina quinase proto-oncogênica (*proto-oncogene tyrosine-kinase Src*)

TetON - promotor responsivo à tetraciclina ou derivados

VSMC – célula muscular lisa vascular

VSMC – PDI^{TetON} – célula muscular lisa vascular que superexpressa PDIA1 sob promotor TetON

Lista de tabelas

Tabela 1: NADPH oxidase vascular

Tabela 2: Quantificação de proteína total do homogenato de amostras de VSMC-
PDI^{tetOn} L4:4

Tabela 3: Marcação por imunofluorescência para AT1R-GFP e PDI

Lista de figuras

Figura 1: Modelo de estrutura das Noxes nas suas diferentes isoformas, e seus principais elementos regulatórios.	17
Figura 2: Modelo proposto do controle de migração de VSMC por Poldip2.....	18
Figura 3: Efeito do silenciamento da PDI na expressão da NADPH oxidase.....	19
Figura 4: Estrutura tridimensional da Dissulfeto Isomerase proteica com representação dos seus sítios ativos. Ao lado, quadro de resumo das principais funções exercidas pela PDI.	20
Figura 5: Modelo crônico de superexpressão de PDI.....	33
Figura 6: Linhagens VSMC-PDI ^{TetON} obtidas após infecção viral.....	34
Figura 7: Expressão de PDI nas VSMC-PDI ^{TetON}	35
Figura 8: Distribuição da PDI superexpressa nas VSMC-PDI ^{TetON}	36
Figura 9: A indução de PDI nas VSMC-PDI ^{TetON} (L4:4) não induz estress do retículo endoplasmático nem outras PDIs.....	37
Figura 10: Atividade redutase em homogenatos de VSMC-PDI ^{TetON} (L4:4).....	38
Figura 11: Produção de oxidantes em VSMC ^{tetON} estimuladas com doxiciclina por 24 e 48h comparada com o basal sem doxiciclina.....	39
Figura 12: Produção de superóxido intracelular em VSMC-PDI ^{TetON}	40
Figura 13: Produção de H2O2 extracelular em VSMC-PDI ^{TetON}	41
Figura 14: Atividade da NADPH oxidase em VSMC-PDI ^{TetON}	42
Figura 15: VSMC-PDI ^{TetON} exibem maior distância percorrida em ensaio de migração de células única, de forma espontânea.....	43
Figura 16: Superexpressão da PDI em VSMC ^{tetON} induzida pela presença doxiciclina (1500ng/ml por 48h) alterou a expressão de quinases parcialmente redox sensíveis.....	44

Figura 17: Superexpressão da PDI altera o fenótipo celular de VSMC-PDI ^{tetON} L4:4 para um perfil mais alongado e contrátil.....	45
Figura 18: Superexpressão da PDI altera o fenótipo celular de VSMC-PDI ^{tetON} L8:8 para um perfil mais alongado e contrátil.....	45
Figura 19: Superexpressão da PDI aumenta expressão de marcadores de diferenciação em VSMC ^{tetON} L4:4.....	46
Figura 20: Catalase foi capaz de inibir o efeito de aumento da expressão de Calponina	47
Figura 21: Silenciamento da PDI aumenta expressão de marcadores de proliferação (PCNA)).....	48
Figura 22: Marcação por imunofluorescência do fator de Transcrição Nrf2	53
Figura 23 produção de peróxido de hidrogênio e fosforilação da ERK1/2 na presença ou ausência de Losartan.....	57
Figura 24 Atividade NADPH oxidase, produção de superóxido intracelular e fosforilação da ERK1/2 no modelo crônico de superexpressão da PDI (VSMC-PDI [∞]).....	58
Figura 25 Marcação da PDI (ab anti-PDI Stressgen) e AT1R –GFP (autofluorescente) em VSMC no modelo agudo e crônico.....	59
Figura 26 Silenciamento de PDI em CHO-AT1R e mecanoativação do AT1R.....	59

Resumo (português)

Gonçalves RC. *A ativação da NADPH oxidase mediada pela superexpressão da Dissulfeto Isomerase proteica em células musculares lisas vasculares*. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo. Descritores: isomerases de dissulfetos de proteínas; NADPH oxidase; miócitos de músculo liso; oxidantes; diferenciação celular; movimento celular; superóxidos; espécies de oxigênio reativas.

O fenótipo das células musculares lisas vasculares (VSMC) depende de fatores intrínsecos e extrínsecos, que incluem a sinalização redox dependente da NADPH oxidase (NOX). A expressão / atividade da Nox1 estimuladas por fatores de crescimento é regulada pela chaperona oxidoreductase dissulfeto isomerase proteica (PDI). A PDI é necessária para a migração de VSMC e organização de seu citoesqueleto, e a PDI extracelular contrabalança o remodelamento constritivo vascular por reorganização do citoesqueleto. Tal padrão efeitos da PDI nos levou à hipótese de que a PDI poderia orquestrar alterações fenotípicas das VSMC, e para testá-las desenvolvemos VSMC que superexpressam PDI de forma induzível por tratamento com doxiciclina (VSMC- PDI^{tet^{on}}). Observamos que a superexpressão de PDI prolongada (por 72h) aumenta o comprimento celular e induz a expressão de marcadores de diferenciação calponina, α -actina, e smoothelina, cujo aumento foi inibido após a incubação com catalase. A produção de superóxido intracelular aumentou após 48h de superexpressão de PDI, produzido parcialmente pela Nox1, conforme inibição por GKT136901 ou peptídeo NOXA1ds. Em curto prazo, a superexpressão da PDI (40h) aumentou a distância percorrida em ensaio de migração de célula única. Finalmente, o silenciamento da PDI em VSMC diminuiu espontaneamente a expressão do marcador de diferenciação (calponina). Estes dados sugerem que a superexpressão de PDI induz ativação da NADPH oxidase transientemente e que provavelmente a principal isoforma responsável seja a Nox1, enquanto que a superexpressão de PDI sustentada induz alteração no fenótipo de VSMC.

Resumo (inglês)

Gonçalves RC. NADPH oxidase activation mediated by Protein Disulfide Isomerase overexpression in vascular smooth muscle cells. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

Descriptors: protein disulphide-isomerases; NADPH oxidase; myocytes smooth muscle; oxidants; cell differentiation; cell movement; superoxides; reactive oxygen species.

Vascular smooth muscle cell (VSMC) phenotype switch depends on extrinsic/ intrinsic cues including NADPH oxidase (Nox) – dependent redox signalling. Growth factor-triggered Nox1 expression/ activity is regulated by the chaperone oxidoreductase protein disulphide isomerase- A1 (PDI). PDI is required for VSMC migration and cytoskeleton organization, and extracellular PDI counteracts constrictive vascular remodelling via cytoskeleton reshaping. Such pattern of PDI effects led us to hypothesize that PDI may orchestrate VSMC phenotypic alterations, and test it we developed VSMC which overexpress PDI by doxyxycycline treatment (VSMC-PDI^{tet^{on}}). We observed that sustained PDI overexpression (72h) increased cell length and induced the expression of differentiation markers calponin, α -actin and smoothelin, which were not further upregulated upon catalase incubation. Intracellular superoxide production increased after 48h of PDI overexpression, produced partially from Nox1, based on inhibition with GKT136901 or NOXA1ds peptide. Acute PDI overexpression (40h) increased VSMC distance during single cell migration assay. Finally, PDI silencing spontaneously decreased differentiation marker calponin expression. These data suggest that PDI overexpression induces transiently NADPH oxidase overexpression and probably the major isoform is Nox1, while sustained PDI overexpression induces VSMC phenotypic changes.

1. Introdução

FENÓTIPO VASCULAR (VSMC)

Células musculares lisas vasculares (VSMC) são críticas para a manutenção do tônus muscular dos vasos. Estas células possuem a habilidade de trocar características fenotípicas rapidamente e reversivelmente, de um fenótipo contrátil para um sintético e migratório. As células musculares lisas vasculares da camada média possuem características fenotípicas mais diferenciadas e especializadas e são importantes para contração e regulação do diâmetro dos vasos. VSMCs diferenciadas expressam proteínas musculares contráteis específicas que incluem α -actina, smothelina e calponina, dentre outras. Já as células musculares lisas vasculares da neoíntima em artérias lesadas são pouco diferenciadas e expressam baixos níveis destas proteínas marcadoras de diferenciação. (Griendling K, et al 2006). No caso de doenças cardiovasculares como aterosclerose e reestenose, as VSMCs podem sofrer uma dediferenciação, caracterizada pela diminuição de genes de diferenciação e aumento da expressão de genes envolvidos na proliferação celular, migração, síntese de matriz extracelular, (Lee et al 2016), por mecanismos que ainda precisam ser elucidados.

Fatores que mediam a modulação do fenótipo de VSMC incluem hormônios, fatores de crescimento (ex fator de crescimento derivado de plaquetas PDGF, TGF β) peptídeos (como angiotensina II, AII) e oxidantes. Estes últimos, como o ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), estão envolvidos na regulação das vias de sinalização redox que levam a processos como hipertrofia, proliferação, diferenciação celular e inflamação vascular (Lassegue et al 2012)-- e são produzidos principalmente por NADPH oxidases (Hilenski et al 2004).

NADH OXIDASE (NOX)

NADPH oxidase são enzimas multiméricas dedicadas à produção do radical ânion superóxido- pela redução por um elétron do oxigênio molecular. A subunidade catalítica (Nox, com sítios de ligação heme- and flavina) encontra-se incorporada na membrana plasmática; e dependendo da isoforma específica, p22phox e outras subunidades regulatórias citossólicas são recrutadas (Brown DI et al 2015). Nox2 é a principal isoforma de VSMC em artérias de resistência, enquanto que em grandes artérias, as principais isoformas encontradas são as Nox1 e Nox4. Nox1, menos abundante do que Nox4, está localizada em cavéolas e media a proliferação celular,

enquanto Nox4, que induz a diferenciação, está principalmente localizada em cavéolas e -adesões focais, em sítios de sinalização tirosina quinases (Hilenski et al., 2004). –Em animais seguintes aos roedores em escala de evolução observa-se também a expressão de Nox5; sua ativação é independente das subunidades regulatórias citossólicas mas, de forma diferente das outras isoformas, é modulada por cálcio (Touyz et al., 2015). A tabela a seguir representa as diferentes isoformas da NADPH oxidase vascular.

Tabela 1: NADPH oxidase vascular (Laurindo e col, *Antiox Redox Signal* 2008).

	SUBUNIDADES CATALÍTICAS (expressão basal)			SUBUNIDADES ASSOCIADAS REGULATÓRIAS	EFEITOS CELULARES PRINCIPAIS
	EC	VSMC	Fib		
Nox1	+	++	0/+	p22 ^{phox} Noxo1 Noxa1 p47 ^{phox} (?)	Proliferação Migração
Nox2	++	0	+++	p22 ^{phox} p47 ^{phox} p67 ^{phox} p40 ^{phox} (?)	Proliferação Migração Inflamação
Nox4	+++	++	+	p22 ^{phox}	Diferenciação Apoptose
Nox5	+	++	(?)	p22 ^{phox}	Respostas mediadas por Ca ²⁺

Abreviaturas: EC = células endotelial; VSMC = célula muscular lisa; Fib = fibroblasto.

A quantidade relativa (+ a +++) representa estimativas semi-quantitativas de várias referências.

A ativação de Nox1, por estímulo de Angiotensina II ou durante a migração de VSMC, depende da montagem de subunidades citossólicas (Nox organizador 1 ou Noxo1, Nox adaptador 1 ou Noxa1 e Rac1). Ativação da Nox4 é independente de sua montagem, portanto, a atividade da Nox4 está associada com a sua expressão (Serrander et al., 2008) e mais recentemente, dependente da pressão de oxigênio (PO₂, Nisimoto et al. 2014). Importante, a Nox4 produz primordialmente peróxido de hidrogênio (H₂O₂) ao invés do superóxido (Ambasta et al., 2004; Nisimoto et al., 2014), porém é incerto, o mecanismo. Propõe-se uma dismutação direta de duas moléculas de superóxido devido à uma carga positiva no Eloop em Nox4 (Takac et al., 2011) e/ ou sua associação de Nox4 com a superóxido dismutase.

Figura 1: Modelo de estrutura das Noxes nas suas diferentes isoformas, e seus principais elementos regulatórios. Karen Block & Yves Gorin, Nature reviews. 2012

MIGRAÇÃO CELULAR (VSMC)

Durante a migração celular, o citoesqueleto é reorganizado para facilitar o movimento para frente, e ambas Nox1 e Nox4 estão envolvidas. Está bem estabelecido na literatura que oxidantes são necessários para a migração de VSMC (Sundaresan et al., 2005) e que a migração induzida por PDGF é dependente da ativação de Nox1 na frente de migração. (Lee et al., 2009; Brown and Griendling, 2015). Nox4 é importante para regular montagem e desmontagem de adesões focais durante a migração, que juntamente com seus parceiros, proteína de interação com polimerase 2 (POLDIP2), ativa RhoA/FAK (Datla et al., 2014). A imagem a seguir demonstra a importância da NADPH oxidase, mais especificamente Nox4 e o complexo Nox4/Poldip2 para o controle migratório de VSMC induzido por PDGF.

Figura 2: Modelo proposto do controle de migração de VSMC por Poldip2. Quando PDGF inicia a migração celular, H₂O₂ gerada do complexo Nox4/Poldip2 estimulada por integrina pode ativar RhoA e aumentar a fosforilação de FAK em tirosina 397, levando a formação da adesão focal, e gerando uma força de tração. Superexpressão de Poldip2 leva à produção contínua de H₂O₂ e previne a dissolução das adesões focais na parte de trás da célula causando longas extensões citoplasmáticas, porém sem a habilidade de migrar e polarizar a célula. Perda de Poldip2 ou Nox4 leva à redução de fosforilação de FAK em tirosina 397 e falha na formação de novas adesões focais. Datla et al 2014.

DISSULFETO ISOMERASE PROTEICA (PDI)

Resultados do nosso grupo e de outros grupos demonstraram que a dissulfeto isomerase proteica (PDIA1, P4HB) tem um importante papel na regulação da NADPH oxidase em VSMC (Janiszewski e col., 2005; Fernandes et al., 2009), em macrófagos (Santos et al., 2009), em células endoteliais (Laurindo e col., 2008) e em neutrófilos (Paes e col., 2012). Em todos estes tipos celulares, ocorre interação física entre as subunidades NOX (NOX1, 2 ou 4) com a PDI (por imunoprecipitação e análise confocal) e experimentos de ganho e perda de função da PDI alteram a atividade NADPH oxidase [revisão PDI do lab ARS 2008]. Particularmente em VSMC de aortas, a PDI co-localiza e co-imunoprecipita com diferentes subunidades da NADPH oxidase (p22phox, Nox1, Nox2 e Nox4) (Janiszewski e col, 2005; Laurindo e col, 2008) e durante ativação da Nox1 por angiotensina II, PDI transloca-se para compartimentos da membrana celular, e sustenta a atividade da NADPH oxidase por mecanismos ainda não

esclarecidos (Janiszewski e col, 2005; Fernandes e col, 2009). De fato, a superexpressão da PDI em VSMC promove ativação espontânea da NADPH oxidase e aumenta a expressão do RNA mensageiro da Nox1 (e não da Nox4) e produção de H_2O_2 após estímulo com angiotensina II (Fernandes e col, 2005). Funcionalmente, o silenciamento da PDI diminui a migração celular estimulada por PDGF, e processos que envolvem Nox1 e RhoGTPases, associados à migração celular (Pescatore et al. 2012).

Figura 3: Efeito do silenciamento da PDI na expressão da NADPH oxidase. A) Após 72h de silenciamento da PDI as células foram tratadas com Angiotensina II (100nM, 4h). B) Isoforma da NADPH oxidase foi mensurada (Nox1) através da PCR-Real Time e corrigida por mRNA de GAPDH. Dados foram comparados com o controle negativo (*mock*) submetidos à lipofectamina. C) fração de membrana proteica de VSMC (1 μ) foi fixado em uma membrana de nitrocelulose e blotada para anticorpos contra Nox1 e Nox4. O controle de carregamento utilizado foi o marcador proteico Ponceau. Dados estão demonstrados em duplicata para o controle negativo, siRNA PDI em células não estimuladas. D) produção total de ROS (H_2O_2) foi mensurada por Amplex Red, em células em suspensão. Figura adaptada de Denise CF. et AL, ABB 2009.

A PDIA1 é uma chaperona ditiol oxidoredutase e membro fundador da família das PDIs (um subgrupo da superfamília das tioredoxinas), atualmente com mais de 20 membros. A maior importância da PDI é catalisar o enovelamento proteico via formação (oxidação)/isomerização de pontes dissulfeto de proteínas recém sintetizadas no retículo endoplasmático (RE).

Figura 4: Estrutura tridimensional da Dissulfeto Isomerase proteica com representação dos seus sítios ativos. Ao lado, quadro de resumo das principais funções exercidas pela PDI. Adaptado de Laurindo FRM et. AL, Antioxidants and Redox Signaling, 2008.

A PDI participa do tráfego subcelular e de secreção de várias proteínas (Terada et al, 1955) e na membrana celular a atuar como tiol redutase (Gruber e col, 2006). Trabalhos mais recentes tem demonstrado um papel importante da PDI de superfície e/ou extracelular, como por exemplo, desempenhando um papel crucial na agregação de plaquetas, na sinalização de integrinas, na regulação da metaloproteinase ADAM17 [Flaumenhaft Furie 2016]. Por possui um papel central na trombose, há estudos clínicos em humanos em andamento em que se busca inibir a PDI de superfície com derivados de quercetina (Furie et al, 2014).

Em grandes artérias, dados obtidos pelo grupo mostraram que a PDI possui um papel importante na reorganização do citoesqueleto que contrabalança o remodelamento construtivo em modelo de lesão por cateter balão (Tanaka, et al 2015).

Demonstramos também evidências de que o silenciamento de PDI intracelular impacta o citoesqueleto em VSMC, através da desorganização de fibras de actina e redução do número de adesões focais (Pescatore et al 2012).

Portanto, para analisar temporalmente a indução da NADPH oxidase e consequente aumento na produção de oxidantes estimulada pela superexpressão da PDI em VSMC, desenvolvemos linhagens que superexpressam PDI sob ativação de um promotor induzível por tetraciclina (VSMC-PDI^{TetON}). Notavelmente, a indução da superexpressão da PDI de forma sustentada promoveu alterações fenotípicas, que sugerem a PDI como proteína importante para a plasticidade fenotípica de VSMC.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é estudar como a superexpressão induzível de PDIA1 altera a atividade da NADPH oxidase e identificar possíveis alterações fenotípicas durante a superexpressão de PDIA1 em células musculares lisas vasculares.

2.1 Objetivos específicos

1. desenvolver linhagens de VSMC que superexpressam a PDIA1 de forma induzível
2. analisar a atividade NADPH oxidase temporalmente durante a superexpressão da PDI
3. analisar se a superexpressão da PDI altera parâmetros de migração espontânea de VSMC
4. identificar possíveis alterações fenotípicas durante a superexpressão da PDI

3. Materiais e Métodos

3.1 Materiais e métodos

3.1.1 Cultura celular

Este projeto utilizou a linhagem imortalizada de células musculares lisas de aorta de coelho (Buonassissi e Venter, 1976) que tem sido rotineiramente utilizada no laboratório. Estas células são facilmente transfectadas com siRNA ou cDNA utilizando-se lipofectamina (Fernandes e col, 2009). VSMC foram mantidas em frascos de cultura contendo meio completo F-12 Coon's com estreptomicina (100 μ M) e penicilina (100 U/mL), suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (Gibco BRL-Life Technologies Grand Island, NY, USA) e mantidas em estufa com 5% CO².

Utilizamos no trabalho também células musculares lisas vasculares (VSMCs) isoladas da aorta de artérias torácicas de coelhos. Após a lavagem e retirada de todo o tecido conectivo, a aorta foi digerida em collagenase tipo IV (165U/mL), 6 elastase (15U/mL) e inibidor de tripsina (0.375mg/mL) por 2 a 3 horas a 37°C em DMEN. Em seguida, a aorta pré-digerida foi cortada em pequenos pedaços, o endotélio foi gentilmente retirado e os fragmentos foram mantidos em placas tratadas com gelatina (0,1%), com a porção luminal virada para cima da placa. Os fragmentos foram cultivados em DMEN com soro fetal bovino 10%. Quando VSMC atingem a confluência máxima, os fragmentos são removidos e as células são tripsinizadas e passadas para garrafas para expansão celular.

3.1.2 Silenciamento da PDI em VSMC

Para a transfecção de siRNA, VSMC (1.2×10^5 cel./well) foram cultivadas em meio de crescimento sem o soro fetal bovino e antibióticos, e incubadas por 6 horas com oligonucleotídeo siRNA da PDI de coelho (50nM de concentração final) e lipofectamina 2000 (5mL). A sequência siRNA da PDI foi obtida através do programa BLOCK-iTTM RNAi Designer, da Invitrogen (GAGGUGGCCUUUGACGAGAAGAAGA). Esta concentração de siRNA da PDI foi capaz de efetivamente silenciar pelo menos 70% da expressão protéica da PDI, analisada por Western blot. siRNA controle utilizado foi o StealthTM RNAi Negative Control Duplexes (medium GC), da Invitrogen. Após 6h do início da transfecção, o meio de transfecção foi substituído por DMEN contendo SFB10%.

3.1.3 Superexpressão da PDI aguda e crônica em VSMC

VSMC são crescidas a 1×10^6 células em placas de cultura de 10cm de diâmetro (Falcon). Após 48h substituiu-se o meio de cultura por 10 mL de meio de transfecção (F12 sem SFB, 12 μ g de plasmídeo e 30 μ L de Lipofectamina®, Invitrogen). Após 8h, o meio de transfecção é substituído pelo meio de cultura. Neste momento foram adicionados os inibidores do receptor AT1, quando necessário. Os plasmídeos utilizados são pCR3.1 para controle do vetor vazio ou wild type PDI (clonado em pCDNA3, Invitrogen) e mutPDI (PDI com a ausência de thióis, clonado em pCDNA3, Invitrogen), os quais foram cedidos pelo Prof. Xavier Neto (LNBio) e Prof. Tomohiro Nakamura (Hokkaido University, Japão). Para o modelo crônico, as células foram selecionadas com antibiótico (G418, 2mg/ml) de resistência por duas semanas e mantidas na metade da concentração do antibiótico (1mg/mL).

3.2 Clonagem, produção e transdução viral

3.2.1 Subclonagem dos vetores – Foram realizadas subclonagens dos vetores, ou seja, retiramos a sequência da PDIA1 (ref NCBI NM_012998.1) do vetor PCR3.1 utilizando enzimas de restrição e a subclonamos no vetor utilizado para produção lentiviral pLVXTight (kit Lenti-X Clontech).

3.2.2 Produção lentiviral – Os vetores de transferência pLVX-Tight-PDIA1, pLVX-tet-on Lenti-X Clontech foram utilizados para a produção viral, a partir das construções plasmidiais (maxi-preps). Cada vetor foi co-transfectado com o vetor de empacotamento pSPAX2 e o vetor do envelope pCMVVSvg. A transfecção do DNA viral foi feita por precipitação com fosfato de cálcio em células HEK293T (Tiscornia et al., 2006). Vinte e quatro horas após o início da transfecção as culturas tinham o meio coletado e ultracentrifugado a 110.000 g durante 90 min. Após ultracentrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet viral ressuspensionado em Hank's salt solution (HBSS), mantido a 4 °C por 16 h, aliquotado e armazenado a -70 °C. O meio das culturas foi repostado e depois de outras vinte e quatro horas foi novamente coletado, ultracentrifugado, ressuspensionado e armazenado a -70 °C. As produções foram avaliadas através de

titulação por seleção com puromicina usando células HT1080 plaqueadas em placas de 6 poços. No dia posterior ao plaqueamento, as células foram transduzidas com 1, 10 ou 100 µl de vírus previamente diluído (1:1000) em meio completo+polybreno (8 µg/ml final). Após 24 horas foi adicionado puromicina e as células incubadas por 7 a 10 dias até a formação de colônias de células visíveis. Após a seleção, as colônias foram coradas com giemsa, o número de colônias determinado, e o título viral (Título = N° colônias $\times$ fator de diluição $\times$ 1000).

3.2.3 Transdução Lentiviral – foram plaqueados 10^4 células em placa de 12 poços (25 a 30% de confluência para o dia da transdução) e adicionados 1mL do meio apropriado. No dia seguinte, adicionou-se 300µl de meio de cultura completo contendo o vetor suplementado com 8ug/ml de polibreno (concentração final). NOTA: a quantidade de vetor a ser adicionado depende do moi (*multiplicity of infection*) que se pretender atingir. E nos controles, adicionamos apenas o meio de cultura contendo o polibreno (8ug/ml). Mantivemos as células por 6-8horas. Após a incubação, retornamos 1ml de meio de cultura completo, e após 24h de incubação, substituímos por um meio de cultura contendo o antibiótico de seleção na concentração letal para seleção dos clones.

3.2.4 Seleção dos clones (linhagens policlonais) - estas células que foram submetidas à transdução lentiviral carrega o genem da PDI + o gene de dependencia da presença de doxiciclina. A contrução do plasmídeo possui uma região codificada para resistir a um tipo específico de antibiotico. Desta forma, apenas as células que receberam a carga viral conseguem resisitir à presença deste antibiotico espercífico nas concentrações letais, previamente estabelicidas. Neste caso, submetemos as nossas células à 0,8mg/ml de G418 e 0,2mg/ml puromicina, por uma semana. Após a comprovação da morte de todas as células que não receberam a carga viral, estas células foram mantidas com a metade da concentração de antibiotico usada na seleção. Uma parte das células foi congelada, enquanto outra parte foi usada para realizar experimentos. A seleção das células submetidas à transfecção transiente de PDI por lipofectamina seguiu este mesmo protocolo, apenas com a diferença de termos utilizado apenas o G418 0,8mg/ml por uma semana. Estas células foram mantidas em F12 com G418 0,4mg/ml.

3.3 Medida de oxidantes derivados do oxigênio

As medidas foram realizadas por dois métodos: i) oxidação do AmplexRed (Invitrogen) amplificado por peroxidase (HRP) como medida da produção de H_2O_2 extracelular das VSMC em suspensão; ii) oxidação da dihidroetidina por oxidantes intracelulares, com posterior extração dos produtos derivados da oxidação da DHE com acetonitrila seguido de análise dos mesmos por HPLC; neste caso trata-se da produção intracelular de oxidantes, com ênfase no ânion radical superóxido, que oxida a DHE para 2-hidroxietídeo (Fernandes et al 2007).

3.3.1 Oxidação da Dihidroetidina (medida do superóxido intracelular) – VSMC foram incubadas em PBS/DTPA (0,5 mL) contendo dihidroetidina (50 μ M). Após 30 min, as células foram lavadas com PBS para retirada da dihidroetidina que não é incorporada, raspadas em presença de 0,5 mL de acetonitrila, e o extrato de células obtido foi centrifugado (12.000g por 10 min a 4°C) para retirada de debris. Os sobrenadantes dos extratos foram secos sob vácuo (Speed VacR Plus SC-110A, Thermo Savant) e os resíduos armazenados a -20°C no escuro até análise. As amostras devem ser ressuspendidas em 120 μ L de fase móvel (CH₃CH 10%, TFA 0,1%) e injetadas no sistema de HPLC (100 μ L). Durante a separação cromatográfica, a quantificação de dihidroetidina remanescente (que não reage) é utilizada como controle interno da extração orgânica. Desta forma, os dados foram expressos como 2- hidroxietídio por dihidroetidina consumida (EOH/DHE) e etídio por dihidroetidina consumida (E/DHE). A dihidroetidina consumida é calculada como a diferença entre a concentração inicial adicionada às células e a dihidroetidina remanescente no extrato celular quantificada por HPLC. Vale ressaltar que todas as etapas devem ser realizadas em ausência de luz.

3.3.2 Oxidação do AmplexRed amplificado por HRP (medida de H_2O_2 extracelular) - Produção celular de H_2O_2 foi mensurada em VSMC pela incubação com reagentes AmplexRed (0.1mM) e horseradish peroxidase (1U/mL) em tampão Krebs (em mM: CaCl₂ 0.5; MgSO₄ 1.2; KCL 4.9; KH₂PO₄ 5.7; NaCl 145mM; Na₂HPO₄ 5.7; glicose 5.5, pH7.4) contendo DTPA (0.1mM) por 30min a 37°C. As células em suspensão, provenientes de um poço de placa de 6 poços, foram separadas em dois poços em placas de 96well, um deles contendo catalase (200U/mL). A quantificação de H_2O_2 foi calculada através da diferença entre a fluorescência obtida no poço com e sem catalase.

A fluorescência foi medida em um leitor de microplaca (onda de excitação/emissão 480/560nm) em um espectofluorômetro (SpectraMax M5, Molecular Devices).

3.4 Medida da atividade da NADPH oxidase

A atividade da NADPH oxidase foi realizada em fração de membranas estimuladas com NADPH. A separação da fração enriquecida da membranas foi obtida através da lavagem de VSMC, crescidas a 1×10^6 células em placas de 10 cm de diâmetro, com PBS gelado duas vezes. A placa é raspada com tampão de lise (Tris 50mM pH7,2, contendo EDTA/EGTA 100uM e inibidores de protease). Para romper a células, é feita a sonicação em intervalos de 10 segundos entre cada uma, por três vezes. O lisado foi centrifugado a 18000g por 15 minutos à 4°C para retirar as grandes organelas (núcleo e mitocôndrias). Logo após, o sobrenadante foi centrifugado à 100.000g por 1h à 4°C. O pelet foi ressuspensionado em 100uL do tampão de lise. A dosagem de proteína foi realizada pelo método de Bradford (BioRad), utilizando-se concentrações conhecidas de albumina bovina.

3.4.1 Redução da Lucigenina – VSMC, crescidas a 1×10^6 células em placas de cultura de 10 cm de diâmetro, foram lavadas com PBS + EDTA e DTPA gelado duas vezes. As células foram submetidas à separação da fração de membrana. Após a dosagem de proteínas, 30ug da amostra foram diluídas em 810ul de PBS pH7,4 contendo EDTA 10μM. Após a adição de 150uL de NADPH (300uM) as amostras foram analisadas no luminômetro Sirius da Berthold termostatizado à 37°C. A lucigenina (5μM) foi injetada automaticamente às amostras após 10 segundos. A lucigenina é reduzida pelo ânion superóxido proveniente da amostra, resultando na formação de 1,2-dioxetano que ao ser decompor resulta na formação do produto excitado (metilacridona), que emite luz. A captação da luminescência foi acompanhada por cerca de 40min.

3.4.2 Oxidação de Amplex Red - Para medir H_2O_2 derivada da atividade da NADPH oxidase, homogenatos de membrana (15 μg de proteína) foram incubadas com reagentes de AmplexRed (0.25mM) e horseradish peroxidase (10 unidades/ml) em tampão fosfato/DTPA na presença de NADPH (250μM) por 30min a 37°C no escuro.

Fluorescência foi medida em um leitor de microplaca (onda de excitação/emissão 480/560nm) em um espectofluorômetro (SpectraMax M5, Molecular Devices).

3.5 Microscopia confocal – VSMC (10^4 células x poço) foram plaqueadas em p24 contendo lamínulas esterilizadas. As células foram fixadas nas lamínulas com paraformaldeído 4% e depois permeabilizadas com PBS contendo Saponina 0,1%, por 3x de 15 min a 37°C ou NP40 0,1% por 30 min a 37°C), e bloqueio com albumina 3% (por 30 minutos a 37°C). Os anticorpos primários específicos foram incubados *overnight*, a 4°C, diluídos em PBS contendo albumina (1%). Sendo eles: AbCam (Nrf2 1:200); Cell Signaling (Myc 1:200); Thermo –Pierce (PDI 1:400). Após incubação com anticorpo secundário (3h a 24°C), as lâminas são montadas em presença de PBS contendo glicerol (1:1, v/v) e DAPI (10 µg/mL). As lâminas foram analisadas em microscópio confocal (Zeiss LSM510 Meta).

3.6 Western blot - O homogenato celular total foi obtido após lavagem das células (retirada de meio de cultura) com PBS contendo EDTA (1 mM) seguido de raspagem das células em tampão de lise (tampão RIPA: Tris 50mM, pH 7,4, SDS 1%, EDTA e EGTA 0,1mM, contendo inibidores de protease- PMSF 1mM, leupeptina e aprotinina 10µg/ml e inibidores de fosfatase- DTT 1mM, tetrasodiopirofosfato 10mM, NaF 100mM, β-glicerofosfato 17,5 mM). Após 20 minutos em gelo os debris foram separados por centrifugação (1000g 5 minutos) e a dosagem de proteína foi realizada pelo método de Bradford (BioRad), utilizando-se concentrações conhecidas de albumina bovina. Alíquotas de 30µg de proteína foram diluídas em tampão de amostra contendo azul de bromofenol 0,02%, mercaptoetanol 10 mM e dodecil sulfato de sódio 10% e são aplicadas juntamente com uma padrão de pesos moleculares em gel de poliacrilamida para separação das proteínas por eletroforese. Posteriormente, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em sistema semi seco (Semiphor, Hoefer-Pharmacia, Suécia). A membrana foi incubada com a solução de bloqueio (leite desnatado 5% em TBS-Teewn 0,01%). A detecção de proteínas específicas foi feita pela incubação com os anticorpos primários Abcam (PCNA, 1:1000; myocardin 1:750; Nrf2 1:1000; RhoGDIα 1:1000), Enzo (mouse-PDI, 1:1000), Sigma (β-actin, 1:5000; Calponin 1:1000; α smooth muscle actin 1:1000), Thermo-Pierce (PDI, 1:1000), Millipore (SrcY416 1:1000; Smoothelin 1:1000), Cell Signaling (Src 1:1000; ERK 1:1000; ERKT202/Y204 1:1000; Myc 1:1000), sendo posteriormente incubados com

anticorpos secundários que foram excitados na região do infravermelho. A captação das imagens foi realizada no Licor. A densitometria foi obtida pela contagem de pixels de cada imagem.

3.7 Ensaio de migração de célula única (*Single Cell Migration assay*) - VSMC foram plaqueadas em baixa confluência ($0,6 \cdot 10^4$ células/poço) na placa p12. Após o período de adesão (6hs) as células foram ou não estimuladas com Angiotensina II. A análise da migração foi realizada a 37°C em microscópio invertido (Leica DMIRB) em objetiva de x10. Com uma câmera (Axion Vision 4.8), acoplada ao microscópio operada pelo Metamorph image analysis software (Princeton Instruments, Evry, France) foram fotografados 3 campos por poço, em um intervalo de 5 minutos, por 16hs. As imagens obtidas (em formato ND2) foram convertidas em AVI e utilizando-se o software ImageJ (time-lapse movies; manual tracking plugin). As coordenadas (X, Y) obtidas do rastreamento de cada célula foram utilizadas para o cálculo da distância total percorrida, distância do ponto de origem e persistência direcional da migração. A distância total percorrida representa a soma de todos os deslocamentos de cada célula durante o período de 16hs. A distância do ponto de origem representa o deslocamento entre o ponto inicial e final. A persistência direcional da migração foi calculada utilizando-se a distância do ponto de origem (durante o período de 16hs) dividido pela distância total percorrida durante este período. Os experimentos foram realizados em duplicata e a quantificação foi feita com no mínimo 6 células por monocultura.

3.8 Medida da atividade redutase em homogenatos celulares – As células crescidas em placas de 10cm de diâmetro foram lavadas duas vezes com PBS e raspadas em tampão fosfato 0,1% contendo 1mM EDTA e inibidores de proteases (aprotinina 1µg/mL, leupetina 1µg/mL, fenil-metil-sulfonil 10mM). As células foram lisadas por ciclos de congelamento em N₂ e seguido de descongelamento a 37°C por três vezes e centrifugadas a 10.000rpm por 10min. 20µL do sobrenadante foi incubado em tampão de lise na presença de DTT 5µM por 20min em temperatura ambiente. 150nM de Di-E-GSSG foi adicionado às amostras e imediatamente iniciou-se a leitura da cinética da redução da Di-E-GSSG pelo aumento da fluorescência (exc. 525nm em 545 nm) à 37°C por 30 min. A dosagem de proteína nas amostras foi realizada no mesmo dia, pelo método de Bradford. A atividade redutase foi calculada

3.9 Ensaio de viabilidade celular (*MTT assay*) – após estímulo com Angiotensina II, o meio de cultura celular foi substituído por solução de MTT fresca (0,5mg/mL em Krebs/DTPA). Após 4h de incubação a 37°, cristais de MTT foram dissolvidos em DMSO e a absorbância foi mensurada a 540nm. As amostras foram normalizadas pelo controle negativo (amostras sem a presença de doxíciclina).

3.10 Medida do comprimento celular – As imagens obtidas durante o experimento de migração celular (0 vs 16h) foram utilizadas para calcular o comprimento celular, utilizando o ImageJ software.

3.11 Análise estatística – Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão. As comparações foram feitas utilizando test t de *student* (pareado ou não pareado) ou ANOVA de uma via com *post-hoc* de Benferroni. Os gráficos e testes foram realizados utilizando o software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc.) Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

4.Resultados

4.1 A superexpressão crônica da PDI em VSMC não eleva os níveis de superóxido intracelular - Demonstramos previamente que a transfecção transiente em VSMC feita por vetor plasmidial (que aumenta cerca de 2,5 vezes a expressão da PDI quando comparada com a células transfectada com o plasmídeo controle) induz expressão da RNA mensageiro da Nox1 (e não da Nox4), e aumenta a atividade da NADPH oxidase nos mesmos níveis de ativação por Angiotensina II (Fernandes et al., 2009). Entretanto, quando VSMC transfectadas com PDI foram selecionadas para originar uma linhagem de células que superexpressam cronicamente PDI (aumento cerca de 2.5 vezes a expressão da PDI quando comparada ao basal, Fig.5), nós não observamos aumento da atividade NADPH oxidase (vs. Basal), assim como não houve alteração dos níveis de produção de superóxido intracelular.

Figura 5: A superexpressão crônica da PDI não aumenta a atividade NADPH oxidase em VSMC. A atividade NADPH oxidase avaliada pela redução da Lucigenina em fração enriquecida de membrana de VSMC e a produção de superóxido intracelular avaliada por oxidação do DHE intracelular, neste modelo, não se alteram em relação ao controle basal. Angiotensina II (100nM, 4h) foi utilizada como controle positivo.

Estes dados sugerem que a produção de oxidantes pela superexpressão da PDI deva ser transiente, por alterações na expressão da fonte geradora de oxidantes

(possivelmente Nox1), na atividade desta fonte e/ou na ativação de vias de adaptação que promovam aumento de sistemas antioxidantes, como p.ex, Nrf2 [EspinosaDiez C et al. 2015]. Sendo assim, desenvolvemos um modelo induzível de superexpressão da PDI para analisar temporalmente os efeitos da superexpressão da PDI em células musculares lisas vasculares.

4.2 Desenvolvimento de modelo de superexpressão induzível de PDI em VSMC

Este modelo foi obtido por infecção lenti- viral da linhagem de VSMC de aorta de. Os detalhes experimentais para obtenção das linhagens estão nos métodos (seção 3.2). VSMC foram infectadas simultaneamente com 2 lentivírus (um deles com o promotor TetON induzível por doxíciclina e o outro com o gene da PDIA1 de rato, em diferentes proporções (4:4 e 8:8, TetON:PDIA1). Este gene da PDIA1 contém uma inserção de 9 aminoácidos (Myc-tag) anterior à porção C-terminal para diferenciá-la da PDIA1 intracelular (Fig. 6).

Figura 6: Linhagens de VSMC-PDI^{TetON} obtidas após infecção viral. (acima) Ilustração do transgene da PDIA1 demonstrando seus domínios a/b/b'/a'/c e o peptídeo de retenção no retículo endoplasmático KDEL, assim como os sítios (CGHC) redox e a Inserção da cauda Myc (EQKLISEEDDL). (abaixo) Morfologia de VSMC-PDI^{TetON} após estímulo com doxiciclina (1,5µg/ml) por diferentes tempos de exposição. Observa-se uma importante alteração morfológica no alinhamento das células que será importante para a discussão dos dados demonstrados neste trabalho.

Ambas as linhagens obtidas de VSMC (VSMC-PDI^{TetON} L4:4 e L8:8) mostraram um aumento tempo-dependente da expressão total de PDI após tratamento com doxiciclina (Fig. 6). A escolha da concentração de doxiciclina (1,5µg/mL) baseou-se na expressão de PDI e Myc separadamente. A menor concentração capaz de

estimular tanto o aumento da expressão de PDIA1 quanto de Myc (na altura de 57KDa, o peso molecular da PDIA1) a partir de 24 horas. (dado não demonstrado). A linhagem L4:4 exibiu aumento de 3,7 vezes da PDIA1 em 48h de tratamento com doxíciclina, enquanto a linhagem L8:8 exibiu aumento de 8,5 vezes (versus PDIA1 endógena no basal). De acordo, a superexpressão da PDIA1 transgênica (marcada pela expressão de Myc na altura de 57KDa) foi também maior em L8:8, cerca de 2 vezes quando comparada com L4:4 após 48h de tratamento com doxíciclina.

Figura 7: Indução da superexpressão de PDIA1 nas VSMC-PDIA1^{TetON} L4:4 e L8:8.

A) Expressão de myc na altura de aproximadamente 60KDa sem doxíciclina e após 24 e 48h de estímulo. **B)** PDIA1 aumenta sua expressão após estímulo com doxíciclina por 24 e 48h. A expressão das duas proteínas foram avaliadas tanto para a linhagem L4:4 como para L8:8.

Para analisar a distribuição da PDIA1 superexpressa, marcamos a PDIA1 ou a cauda Myc após 48h de estímulo com doxíciclina, e observamos a marcação por microscopia confocal (fig8). O myc endógeno, (que é um fator de transcrição) apresenta marcação nuclear enquanto que a marcação da cauda Myc após a superexpressão da PDIA1 é perinuclear e colocaliza-se com a PDIA1 (Fig. 8). Importante, a inserção de

Myc não altera a distribuição intracelular da PDIA1, que se mantém similar à marcação perinuclear observada nas células sem estímulo de doxíciclina. Ainda, observamos algumas protusões/prolongamentos ao longo da célula após o estímulo com doxíciclina por 48h, o que não é observado no basal (Fig. 8, setas brancas).

Figura 8: Distribuição da PDI superexpressa nas VSMC-PDI^{TetON}. Localização de expressão celular de PDI e do inserto de Myc nas VSMC-PDI^{TetON} antes e após estímulo com doxíciclina (1500ng/mL por 48h) em ambas as linhagens (L4:4 e L8:8).

Para verificar se a superexpressão da PDI poderia levar à indução de estresse do RE, em consequência da maior quantidade de proteína sendo enovelada no RE, analisamos a expressão das chaperonas residentes do RE Grp8 e Grp94. Observamos que diferentes tempos de indução de PDI (0/24/48/72h) não alteraram a expressão destas chaperonas, nem de chaperonas encontradas no citoplasma (Hsc70 e RhoGDI) (Fig. 8A).

Figura 9: A indução de PDI nas VSMC-PDI^{TetON} (L4:4) não induz estresse do retículo endoplasmático nem aumenta a expressão de outras PDIs. Expressão proteica das chaperonas do retículo Grp78 e Grp94 bem como citossólicas (Hsc70 e RhoGDIα), e das chaperonas da família da PDI, PDIA3 (Erp57) e PDIA4 (Erp72) após estímulo com doxiciclina (1500ng/mL) em diferentes tempos (24h, 48h, 72h). Beta-actina foi utilizada como controle de carregamento.

Também confirmamos que a indução da PDI não alterou a expressão de outras PDIs, pelo menos das PDIA3 (Erp57) e PDIA4 (Erp72) (Fig. 9B). Poderia haver uma forma de compensação fisiológica determinada pelo aumento de expressão de PDI e todos os resultados obtidos poderiam ser decorrentes, de uma maneira indireta, desta compensação. Portanto, os resultados obtidos e descritos adiante podem ser correlacionados diretamente ao aumento da expressão de PDIA1 em VSMC-PDI^{TetON}, sem interferências de alteração de expressão de outras chaperonas.

A seguir analisamos se a PDIA1 superexpressa estava ativa. A PDIA1 apresenta diversas atividades, isomerase, chaperoa, oxidase e redutase. Todas podem ser

medidas separadamente utilizando PDIA1 purificada (Raturi FRBM 2007). Entretanto, um homogenato celular há descrição somente do método fluorescente de redução da glutathiona oxidada ligada covalentemente à eosina (REF). Este método mede a atividade redutase total do homogenato, que inclui a PDIA1 e outros sistemas redutases, como a tioredoxina (Muller et al ATVB 2010.). Observamos uma maior atividade redutase (em cerca de 30%) nos homogenatos das VSMC-PDI^{TetON} tratadas por 72h com doxiciclina em relação às VSMC-PDI^{TetON} sem tratamento (Fig. 10). Considerando se a PDIA1 superexpressa a maior contribuição na diferença entre a medida de t=72h vs. T=0h, conclui-se que a PDIA1 superexpressa está ativa. Além disso, é possível calcular quanto de PDIA1 foi superexpressa comparando-se com a cinética de redução da Di-eosina-GSSG pela PDI purificada analisada no mesmo ensaio. Por este calculo, tem-se 83 ng de PDI-myc, que corresponde a cerca 0,2% do total de proteína no homogenato.

Figura 10: Atividade redutase em homogenatos de VSMC-PDI^{TetON} (L4:4). A atividade redutase, medida pela redução da Di-eosina-GSSG (*esquema acima*), foi maior após 72h de estímulo de doxiciclina (1500ng/ml) quando comparada com a células na ausência de doxiciclina (N=2).

Após a caracterização das linhagens de VSMC-PDI^{TetON}, investigamos os efeitos da indução da superexpressão da PDI na produção de oxidantes e na atividade da NADPH oxidase em VSMC.

2. Superexpressão da PDI induz formação de oxidantes e atividade da NADPH oxidase

Demonstramos anteriormente que a superexpressão transiente da PDI (por 24h, com transfecção plasmidial) aumenta os níveis de superóxido intracelular cerca de 2 vezes e especificamente o mRNA da Nox1 (e não da Nox4), comparado com VSMC controles (transfecção com plasmídeo vazio) (Fernandes et al., 2009). No modelo de superexpressão induzível, a produção de anion superóxido intracelular aumentou em L4:4 após 48h de exposição à doxíciclina, de maneira similar ao tratamento com angiotensina II (100nM), um agonista clássico de ativação da Nox1 (Fig. 11).

Figura 11: Produção de oxidantes em VSMC^{tetON} estimuladas com doxíciclina por 24 e 48h comparada com o basal sem doxíciclina. A) Medida de superóxido intracelular avaliado pela oxidação do DHE medida por HPLC. B) Medida de peróxido

de hidrogênio extracelular, avaliado por oxidação do Amplex Red avaliado por espectofluorometro. Angiotensina II (100nM, 4h) foi utilizada como controle positivo e GKT (80uM, 30min) como controle negativo. Dados foram normalizados pela concentração de proteína. * $p < 0,05$ vs. noDOX $n=3$.

A superexpressão da PDI também aumentou a produção de H_2O_2 extracelular em L4:4, onde o pico de produção se deu com 24h de exposição à doxíciclina. Importante, a produção de superóxido intracelular foi inibida quando as VSMC-PDI^{TetON} foram tratadas 1h antes da incubação com dihidroetidina com o inibidor farmacológico específico para as Nox1/4 (GKT136901, Drummond et al., 2011) (Fig. 11) ou com o peptídeo NoxA1ds, um antagonista da montagem de NoxA1 (Ranayhossaini et al., 2013) (Fig. 12). Em adição, GKT136901 também inibiu a produção extracelular de H_2O_2 (Fig. 12). O inibidor da oxido nítrico sintase (L-NAME) não alterou a produção extracelular de peróxido de hidrogênio nas VSMC-PDI^{TetON}, mas diminuiu a produção de superóxido intracelular nestas células (Fig. 12). O inibidor de xantina oxidase oxipurinol não alterou a produção de oxidantes em VSMC-PDI^{TetON}. Ao contrário de L4:4, em L8:8 não houve aumento da produção de superóxido intracelular nem aumento da produção de peróxido de hidrogênio extracelular (Fig. 11-12), sugerindo que a produção de oxidantes mediada pela superexpressão da PDI deve ter um limiar máximo de expressão de PDI, possivelmente exarcebado em L8:8.

Figura 12: Produção de superóxido intracelular em VSMC-PDI^{TetON}. GKT (80uM) foi utilizado como inibidor específico para Nox1 e Nox4. Noxalids 10uM) como inibidor especificamente de Nox1. Oxypurinol (XXuM, inidibor da Xantina Oxidase) e L-NAME (XXuM, inibidor de eNOS) foram utilizados. As células foram estimuladas ou não com doxiciclina por 48h e os inibidores foram adicionados ao meio de cultura 30min antes da lise.

Figura 13: Produção de H₂O₂ extracelular em VSMC-PDI^{TetON}. Semelhante ao ensaio anterior, porém agora com a presença de DPI (inibidor de isoflavinas, inibidor indireto da NADPH oxidase, XXuM).

Para avaliar a atividade da NADPH oxidase nas VSMC-PDI^{TetON} escolhemos dois métodos distintos, ambos baseados na produção de oxidantes desencadeada por NADPH em fração enriquecida de membrana (“100.000 g fraction”). O primeiro método foi baseado na redução da lucigenina pelo ânion superóxido (levando ao

aumento de luminescência) e o segundo foi baseado na oxidação dos reagentes de Amplex Red por H_2O_2 (formando o produto resofurina fluorescente). A atividade da NADPH oxidase com o passar do tempo em L4:4 exibiu um ponto máximo (48h para o experimento de lucigenina) (Fig. 14), que foi abolido em fração de membrana pré-incubada com GKT136901 (dado não demonstrado). Para o experimento de Amplex Red, não houve diferença estatística na produção de H_2O_2 nas frações de membrana estimuladas com NADPH, oriundas de VSMC-PDI^{TetON} L4:4 tratadas com diferentes tempos de doxíciclina. Similar aos níveis de superóxido intracelular, o tratamento com doxíciclina em L8:8 não alterou a atividade NADPH oxidase mensurada por ambos os métodos. Juntos, estes dados sugerem que a superexpressão da PDI em L4:4 induz uma ativação da NADPH oxidase transiente, provavelmente da isoforma Nox1, similar aos dados observados com a transfecção transiente em VSMC (Fernandes 2009). Entretanto, a discriminação de qual isoforma contribui em cada tempo de tratamento com doxíciclina, ou mesmo se há contribuição de duas isoformas simultaneamente, ainda precisa ser elucidado.

Figura 14: Atividade da NADPH oxidase em VSMC-PDI^{TetON}. Medida por redução da lucigenina e por oxidação de Amplex Red nas VSMC-PDI^{TetON} estimuladas com doxíciclina por 24, 48 e 72h, comparada com o basal sem doxíciclina.

3. A superexpressão da PDI aumenta a migração espontânea das VSMC-PDI^{TetON}

Duante a migração de VSMC a sinalização redox pela NADPH oxidase Nox1 é essencial (Lee et al., 2009). Em VSMC que superexpressam PDIA1 de forma transitória (por 24h) observamos um pequeno aumento basal da migração de VSMC (sem estímulo) quando comparada com VSMC transfectadas com o plasmídeo vazio, analisado por ensaio de Câmara de Boyden (Pescatore et al., 2012). Assim sendo, avaliamos a migração celular em ambas as linhagens L4:4 e L8:8 de VSMC-PDI^{TetON} (Fig. 15). Células foram pré-incubadas com doxíciclina (1.5µg/ml) por 40h antes do início da análise de migração. Em ambas as linhagens, L4:4 e L8:8, houve aumento de distância total percorrida comparado ao basal, sem alteração da persistência, ou seja, sem a manutenção de um direcionamento durante a trajetória percorrida por 16h, como ocorre, por exemplo, com estímulo como PDGF (Pescatore, 2012).

Figura 15: VSMC-PDI^{TetON} exibem maior distância percorrida em ensaio de migração de células única, de forma espontânea. O parâmetro persistência é a razão da distância total percorrida pela diferença de trajetória do ponto inicial ao ponto final no ensaio de migração (que dura 16h).

Analizamos também a ativação da cinase c-Src (pela fosforilação da serina 416) durante a indução de PDI nas VSMC-PDI^{TetON} já que Src ativa é um potencial mediador de migração de VSMC (Weber et al., Circ Res 2004). Após 48 horas de exposição à doxíciclina, houve um aumento de aproximadamente 50% no aumento da pSrc(Ser416) quando comparada em células na ausência de doxíciclina (Fig 16). A fosforilação da ERK não foi alterada quando comparada à condição basal.

Figura 16: Superexpressão da PDI em VSMC^{TetON} induzida pela presença doxíciclina (1500ng/ml por 48h) alterou a expressão de quinases parcialmente redox sensíveis. Por western blot foram analisadas a expressão de Src fosforilada (416) que representa a Src ativada, e ERK1/2 fosforilada. A) representação da fosforilação da Src(416) marcada com anticorpo (Cell Signaling) para ambas Src fosforilada e Src total, após 48h de exposição à doxíciclina. * $p < 0,05$ L4/L8 vs. No DOX. $n = 4$. B) representação da fosforilação de ERK1/2 marcada com anticorpo (Cell Signaling) para ambas ERK1/2 total e fosforilada novamente após 48h de exposição à doxíciclina. $N = 4$.

4. A indução sustentada de PDI altera VSMC para fenótipo mais diferenciado

Durante os ensaios de migração celular, notamos que as VSMC-PDI^{TetON} L4:4, após 48h de doxíciclina estavam mais alongadas. De fato, a quantificação pelo Image J. mostrou um aumento de cerca de 30% no comprimento destas células vs. Basal (fig17 c). Entretanto, o conteúdo proteico se manteve constante durante a superexpressão da PDIA1 (tabela2). Isto sugere uma diminuição do número de células com aumento do tamanho das mesmas. De fato, contagem de células por câmara de Neubauer durante a superexpressão da PDIA1 exibiu uma diminuição do número total de células. Estes dados sugerem que, nas VSMC-PDI^{TetON} L4:4, o aumento da expressão da PDIA1 por tempos maiores que 48h poderia alterar o fenótipo célula, mas sem diminuir a sua viabilidade (fig17b).

Já a linhagem VSMC-PDI^{TetON} L8:8 não alterou o número de células em nenhum dos tempos de tratamento com doxíciclina mas apresentou maior redução do MTT para Formazan (de forma similar à L4:4) (Fig18). Talvez as células estejam alteradas metabolicamente, mas com menores reflexos na morfologia celular. Não realizamos as análises de comprimento celular para a linhagem L8:8 pelo fato desta linhagem apresentar resultados muito distoantes dos resultados da linhagem L4:4, e principalmente por não apresentar diferenças na produção de oxidantes (Fig11).

VSMC-PDI ^{TetON} L4:4 (doxíciclina 1,5mg/mL)	T=0H	T=24H	T=48H	T=72H
QT. DE PROT. (mg/mL)	1.01±0.04	1.09±0.16	1.01±0.30	0.99±0.02

Tabela 2: Quantificação total de proteína em homogenato de células VSMC-PDI^{TetON} L4:4 por método Bradford em diferentes tempos de exposição com doxíciclina. O homogenato foi lisado com RIPA na presença de inibidores de protease. As amostras apresentaram a mesma quantidade de proteína total no homogenato quando comparadas entre si, apesar da diferença na quantidade total de célula por campo (fig 17 a). Tabela representado valor bruto e desvio padrão.

Figura 17: Superexpressão da PDI altera o fenótipo celular de VSMC-PDI^{tetON} L4:4 para um perfil mais alongado e contrátil. O número de células diminui na presença de doxiciclina enquanto a viabilidade celular, avaliada pela metabolização de MTT mitocondrial aumentou na presença de doxiciclina (1500ng/ml, 24h, 48h e 72h).

Figura 18: Superexpressão da PDI altera o fenótipo celular de VSMC-PDI^{tetON} L8:8 para um perfil mais alongado e contrátil. O número de células diminui na presença de doxiciclina enquanto a viabilidade celular, avaliada pela metabolização de MTT mitocondrial aumentou na presença de doxiciclina (1500ng/ml, 24h, 48h e 72h).

Como observamos alterações morfológicas nas VSMC- PDI^{tetON} com tempos de superexpressão de PDIA1 de 48h que sugeriram um fenótipo mais diferenciado, avaliamos se a indução da PDI poderia alterar a expressão de marcadores de diferenciação, analisamos a expressão de calponina, smoothelina e α -actina nas VSMC- PDI^{TetON} L4:4. De fato, a indução sustentada de PDI (t>48h) aumentou a expressão destes três marcadores (Fig. 19). A expressão do marcador de proliferação celular (PCNA) não foi alterada. Na linhagem VSMC-PDI^{TetON} L8:8 não observamos alterações na expressão de PCNA ou calponina com 48h de doxíciclina (dados não mostrado).

Figura 19: Superexpressão da PDI aumenta expressão de marcadores de diferenciação em VSMC^{tetON} L4:4. como alfa actina, calponina e smothelina (marcadores de diferenciação celular), enquanto diminui a expressão de PCNA (marcador de proliferação celular).

Para entendermos se esta alteração fenotípica durante a indução da expressão da PDI em VSMC ocorre de maneira dependente da produção de oxidantes, utilizamos catalase para diminuir a concentração intracelular de H_2O_2 durante a indução de PDI. A catalase quando adicionada ao meio de cultura por tempos maiores que 4h, é endocitada (REF.) Catalase (500U/ml) foi adicionada 4h antes da indução de expressão de PDI por doxiciclina. Os resultados demonstram que a presença da catalase durante a superexpressão da PDIA1 inibiu o aumento da expressão de calponina e α -actina (Fig. 20).

Figura 20: Catalase foi capaz de inibir o efeito de aumento da expressão de Calponina (marcador de diferenciação celular) em VSMC^{tetON} estimuladas com doxiciclina em diferentes tempos de exposição (1500ng/ml).

5. A perda de função da PDI induz espontaneamente aumento de PCNA

Dados de perda de função da PDI em cultura primária de células musculares lisas vasculares (por transfecção com siRNA) corroboram com os dados obtidos nas VSMC-PDI^{TetON}L4:4. Após 72h de silenciamento, a expressão de calponina diminuiu enquanto a expressão de PCNA aumentou, comparando-se às células transfectadas com siRNA controle (*scrambled*) (Fig. 21).

Figura 21: Silenciamento da PDI aumenta expressão de marcadores de proliferação (PCNA) em VSMC primária enquanto diminui a expressão de marcadores de diferenciação celular (Calponina). Células musculares lisas vasculares primárias isoladas da aorta de coelhos foram silenciadas para PDI (ou transfectadas com scrambled siRNA; 50nM por 72h). Expressão de PCNA aumentou enquanto a expressão de Calponina diminuiu, beta actina foi utilizada como controle positivo. (n=4 *p>0,05)

5. Discussão

O presente trabalho demonstrou que a PDI superexpressa em VSMC induz a produção de oxidantes e a ativação da NADPH oxidase de maneira transiente, possivelmente pelas isoformas Nox1 e Nox4 da NADPH oxidase, apesar de outras não podermos descartar a contribuição de outras fontes geradoras de oxidantes (como NOS desacoplada). A superexpressão da PDI aumenta a migração espontânea e, quando sustentada, altera características fenotípicas em VSMC para um estado mais diferenciado, observado pela diminuição do número de células, células mais alongadas e pelo aumento da expressão de calponina e α -actina (marcadores de diferenciação celular).

Através do modelo de superexpressão indúzível de PDI (VSMC-PDI^{TetON}) confirmamos os resultados obtidos previamente com a transfecção transiente da PDI de que a superexpressão aguda da PDI aumenta a produção de superóxido intracelular e produção de H₂O₂ extracelular além de aumentar a atividade da Nox (Fernandes et al. 2009). Por usarmos um modelo de superexpressão indúzível, observamos que a geração de oxidantes é transiente. De fato, quando na superexpressão crônica da PDI (Fig. 5) não observamos mais aumento da produção de superóxido intracelular nem aumento da atividade da NADPH oxidase. No modelo de indução de superexpressão de PDI, a produção de oxidantes foi diminuída pelos inibidores de Nox1/4 GKT136901 (Drummond et al., 2000) e pelo peptídeo NoxA1ds (que previne a montagem da NoxA1 Ranayhossaini DJ et al 2013), sugerindo que Nox1 é ativada, similarmente aos dados de superexpressão transiente (Fernandes et al, ABB 2009). Nossos resultados também sugerem indução de outras fontes de geração de superóxido durante a superexpressão de PDI, particularmente a oxido nítrico sintase desacoplada. A confirmação da participação da NOS neste modelo teria que ser feita por análise de expressão da mesma (proteína ou mRNA) já que a NOS desacoplada contribui para a produção de superóxido no ensaio de fração enriquecida de membrana incubada com NADPH (atividade da NADPH oxidase; Rezende et al., 2015; Laurindo et al., 2008).

Considerando que o anion superóxido é o oxidante primário, e que o superóxido é gerado através da ativação da Nox e da NOS desacoplada em VSMC-PDI^{TetON}, foi inesperado o comportamento temporal de H₂O₂ comparado com a produção de superóxido intracelular (Fig. 13). Enquanto o pico de superóxido foi obtido com 48h após indução de PDI, o máximo de produção de H₂O₂ foi observado

após 24h. Este resultado pode refletir alguma ativação de fonte de superóxido/ H_2O_2 antes de 24h de indução de PDI que foi perdida no nosso desenho experimental e/ou em consequência da privação de soro fetal bovino, procedimento realizado apenas para a avaliação de H_2O_2 extracelular (24h de carenciamento).

Não observamos produção de oxidantes em VSMC-PDI^{TetON} L8:8, assim como não houve aumento da atividade da NADPH oxidase, enquanto esta linhagem apresentou maior migração espontânea e fosforilação da Src, ambos eventos redox sensíveis. De fato, Src é (pelo menos em parte) ativada por ROS que levam à formação de uma ponte dissulfeto entre C245 e C487 (Giannoni and Chiarugi ARS 2014). Talvez a produção de oxidantes foi perdida por causa do desenho experimental, cujo dado temporal inicial foi com 24h após indução de PDI. Entretanto, em L8:8 não houve aumento de oxidantes após estímulo com angiotensina II (fig11, 12 e13), podendo ser uma consequência da maior titulação com de lentivirus para produzir esta linhagem (em comparação com L4:4), e a linhagem L8:8 desta forma apresentar menor regulação de sistemas de geração de oxidantes e/ou uma superativação de sistemas antioxidantes.

A geração de oxidantes por ambas NADPH oxidase, Nox1 e Nox4, é essencial para a migração de VSMC. Nox1 é ativada na linha de frente das células durante a migração por Rac GTPase, através da ativação da fosfatase SSH1L e oxidação de 14-3-3, despolimerização dos filamentos de actina que resultam em protusões de lamellipodia e aumentam a migração (Brown and Griendling, 2015). Nox4 (e seu parceiro Poldip2) mantém a estabilidade das adesões focais durante a migração de VSMC; Nox4 é ativado por GTPase Rho para manter a produção de H_2O_2 em adesões focais, necessário para sua formação (Datla et al., AJP 2014). Demonstramos previamente que o silenciamento de PDI diminuiu migração de VSMC induzida por PDGF enquanto que a superexpressão de PDI transiente causou um leve aumento na migração em VSMC não estimuladas (Pescatore et al., 2012). Nossos dados pelo método de migração de célula única confirmaram maiores distâncias totais percorridas nas VSMC-PDI^{TetON} induzida por doxiciclina, porém sem alterações no parâmetro de persistência. Estes resultados podem refletir o efeito do complexo GTPases durante a migração de VSMC, já que PDI possivelmente interage com GTPases como RhoGDI para suportar ativação de Rac1 e RhoA durante migração de VSMC (Pescatore et al., 2012). A atividade de GTPases (Rac1, RhoA, RhoGDI) durante a superexpressão da PDI é uma questão em aberto.

A superexpressão de PDI altera o fenótipo celular de VSMC de um estado mais proliferativo para um estado mais diferenciado, baseado nos resultados obtidos no modelo de superexpressão de PDI induzível e também no modelo de perda de função da PDI (fig.21). O mecanismo pelo qual PDI altera o fenótipo celular ainda não está estabelecido, porém podem envolver a atuação direta da PDI na reorganização do citoesqueleto por troca de pontes dissulfeto na β -actina (Sobierajska et al., 2014), ou via associação com GTPases (Pescatore et al., 2012), e/ou via ativação da Nox4, isoforma importante para a manutenção do fenótipo celular mais diferenciado (Clempus ATVB 2007). De fato, a manutenção do fenótipo celular mais contrátil/diferenciado se dá em tempos mais longos de superexpressão de PDI, após 72h na presença de doxíciclina (1.5 μ g/mL), para marcação de calponina, smothelina e α -actina. Observamos neste trabalho que a presença de oxidantes é essencial para a manutenção do fenótipo diferenciado já que a presença da catalase no meio de cultura nos mesmos tempos de estímulo de doxíciclina aboliu o aumento estimulado pela superexpressão da PDI. Uma pergunta extremamente importante neste modelo é identificar qual/quais isoforma(s) da Nox são induzidas e contribuem para a alteração fenotípica.

Os dados preliminares de marcação por imunofluorescência do fator de transcrição Nrf2 demonstram que durante a indução da PDI VSMCtetON há maior expressão protéica, com marcação difusa pela célula, característica de localização citoplasmática. Aparentemente também ocorre intensificação da marcação nuclear após indução da PDI. Sob condições homeostáticas, Nrf2 é negativamente regulado por Kelch-like ECH associated protein 1 (Keap1) citoplasmático. A fina regulação do sistema Keap1-Nrf2 é uma poderosa defesa antioxidante celular e mais recentemente tem sido demonstrado contribuir para o controle da biodisponibilidade de substrato energético para a respiração mitocondrial. Nrf2 se liga a seqüências específicas de elementos de resposta antioxidante (AREs) presentes em regiões promotoras dos seus genes alvos, como heterodímeros com small Maf protein, e estimula transcrição de proteínas antioxidantes (Abramov A, et al 2015). Lee et al 2016 publicou recentemente, em um modelo de cultura de célula tronco mesenquimal, que a manutenção sustentada de NRF2 nuclear mantém o estado de de-diferenciação celular, e que o estado de não diferenciação celular pode ser mantido por ambiente de hipoxia, mimetizado pela sinalização de NRF2-HIF1 α . Ou seja, a manutenção de Nrf2 nuclear tem papel

importante na regulação de senescência celular e perda de multipotencialidade celular durante passagens prolongadas em cultura primária no modelo de célula tronco mesenquimal. No nosso caso, o aumento precoce de Nrf2 pode ser uma resposta adaptativa ao aumento de oxidantes pela indução da PDI, para inibir o aumento da migração e induzir Nox4, isoforma da NADPH oxidase necessária para a indução do fenótipo diferenciado em VSMC. Ainda, a indução de ativação de Nrf2 leva ao aumento da quantidade total de glutathiona reduzida na célula. C.J. Harvey, 2009. Para tal experimentos de silenciamento de Nrf2 nas VSMC-PDI^{TetON} poderiam elucidar estas vias propostas. Ainda, deixamos em aberto a interessante especulação sobre uma possível interação redox entre PDI e Keap1 que regularia a atividade de Nrf2 em VSMC.

Figura 22: Marcação por Western Blot e imunofluorescência do fator de Transcrição Nrf2 em VSMC-PDI^{TetON} estimuladas com doxiciclina (24h, 48h, 72h;

1500ng/ml) e a quantificação de glutathione reduzida no homogenato celular. A) o homogenato celular foi incubado na presença do anticorpo anti-Nrf2 (AbCam 1:1000) e uma banda identificada em aproximadamente 68KDa, altura esperada para a marcação de Nrf2 anticorpo policlonal AbCam. Os homogenatos foram normalizados pela marcação da beta actina. B) As células foram fixadas com PFA4% por 30'. Após bloqueio e permeabilização, as proteínas Nrf2 foram marcadas com anti-Nrf2 (1:200, t=16h). Estas células foram previamente tratadas com doxíciclina 1,5mg/mL em diferentes tempos. Hoesch foi utilizado para a marcação nuclear e a fase foi utilizada para demarcação da extensão celular. Os dados foram analisados em Microscopia Confocal invertido com um aumento de 63x. C) o total de glutathione avaliado no homogenato após a indução de PDI, mensurado por DTNB assay (N=6, *P<0.05 vs. 0h) Total reduced glutathione in VSMC homogenates after PDI induction, measured by DTNB assay (N=6, *P<0.05). As células estimuladas foram comparadas com o controle sem a presença de doxíciclina.

7. Anexos

Superexpressão da PDI em VSMC pode ativar de maneira transiente o receptor de Angiotensina II AT1R

Demonstramos previamente que a transfecção transiente feita por vetor plasmidial (modelo VSMC-PDI24h que aumenta cerca de 2,5 vezes a expressão da PDI quando comparada com a células transfectada com o plasmídeo controle, empty vector) induz expressão da RNA mensageiro da Nox1 (e não da Nox4), e ativa a NADPH oxidase nos mesmos níveis de ativação por AngiotensinaII (Fernandes et al., 2009). Sendo assim, hipotetizamos que a superexpressão da PDI pode ativar o receptor de angiotensina II (AT1R), o qual contém uma ponte dissulfeto extracelular. A redução desta ponte dissulfeto faz com que o receptor apresente uma atividade alterada, constitutiva e de baixa afinidade com o agonista clássico Angiotensina II (Correa et al., 2006). Em aorta de coelho VSMC-PDI24h observamos que inibidores do receptor AT1R, como losartan, em baixas concentrações ($<1\mu\text{M}$) diminuem a produção extracelular de peróxido de hidrogênio aumentada durante a superexpressão da PDI (fig23), assim como a produção de superóxido intracelular (dado não demonstrado). Estes resultados sugerem que AT1R pode ativar de maneira transiente o receptor de AT1 durante a superexpressão de PDI. Entretanto, quando estas células foram selecionadas para originar uma linhagem de células que superexpressam cronicamente PDI (modelo VSMC-PDI ∞ , aumenta cerca de 2.5x a expressão da PDI quando comparada ao basal, Fig. 24), nós não observamos aumento da atividade da NADPH oxidase quando comparado à VSMC basal, assim como não alterou os níveis de produção de superóxido intracelular. Fosforilação da ERK1/2 é uma marca “downstream” da ativação do receptor de AT1, a qual pode ser fosforilada por mecanismos dependentes ou independentes de protein G elucidada por AT1R (Barauna et al., 2013). Embora VSMC-PDI24h demonstrou maiores níveis de fosforilação quando comparada aos níveis das células no basal, inibidores do AT1R não alteraram pERK (Fig. 23). Interessantemente, pERK também está aumentada em VSMC-PDI ∞ (modelo crônico) quando comparada à VSMC no basal (Fig. 24).

Considerando que fosforilação da ERK1/2 está aumentada em ambos os modelos de expressão da PDI, de maneira independente da produção de oxidantes, nós decidimos não seguir com a investigação da pERK1/2 nos experimentos futuros.

Dado o efeito de inibidores do AT1R inibirem o aumento da produção de oxidants mediado pela superexpressão da PDI em VSMC-PDI24h, investigamos se PDI poderia

interagir fisicamente com AT1R. Usando anticorpos contra o epítipo anti-AT1R e um anti-PDI, observamos uma forte co-localização entre PDI e AT1R (fig 27). Porém anticorpos contra AT1R são conhecidos por produzir artefatos (Elliott et al., 2013; Herrera et al., 2013). Tendo em vista a dificuldade de marcação do receptor, optamos por superexpressar o AT1R através de um plasmídio (AT1R ligado à cauda GFP; Chen et al., 2006), de forma transiente, em VSMC, VSMC-PDI24h or VSMC-PDI ∞ . Entretanto, não fomos capazes de encontrar nenhum vestígio de colocalização utilizando AT1R-GFP (Fig. 27 e Tabela 1). Por imunoprecipitação, (IP:GFP, WB:PDI ou vice-versa), novamente não observamos interação física entre estas proteínas (dado não demonstrado). Para confirmar estes dados de não interação entre as duas proteínas PDI/AT1R em VSMC, um modelo de ativação do AT1R independente do agonista clássico, mediado por estímulo mecânico (laminar shear stress) também foi testado. Células de ovário de hamster chinês (CHO) foram transfectadas e em seguida selecionadas, formando assim uma linhagem de células que expressam o receptor AT1, tendo em vista que esta linhagem celular (CHO) não expressa nem o receptor, nem as enzimas produtoras de oxidants (NADPH oxidases). Células CHO-AT1R foram submetidas à shear stress laminar agudo (10min) levando ao aumento da fosforilação de ERK1/2 lidando com a ativação mecânica de AT1R (baseada em uma alteração conformacional da estrutura do receptor) comparada com CHO (que não expressa o AT1R, Barauna et al., 2013). Como esperado, a perda de função da PDI através do tratamento com siRNA não alterou a fosforilação da ERK1/2 mediada pela mecanoativação do receptor em células CHO-AT1R (Fig 28).

Apesar dos dois modelos de superexpressão da PDI (transiente e crônico) terem contribuído potencialmente para entender o mecanismo de ativação do AT1R, consequente ativação da NADPH oxidase e produção de oxidantes, ambos modelos possuem importantes limitações. O modelo crônico VSMC-PDI ∞ , possivelmente lida com uma adaptação, e por isso não leva ao aumento da atividade da NADPH oxidase e nem a produção de oxidantes (Fig 24) enquanto VSMC-PDI24h limita o nosso estudo a tempos de superexpressão da PDI de no máximo 48h quando a expressão de PDI-myc começa a decair (dado não demonstrado).

Sendo assim, desenvolvemos um modelo induzível de superexpressão da PDI para analisar temporalmente os efeitos da superexpressão da PDI em células musculares lisas vasculares.

Table1: Immunofluorescence conditions tested for analyzes of eventual AT1R-GFP and PDI co-localization in VSMC.

PDI staining (anti-PDI)	AT1R staining	Co-localization PDI/AT1R?	Immunofluorescence protocol
endogenous PDI (VSMC)	anti-GFP antibody (Invitrogen)	No	4% PFA (10') + 0.01%NP40 (30' at 37°C)
endogenous PDI (VSMC)	GFP fluorescence	No	4% PFA (10') + 0.01% NP40 (30' at 37°C)
wtPDI overexpressed in VSMC (VSMC-PDI ^{24h})	GFP fluorescence	No	4% PFA (10') + 0.01% NP40 (30' at 37°C)
endogenous PDI (VSMC)	GFP fluorescence	No	4% PFA (10') +0.001% NP40 (30' at 37°C)
wtPDI overexpressed in chronic VSMC-PDI ^{24h} model	GFP fluorescence	No	4% PFA (10') + 0.01% NP40 (30' at 37°C)
endogenous PDI (CHO)	GFP fluorescence	No	4% PFA (10') + 0.01% NP40 (30' at 37°C)

Fig23 produção de peróxido de hidrogênio e fosforilação da ERK1/2 na presença ou ausência de Losartan (10, 100nM O/N) em VSMC-PDI^{24h}.

Fig24 Atividade NADPH oxidase, produção de superóxido intracelular e fosforilação da ERK1/2 no modelo crônico de superexpressão da PDI (VSMC-PDI[∞])

A.

Fig25 Marcação da PDI (ab anti-PDI Stressgen) e AT1R –GFP (autofluorescente) em VSMC no modelo agudo e crônico.

Fig26 Silenciamento de PDI em CHO-AT1R e mecanoativação do AT1R na condição de presença ou ausência do siRNA PDI, verificada através da fosforilação de ERK1/2

8. Referências bibliográficas

Ambasta RK¹, 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. Epub 2004 Aug 18.

Barauna VG, Mantuan PR, Magalhães FC, Campos LC, Krieger JE. AT1 receptor blocker potentiates shear-stress induced nitric oxide production via modulation of eNOS phosphorylation of residues Thr(495) and Ser(1177.). *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Nov 29;441(4)

C.J. Harvey, R.K. Thimmulappa, A. Singh, D.J. Blake, G. Ling, N. Wakabayashi, J. Fujii, A. Myers, S. Biswal. Nrf2-regulated glutathione recycling independent of biosynthesis is critical for cell survival during oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.10.040>, 2009.

Brown DI, Griendling KK. Regulation of signal transduction by reactive oxygen species in the cardiovascular system. *Circ Res*. 2015 Jan 30;116(3):531-49. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.303584. Review.

Buonassisi V, Venter JC. Hormone and neurotransmitter receptors in an established vascular endothelial cell line. 1976 *Proc Natl Acad Sci USA* 73(5):1612-6.

Chen K, Detwiler TC, Essex DW. 1995. Characterization of protein disulphide isomerase released from activated platelets. *Br J Haematol*, 90:425-431.

Choi H, Leto TL, Hunyady L, Catt KJ, Bae YS, Rhee SG. Mechanism of angiotensin II-induced superoxide production in cells reconstituted with angiotensin type 1 receptor and the components of NADPH oxidase. 2008 *J Biol Chem* 283(1):255-67.

Clempus RE, Sorescu D, Dikalova AE, Pounkova L, Jo P, Sorescu GP, Schmidt HH, Lassègue B, Griendling KK. Nox4 is required for maintenance of the differentiated vascular smooth muscle cell phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 Jan;27(1):42-8. Epub 2006 Nov 2.

Datla SR, McGrail DJ, Vukelic S, Huff LP, Lyle AN, Pounkova L, Lee M, Seidel-Rogol B, Khalil MK, Hilenski LL, Terada LS, Dawson MR, Lassègue B, Griendling KK. Poldip2 controls vascular smooth muscle cell migration by regulating focal adhesion turnover and force polarization. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2014

DS Yoon¹, Y Choi^{1,2} and JW Lee. Cellular localization of NRF2 determines the self-renewal and osteogenic differentiation potential of human MSCs via the P53 SIRT1 axis *Cell Death and Disease* (2016) 7, e2093; doi:10.1038/cddis.2016.3

Dikalova A, Clempus R, Lassègue B, Cheng G, McCoy J, Dikalov S, San Martin A, Lyle A, Weber DS, Drummond GR, Selemidis S, Griendling KK, Sobey CG. Nox1 overexpression potentiates angiotensin II-induced hypertension and vascular smooth muscle hypertrophy in transgenic mice. *Nat Rev Drug Discov.* 2011 Jun;10(6):453-71. doi: 10.1038/nrd3403.

Elliott KJ, Kimura K, Eguchi S. Lack of specificity of commercial antibodies leads to misidentification of angiotensin type-1 receptor protein. *Hypertension.* 2013 Apr;61(4):e31. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.00943. 2013

Espinosa-Diez C, Miguel V, Mennerich D, Kietzmann T, Sánchez-Pérez P, Cadenas S, Lamas S. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biol.* 2015 Jul 21;6:183-197. doi: 10.1016

Fernandes DC, Manoel AH, Wosniak J Jr, Laurindo FR. Protein disulfide isomerase overexpression in vascular smooth muscle cells induces spontaneous preemptive NADPH oxidase activation and Nox1 mRNA expression: effects of nitrosothiol exposure. *Arch Biochem Biophys* 2009 484:197-204.

Fernandes, DC, Wosniak J, Pescatore LA, Liberman M, Bertoline, MA, Laurindo FRM, Santos CXC. Analysis of DHE-derived oxidation products by HPLC in the assessment of superoxide production and NADPH oxidase activity in vascular systems. 2007 *Am J Physiol* 292:C413-C422.

Furie R, Petri MA, Strand V, Gladman DD, Zhong ZJ, Freimuth WW; BLISS-52 and BLISS-76 Study Groups. Clinical, laboratory and health-related quality of life correlates of Systemic Lupus Erythematosus Responder Index response: a post hoc analysis of the phase 3 belimumab trials. *Lupus Sci Med*. 2014 Jun 26;1(1):e000031. doi: 10.1136/lupus-2014-000031. eCollection 2014.

Giannoni E, Chiarugi P. Antioxid Redox Signal. Redox circuitries driving Src regulation. 2014 May 1;20(13):2011-25. doi:10.1089/ars.2013.5525. Epub 2013 Sep 20. Review.

Herrera M, Sparks MA, Alfonso-Pecchio AR, Harrison-Bernard LM, Coffman TM. Response to lack of specificity of commercial antibodies leads to misidentification of angiotensin type-1 receptor protein. 2013 *Hypertension*.

Hilenski LL, Clempus RE, Quinn MT, Lambeth JD, Griendling KK. Distinct subcellular localizations of Nox1 and Nox4 in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004 Apr;24(4):677-83. Epub 2003 Dec 11.

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. 2005 *J Biol Chem*. 280:40813-40819

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. *Arterioscler Thromb Vasc* 2004

Lassègue B, Sorescu D, Szöcs K, Yin Q, Akers M, Zhang Y, Grant SL, Lambeth JD, Griendling KK. Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells : nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. 2001 *Circ Res* 88(9):888-94

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, Fernandes DC, Santos CX. Assessment of superoxide production and NADPH oxidase activity by HPLC analysis of dihydroethidium oxidation products. *Methods Enzymol*. 2008;441:237-60. doi: 10.1016/S0076-6879(08)01213-5. Review.

Lee MY, San Martin A, Mehta PK, Dikalova AE, Garrido AM, Datla SR, Lyons E, Krause KH, Banfi B, Lambeth JD, Lassègue B, Griendling KK. Mechanisms of vascular smooth muscle NADPH oxidase 1 (Nox1) contribution to injury-induced neointimal formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009

Mehta PK, Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. 2007 *Am J Physiol Cell Physiol* 292(1):C82-97.

Minyoung Lee, Alejandra San Martín, Alejandra Valdivia, Abel Martin-Garrido, Kathy K. Griendling*, Nox4 and Palladin Regulation of MRTF-A Phosphorylation. *PlosONE*, 2016

Montezano AC, Tsiropoulou S, Dulak-Lis M, Harvey A, Camargo Lde L, Touyz RM. Redox signaling, Nox5 and vascular remodeling in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2015 Sep;24(5):425-33. doi: 10.1097/MNH.000000000000153. Review.

Nishimoto T, Furuta M, Kataoka M, Kishida M. Important role of catalase in the cellular response of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* exposed to ionizing radiation. *Curr Microbiol*. 2015 Mar;70(3):404-7. doi: 10.1007/s00284-014-0733-2. Epub 2014 Nov 22.

Pagano PJ, Griendling KK, Miller FJ, Laurindo FR, Touyz RM. Chemiluminescence and the Nox1-Nox2-Nox4 Triple Knockout. *Antioxid Redox Signal*. 2015 Nov 20;23(15):1246-7. doi: 10.1089/ars.2015.6382. Epub 2015 Jul 14. No abstract available.

Paes AM, Veríssimo-Filho S, Silva ACB, 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 Leukocyte Biol* 2010.

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. 2012 *J Biol Chem* 287: 29290- 300.

Ranayhossaini DJ1 MT, Romero G, Pagano PJ. Selective recapitulation of conserved and nonconserved regions of putative NOXA1 protein activation domain confers isoform-specific inhibition of Nox1 oxidase and attenuation of endothelial cell migration. *J Biol Chem*. 2013

Raturi A, Mutus B. Characterization of redox state and reductase activity of protein disulfide isomerase under different redox environments using a sensitive fluorescent assay. *Free Radic Biol Med*. 2007 Jul 1;43(1):62-70. Epub 2007 Mar 31

Rodriguez AI, Sahoo S, Chen BB, Mallampalli RK, Kelley EE, Csanyi G, Gladwin Shao J, Nangaku M, Inagi R, Kato H, Miyata T, Matsusaka T, Noiri E, Fujita T. J Hypertens. 2007 Aug;25(8):1643-9.

SAA Correa, Pignatari GC, Ferro ES, Pacheco NAS, Costa-Neto CM, Pesquero JB, Oliveira L, Paiva ACM and Shimuta SI. Role of the Cys18-Cys274 disulfide bond and of the third extracellular loop in the constitutive activation and internalization of angiotensin II type 1 receptor. 2006 Regulatory Peptides 134 :132-140.

Sadok A, Bourgarel-Rey V, Gattacceca F, Penel C, Lehmann M, Kovacic H. Nox1-dependent superoxide production controls colon adenocarcinoma cell migration. 2008 Biochim Biophys Acta.1783:23-33.

Santos CX, Stolf BS, Takemoto PV, Amanso AM, Lopes LR, Souza EB, Goto H, Laurindo FR. Protein disulfide isomerase (PDI) associates with NADPH oxidase and is required for phagocytosis of *Leishmania chagasi* promastigotes by macrophages. J Leukocyte Biol 2009a 86:989-98.

Serrander L, Cartier L, Bedard K, Banfi B, Lardy B, Plastre O, Sienkiewicz A, Fórró L, Schlegel W, Krause KH. NOX4 activity is determined by mRNA levels and reveals a unique pattern of ROS generation. Biochem J. 2007 Aug 15;406(1):105-14.

Stjepana Kovac,^{a,b} Plamena R. Angelova,^a Kira M. Holmström,^{a,1} Ying Zhang,^b Albena T. Dinkova-Kostova,^{c,d,□,2} and Andrey Y. Abramov Nrf2 regulates ROS production by mitochondria and NADPH oxidase Biochim Biophys Acta. 2015 Apr; 1850(4): 794–801.

Sundaresan V, Chartron J, Yamaguchi M, Stout CD. Conformational diversity in NAD(H) and interacting transhydrogenase nicotinamide nucleotide binding domains. *J Mol Biol.* 2005 Feb 18;346(2):617-29. Epub 2004 Dec 30

Takac I, Schröder 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 Nox4. *J Biol Chem.* 2011 Apr 15;286(15):13304-13. doi: 10.1074/jbc.M110.192138. Epub 2011 Feb 22

Tiscornia G, Singer O, Verma IM. Production and purification of lentiviral vectors. *Nat Protoc.* 2006;1(1):241-5.

Touyz RM, Briones AM, Sedeek M, Burger D, Montezano AC. NOX isoforms and reactive oxygen species in vascular health. *Mol Interv.* 2011 Feb;11(1):27-35. doi: 10.1124/mi.11.1.5. Review.

Takac I, Schröder K, Zhang L, Lardy B, Anilkumar N, Lambeth JD, Shah AM, Morel F, Brandes RP. *J Biol Chem.* The E-loop is involved in hydrogen peroxide formation by the NADPH oxidase Nox4. 2011 Apr 15;286(15):13304-13. doi: 10.1074

Weiss D, Taylor WR, Schmidt HH, Owens GK, Lambeth JD, Griendling KK. Nox1 overexpression potentiates angiotensin II-induced hypertension and vascular smooth muscle hypertrophy in transgenic mice. 2005 *Circulation* 112(17):2668-76.