UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Estudo da S-nitrosação de Ras e participação
das MAP quinases (ERK, JNK e p38) na apoptose de
células THP-1 induzida por
óxido nítrico

Maristela Tsujita

Dissertação para obtenção do grau de
Mestre

Orientador:
Prof. Dr. Hugo Pequeno Monteiro

São Paulo
2004

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Tsujitã, Maristela
T882e Estudo da S-nitrosação de Ras e participação das MAP
quinases (ERK, JNK e p38) na apoptose de células THP-1
induzida por óxido nítrico / Maristela Tsujitã. -- São
Paulo, 2004.
118p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Monteiro, Hugo Pequeno

1. Bioquímica clínica : Medicina 2. Apoptose : Patologia
I. T. II. Monteiro, Hugo Pequeno, orientador.

616.0756 CDD

Maristela Tsujita

Estudo da S-nitrosação de Ras e participação das MAP quinases
(ERK, JNK e p38) na apoptose de células THP-1 induzida por
óxido nítrico

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Hugo Pequeno Monteiro
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____.

Com todo o meu amor, à minha mãe Maria José, irmão Carlinhos e meu
esposo Dominique pelo admirável incentivo.

“ E todo o impulso é cego, exceto quando há saber.

E todo saber é vão, exceto quando há trabalho.

E todo trabalho é vazio, exceto quando há amor.”

Gibran Khalil Gibran

AGRADECIMENTOS

Agradeço

Ao meu orientador Dr. Hugo Pequeno Monteiro, pela oportunidade de realização deste trabalho e por contribuir para o meu crescimento científico.

À Dra. Beatriz Beitler de Maurino, chefe do departamento de Imunopatologia da Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo, o meu especial agradecimento pela oportunidade e confiança em mim depositados. O seu incentivo para o meu desenvolvimento científico foi fundamental em todos os momentos. Sinto-me honrada por fazer parte de sua equipe de trabalho e compartilhar de sua amizade.

À Dra. Primavera Borelli do Laboratório de Hematologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, por incentivar e estar presente em meu desenvolvimento científico desde a graduação. Os seus ensinamentos me estimularam a continuar em busca de novos desafios.

Ao Dr. José Ernesto Belizario do Instituto de Ciências Biomédicas da USP sempre solícito e gentil em esclarecer minhas dúvidas experimentais.

À Sueli Satiko Ioguy do Laboratório de Imunopatologia que me ensinou os princípios da citometria de fluxo. A realização deste trabalho, principalmente a etapa final que exigiu minha ausência da rotina só foi possível graças a sua colaboração.

Ao Roberto Jun Arai pelas horas despendidas nas discussões de resultados. O seu conhecimento técnico e amizade foram preciosos para o desenvolvimento deste trabalho.

À Enny Fernandes Silva, por ter me recebido no laboratório de maneira tão amiga e me ensinar muitos de seus conhecimentos. A sua alegria e incentivo são contagiantes.

Ao Victor Debbas pela ajuda em muitos princípios experimentais e pelo companheirismo ímpar de sua pessoa.

Ao Carlos Jorge de Oliveira pela contribuição técnica e palavras de sabedoria, necessários nos momentos mais árduos.

À Marli Curcio, Miriam Moraes e Moacir Cernelós colegas de bancada que compartilharam muitas discussões de resultados.

Ao Alípio Carmo de Oliveira do Hospital Albert Einstein pelo suporte técnico e incentivo em todos os momentos.

Ao professor Henry Stuker pelo profissionalismo e dedicação ao ensino da Estatística.

Ao professor e amigo Jamilson Alves da Silva pela correção ortográfica.

Ao Juliano Rocha de Oliveira sempre presente quando precisei recorrer a seus conhecimentos de informática.

À Dra. Juliana Pereira e Dra. Gracia Martinez do Laboratório de Imunopatologia pelo incentivo em todos os momentos de realização deste trabalho.

À Izabel Eiko Tutiya do Laboratório de Imunopatologia pelos ensinamentos de citometria de fluxo, Lucilla Gonçalves Viana e Nádia Shigueoka que acompanharam todo o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Francisco Laurindo e toda a equipe do Laboratório de Biologia Vascular do Incor; Fernanda, João, Marcel, Célio pela acolhida imprescindível para a realização experimental e finalização deste trabalho.

À Dra. Sônia Jancar Nigro e Dra. Fátima Ribeiro Dias do Laboratório de Imunofarmacologia do Instituto de Biociências que proporcionaram o início de minha trajetória científica.

À Solange Lúcia Blatt pelo incentivo e sugestões para a finalização deste trabalho. Além da mais preciosa das contribuições, sua amizade.

Ao querido Dominique por ter acompanhado e incentivado pacientemente o desenvolvimento deste trabalho.

À Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo pela oportunidade de realização deste trabalho.

Lista de abreviaturas

Lista de símbolos

Lista de figuras e gráficos

Resumo

Summary

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1	Vias de sinalização celular	2
1.2	MAP quinases	6
1.3	Apoptose	8
1.4	O óxido nítrico	13
1.4.1	Efeitos pró-apoptóticos do NO	14
1.4.2	Inibição da cadeia respiratória	14
1.4.3	Ativação de caspases	15
1.4.4	Ativação das MAP quinases	15
1.5	S-nitrosação	16
1.5.1	Importância da S-nitrosação em sistemas biológicos	19
1.5.2	S-nitrosação de Ras	20
2.	OBJETIVOS	22
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1	Materiais	25
3.2	Métodos	28
3.2.1	Cultura celular	28
3.2.2	Ensaio de viabilidade celular	29
3.2.3	Reação Hoechst 33258	29
3.2.4	Ensaio Anexina/PI	30
3.2.5	Amplificação dos plasmídeos	
	vetores pcDNA-H-ras ^{W.t.} e pcDNA-H-ras ^{C118S}	30

3.2.6	Purificação dos plasmídeos pcDNA-H-ras ^{Wt} e pcDNA-H-ras ^{C118S}	31
3.2.7	Transfecção das células THP-1	31
3.2.8	Preparação de GST-RBD	32
3.2.9	Lisado de proteínas totais	33
3.2.10	Precipitação de GST-RBD	33
3.2.11	Reações de Western blot	34
3.2.11.1	Western blot para Ras e Ras-GTP.....	35
3.2.11.2	Western blot para ERK e pERK	35
3.2.11.3	Western blot para JNK e pJNK.....	36
3.2.11.4	Western blot para p38 e pp38.....	36
3.2.11.5	Western blot para caspase-3.....	37
3.3	Análise estatística.....	39
4.	RESULTADOS	39
4.1	Ensaio de viabilidade das células THP-1 incubadas com diferentes concentrações de SNOG	40
4.2	Avaliação morfológica das células THP-1 incubadas com SNOG1mM	41
4.3	Exposição de fosfatidilserina nas células THP-1 incubadas com SNOG1mM	46
4.4	Ativação de caspase-3 durante o processo de apoptose induzido por SNOG1mM	49
4.5	Digestão dos plasmídeos p21Ras ^{C118S} e p21Ras ^{Wt}	50
4.6	Cinética de ativação da proteína Ras	53
4.7	Avaliação da atividade de Ras em células THP-1 transfectadas com plasmídeos p21Ras ^{C118S} e p21Ras ^{Wt}	54

4.8	Comparação da morte celular entre as Células parental, p21Ras ^{C118S} e p21Ras ^{Wt}	55
4.9	Evidência da participação da S-nitrosação de Ras no processo de apoptose induzida por NO.....	56
4.10	Participação das MAP quinases no processo de apoptose induzida por NO nas células parentais.....	57
4.11	Ativação das MAP quinases ERK, JNK e p38 nas células transfectadas com os plasmídeos p21Ras ^{C118S} e p21Ras ^{Wt}	61
4.12	Dependência da via MAPquinase-ERK no processo de apoptose	65
4.13	Independência da via JNK no processo de apoptose.....	67
4.14	Independência da via p38 no processo de apoptose.....	69
5.	DISCUSSÃO	72
6.	CONCLUSÕES	88
7.	ANEXOS	90
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102

LISTA DE ABREVIATURAS

Apaf-1	Fator ativador da apoptose 1
B.D	Becton e Dickinson
BAD	Proteína promotora de morte associada Bcl-2/Bcl-x _L
Bax	Proteína X associada a Bcl-2
BH	Domínios homólogos de Bcl-2
Cdk	Ciclina dependente de quinase
Cdkl	Proteína inibidora do complexo ciclina-Cdk
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
<i>ced</i>	Gene relacionado com a morte celular descrito no nematódeo <i>Caenorhabditis elegans</i>
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DR	Receptores de morte
ERK	Quinase regulada por estímulo extracelular
FADD	Domínio de morte associado a Fas
FAK	Quinase de adesão focal
FAS/ APO-1	Proteína Fas/ APO-1
FasL	Ligante de Fas
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GAP	Proteína ativadora de GTPase
GDP	Guanosina difosfato
GEF	Fator trocador do nucleotídeo guanosina
GMP	3'5'-monofosfato de guanosina
Grb2	Proteína adaptadora de Sos
GTP	Guanosina trifosfato
IAP	Proteína inibidora da apoptose
Ig	Imunoglobulina

INF- γ	Interferon γ
JNK	Quinase ativada por estresse
MAP	Proteína quinase ativada por mitógeno
MAT	Metionina-adenosina-transferase
MEKK	Quinase quinase regulada por estímulo extracelular
MMP-9	Metaloproteinase 9
MTT	brometo de tetrazolium 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil
NMDA	Receptor N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintetase
p21Ras ^{C118S}	Plasmídeo que contém a cisteína 118 de Ras mutada por serina
p21Ras ^{Wt}	Plasmídeo que contém cópias adicionais de Ras
p38	Proteína quinase p38
PARP	Poli-ADP-ribose
PBS	Tampão fosfato
PCR	Reação de polimerase em cadeia
PI3K	Fosfatidilinositol-3-fosfato
PIP3	Fosfatidil-inositol-3,4,5-trifosfato
Rac	Proteína G monomérica
Raf-1	Proteína serina quinase
Ras	Proteína codificada pelo oncogene do vírus do sarcoma murino de Harvey
Rb	Proteína do retinoblastoma
rpm	Rotações por minuto
SFB	Soro fetal bovino
SH	Grupo tiol
SH2 e SH3	Domínios homólogos a Src quinase
SNAP	S-nitrosopenicilamina
SNOG	S-nitrosoglutathiona
SNP	Ferrocianeto de sódio

Sos	"Son of Sevenless" proteína adaptadora de Grb2
Src	Tirosina quinase
TBS	Tampão Tris-base
TNF	Fator de necrose tumoral
TNFR1	Receptor do fator de necrose tumoral

LISTA DE SÍMBOLOS

μL	microlitro
μM	micromol
h	hora
kDa	kilodalton
mL	mililitro
mM	milimol
nM	nanomol
$^{\circ}\text{C}$	grau Celsius

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1 - Controle da ativação e desativação da proteína Ras	4
Figura 2 - Efeitores de Ras-GTP	7
Figura 3 - Alterações morfológicas da apoptose e necrose	11
Figura 4 – Ativação das caspases	12
Figura 5 - Reação de S-nitrosação	17
Gráfico 1 - Avaliação da viabilidade celular	39
Figura 6 - Análise morfológica das células THP-1 incubadas com SNOG 1mM	40
Gráfico 2 - Porcentagem de células vivas após incubação com SNOG 1mM	43
Gráfico 3 - Porcentagem de núcleos picnóticos após incubação com SNOG 1mM	44
Gráfico 4 - Porcentagem de corpos apoptóticos após incubação com SNOG 1mM	45
Figura 7 - Análise do tamanho e complexidade celular através de citometria de fluxo em células THP-1 após incubação com SNOG 1mM	47

Figura 8 - Exposição de fosfatidilserina nas células parentais incubadas com SNOG 1mM	48
Figura 9 - Ativação da caspase-3	49
Figura 10 - Vetor pcDNA3	51
Figura 11 - Digestão dos plasmídeos p21Ras ^{C118S} e p21Ras ^{Wt}	52
Figura 12 - Cinética de ativação da proteína Ras	53
Figura 13 - Ativação da proteína Ras	54
Figura 14 - Participação da cisteína 118 na apoptose	55
Figura 15 - Indução da apoptose com H ₂ O ₂	56
Figura 16 - Cinética de ativação de ERK após incubação das células parentais com SNOG 1mM	58
Figura 17 - Cinética de ativação de JNK após incubação das células parentais com SNOG 1mM	59
Figura 18 - Cinética de ativação de p38 após incubação das células parentais com SNOG 1mM	60
Figura 19 - Comparação da ativação de ERK entre as células transfectadas com os plasmídeos p21Ras ^{C118S} e	

p21Ras ^{Wt} após incubação com SNOG 1mM	62
Figura 20 - Comparação da ativação de JNK entre as células transfectadas com os plasmídeos p21Ras ^{C118S} e p21Ras ^{Wt} após incubação com SNOG 1mM	63
Figura 21 - Comparação da ativação de p38 entre as células transfectadas com os plasmídeos p21Ras ^{C118S} e p21Ras ^{Wt} após incubação com SNOG 1mM	64
Figura 22 - Inibição da ativação de ERK com PD 098059	66
Figura 23 - Influência do inibidor de MEK na apoptose	67
Figura 24 - Inibição da ativação de JNK com CEP 11004	68
Figura 25 - Ausência da participação de JNK na apoptose	69
Figura 26 - Inibição da ativação de p38 com SB 220025	70
Figura 27 - Ausência da participação de p38 na apoptose	71
Figura 28 - Ciclo celular	85
Figura 29 - Mecanismo proposto na apoptose de células THP-1 induzida por NO [•]	86

Figura 30 - Possível mecanismo na	
apoptose regulada via Ras/Raf/MEK/ERK.....	87

RESUMO

Ras é uma proteína G monomérica que converte estímulos extracelulares em sinais bioquímicos intracelulares e controla uma variedade de processos biológicos, tais como, proliferação, diferenciação, adesão e morte celular por apoptose. Além da ativação mediada por fatores de crescimento e hormônios, Ras pode ser ativado pela interação com o óxido nítrico (NO[•]), um radical capaz de mediar processos de sinalização. Essa interação resulta na S-nitrosação do resíduo de cisteína 118 de Ras. Assim, propusemo-nos avaliar a participação da proteína Ras e das MAP quinases: ERK1/2, JNK e p38 no processo de apoptose de células THP-1 induzida pelo doador de NO[•], S-nitrosoglutathione (SNOG).

Para tanto, transfectamos células THP-1 com o plasmídeo que carrega o gene que codifica para a proteína Ras mutada, na qual o resíduo de cisteína 118 foi trocado por um resíduo de serina, o que tornou Ras não responsiva ao NO[•]. A apoptose foi evidenciada através da formação de corpos apoptóticos, exposição de fosfatidilserina e ativação de caspase-3. A modulação da apoptose via reação de S-nitrosação foi demonstrada através da diminuição estatisticamente significativa da exposição de fosfatidilserina nas células transfectadas com o plasmídeo p21Ras^{C118S} quando comparadas com as células selvagens e parentais. A ativação da proteína Ras ocorreu após 5, 15 e 30 minutos da adição de SNOG nas células parentais; entretanto, nas células transfectadas com o plasmídeo p21Ras^{C118S} não observamos resposta de ativação de Ras. A avaliação das MAP quinases revelou ativação de máxima de ERK após 4 horas e ativação máxima de JNK e p38 após 2 horas de incubação com SNOG. Em relação as MAP quinases nas células transfectadas, as células p21Ras^{C118S} apresentaram diminuição apenas da ativação ERK, quando comparadas com as células p21Ras^{wt}. A utilização dos inibidores específicos de MEK, JNK e p38; PD09895, CEP11004 e SB22004, respectivamente demonstrou que apenas a inibição de ERK diminuiu significativamente a apoptose nas células THP-1. Concluímos que na apoptose de células THP-1 estimulada por NO[•], o radical livre ativa Ras via S-nitrosação, que por sua vez, recruta ERK, MAP quinase participante desta cascata de sinalização. Finalmente, demonstramos que ERK exerce papel fundamental na condução do sinal de apoptose no modelo que estudamos.

SUMMARY

Ras is a monomeric small G protein that converts intracellular stimulus into intracellular biochemical signals. Ras controls a myriad of biological processes such as, proliferation, differentiation, adhesion and cell death by apoptosis. In addition to growth factor-mediated activation of Ras, nitric oxide (NO $\cdot$) directly interacts with and activates Ras via S-nitrosation on a single cysteine residue (Cys118). Therefore, we investigated the participation of Ras and of the MAP kinases (ERK, JNK and p38) in the apoptosis of THP-1 cells induced by the NO $\cdot$ donor S-nitrosoglutathione (SNOG).

For that, we transfected THP-1 cells with a plasmid that contains the gene that codifies for the mutated Ras protein, in which the cysteine residue 118 was replaced by a serine. Apoptosis was evidenced by apoptotic bodies formation, phosphatidylserine exposition and caspase-3 activation. Parental and wild type Ras transfected-THP-1 cells (Wt) exposed phosphatidylserine upon treatment with 1.0 mM SNOG. The importance of the S-nitrosation reaction in the process was evidenced by a decrease on phosphatidylserine exposition in the cells transfected with the plasmid p21Ras^{C118S}, as compared to parental and wild type cells.

Ras activation occurred within the first 30 minutes after SNOG addition to parental cells. However in p21Ras^{C118S} transfected cells, we were unable to detect activation of Ras. Regarding the MAP kinases located downstream on the Ras-mediated signaling cascade, ERK activity was maximum after 4 hours incubation with the NO $\cdot$ donor. JNK and p38 MAP kinase followed different kinetics, displaying maximum activity after 2 hours incubation with SNOG. The use of specific inhibitors to MEK, JNK and p38; PD09895, CEP11004 and SB22004 respectively has shown that only ERK inhibition has significantly decreased THP-1 cells apoptosis. We concluded that NO $\cdot$ induced apoptosis in THP-1 cells activating Ras by S-nitrosation and recruiting the MAP kinase ERK, a downstream element of this signaling cascade. Furthermore, our findings support a major role for ERK in the NO $\cdot$ mediated apoptosis of THP-1 cells.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Vias de sinalização celular

Nas células eucarióticas, as vias de sinalização celular controlam uma variedade de processos tais como: proliferação, diferenciação, adesão, transformação tumoral celular e morte por apoptose. Modificações pós-tradução (a fosforilação de proteínas, por exemplo), são a base do que se convencionou denominar transdução de sinais biológicos. Esse mecanismo dinâmico e reversível é controlado a partir da interação entre proteínas quinases e fosfatases. As proteínas alvo são fosforiladas reversivelmente em resíduos de serina/ treonina ou tirosina, e a fosforilação de proteínas pode ser induzida por fatores extracelulares tais como; hormônios, citocinas e fatores de crescimento polipeptídicos. O fator extracelular liga-se ao receptor correspondente e este converte um estímulo extracelular em um sinal bioquímico intracelular. Na proliferação celular, o estímulo extracelular que pode ser um fator polipeptídico de crescimento, ao se ligar no receptor correspondente promove a autofosforilação dos seus domínios citoplasmáticos e a associação das proteínas adaptadoras Grb2 e Sos, que apresentam domínios específicos e conservados, denominados SH2 e SH3, em referência à homologia com domínios da proteína tirosina quinase (Src) (SCHLESSINGER, 2000). O recrutamento das proteínas adaptadoras permite a ativação da proteína G monomérica Ras de peso molecular 21kDa.

Ras é transcrita no citoplasma e sofre uma série de modificações pós-transdução na região carboxi-terminal que permitem sua ancoragem na membrana plasmática. A região carboxi-terminal apresenta a sequência CA₁A₂X, na qual C representa um resíduo de cisteína, A₁ e A₂ representam

aminoácidos alifáticos, geralmente valina, leucina ou isoleucina, e X geralmente corresponde a metionina ou serina. A primeira etapa é a farnesilação, isto é, adição de três grupos isoprenos à cisteína do grupo carboxila terminal catalisada pela enzima farnesiltransferase. Em seguida ocorre a clivagem proteolítica que constitui a remoção do grupo A_1A_2X . A última etapa corresponde à metilesterificação do resíduo de cisteína da região carboxi-terminal. Essas modificações aumentam as propriedades hidrofóbicas da proteína Ras, facilitando sua associação à camada interna da membrana plasmática (HANCOCK et al., 1989; JACKSON et al., 1990).

Ras é uma proteína de membrana trocadora do nucleotídeo guanosina que desempenha importante função na conversão de estímulos extracelulares em eventos bioquímicos intracelulares. Nas células, Ras cicla entre o estado inativo, ligado à guanosina difosfato (GDP) e ativo, ligado à guanosina trifosfato (GTP). A atividade de Ras é regulada por funções opostas exercidas por fatores trocadores do nucleotídeo guanosina (GEFs) e proteínas ativadoras de GTPases (GAPs). GEFs catalisam a ativação de Ras trocando um GDP por GTP, enquanto as GAPs aceleram a atividade catalítica intrínseca das GTPases (BOURNE et al., 1991) (Figura 1). Essa troca de GDP por GTP resulta na mudança conformacional de 2 regiões da proteína Ras, denominadas *Switch I* e *Switch II*. A região *Switch I* compõe o sítio alostérico dessa proteína permitindo a interação de Ras ligado a GTP (Ras-GTP), com múltiplos efetores (HALL et al., 2001). Várias proteínas ativadoras de GTPases (GAPs) também se ligam a Ras no estado GTP, atuando como reguladores negativos. As GAPs aceleram a baixa atividade intrínseca das GTPases, promovendo a hidrólise de GTP em GDP, o que resulta em mudança alostérica de Ras para seu estado inativo.

Figura 1: Controle da ativação e desativação da proteína Ras: Fatores trocadores de guanosina (GEF) quando ativados promovem a conversão de Ras-GDP (inativa) em Ras-GTP (ativa). A ativação das proteínas ativadoras de GTPases (GAP) promove a desativação de Ras.

Ras pode interagir com vários efetores que podem ser agrupados em três subgrupos; proteínas quinases (Raf-1, MEKK e PI3-K), proteínas trocadoras do nucleotídeo guanosina (RalGDS), reguladores negativos de Ras (p120GAP) e efetores com funções ainda não totalmente elucidadas (AF6/Canoe). Embora os efetores sejam estruturalmente e funcionalmente distintos todos apresentam afinidade pela forma ativa de Ras (Figura 2).

A primeira evidência de que Ras interage com múltiplos efetores surgiu a partir de estudos genéticos da levedura de brotamento *Saccharomyces cerevisiae*. Leveduras de brotamento desprovidas de Ras são inviáveis, entretanto, com perda da adenilato ciclase, um efector de Ras neste organismo não compromete a capacidade de formação de microcolônia (TODA et al., 1985), sugerindo que a proteína Ras em *S. cerevisiae* ativa outras proteínas durante o processo de proliferação. Observações adicionais em células de mamíferos indicaram que eventos subsequentes a Ras eram mais complexos que a simples ativação da proteína. Ras-GTP ativa três cascatas de MAP

quinases distintas (ERK, JNK e p38) enquanto Raf ativa diretamente apenas ERK (VOJTEK et al, 1993).

Ras participa do processo de proliferação celular desencadeando a ativação da cascata de quinases: Raf (c-Raf-1, A-Raf e B-Raf), MEK (MAQ quinase/ERK quinase) e ERK 1/2 (EGAN; WEINBERG, 1993). Entretanto, a participação dessa mesma via no processo de apoptose foi observada em células mesenquimais quando estimuladas com 4-hidroxitamoxifeno (KAUFFMAN-ZEH et al., 1997).

Outra proteína quinase que pode interagir com Ras é a fosfatidilinositol-3-fosfato quinase (PI3K). A sub-unidade p110 da proteína PI3K interage diretamente com Ras-GTP e catalisa a produção de fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato. Um dos alvos de interação desse segundo mensageiro é a serina/treonina quinase citoplasmática Akt/PKB. Os eventos subsequentes à ativação de Akt/PKB incluem a fosforilação e inativação da proteína pró-apoptótica BAD (NUNEZ; DEL PESO, 1998), o que bloqueia a morte celular por apoptose.

Outro grupo de efetores de Ras são as proteínas trocadoras do nucleotídeo guanosina da proteína Ral, incluindo RalGDS. RalGDS interage com Ras em resposta a estímulos extracelulares e promove a troca de GDP por GTP em Ral. Tal proteína, assim como Ras, cicla entre os estados inativos, ligada a GDP, e ativa; ligada a GTP. Ral liga-se a RalBP1 (proteína ligadora de Ral) e, esta última, regula a atividade de outras GTPases, Rac e Cdc42, por exemplo, que participam da reorganização da actina do citoesqueleto e estão envolvidas nos processo de transformação celular e metástase (CANTOR, et al., 1995; OLSON et al., 1995).

Ras também interage com as GAPs entre elas a proteína p120 GAP, que além de efetuar a troca de GTP por GDP, pode associar-se com a proteína p190, cuja participação já foi descrita na transformação celular e processo de adesão (SETTLEMAN et al., 1992).

1.2 MAP quinases

As proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAP quinases) são proteínas serina/treonina quinases que regulam entre outros processos metabólicos, a proliferação e a morte celular. Os principais grupos são: quinases reguladas por sinais extracelulares (ERK1/2), quinases ativadas por estresse (JNK/SAPK) e p38 MAP quinase.

ERK 1/2, JNK e p38 podem ser ativadas por vários estímulos tais como fatores de crescimento, citocinas e estresses de várias naturezas. ERKs são preferencialmente ativadas em resposta a estímulo mitogênico (KYRIAKIS et al., 1994), enquanto JNK e p38 são ativadas em resposta a estresse celular (KYRIAKIS et al., 1994; HAN et al., 1994; ROUSE et al., 1994; DÉRIJARD et al., 1994). Entretanto, alguns modelos experimentais propõem a existência de um balanço na ativação das MAP quinases na decisão de proliferação ou morte celular. Enquanto a via de ativação das MAP quinases, mediada por estímulos mitogênicos, está bem elucidada, o mesmo não ocorre com as vias de sinalização em resposta a estímulos que induzem morte celular.

Além da associação não-covalente entre hormônios, citocinas e fatores de crescimento e receptores específicos, o status redox intracelular também modula a função desses receptores. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio também modulam a atividade de proteínas quinases e fosfatases (MONTEIRO et al., 1991; PERANOVICH et al., 1995). A utilização de concentrações da ordem de nanomolar e micromolar de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) estimula proliferação celular em fibroblastos e em células musculares lisas (BURDON et al., 1989; GALLAGNER et al., 1993); além de promover o aumento do transporte e utilização da glicose. De fato, foi demonstrado que o H_2O_2 estimula a fosforilação de resíduos de serina e tirosina da subunidade β do receptor de insulina em células de fígado de camundongos (KOSHIO et al.,

1988). A ativação de proteínas quinases e fosfatases por espécies reativas de nitrogênio foi observada por Lander, a partir do uso dos doadores de óxido nítrico, nitroprussiato de sódio (SNP) e S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP). Esses doadores estimulam o aumento do transporte de glicose em linfócitos humanos (LANDER et al., 1993). Em contraste aos efeitos estimulatórios do NO, nas proteínas tirosina fosfatases de linfócitos, o NO[•] pode inibir a atividade dessas proteínas em fibroblastos (MONTEIRO et al., 1994).

Figura 2: Efetores de Ras: Ras-GTP pode interagir com proteínas quinases (Raf, MEKK e PI3K), fator trocador de nucleotídeo guanosina (RalGDS) e regulador negativo de Ras p120GAP, desencadeando diferentes respostas biológicas.

1.3 Apoptose

Apoptose é um processo de morte celular que ocorre na remoção fisiológica de células do organismo e também em determinadas condições patológicas. Algumas características apoptóticas são a desidratação celular, o que promove diminuição do volume citoplasmático, acompanhada de diminuição do tamanho e aumento da complexidade interna da célula (KERR et al., 1972). Um dos eventos primários desse processo é a condensação da cromatina e exposição de fosfatidilserina na membrana externa da célula apoptótica. Nas células vivas, a fosfatidilcolina e a esfingomielinina estão presentes na membrana externa, ao passo que a fosfatidilserina localiza-se na face interna. Entretanto, após o estímulo apoptótico, a fosfatidilserina transloca-se para a face externa (FADOK et al., 1992). Durante a apoptose, as células tornam-se reativas ao anticoagulante anexina V, que preferencialmente se liga a fosfolípidos negativamente carregados como a fosfatidilserina (KOOPMAN et al., 1994). Seguida à condensação da cromatina, ocorrem: condensação da cromatina nuclear, proteólise de lamininas que constituem o envelope nuclear e fragmentação do DNA (cariorrésis). Os fragmentos nucleares juntamente com componentes do citoplasma (incluindo organelas intactas) são envolvidos por fragmentos de membrana plasmática e formam corpos apoptóticos que são reconhecidos por fagócitos e degradados por lisossomos. Distintamente da apoptose, a necrose está associada à ruptura irregular da cromatina nuclear, ao aumento do volume celular e à desintegração da membrana celular (Figura 3).

Os mecanismos bioquímicos que envolvem a execução do processo de apoptose começaram a ser elucidados a partir de estudos que utilizaram o nematóide *Caenorhabditis elegans*, como modelo experimental. A apoptose desenvolve-se de maneira programada e reprodutível em 131 das 1090 células que compõem este nematódeo. A partir de estudos realizados com mutantes de

C. elegans, genes denominados *ced* (cell-death defective) foram identificados e correlacionados com o processo de morte celular programada (ELLIS; HORVITZ, 1986). Estudos posteriores em *Drosophila melanogaster*, identificaram, além de genes homólogos aos *ced*, uma nova classe de genes reguladores da apoptose; as proteínas inibidoras da apoptose (IAPs). As IAPs representaram um novo nível de controle nesse processo, relacionado à neutralização da atividade dos genes *ced* (HAY et al., 1995; VUCIC et al., 1997). O controle do programa de morte celular em *C. elegans* e *D. melanogaster* compartilha similaridades com o controle da apoptose em humanos (VAUX et al., 1992). As proteínas homólogas às transcritas pelos genes *ced*, em humanos, são as caspases.

As caspases são uma família de proteases que apresentam o aminoácido cisteína no sítio ativo e clivam substratos em resíduos de aspartato (THORNBERRY et al., 1997). A síntese dessas proteínas ocorre na forma de zimógenos enzimaticamente inertes (pró-caspases), que são ativados por clivagem proteolítica nos sítios de aspartato. Uma vez iniciada a ativação da caspase, o sinal é amplificado em uma série de novas ativações que resultam em modificações morfológicas e reconhecimento dos corpos apoptóticos por fagócitos (NICHOLSON; THORNBERRY, 1997). Todas as caspases apresentam estruturas similares, compostas de um pró-domínio de 20kDa e sub-unidade pequena de 10kDa. Em relação à função que desempenham, podem ser classificadas em iniciadoras e executoras. As iniciadoras apresentam região de pró-domínio mais longa, estão inclusas nesse grupo, as caspases 1, 2, 8, 9 e 10, enquanto as caspases 3, 4, 5, 6 e 7 são classificadas como executoras.

A ativação das caspases pode ocorrer em consequência de distintos estímulos promotores de apoptose. O processo pode ser iniciado por agentes que se difundem diretamente através da membrana celular e modulam a resposta celular, mesmo na ausência de receptores de membrana específicos. Exemplos desses agentes incluem; radicais livres (BUTTKE; SANDSTROM,

1994), radiação ultravioleta (ASSEFA et al., 2003) e peptídeos sintéticos (SCHWALL et al., 1993). A exposição celular a agentes citotóxicos induz a liberação de moléculas presentes no espaço intermembranar mitocondrial para o citoplasma sob o controle de proteínas da família Bcl-2 (REED; KROMER, 2000). Alguns mecanismos sugerem que a liberação dessas moléculas ocorre via formação de poros na membrana mitocondrial externa por proteínas, tais como Bax, ou ainda, perda rápida do potencial transmembrânico. O citocromo c é uma das moléculas liberadas da mitocôndria essencial para a formação do complexo conhecido como apoptossomo. O citocromo c liga-se à região carboxi-terminal da proteína Apaf-1, promove sua modificação conformacional e permite a ligação da procaspase-9 na região amino terminal. A ligação entre citocromo c, Apaf-1 e procaspase-9 origina o apoptossomo, um complexo que amplifica a ativação de caspases (CAIN et al., 1999).

Outros mecanismos são dependentes da expressão apropriada de receptores de membrana, tais como, CD95/Fas/APO-1, TNFR1, DR3, DR4, DR5 e DR6, que são subtipos de receptores da família de fator de necrose tumoral (TNF) e apresentam em comum, um domínio de morte na porção citoplasmática dos receptores. O domínio de morte recruta proteínas adaptadoras que, por sua vez, ativam caspases. Um dos sistemas mais estudados envolve o receptor de morte Fas, uma proteína de membrana solúvel e seu ligante, FasL (SCAFFIDI et al., 1998). Tal sistema desempenha importante função no desenvolvimento normal de linfócitos T no timo, eliminando linfócitos T auto-reativos (PINKOSKI et al., 1999). A interação Fas/FasL é também o mecanismo pelo qual, células imunes citotóxicas podem eliminar células que expressam receptor Fas. A ligação Fas/FasL induz a trimerização do receptor e ativa a transdução do sinal de morte celular. Essa via de sinalização inicia-se com a formação do complexo de sinalização de morte ou DISC, que envolve a proteína adaptadora denominada, “domínio de morte associada a Fas ou FADD” e a prócaspase-8. FADD liga-se ao domínio de morte citoplasmático de Fas e à região amino terminal da prócaspase-8. A

ativação da caspase-8 propaga o sinal de morte via ativação de Bid, proteína que induz a liberação de citocromo c ou ativação direta de caspase-3 (Li et al., 1998). Ambos os mecanismos produzem amplificação da ativação de caspases e execução do processo de proteólise dos substratos relacionados à apoptose (Figura 4).

Figura 3: Alterações morfológicas da apoptose e necrose a partir da célula viva (a). (b) Diminuição do volume celular e condensação da cromatina nuclear. (c) Formação de corpos apoptóticos. (d) Remoção dos corpos apoptóticos por fagócitos. (e) Aumento do volume celular. (f) Necrose.

Figura 4: Ativação das caspases. A ativação das caspases pode ocorrer por estímulo direto na mitocôndria que promove perda de potencial de membrana e liberação de citocromo-c com conseqüente formação de apoptossomo e ativação das caspases ou via estímulo de receptores de morte situados na membrana plasmática com conseqüente ativação de caspase-8, liberação de citocromo-c da mitocôndria e ativação de caspase-3. Uma vez iniciada a ativação das caspases ocorre um processo de amplificação das mesmas que culmina com a proteólise de substratos relacionados com as características morfológicas das células apoptóticas.

1.4 O óxido nítrico

O óxido nítrico é um radical livre lipofílico sintetizado a partir da conversão do aminoácido L-arginina em L-citrulina, em uma reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintetase (NOS) presente em inúmeros tipos celulares (NATHAN, 1992; FLEMING; BUSSE, 1999). As isoformas principais da NOS são; a isoforma constitutiva, que é dependente de cálcio/calmodulina presente em células endoteliais e neuronais, e a isoforma induzível, presente em macrófagos, células musculares lisas vasculares e fibroblastos (KNOWLES; MONCADA, 1994). O $\text{NO}^\cdot$ participa de vários processos fisiológicos, tais como relaxamento do músculo liso vascular, inibição da agregação plaquetária, neurotransmissão e outros. Além de se comportar como mensageiro celular e citoprotetor, o $\text{NO}^\cdot$ e seus produtos de reação podem provocar efeitos citotóxicos. Efeitos citoprotetores ou citotóxicos mediados pelo $\text{NO}^\cdot$ irão depender da concentração da concentração do radical e do tipo celular envolvido no processo.

O radical livre $\text{NO}^\cdot$ em solução aquosa pode reagir com O_2 se oxidando a nitrito e a nitrato. O $\text{NO}^\cdot$ pode perder um elétron e gerar o cátion nitrosonium (NO^+) ou ganhar um elétron, convertendo-se no ânion nitroxil (NO^-). Em reações secundárias, o $\text{NO}^\cdot$ pode gerar peroxinitrito (ONOO^-) e trióxido de dinitrogênio (N_2O_3) a partir da reação com ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e oxigênio (O_2), respectivamente. O ONOO^- é uma espécie reativa derivada do nitrogênio, altamente tóxica e potente oxidante de biomoléculas como lipídeos, ácido nucléico e proteínas.

Estudos sugerem que em concentrações pequenas (0,1 – 1 μM) prevalece o efeito citoprotetor do $\text{NO}^\cdot$, enquanto as espécies reativas de nitrogênio produzidas em condições patofisiológicas ou produzidas por doadores exógenos de NO podem levar à morte celular (LIU; STAMLER, 1999). Vale a pena ressaltar que o tipo de doador de $\text{NO}^\cdot$ e linhagem celular utilizados, são relevantes em relação à resposta biológica produzida.

1.4.1 Efeitos pró-apoptóticos do NO $\cdot$

Os efeitos pró-apoptóticos do NO $\cdot$ já foram reportados em várias linhagens celulares leucêmicas; a maioria em células de origem mielomonocítica, mas também em células de linhagem T e eritroleucemia. A maioria dos estudos foi realizada em células expostas ao NO $\cdot$ liberado por doadores químicos. O NO $\cdot$ promove morte celular em macrófagos murinos (Raw 264.7) e células leucêmicas monocíticas (U937 e THP-1) por mecanismos p53-dependente (Raw 264.7) e p53-independente (U937 e THP-1) (MESSMER et al, 1998). A indução de apoptose em células U937 por doador de NO $\cdot$ induz simultaneamente a produção de várias citocinas, sugerindo a possibilidade de recrutamento de fagócitos para a eliminação das células apoptóticas (MESSMER; BRUNE, 1996).

Os efeitos pró-apoptóticos do NO $\cdot$ incluem vários mecanismos, incluindo; inibição da cadeia respiratória, ativação de caspases e ativação de MAP quinases, entre outros.

1.4.2 Inibição da cadeia respiratória

O NO $\cdot$ pode induzir a liberação de citocromo c através da perda de potencial da membrana mitocondrial e esse citocromo c no citoplasma, ativa um processo apoptótico caspase dependente (JEKABSONE et al., 2003). O NO $\cdot$ também reage com o O $_2^{\cdot-}$ produzido continuamente na mitocôndria, ocasionando a formação do ONOO $^-$. A oxidação das proteínas mitocondriais que contêm tióis pelo peroxinitrito induz a formação de poros e liberação de cálcio mitocondrial e outros componentes, incluindo fator ativador de protease apoptótica (APAF-1) e citocromo-c. A indução da apoptose pelo ONOO $^-$ já foi descrita em timócitos (SALGO et al., 1995), células neuronais (ESTEVEZ et al., 1995) e HL-60 (LIN et al., 1995).

1.4.3 Ativação de caspases

Os doadores de NO[•] induzem a ativação de caspases por via dependente ou independente da interação do receptor de membrana CD95 com o ligante correspondente CD95L. Em células Jurkat, NO[•] induz a expressão de RNA mensageiro de CD95 e do ligante APO-2/TRAIL. O NO[•] induz apoptose em linfoblastos humanos através da ativação de caspase 8. A linhagem mielomonocítica humana HL60, quando exposta aos doadores de NO, SNAP e SNP apresenta ativação de caspase 3 durante o processo de apoptose (YABUKI et al., 1997). Macrófagos murinos, Raw 264.7 e células humanas da linhagem U937 apresentam ativação de várias caspases na apoptose induzida por doadores de NO[•], promovendo a clivagem de PARP (BROCKHAUS; BRUNE, 1998)

1.4.4 Ativação de MAP quinases

Estudos realizados em nosso laboratório mostraram inicialmente em fibroblastos de camundongos que doadores de NO[•] promoviam fosforilação em tirosina de pelo menos três proteínas quinases: a quinase de adesão focal (FAK), Src quinase e as MAP quinases ERK 1/2 (PERANOVICH et al., 1995; MONTEIRO et al., 2000). Posteriormente, utilizando células endoteliais de aorta de coelho, mostramos que a fosforilação e conseqüente ativação das ERK 1/2 estava vinculada à ativação de Ras pelos doadores de NO[•]. Esse processo, por sua vez, estava associado à proliferação celular (OLIVEIRA et al., 2003).

A ativação das MAP quinases (ERK 1/2, JNK e p38) por NO[•] no processo de apoptose ainda é pouco elucidado e controverso. Estudos associam ativação de JNK 1/2 e p38 à morte celular, enquanto a ativação de ERK 1/2 está associada à proliferação. Estudos realizados por Lander e colaboradores propõem a existência de uma ativação diferencial entre ERK 1/2,

JNK e p38 mediada por doadores de $\text{NO}^\cdot$ para a ocorrência da proliferação ou morte celular (LANDER et al., 1996).

1.5 S-nitrosação

Duas modificações pós-tradução mediadas pelo $\text{NO}^\cdot$ são responsáveis pelas propriedades sinalizadoras do radical. A primeira delas é a nitrosilação do grupo ferro-heme da enzima guanilil ciclase com produção do segundo mensageiro guanilato monofosfato ciclase (cGMP). Esse processo é a base das propriedades vasorelaxadoras do radical. Por outro lado, cresce o número de evidências experimentais que ressaltam a importância da reação da nitrosação em processo de sinalização.

A reação de S-nitrosação consiste basicamente na ligação do cátion nitrosônio (NO^+) a um grupo tiol (SH) do aminoácido cisteína. Essa nomenclatura surgiu para diferenciar a nitrosação da nitrosilação, que é a complexação do NO a metais, como no caso do Fe (II) da desoxihemoglobina formando nitrosil-hemoglobina (MANNICK; SCHONHOFF, 2002). Óxidos de nitrogênio, tais como, NO_2 , N_2O_3 nitrosam grupos tióis (LANE et al., 2001). Esses óxidos de nitrogênio são gerados, com maior frequência, em células que produzem altas concentrações de $\text{NO}^\cdot$. A produção de NO_2 é altamente favorecida a partir da reação entre $\text{NO}^\cdot$ e O_2 , devido à alta solubilidade dessas espécies nas membranas celulares. Portanto, mesmo na ausência de produção aumentada de $\text{NO}^\cdot$, proteínas intramembranares podem ser nitrosadas por NO_2 e N_2O_3 nas membranas celulares (LIU et al., 1998). Um outro mecanismo pelo qual proteínas que contêm tióis podem ser nitrosadas é a transnitrosação; que consiste na transferência direta do cátion nitrosônio (NO^+) a partir de uma proteína nitrosada ou nitrosotiol de baixo peso molecular, como por exemplo, S-nitrosoglutathione (SNOG) (STAMLER, 1994) (Figura 5).

Figura 5: Reação de S-nitrosação. (i) S-nitrosação da cisteína (RSH). (ii) S-nitrosação da cisteína C118 da proteína p21Ras a partir do cátion nitrosônio (NO^+) doado pelo SNOG.

Embora quase todas as proteínas contenham resíduos de cisteína, muitas proteínas apresentem metais de transição como cofatores e a maioria das células produzam NO^+ , nem todas as proteínas são nitrosadas. A especificidade da nitrosação é conferida pelo confinamento espacial dos alvos a serem nitrosados, junto às espécies reativas de nitrogênio; bem como pela presença de seqüências consenso que flanqueiam resíduos de cisteína. O confinamento espacial pode ser exemplificado na nitrosação do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA). A regulação precisa da atividade do receptor NMDA é crítica para o funcionamento neuronal, pois sua ativação excessiva resulta em morte celular. No receptor NMDA, a proximidade das proteínas PSD95 e CAPON, juntamente à isoforma neuronal da NOS (nNOS), favorece a nitrosação de três alvos; a subunidade regulatória NR2a, a proteína G monomérica Dexas1 e a guanilato ciclase. A estimulação do receptor NMDA induz a um influxo de cálcio que estimula a atividade nNOS. As espécies reativas de nitrogênio geradas pela ativação da nNOS nitrosam uma cisteína crítica na subunidade regulatória NR2a que, por sua vez, diminui o influxo de cálcio no receptor. Dexas, uma proteína G monomérica da família Ras, e guanilato ciclase também são nitrosadas. A S-nitrosação de Dexas aumenta a atividade trocadora do nucleotídeo guanina, resultando em aumento da concentração de GTP que se liga a Dexas. E a nitrosilação de guanilato ciclase aumenta a produção de GMPcíclico. Portanto, a ativação do receptor neuronal

NMDA estimula a geração de espécies reativas de nitrogênio que irão nitrosar e regular alvos específicos que controlam a atividade do mesmo.

Além do confinamento espacial, a compartimentalização celular é também um elemento importante na garantia de especificidade e estabilidade do produto de S-nitrosação. O espaço mitocondrial intramembranar, por exemplo, é um sítio favorável para a estabilização do produto da reação de S-nitrosação. A maioria das caspases, em forma de zimógenos, localizadas no espaço intermembranar mitocondrial, estão S-nitrosadas (MANNICK et al., 2001). Entretanto, a compartimentalização celular não é suficiente para conferir a especificidade da reação de S-nitrosação. Existem também seqüências consenso flanqueadoras da cisteína-alvo a ser nitrosada, que favorecem a reação.

A cisteína alvo situa-se entre seqüências de aminoácidos básicos e ácidos (STAMLER et al., 1994). Essa seqüência pode estar presente na estrutura primária ou terciária da proteína e promove um incremento da propriedade nucleofílica do átomo de enxofre presente na cisteína, favorecendo, assim a reação de S-nitrosação (STAMLER et al., 1997; ASCENZI et al., 2000; HESS et al., 2001). A importância dessas seqüências é observada na enzima metionina-adenosina-transferase (MAT), que catalisa a síntese de S-adenosina-metionina, um doador de grupo metil em muitas reações biológicas de metilação. Cada subunidade da MAT possui 10 cisteínas livres, mas somente a cisteína 121 é S-nitrosada, resultando em inibição enzimática (AVILA et al., 1997; PEREZ-MATO et al., 1999). A estrutura terciária da enzima MAT revela que a cisteína 121 está justaposta a aminoácidos básicos e ácidos. Mutações sítio dirigidas dos resíduos flanqueadores inibem a S-nitrosação e abolem os efeitos do $\text{NO}^\cdot$ sob a inibição enzimática (PEREZ-MATO et al., 1999). Regiões flanqueadoras com características hidrofóbicas também favorecem a S-nitrosação, uma vez que moléculas de O_2 e $\text{NO}^\cdot$ estão concentradas em sítios hidrofóbicos, resultando na formação de NO_2 e N_2O_3 . Modificações alostéricas com alterações na conformação protéica que criam

sítios hidrofóbicos podem permitir à proteína catalisar a auto-nitrosação (SUN et al., 2001).

1.5.1 Importância da S-nitrosação em sistemas biológicos

A formação elevada ou diminuída de S-nitrosotióis foi observada em uma série de doenças, tais como diabetes, esclerose múltipla, asma e fibrose cística entre outras (FOSTER et al., 2003). A S-nitrosação pode aumentar ou diminuir a atividade de múltiplas classes de proteínas, incluindo receptores, enzimas, fatores de transcrição, quinases e proteínas trocadoras de guanosina, dependendo do tipo celular envolvido, espécie e concentração do doador de óxido nítrico.

Metaloproteinases constituem uma família de proteases extracelulares solúveis ou ligadas à membrana celular envolvidas na remodelação da matrix extracelular. A S-nitrosação da metaloproteinase MMP-9 induz apoptose de células neuronais de camundongos C57BL/6J, mecanismo relevante na elucidação da participação do estresse nitrosativo em doenças neurodegenerativas (GU et al., 2001).

As MAP quinases JNK/SAPK também são alvos da S-nitrosação. Estas MAP quinases podem ser ativadas em resposta a vários estímulos celulares; tais como, radiação UV, choque térmico, choque osmótico, agentes que provocam danos no DNA e citocinas pró-inflamatórias. Células RAW264.7, da microglia de camundongo BV-2 e macrófagos alveolares de rato, quando tratadas com $\text{INF-}\gamma$ ou SNAP, não apresentam ativação de JNK; entretanto, quando tratadas com NG-nitro-L-arginine, um inibidor da NO sintetase, apresentam ativação de JNK. A substituição de uma serina por cisteína na posição 116 de JNK abole o efeito inibitório de $\text{INF-}\gamma$ e SNAP *in vivo* e *in vitro* respectivamente. (PARK et al., 2000).

A S-nitrosação também é importante na regulação da apoptose via Fas. Em células viáveis, a apoptose é inibida pela S-nitrosação do sítio catalítico de uma subpopulação de caspases presentes na mitocôndria. A S-nitrosação inibe a atividade das caspases e previne a ativação inapropriada do programa de morte celular (MANNICK et al., 1999). Após a ligação de Fas com seu ligante, caspase-3 mitocondrial é liberada no citoplasma e denitrosada, ou seja, o sítio catalítico torna-se ativo. Concomitantemente, citocromo c é nitrosado na mitocôndria após a ligação de Fas e também é liberado no citoplasma. A nitrosação do citocromo c estimula a ligação da caspase-9 ao Apaf-1, resultando na formação do apoptossomo, um complexo multiprotéico composto por citocromo c, caspase-9 e Apaf-1. Portanto, a nitrosação do citocromo c, em combinação com a denitrosação da caspase-3; promove a propagação do sinal apoptótico induzido por Fas (MANNICK et al., 2001).

1.5.2 S-nitrosação de Ras

A S-nitrosação da proteína Ras foi primeiramente relatada por Lander (LANDER et al., 1997). Inicialmente, Lander demonstrou o aumento dos níveis de Ras ligado a GTP em células T humanas tratadas com NO. Estudos utilizando a proteína Ras pura e recombinante demonstraram que a ativação de Ras era direta e reversível (LANDER et al., 1995). Estudos posteriores identificaram o sítio de interação do NO com Ras; a cisteína 118. A nitrosação da cisteína 118 provoca modificações conformacionais da proteína Ras, ativando-a, ou seja, Ras liga-se a GTP. A obtenção do mutante C118S, no qual a cisteína 118 é substituída por uma serina, não permite a ocorrência da S-nitrosação. Células T da linhagem Jurkat, que apresentam a cisteína de Ras mutada por serina, não apresentam atividade da MAP quinase ERK 1/2 quando comparadas com células selvagens, demonstrando a importância da reação de

S-nitrosação nos processos de sinalização celular mediados por Ras (LANDER et al., 1997).

Estudos estruturais e bioquímicos da S-nitrosação de Ras indicaram que, a adição de um grupo $\text{NO}^\cdot$ à proteína modifica somente a cisteína 118. Nenhum outro sítio de Ras é modificado pela S-nitrosação ou por produtos da decomposição da reação entre o NO e a cisteína 118. A S-nitrosação não altera a estrutura secundária ou terciária da proteína e não modifica a ligação de Ras com Raf. Não obstante, a introdução de agentes doadores de $\text{NO}^\cdot$ reduzem a afinidade entre Ras e GDP, resultando em um aumento da dissociação da ligação Ras-GDP (WILLIAMS et al., 2003).

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram :

- Avaliar a participação da proteína Ras e das MAP quinases (ERK 1/2, JNK/SAPK e p38) no processo de apoptose em células de linhagem monocítica leucêmica; THP-1, quando submetidas a tratamento com o doador de óxido nítrico SNOG.
- Avaliar a participação da reação de S-nitrosação da proteína Ras no processo de apoptose através da transfecção das células THP-1 com plasmídeos que apresentam a cisteína da proteína Ras mutada por serina.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Linhagem THP-1

A linhagem THP-1, constituída de células leucêmicas monocíticas humanas, foi obtida da ATCC (American Type Culture Collection).

Plasmídeos

p21Ras^{C118S} e p21Ras^{Wt} - gentilmente doados pelo professor Harry Lander da Universidade Cornell de Nova York.

Anticorpos

Anti pan-Ras monoclonal (Oncogene)

Anti ERK 1,2 total (New England Biolabs)

Anti ERK 1,2 fosforilada (New England Biolabs)

Anti JNK total (Calbiochem)

Anti JNK fosforilada (Calbiochem)

Anti p38 total (Cell Signaling)

Anti p38 fosforilada (Cell Signaling)

Anti IgG de camundongo e anti IgG de coelho conjugados com peroxidase (Amersham Pharmacia)

Anti IgG de cabra conjugado a peroxidase (KPL)

Anexina FITC (Roche)

Drogas e antibióticos**Ampicilina** (Gibco)**CEP11004** (Cephalon)**Estreptomicina** (Gibco)**Geneticina** (Gibco)**Hoechst 33258** (Calbiochem) - solução estoque 1mM**Iodeto de propídio** (Calbiochem) - solução estoque 50µg/ml**IPTG** (USB) - isopropilgalactosídeo**MTT** (Molecular Probes) - brometo de tetrazolium 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil**SB220025** (Calbiochem)**S-nitrosoglutationa** (Calbiochem)**PD98059** (Calbiochem)**Penicilina** (Gibco)**Meio de cultura e soro****RPMI-1640** (Gibco)**Meio LB** - 0,1% triptona, 0,5% extrato de levedura, 0,5% NaCl, 0,1% NaOH 1N**Meio LB em placa** - 0,1% triptona, 0,5% extrato de levedura, 0,5% NaCl, 0,1% NaOH 1N, 1,5% ágar, pH 7.0**Meio SOB** - 2% triptona, 0,5% extrato de levedura, 0,05% NaCl, 1% KCl 250mM, 0,5% MgCl₂ 1M, 0,5% MgSO₄ 1M, pH 7.0**Meio SOC** - SOB adicionado à glicose 1M**SFB** (soro fetal bovino) (Gibco) – inativado a 55°C durante 1 hora.**Meio 2YT** - 1,6% triptona, 1% extrato de levedura, 0,5% NaCl**Soluções****Solução de congelamento** - 50% FBS, 10% DMSO, 40% RPMI

Tampão RIPA pH8.0 - 20mM Tris-HCl, 137mM NaCl, 1%NP40, 10% glicerol, 10µg/ml aprotinina, 10µg/ml leupeptina, 1mM PMSF, 200µM ortovanadato de sódio.

Tampão de lise pH7.5 - 20mM Hepes, 150mM NaCl, 10% glicerol, 1% Triton X, 1mM EGTA, 1.5mM MgCl₂, 1µg/ml aprotinina, 1µg/ml leupeptina, 1mM PMSF, 1mM ortovanadato de sódio, 100mM pirofosfato de sódio e 500mM fluoreto de sódio.

Tampão de lavagem - 50mM Tris pH7.5, 0,5% Triton X 100, 150mM NaCl, 5mM MgCl₂, 1mM DTT, 1µg/ml aprotinina, 1µg/ml leupeptina.

Tampão de corrida - 500mM glicina, 50mM Tris-base pH 8.3, 1% SDS.

Tampão de transferência - 48mM Tris-base, 39mM glicina, 0,037% SDS, 20% metanol.

TBS - 10mM Tris-base pH7.6, 150mM NaCl, 0,1% Tween.

PBS - 7,78mM Na₂HPO₄, 2,20mM KH₂PO₄, 140mM NaCl, 2,73mM KCl.

Tampão Hepes - 10mM Hepes/NaOH pH7.4, 140mM NaCl, 5mM CaCl₂.

Tampão TE - 100mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA.

Tris - solução estoque 1.5M pH8.8

Tris - solução estoque 1.0M pH6.8

SDS - solução estoque 10%

Persulfato de amônio - solução estoque 10%

Solução para a retirada de anticorpos da membrana (solução de stripping) - Tris-HCl pH6.7, 0,78% 2-mercaptoetanol e 2%SDS.

Tampão de amostra 4x - 50mM Tris-HCl pH6.8, 5% 2-mercaptoetanol, 2% SDS, 0,05% bromofenol, 10% glicerol

Corante Ponceau S - 5% TCA, 0,5% Ponceau

Reagente de Bradford (Bio Rad)

Géis de resolução:

Gel de poli(acrilamida) 10% - 11,9ml H₂O, 10ml solução de poli(acrilamida) 30%, 7,5ml Tris 1,5M pH8.8, 300µl SDS 10%, 300µL persulfato de amônia, 12µl TEMED.

Gel de poliacrilamida 12% - 9,9ml H₂O, 12ml solução de poliacrilamida 30%, 7,5ml Tris 1,5M pH8.8, 300µl SDS 10%, 300µL persulfato de amônia, 12µl TEMED.

Gel de empilhamento - 6,8ml H₂O, 1,7ml solução de poliacrilamida 30%, 1,25ml Tris 1,0M pH6.8, 100µl SDS 10%, 100µL persulfato de amônia, 10µl TEMED.

Kits

ECL (Amershan)

MAXIPREP (Gibco)

3.2 Métodos

3.2.1 Cultura celular

As células THP-1 foram mantidas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (FCS), acrescido de penicilina (100U/ml) e estreptomicina (100µg/ml). As células THP-1 transfectadas com os plasmídeos pcDNA-H-ras^{C118S} e pcDNA-H-ras^{W.t.} foram mantidas nas mesmas condições acrescidas de geneticina (G418). As culturas celulares foram mantidas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. A troca do meio foi realizada a cada dois dias. Estoques de células THP-1 foram mantidos em solução de congelamento e armazenados em nitrogênio líquido.

3.2.2 Ensaio de viabilidade celular

Um total de 10^6 células/ml foi plaqueado em placas de 12 poços aglomerados e incubado em concentrações crescentes de SNOG durante 10 horas a 37°C em atmosfera 5%CO₂. Após esse período, concentrações de $1,25 \times 10^4$ células /poço foram transferidas para placa de 96 poços e uma alíquota de 10µl de MTT foi adicionada a cada poço. As células foram incubadas por mais 3 horas a 37°C e 5%CO₂; em seguida, adicionaram-se 100µl de solução SDS 10% HCl 0,01N e incubou-se a placa por mais 20 horas a 37°C e 5%CO₂. A leitura da absorbância foi realizada em leitora de ELISA em comprimento de onda 570nm e filtro de referência 630nm.

3.2.3 Reação Hoechst 33258

10^6 células/ml foram plaqueadas em placas de 12 poços e tratadas com 1mM de SNOG durante 12 horas em atmosfera 5% de CO₂ à 37°C.

Após esse período de incubação as células foram centrifugadas a 1.000 rpm por 5 minutos à temperatura ambiente.

O sedimento foi ressuspenso em 1ml de PBS e lavado 2 vezes nas mesmas condições descritas anteriormente. A permeabilização da membrana foi realizada adicionando-se 200µl de paraformaldeído 4% ao sedimento e incubando-se por 30 minutos a temperatura ambiente. As células foram novamente lavadas com 1ml de PBS e incubadas com 1mM Hoechst33258 a 37°C durante 30 minutos. As células foram fixadas em lâmina utilizando-se citocentrífuga a 400 rpm por 2 minutos. A leitura da fluorescência foi feita em microscópio de fluorescência.

3.2.4 Ensaio Anexina/PI

Um total de 10^6 células/ml foi plaqueado em placas de 12 poços aglomerados e incubado na presença ou ausência de SNOG 1mM durante 4, 6 e 10 horas em atmosfera 5% de CO_2 à 37°C. Após o período de incubação as células foram lavadas duas vezes em PBS e centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos a 4°C. O sedimento foi ressuspenso em 100µl de tampão Hepes contendo 20µl do anticorpo anexina V conjugado ao fluorocromo FITC e 20µl de solução estoque de iodeto de propídio a 50µg/ml. Após 20 minutos de incubação ao abrigo da luz e à temperatura ambiente, foram adicionados 500µl de tampão Hepes a cada tubo e mantidos em gelo até a aquisição por citômetro de fluxo. Em todos os ensaios foram adquiridas 10^6 células, utilizando-se o citômetro de fluxo modelo FACSCalibur (Becton Dickinson).

3.2.5 Amplificação dos plasmídeos vetores pcDNA3

Alíquotas de 0,5µl dos plasmídeos pcDNA-H-ras^{W.t.} e pcDNA-H-ras^{C118S} foram incubadas separadamente com 10µl de *Escherichia coli* e submetidas a 4°C por 20 minutos, 42°C por 45 minutos e 4°C por 5 minutos. Após as sucessivas incubações adicionaram-se 90µl de meio SOC e incubaram-se sob agitação a 37°C por 1 hora. As bactérias foram então plaqueadas em agarose com ampicilina a 37°C durante toda a noite.

Uma colônia foi isolada e incubada em 500ml de meio LB contendo ampicilina, sob agitação a 1.000 rpm durante toda a noite.

3.2.6 Purificação dos plasmídeos pcDNA-H-ras^{W.t.} e pcDNA-H-ras^{C118S}

A purificação dos plasmídeos foi realizada em sistema Concert (Gibco). O meio de cultura contendo *E.coli* foi centrifugado a 6.000 rpm à temperatura ambiente por 15 minutos. O sedimento foi ressuspenso em 10ml de tampão de lise (Concert), homogeneizado por inversão e centrifugado a 15.000 rpm a temperatura ambiente por 10 minutos. O sobrenadante foi aplicado à coluna de purificação (Concert) previamente lavada com 30ml de tampão de equilíbrio. Após o escoamento do sobrenadante pela coluna, ela foi lavada com 60ml de tampão de lavagem (Concert) e em seguida o DNA foi eluído com 15ml de tampão de eluição (Concert). O eluato foi recolhido, acrescido de 10,5ml de isopropanol, homogeneizado e centrifugado a 15.000 rpm, 4°C por 30 minutos. O sedimento foi lavado com etanol 70% e ressuspenso em 1ml de tampão TE. Em seguida foi determinado o grau de pureza do DNA através da relação da absorbância determinada nos comprimentos de onda 280/260nm.

Os plasmídeos foram digeridos com as enzimas de restrição Bstx e BamHI para confirmação da estrutura. A análise das digestões foi feita através de eletroforese em gel de agarose 1% contendo 10µg/ml de brometo de etídeo, submetida a uma corrente de 90mA por 60minutos. A visualização das bandas foi feita em trans-iluminador de luz ultravioleta.

3.2.7 Transfecção das células THP-1

A seleção das células THP-1 foi realizada plaqueando-se 10⁵ células/ml/poço e adicionando-se concentrações crescentes de geneticina de 0.1mg/ml a 0.5mg/ml. A troca de meio e a adição de antibiótico foram realizadas a cada 3 dias e, a viabilidade celular, avaliada por Azul de Tripán

1%. Colônias resistentes foram isoladas depois de 20 dias de tratamento com geneticina e foram propagadas na presença desse antibiótico.

Para a transfecção, 10^6 células foram previamente lavadas em 2ml de meio RPMI na ausência de soro e gentamicina, centrifugadas a 1.000rpm por 5 minutos a 4°C e ressuspensas em 700µl de RPMI. As células foram plaqueadas e transfectadas utilizando-se o método da lipofectina (Gibco), de acordo com as normas do fabricante. Uma alíquota de 4µg do DNA foi incubada a 25µl de RPMI sem soro e antibiótico e 4µl do reagente PLUS. Separadamente, 4µl de lipofectina foram diluídos em 25µl de RPMI sem soro e antibióticos. As preparações foram incubadas a 37°C durante 15 minutos e em seguida misturadas e incubadas nas mesmas condições para a obtenção do complexo DNA-lipofectina. O complexo foi então adicionado às células e incubado em atmosfera 5% CO₂ a 37°C durante 24 horas. Decorrido esse período, o meio utilizado para transfecção foi substituído por meio suplementado com 10% SFB acrescido de geneticina na concentração 300µg/ml. A análise da atividade Ras foi realizada utilizando-se proteína de fusão GST-RBD.

3.2.8 Preparação de GST-RBD

Uma alíquota de 1,5ml de bactérias BL21 contendo o plasmídeo pGEX-2T-RBD foi inoculada em 35ml de meio 2YT contendo 100µg/ml de ampicilina sob agitação a 37°C, durante toda a noite. Após esse período, volumes iguais da cultura foram distribuídos a 1.500ml de meio de cultura 2YT contendo 100µg/ml de ampicilina, sob agitação de 1.000rpm a 37°C, até atingir densidade óptica de 0.7 em comprimento de onda 600nm. Nesse ponto adicionou-se 1mM IPTG e incubaram-se tais volumes por mais duas horas. A suspensão de bactérias foi centrifugada a 6.000rpm por 30minutos a 4°C. O sedimento foi ressuspenso em 30ml de tampão de lise e sonificado em gelo por 10 ciclos a 50watts. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 13.000 rpm a 4°C por 30

minutos e ao sobrenadante foi adicionado 10% de glicerol. Um volume de 750µl de micropartículas (“beads” de glutathiona-sepharose) foi adicionado a 15ml do sobrenadante e incubados sob agitação em orbital a 4°C durante toda a noite.

A seguir os “beads” foram centrifugados a 3.000 rpm, 4°C por 3 minutos e lavados 3 vezes com 5ml de PBS. Os sedimentos foram então ressuspensos em 6 ml de tampão de lavagem e armazenados a -80°C.

3.2.9 Lisado de proteínas totais

10⁶ células/ml foram plaqueadas em placas de 12 poços e tratadas com 1mM de SNOG em atmosfera 5% de CO₂ à 37°C. Após o período de incubação as células foram lavadas duas vezes em PBS e centrifugadas a 1.500rpm por 5 minutos a 4°C. O sedimento foi ressuspenso em 500µl de tampão de lise e mantido a 4°C por 1 hora. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 12.000rpm a 4°C por 10 minutos.

O sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C. A quantificação de proteína foi feita pelo método de Bradford (Bradford, M.M., 1976).

3.2.10 Precipitação GST-RBD

Uma alíquota de 250µg de proteínas totais foi incubada com 30µl de proteína de fusão imobilizada (micropartículas de sefarose conjugadas à proteína RBD) sob agitação em orbital a 4°C por 1 hora. Após incubação, as amostras foram lavadas em 500µl de tampão Ripa e centrifugadas a 10.000rpm durante 2 minutos por 3 vezes. As amostras foram incubadas com tampão de amostra 4x e submetidas a 100°C por 5 minutos. Foram aplicadas ao gel de poliacrilamida, em seguida.

3.2.11 Reações de Western blot

As reações de Western blot foram realizadas a partir de géis de poliacrilamida em diferentes concentrações, de acordo com a proteína a ser estudada. O lisado de proteínas foi submetido à eletroforese em tampão de corrida a 250V e 8mA durante toda noite. A transferência foi realizada em membrana de nitrocelulose aplicando-se uma corrente de 200mA por 2 horas em cuba de transferência (BioRad). A confirmação da transferência foi realizada incubando-se a membrana com solução de Ponceau S. Em seguida, a membrana foi lavada com TBS-0,1%Tween durante 3 vezes de 15 minutos e bloqueada. A revelação foi realizada utilizando-se metodologia de quimioluminescência utilizando-se o luminol como substrato e a enzima peroxidase (ECL). A leitura das bandas do auto-radiograma foi realizada em densitometria e registrada em unidades arbitrárias densitométricas (UAD) em densitômetro (LKB Bromma).

Após a revelação da expressão das proteínas totais (ERK, JNK e p38) os anticorpos primário e secundário foram retirados da membrana com solução de Tris-HCl, SDS e mercaptoetanol (solução de "stripping"). A membrana foi incubada durante 30 minutos a 56°C, 3 lavagens em TBS-0,1% Tween sob agitação, à temperatura ambiente e rebloqueada com TBS-0,1%Tween -5%leite durante 2 horas. Após a lavagem da mesma por 3 vezes em TBS-0,1%Tween, o anticorpo contra a proteína no estado fosforilado foi adicionado.

3.2.11.1 Western blot para Ras e Ras-GTP

As reações de Western blot para Ras e Ras-GTP foram realizadas a partir de géis de poliacrilamida 12%, transferidos para membrana de nitrocelulose. O bloqueio foi realizado em TBS-0,1%Tween-5%BSA por 2 horas, sob agitação à temperatura ambiente. Após 3 lavagens de 15 minutos, o anticorpo primário anti-Ras (1:1000) diluído em TBS-0,1%Tween-5% BSA foi adicionado à membrana e incubado durante toda a noite, sob agitação a 4°C. Após a incubação, a membrana foi novamente lavada 3 vezes de 15 minutos à temperatura ambiente e o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo produzido em cabra (1:2000) diluído em TBS-0,1%Tween, adicionado à membrana e incubado durante 1 hora à temperatura ambiente sob agitação. Em seguida, a membrana foi lavada 1 vez por 15 minutos e 2 vezes por 5 minutos à temperatura ambiente com TBS-0,1%Tween e revelada.

3.2.11.2 Western blot para ERK e pERK

As reações de Western blot para ERK e ERK fosforilada foram realizadas a partir de géis de poliacrilamida 10% transferidos para membranas de nitrocelulose. O bloqueio foi realizado em TBS-0,1%Tween-5%leite por 2 horas sob agitação à temperatura ambiente. Após 3 lavagens de 15 minutos, o anticorpo primário anti-ERK (1:2000) ou anti-ERK fosforilada (1:2000) diluído em TBS-0,1%Tween-5% BSA, foi adicionado à membrana e incubado durante toda a noite, sob agitação a 4°C. Depois da incubação, a membrana foi novamente lavada 3 vezes de 15 minutos à temperatura ambiente, e o anticorpo secundário anti-IgG de coelho produzido em suíno (1:3000), diluído em TBS-0,1%Tween-5%leite. Esse anticorposecundário foi adicionado à membrana e incubado durante 1 hora à temperatura ambiente sob agitação.

Logo após, a membrana foi lavada 1 vez por 15 minutos e 2 vezes por 5 minutos à temperatura ambiente com TBS-0,1%Tween e revelada.

3.2.11.3 Western blot para JNK e JNK fosforilada

As reações de Western blot para JNK e JNK fosforilada foram realizadas a partir de géis de poliacrilamida 12% transferidos para membrana de nitrocelulose. O bloqueio foi realizado em TBS-0,1%Tween-5%leite por 2 horas sob agitação à temperatura ambiente. Após 3 lavagens de 15 minutos o anticorpo primário anti-JNK (1:1000) ou anti-JNK fosforilada (1:1000) diluídos em TBS-0,1%Tween-5% BSA, foi adicionado à membrana e incubado durante toda a noite, sob agitação a 4°C. Após a incubação, a membrana foi novamente lavada 3 vezes de 15 minutos à temperatura ambiente e o anticorpo secundário anti-IgG de coelho produzido em suíno (1:2000), diluído em TBS-0,1%Tween-5%leite foi adicionado à membrana e incubado durante 1 hora à temperatura ambiente sob agitação. Em seguida, a membrana foi lavada 1 vez por 15 minutos e 2 vezes por 5 minutos à temperatura ambiente com TBS-0,1%Tween e revelada.

3.2.11.4 Western blot para p38 e p38 fosforilada

As reações de Western blot para JNK e JNK fosforilada foram realizadas a partir de géis de poliacrilamida 12% transferidos para membrana de nitrocelulose. O bloqueio foi realizado em TBS-0,1%Tween-5%leite por 2 horas sob agitação à temperatura ambiente. Após 3 lavagens de 15 minutos o anticorpo primário anti-p38 (1:1000) ou anti-p38-fosforilada (1:1000) diluído em TBS-0,1%Tween-5% BSA, foi adicionado à membrana e incubado durante toda a noite, sob agitação a 4°C. Após a incubação, a membrana foi novamente

lavada 3 vezes de 15 minutos à temperatura ambiente e o anticorpo secundário anti-IgG de cabra produzido em coelho (1:2000), diluído em TBS-0,1%Tween-5%leite foi adicionado à membrana e incubado durante 1 hora à temperatura ambiente sob agitação. Em seguida, a membrana foi lavada 4 vezes por 15 minutos à temperatura ambiente com TBS-0,1%Tween e revelada.

3.2.11.5 Western blot para caspase 3

A reação de Western blot para caspase 3 foi realizada a partir de géis de poliacrilamida, 15% transferidos para membrana de nitrocelulose. O bloqueio foi realizado em TBS-0,1%Tween-5%leite-0,02%azida por 2 horas sob agitação à temperatura ambiente. Após 3 lavagens de 10 minutos, o anticorpo primário anticaspase 3 (1:1000), diluído em TBS-0,1%Tween-5%BSA-0,02%azida, foi adicionado à membrana e incubado durante toda a noite, sob agitação a 4°C. Após a incubação a membrana foi novamente lavada 3 vezes de 10 minutos à temperatura ambiente e o anticorpo secundário anti-IgG de coelho produzido em suíno (1:2000), diluído em TBS-0,1%Tween-5%leite, foi adicionado à membrana e incubado durante 1 hora à temperatura ambiente sob agitação. Em seguida, a membrana foi lavada 3 vezes por 10 minutos à temperatura ambiente com TBS-0,1%Tween e revelada.

3.3 Análise estatística

Análise de regressão: esta análise foi utilizada para avaliação do comportamento do número de células vivas, núcleos picnóticos e corpos apoptóticos em relação à variável “tempo”.

Análise de variância (ANOVA): esta análise foi utilizada para verificar, se através do teste F, existe diferença significativa entre as médias dos valores de exposição de fosfatidilserina.

Teste Tukey: teste de comparação de média, empregado para identificação de diferenças significativas na exposição de fosfatidilserina entre as situações controle e células tratadas com SNOG.

O nível de significância adotado para o teste F e Tukey foi de 0,05 ($\alpha=5\%$), no qual os níveis descritivos inferiores a esse valor foram considerados significantes.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Ensaio de citotoxicidade das células THP-1 incubadas com diferentes concentrações de SNOG

A morte celular induzida por SNOG foi inicialmente avaliada utilizando-se o ensaio de MTT. As células foram tratadas com concentrações crescentes de SNOG e após 12 horas a viabilidade celular foi determinada por ensaio de ELISA. O gráfico 5 mostra a diminuição da viabilidade celular quando as células THP-1 foram tratadas com concentrações crescentes de SNOG. Passamos então a utilizar a concentração de 1mM do doador de NO[•]. Nessa concentração, o SNOG reduziu a 20% a viabilidade das células THP-1 (Gráfico 1).

Gráfico 1: Avaliação da viabilidade celular: Efeito do tratamento com concentrações crescentes de SNOG (0, 100µM, 250µM, 500µM, 1mM e 2mM).

4.2 Avaliação morfológica das células THP-1 incubadas com SNOG 1mM

As células foram tratadas com SNOG 1mM em diferentes períodos de incubação e, após esses intervalos, a morfologia celular foi avaliada utilizando-se o reagente Hoeschst 33258. As células não tratadas mostraram núcleo não compactado, indicando viabilidade celular. As células tratadas com SNOG apresentaram compactação nuclear e formação de corpos apoptóticos (Figura 6). O número de células vivas, presença de núcleos condensados e corpos apoptóticos na presença ou ausência de SNOG após 4, 6 e 12 horas de incubação, encontram-se representados graficamente (Gráficos 2, 3 e 4) respectivamente.

Figura 6**Controle** **SNOG 1mM**

Figura 6: Análise morfológica das células THP-1 tratadas com SNOG: Células THP-1 foram incubadas na ausência ou presença de SNOG 1mM por 12 horas e submetidas à coloração de Hoeschst 33258. Os citocentrifugados foram visualizados em microscópio de fluorescência.

Gráfico 2: Porcentagem de células vivas após incubação com SNOG 1mM em diferentes intervalos de tempo: Após 4, 6 e 12 horas, células THP-1 não coradas por Hoechst33258 foram contadas sob microscopia óptica de fluorescência. O número de células vivas tratadas com SNOG após 4, 6 e 10 horas é significativamente menor quando comparado às células controle ($p < 0.05$).

Gráfico 3: Porcentagem de núcleos picnóticos após incubação com SNOG 1mM em diferentes intervalos de tempo: Após 4, 6 e 12 horas, células THP-1 que apresentavam núcleo picnótico corados intensamente por Hoechst33258 foram contados sob microscopia óptica de fluorescência. O número de núcleos picnóticos após 4, 6 e 12 horas é significativamente maior quando comparado ao número de núcleos picnóticos presentes nas células controle ($p < 0.05$).

Gráfico 4: Porcentagem de corpos apoptóticos após tratamento com SNOG 1mM em diferentes intervalos de tempo: Após 4, 6 e 12 horas, corpos apoptóticos corados por Hoechst33258 foram contados sob microscopia óptica de fluorescência. O número de corpos apoptóticos nas células tratadas com SNOG 1mM após 6 e 12 horas é significativamente maior quando comparado ao número de corpos apoptóticos das células controle ($p < 0.05$).

Além dos critérios morfológicos, a morte das células THP-1 induzida por SNOG foi avaliada através de ensaio de detecção de exposição de fosfatidilserina, no qual utilizou-se anexina-V conjugada a isotiocianato de fluoresceína (FITC). A utilização concomitante do iodeto de propídeo (PI) permitiu a caracterização da morte por necrose, secundária à apoptose. Outro marcador bioquímico de morte por apoptose avaliado no nosso modelo de estudo foi ativação de caspase-3 por reação de Western blot.

4.3 Exposição de fosfatidilserina nas células THP-1 incubadas com SNOG 1mM

As células foram incubadas com SNOG 1mM em diferentes intervalos de tempo e em seguida, submetidas à marcação com Anexina-V FITC e PI. A análise dos eventos obtidos dos canais de dispersão ótica nos ângulos 0° e 90° mostrou que as células tratadas com SNOG diminuíram de tamanho e aumentaram a complexidade interna em comparação com o controle, característicos da apoptose (Figura 7).

A análise dos eventos em relação aos canais de fluorescência mostrou que as células THP-1 expõem fosfatidilserina após 4, 6 e 10 horas de incubação com SNOG 1mM e, após 10 horas, observamos a presença de necrose secundária à apoptose. As células vivas, não se ligam à anexina-V FITC ou PI e estão localizadas no quadrante inferior esquerdo da janela eletrônica. As células que expõem fosfatidilserina ligam-se somente à anexina-V FITC e estão presentes no quadrante inferior direito. E as células em necrose, ligam-se somente ao PI e se situam no quadrante superior direito da janela eletrônica (Figura 8).

Figura 7

Controle

SNOG 1mM

Figura 7: Análise da dispersão dos eventos celulares adquiridos por citometria de fluxo: Células controle: uma única região de eventos celulares é observada. Células incubadas com SNOG 1mM durante 4 horas: os eventos celulares diminuem de tamanho e de complexidade interna. Citograma bidimensional em “dot plot” formado por FSC na abscissa e SSC na ordenada. O tamanho celular é representado pelo canal de dispersão a 0° (FSC) e a complexidade interna é representada pelo canal de dispersão a 90° (SSC).

Figura 8

Figura 8: Análise da exposição de fosfatidilserina por citometria de fluxo: Células THP-1 após incubação com SNOG 1mM durante 4, 6 e 10 horas foram marcadas com Anexina-V FITC e PI. Citograma bidimensional em “dot plot” e escala linear formado por Anexina-V FITC na abscissa e PI na ordenada. Quadrante superior direito (SD): células necróticas. Quadrante inferior esquerdo (IE): células vivas. Quadrante inferior direito (ID): células apoptóticas.

4.4 Ativação de caspase-3 durante o processo de apoptose induzido por SNOG

A ativação de caspase-3 foi analisada em células tratadas com SNOG 1mM em períodos crescentes de incubação. Neste ensaio, o anticorpo policlonal anti-CPP32 apresentou imunoreatividade contra a pró-caspase-3 (32kDa) e contra a sub-unidade de 17kDa. A ativação da caspase-3 foi observada após 4 horas de incubação com o doador de NO⁻ (Figura 9).

Figura 9: Análise da ativação da caspase-3: Extratos celulares obtidos das células THP-1 na presença ou ausência de SNOG 1mM nos períodos determinados foram submetidos a Western Blot utilizando anticorpo anti-CPP32 para a detecção da proforma (32kDa) e sub-unidade de 17 kDa. Ensaio representativo de 3 experimentos similares.

4.5 Digestão dos plasmídeos p21Ras^{C118S} e p21Ras^{Wt}

A ativação da proteína Ras por NO[•] através da S-nitrosação do resíduo 118 da cisteína foi inicialmente descrita por Lander e colaboradores (Lander 1997). Muito embora a ativação de Ras mediada por NO[•] esteja associada à ativação de uma via de sinalização constituída pelas proteínas quinases, Raf-1, MEK e ERK 1/2 (Lander et al., 1996; Oliveira et al., 2003), dois caminhos opostos, proliferação e apoptose, podem ser trilhados pela célula após a ativação desta via.

Passamos então a investigar o papel da ativação de Ras mediada por NO[•] na morte de células THP-1 por apoptose. Para tanto, transfectamos células THP-1 com cópias do gene codificador de Ras que apresenta mutação pontual e a troca do aminoácido cisteína por serina na posição 118. Como controle da transfecção, introduzimos cópias adicionais do gene codificador de Ras tipo selvagem (Wt).

A confirmação da estrutura dos plasmídeos p21Ras^{C118S} e p21Ras^{Wt} (Figura 10) após amplificação foi realizada utilizando-se as enzimas de restrição Bstx e BamHI em conjunto. Após amplificação por reação de polimerase em cadeia (PCR), a análise das digestões foi feita em gel de agarose 1%, contendo brometo de etídeo após eletroforese (Figura 11).

Figura 10: Vetor pcDNA3. A proteína p21Ras contendo cisteína mutada por serina e p21Ras tipo selvagem foram expressas no vetor pcDNA3.

- 1 - Marcador de peso molecular Lambda
 2 - p21Ras^{C118S} Bstx + BamH-I
 3 - p21Ras^{Wt} Bstx + BamH-I

Figura 11: Digestão dos plamídeos p21Ras^{C118S} e p21Ras^{Wt} com as enzimas de restrição Bstx e BamHI em conjunto. A presença do inserto foi confirmada utilizando-se as enzimas de restrições BamHI e Bstx I em conjunto, o que conferiu fragmentos de 5.8Kb e 800bp.

4.6 Cinética de ativação da proteína Ras

A ativação de Ras por NO[•] foi avaliada utilizando-se o domínio da proteína Raf que se liga a Ras no estado ativo. Esse domínio foi expresso como uma proteína de fusão com glutathiona S-transferase (DE ROOIJ; BOS et al., 1997) a proteína resultante é pré-conjugada com “beads” de glutathiona-sepharose. A ativação de Ras foi observada após intervalos curtos de incubação com SNOG, 15 e 30 minutos, retornando ao estado basal após 1 hora de estímulo (Figura 12).

Figura 12: Cinética de ativação da proteína Ras: Células THP-1 foram tratadas com SNOG 1mM e, após intervalos de tempo crescentes, a ativação de Ras (Ras-GTP) e proteína total foram determinadas por reações de Western blot. Ensaio representativo de 3 experimentos similares.

4.7 Avaliação da atividade p21Ras em células THP-1 transfectadas com plasmídeos p21Ras^{C118S} e p21Ras^{Wt}

Observamos ausência de resposta à incubação com SNOG 1mM nas células que apresentam a cisteína 118, substituída por serina e resposta positiva nas células que apresentam plasmídeo Wt. Observamos também que, nas células Wt, Ras total está presente em maior quantidade (Figura 13).

Figura 13: Ativação da proteína p21Ras: Células THP-1 transfectadas com plasmídeo C118S ou Wt foram tratadas com SNOG 1mM e, após 15 minutos, a ativação de Ras (Ras-GTP) e proteína total foram determinadas por reações de Western blot. Ensaio representativo de 3 experimentos similares.

4.8 Comparação da morte celular entre as células parental, p21Ras^{C118S} e p21Ras^{Wt}

A influência da reação de S-nitrosação de p21Ras no processo de apoptose foi avaliada comparando-se a exposição de fosfatidilserina entre as células parentais e as células transfectadas com os plasmídeos p21Ras^{C118S} ou p21Ras^{Wt}. As células parentais e transfectadas foram tratadas com SNOG 1mM, diferentes intervalos de incubação e submetidas à análise de citometria de fluxo. Observamos menor número de células apoptóticas quando estas foram transfectadas com o plasmídeo p21Ras^{C118S} (Figura 14).

Figura 14: Participação da cisteína 118 na apoptose: Células THP-1 transfectadas com plasmídeo p21Ras^{C118S} ou p21Ras^{Wt} foram tratadas com SNOG 1mM durante 4 horas e submetidas a ensaio de detecção de fosfatidilserina na superfície externa da membrana celular.

4.9 Evidência da participação da S-nitrosação de Ras no processo de apoptose induzida por NO[•]

A confirmação do envolvimento da reação de S-nitrosação de Ras durante o processo de apoptose foi realizada utilizando-se peróxido de hidrogênio (H₂O₂) como estímulo apoptótico. Células THP-1 foram incubadas com H₂O₂ 1mM durante 4 horas e marcadas com Anexina-V FITC e PI. Observamos exposição de fosfatidilserina devido à indução de apoptose; entretanto, não houve diferença significativa na exposição de fosfatidilserina das células transfectadas com plasmídeos p21Ras^{C118S}, quando comparadas com as células transfectadas com p21Ras^{Wt} (Figura 15).

Figura 15: Indução de apoptose com H₂O₂: Células THP-1 transfectadas com plasmídeo p21Ras^{C118S} ou p21Ras^{Wt} foram tratadas com H₂O₂ 1mM durante 4 horas e submetidas a ensaio de detecção de citometria de fluxo.

4.10 Participação das MAP quinases no processo de apoptose induzida por NO nas células parentais

A cinética de ativação das MAP quinases; ERK (1/2), JNK/SAPK e p38 foi avaliada em lisado de células THP-1 cultivadas com SNOG 1mM em diferentes períodos de incubação. Em cada ensaio, foram avaliadas sua ativação (correspondente a forma fosforilada da proteína) e expressão total das mesmas. A ativação das MAP quinases ERK (1/2), JNK/SAPK e p38 apresentaram o mesmo padrão de resposta ao estímulo de SNOG. A ativação de ERK e JNK iniciou-se após 2 horas de estímulo; entretanto, atingiram pico máximo de ativação em 4 e 2 horas, respectivamente, retornando ao nível basal após 6 horas (Figura 16) (Figura 17). A ativação de p38 iniciou-se 1 hora após o estímulo com SNOG, atingiu ativação máxima após 2 horas, tal qual JNK, e retornou ao nível basal em 6 horas (Figura 18).

Figura 16

Figura 16: Cinética de ativação de ERK1/2. A ativação de ERK 1/2 em células THP-1 na ausência ou presença de SNOG 1mM foi avaliada em intervalos de tempo crescentes através de técnica de Western Blot. Ativação de ERK 1/2 utilizando-se anticorpos que detectam as isoformas de peso molecular 44kDa e 42kDa totais e fosforiladas. Ensaios representativos de 3 experimentos similares.

Figura 17

Figura 17: Cinética de ativação de JNK/SAPK. A ativação de JNK/SAPK em células THP-1 na ausência ou presença de SNOG 1mM foi avaliada em intervalos de tempo crescentes através de técnica de Western Blot. Ativação de JNK/SAPK utilizando-se anticorpos que detectam JNK total (54kDa) e as isoformas fosforiladas pJNK 54kDa e 46kDa. Ensaios representativos de 3 experimentos similares.

Figura 18

Figura 18: Cinética de ativação de p38. A ativação de p38 em células THP-1 na ausência ou presença de SNOG 1mM foi avaliada em intervalos de tempo crescentes através de técnica de Western Blot. Ativação de p38 utilizando-se anticorpos monoclonais que detectam as formas totais e fosforiladas. Ensaios representativos de 3 experimentos similares.

4.11 Ativação das MAP quinases ERK, JNK e p38 nas células transfectadas com os plasmídeos p21Ras^{C118S} e p21Ras^{Wt}

Uma vez observada a diferença de ativação de Ras nas células transfectadas com os plasmídeos C118S e Wt, questionamo-nos se a ativação das MAP quinases ERK, JNK e p38 sofria alterações em virtude da mutação de Ras. Para tanto, as amostras foram submetidas à corrida de eletroforese em um mesmo gel de poliacrilamida e igual tempo de revelação, uma vez que estavam na mesma membrana de nitrocelulose (Figura 19) (Figura 20) (Figura 21). A densitometria das bandas correspondentes à fração total das proteínas, nos dois grupos, resultou similar. Não observamos diferenças nos níveis de ativação de JNK e p38 entre as células transfectadas com os plasmídeos C118S e o plasmídeo Wt. Entretanto, constatamos menor ativação de ERK nas células transfectadas com o plasmídeo C118S, indicando que a ausência da cisteína responsiva ao NO[•], promove menor ativação dessa via.

Figura 19

Figura 19: Comparação da ativação de ERK entre as células transfectadas com os plasmídeos C118S e Wt. Ativação de ERK 1/2 utilizando-se anticorpos que detectam as isoformas fosforiladas e totais de peso molecular 44kDa e 42kDa.

Figura 20

Figura 20: Comparação da ativação de JNK entre as células transfectadas com os plasmídeos C118S e Wt. Ativação de JNK/SAPK utilizando-se anticorpos que detectam JNK total (54kDa) e as isoformas fosforiladas pJNK 54kDa e 46kDa.

Figura 21

Figura 21: Comparação da ativação de p38 entre as células transfectadas com os plasmídeos C118S e Wt. Ativação de p38 utilizando-se anticorpos que detectam as formas totais e fosforiladas.

4.12 Dependência da via MAPquinase-ERK no processo de apoptose

A dependência da via MAPK-ERK no processo de morte celular por apoptose foi confirmada utilizando-se PD98059, um inibidor específico de MEK, a MAP quinase de ERK. Células THP-1 foram pré-tratadas com PD98059 durante 30 minutos e em seguida, cultivadas na presença ou ausência de SNOG. A ativação de ERK foi observada nas células tratadas apenas com SNOG. A inibição de MEK foi observada após a incubação das células com PD98059 na concentração 50 μ M (Figura 22). Após confirmação da inibição da atividade de ERK, as células foram submetidas à análise de morte celular por ensaio de Anexina-V FITC e PI por citometria de fluxo nas mesmas condições descritas anteriormente. Observamos que a pré-incubação com PD98059 inibe significativamente a morte induzida por SNOG de células parentais e células transfectadas com os plasmídeos p21Ras^{C118S} e p21Ras^{Wt} (Figura 23).

A exposição de fosfatidilserina nas células transfectadas com o plasmídeo C118S é significativamente menor quando comparada com as células parentais e transfectadas com o plasmídeo Wt. Apenas a presença do inibidor de ERK, PD98059, não produziu aumento ou diminuição significativa de morte celular nas células parental e transfectadas. Entretanto, o pré-tratamento das células com o inibidor e posterior incubação com SNOG reduziu significativamente a morte celular quando comparado às células tratadas apenas com SNOG. Observamos também que, a porcentagem de exposição de fosfatidilserina nas células parental e transfectadas com o plasmídeo Wt não apresentam diferença significativa.

Figura 22: Inibição da ativação de ERK (1/2): Células THP-1 foram pré-tratadas com 50 μM de PD098059, seguido de tratamento com SNOG 1 mM por 4 horas. Células sem tratamento e apenas na presença de SNOG foram usadas como controle.

Figura 23: Influência do inibidor de MEK na apoptose: Células THP-1 foram cultivadas na presença de PD098059, seguido de tratamento com SNOG 1mM por 4 horas. Após esse período, as células foram marcadas com Anexina V-FITC e PI.

4.13 Independência da via JNK no processo de apoptose

A independência da via JNK no processo de apoptose foi confirmada utilizando-se o inibidor de JNK, CEP 11004 (MARONEY et al., 2001). Inicialmente foi determinada a concentração de CEP que inibia a ativação de JNK. Para tanto, células foram pré-tratadas com concentrações crescentes do inibidor durante 8 horas e, em seguida, foi adicionado SNOG 1mM. A ativação de JNK retornou ao nível basal quando utilizamos 300nM do inibidor CEP 11004 (Figura 24). Em seguida, a influência do inibidor no processo de morte celular foi avaliada por citometria de fluxo. O pré-tratamento das células com o inibidor CEP 11004 não modificou de maneira estatisticamente significativa a morte celular das células quando comparadas às células expostas somente ao SNOG (Figura 25).

Figura 24: Inibição da ativação de JNK/SAPK: Células THP-1 foram pré-tratadas com CEP 11004, durante 8 horas, nas concentrações 100nM e 300nM, seguido de tratamento com SNOG 1mM por 2 horas. Células sem tratamento e apenas na presença de SNOG foram usadas como controle.

Figura 25: Ausência da participação de JNK no processo de morte celular: Células THP-1 foram incubadas com CEP 11004 durante 8 horas e, em seguida, tratadas com SNOG 1mM. Células, na ausência de CEP 11004, foram utilizadas como controle.

4.14 Independência da via p38 no processo de apoptose

A independência da via JNK no processo de apoptose foi confirmada utilizando-se o inibidor específico de p38; SB220025 (JACKSON et al., 1998). As células foram pré-tratadas com concentrações crescentes do inibidor durante 2 horas e, em seguida, foi adicionado SNOG 1mM. A ativação de p38 retornou ao nível basal quando utilizamos concentrações a partir de $1\mu\text{M}$ (Figura 26). Na seqüência, a influência do inibidor no processo de morte celular foi avaliada por citometria de fluxo. A presença do inibidor de p38 não alterou de maneira significativa a porcentagem de células mortas quando comparadas

com células incubadas apenas com o doador de NO, o que indica a ausência de participação dessa via no processo de apoptose estudado (Figura 27).

Figura 26: Inibição da ativação de p38: Células THP-1 foram pré-tratadas com SB 220025, durante 2 horas, nas concentrações 0,25 μM , 0,5 μM , 1 μM e 2 μM , na ausência ou presença de SNOG 1mM por 2 horas. Células sem tratamento e apenas na presença de SNOG foram usadas como controle.

Figura 27: Ausência de participação de p38 no processo de morte celular: Células THP-1 foram incubadas com SB 220025, durante 2 horas e em seguida tratadas com SNOG 1mM. Células, na ausência de SB 220025, foram utilizadas como controle.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A morte celular mediada por NO[•] foi observada em vários tipos celulares dentre eles monócitos, macrófagos, timócitos, células neuronais (BRÜNE, et al, 1999). Outros tipos celulares tais como hepatócitos, linfócitos B humanos, células endoteliais, miócitos cardíacos e esplenócitos são resistentes à toxicidade do NO[•] (LIU; STAMLER, 1999). Além disso, as concentrações de NO[•] às quais, determinado tipo celular é exposto também determinam a viabilidade celular. Esse dado pode ser ilustrado pela indução da apoptose em células PC12 neuronais, expostas a concentrações de doadores da ordem de milimolar e prevenção da morte celular, quando são expostas a concentrações da ordem de micromolar ou inferiores (KIM et al. 1999). Em nosso laboratório estudos com outras linhagens celulares e diferentes doadores de NO[•] demonstraram que concentrações na ordem de 100µM de SNAP estimulavam a proliferação de células endoteliais de aorta de coelho (OLIVEIRA C.J.R. et al., 2003), ao passo que o mesmo doador, quando utilizado em concentrações maiores (750 a 1000µM), induziram a morte de células HeLa.

A participação do NO[•] no processo de apoptose tem sido objeto de vários estudos estudos que buscam a elucidação dos mecanismos envolvidos na regulação desses eventos. Nosso questionamento iniciou-se a partir da proposta de participação da proteína Ras no processo de morte celular (KAUFFMANN-ZEH et al., 1997) e no conhecimento de que tal proteína apresenta, na posição 118, uma cisteína, que ao ser nitrosada, torna-se ativa (LANDER et al., 1997). Assim, propusemo-nos a avaliar a ativação e participação das MAP quinases (ERK 1/2, JNK e p38) a partir da nitrosação de Ras, em células da linhagem leucêmica monocítica THP-1, no processo de apoptose induzida pelo doador de óxido nítrico; SNOG.

O doador de NO[•] eleito foi o SNOG, uma droga que libera maior quantidade de NO[•] quando comparada a outros doadores de NO[•], tais como SNP e SNAP, sendo o mais estável entre os três doadores (MEGSON 2000). Além disso, SNOG libera cátion nitrosônio e promove reação de transnitrosação ao reagir com grupos sulfidrilas (HOGG, 2002).

Estudos anteriores demonstraram que SNOG na concentração 1mM induzia apoptose em células da linhagem monocítica U937 (BROCKHAUS; BRÜNE, 1998). Baseados nessa informação, avaliamos inicialmente a susceptibilidade da linhagem THP-1 a várias concentrações de SNOG através do ensaio de MTT. Esse ensaio baseia-se na redução do MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazolio] por ação de desidrogenases mitocondriais de células vivas. Na concentração 1mM, SNOG inibiu consideravelmente a atividade das desidrogenases mitocondriais das células THP-1 incubadas por 10 horas na presença do doador de NO[•]. Tal inibição caracterizou a perda de viabilidade em 80% e, conseqüente, a morte destas células (Gráfico 1).

Em seguida, avaliamos se as características morfológicas e bioquímicas da morte celular induzida pelo NO[•] correspondiam àquelas presentes na apoptose. A célula apoptótica ativa uma série de eventos moleculares característicos que culminam com o reconhecimento dos corpos apoptóticos por fagócitos “in vivo” ou com a necrose secundária à apoptose na ausência desses, como ocorre no processo “in vitro”. Um dos eventos primários é a desidratação celular. A perda intracelular de água induz a condensação citoplasmática e nuclear, o que pode ser visualizado com o corante H33358. Os eventos morfológicos subseqüentes incluem a desintegração do envelope nuclear, proteólise de lamininas e fragmentação nuclear. Os fragmentos nucleares, juntamente a outros constituintes do citoplasma (incluindo organelas intactas), são então envolvidos pela membrana plasmática, formando estruturas denominadas corpos apoptóticos (KERR, et al., 1994). A avaliação em microscopia óptica de fluorescência revelou um aumento significativo do

número de células THP-1 com cromatina condensada a partir de 4 horas de incubação com SNOG; início do aparecimento de corpos apoptóticos a partir de 6 horas e seu incremento significativo após 12 horas de incubação (Gráfico 4). As células controle apresentaram coloração menos intensa e cromatina homogeneamente distribuída quando comparadas às tratadas com SNOG.

Outra característica avaliada de células apoptóticas foi a exposição de fosfatidilserina. A externalização de fosfatidilserina é especificamente reconhecida por receptores de células fagocíticas incluindo CD36, CD68, CD14 e LOX-1 (FADOK et al 1992). Em células vivas, os fosfolípides da membrana plasmática estão assimetricamente distribuídos entre as superfícies interna e externa da membrana plasmática. Enquanto fosfatidilcolina e esfingomiélin estão expostas na superfície externa da bicamada lipídica, fosfatidilserina localiza-se na superfície interna. Na célula apoptótica ocorre perda de assimetria e exposição da fosfatidilserina, que pode ser identificada por sua ligação desta com a anexina V (FADOK et al., 1992). A anexina V é um anticoagulante que se liga preferencialmente a fosfolípides carregados negativamente, tal como a fosfatidilserina. A conjugação da anexina a um fluorocromo, por exemplo isotiocianato de fluoresceína, permite a identificação de células apoptóticas por citometria de fluxo. A técnica pode ser aperfeiçoada com a adição de PI, que possibilita a distinção entre células apoptóticas e necróticas. As células apoptóticas não são permeáveis ao PI, devido ao grande tamanho da molécula; entretanto, na necrose, a membrana plasmática perde a integridade e permite a entrada de PI (KOOPMAN et al., 1994).

A avaliação da exposição de fosfatidilserina mostrou aparecimento de células apoptóticas após 4, 6 e 10 horas de incubação com SNOG e necrose secundária à apoptose após 10 horas de incubação (Figura 8). Outra característica de células apoptóticas, observada durante o ensaio de citometria de fluxo, foi a diminuição do tamanho celular e aumento da complexidade celular, determinados pela diminuição da intensidade de FSC (canal frontal de dispersão luminosa) e aumento da intensidade de SSC (canal lateral de

dispersão luminosa), respectivamente, quando essas células foram submetidas a um laser de 488nm em citômetro de fluxo (Figura 7). A necrose está associada a uma rápida diminuição dos valores de FSC e SSC, reflexo da ruptura da membrana plasmática e extravasamento do conteúdo citoplasmático (DARZYNKIEWICZ et al., 1997).

Uma vez determinada a cinética de aparecimento das alterações morfológicas associadas à apoptose, demonstramos a participação de caspase-3 no processo (Figura 9). A participação da caspase-3 na apoptose mediada por $\text{NO}^\cdot$ ainda é matéria de debate e a literatura mostra que o $\text{NO}^\cdot$ pode ativar ou inibir caspase-3. A S-nitrosação da cisteína 163, um aminoácido conservado nessa família de proteases, inibe a atividade enzimática da caspase-3 (DIMMELER; ZEIHNER, 1997). Alguns estudos sugerem ainda que os efeitos pró-apoptóticos do $\text{NO}^\cdot$ resultam da formação de ONOO^- , produto da reação entre $\text{NO}^\cdot$ e O_2^- . ONOO^- alteram a permeabilidade da membrana mitocôndria, induzem liberação de citocromo c e ativação de caspases. Os efeitos pró-apoptóticos do ONOO^- já foram demonstrados em timócitos (SALGO et al., 1995), células neuronais (BONFOCO et al., 1995) e tumorais (LIN et al., 1995). O dano direto ao DNA (NGUYEN et al., 1992) acompanhado do acúmulo de p53 é um indicador da indução da apoptose pelo $\text{NO}^\cdot$, seguido da ativação de caspases. Entretanto, existem também mecanismos que são independentes de p53, indicando que a transdução de sinais pró-apoptóticos é mais complexa do que a relação direta proposta anteriormente (MESSMER; BRÜNE, 1996).

Nossa hipótese de trabalho contemplava essa possibilidade quando propusemos que a nitrosação do resíduo de cisteína 118 de Ras era o evento iniciador da apoptose mediada por $\text{NO}^\cdot$ em células THP-1. As primeiras evidências da participação de Ras vieram da determinação da exposição de fosfatidilserina em células THP-1 do tipo selvagem e em células THP-1, expressando C118S. Exposição de fosfatidilserina em células THP-1, tratadas com doador de $\text{NO}^\cdot$, estava consideravelmente reduzida nas células que expressavam Ras insensível à reação de S-nitrosação (Figura 14).

A importância da S-nitrosação de Ras na morte induzida por $\text{NO}^\cdot$ ficou evidente quando avaliamos a morte de células THP-1 mediada por H_2O_2 . Não houve diferença significativa na exposição de fosfatidilserina quando expusemos ao oxidante, as células THP-1 que expressavam $\text{p21Ras}^{\text{C118S}}$ ou as mesmas células que expressavam Ras do tipo selvagem (células parentais e Wt) (Figura 15).

Uma vez confirmada a ativação da proteína Ras através da S-nitrosação da cisteína 118, avaliamos a participação das MAP quinases (ERK 1/2, JNK e p38) no processo de apoptose mediada por $\text{NO}^\cdot$. A primeira observação que fizemos foi a presença majoritária da isoforma de 42kDa de ERK (ERK2) em relação à isoforma de 44kDa (ERK1), tanto na forma total quanto na fosforilada (Figura 16). A maioria dos tipos celulares exibe quantidades equivalentes das duas isoformas. Na literatura não há relatos sobre o quê essa diferença possa implicar na regulação dos processos de sinalização celular. Dados obtidos recentemente pelo nosso grupo sugerem que as isoformas desempenham funções diferentes em células de aorta de coelho, estimuladas com doadores de $\text{NO}^\cdot$. Possivelmente, uma das isoformas fosforila fatores nucleares e a outra permanece no citoplasma, onde poderia fosforilar o domínio intracitoplasmático do receptor de EGF, além de outros substratos, promovendo regulação de proteínas envolvidas na remodelagem de citoesqueleto. Entretanto, células THP-1 não expressam receptor de EGF, o que pode justificar a predominância de apenas uma isoforma.

Observamos também que a ativação das três MAP quinases inicia-se concomitantemente após 2 horas de incubação com SNOG; entretanto, a ativação de ERK 1/2, mantém-se constante por até 4 horas de incubação e retorna ao nível basal após 6 horas (Figura 16). Em relação à JNK e p38, ocorre um pico de ativação significativamente maior em 2 horas quando comparado a 4 horas de incubação com o doador de $\text{NO}^\cdot$ (Figuras 17 e 18). A ativação tardia das MAP quinases, mediada por $\text{NO}^\cdot$, correlacionou-se com a ocorrência de apoptose em nosso modelo. Em concordância com nossos resultados, na

apoptose de células RAW264.7, observou-se ativação tardia das MAP quinases detectadas após 4 horas de incubação com SNOG 1mM. No entanto, as fosforilações de ERK 1/2, JNK e p38 permaneceram por 4, 8 e 16 horas, respectivamente (CALLSEN; BRÜNE, 1999). Nesse mesmo modelo experimental, a ativação de JNK e p38 foi observada apenas quando as células foram tratadas com SNOG 1mM; em concentrações menores; 0,25mM e 0,5mM; foi observada apenas a ativação de ERK 1/2. Ao contrário, quando NO estimulava proliferação ou sobrevivência, observou-se ativação rápida das ERK1/2 (OLIVEIRA et al., 2003).

O uso de inibidores específicos para as MAP quinases permitiu que estabelecêssemos qual, ou quais quinases participavam da via de sinalização que conduzia as células para morte por apoptose, induzida por NO. O pré-tratamento das células com PD98095 (ALESSI et al., 1995), inibidor específico de MEK-1, durante 30 minutos, assegurou a inibição de ERK 1/2 após a adição de SNOG (Figura 22). Observamos que a inibição de ERK1/2 induziu a diminuição significativa da exposição de fosfatidilserina nas células parentais e em células transfectadas com plasmídeo contendo o gene codificador para p21Ras tipo selvagem (Wt). Como esperado, não observamos efeito significativo do inibidor de MEK nas células que expressavam p21Ras^{C118S} (Figura 23). Portanto, ERK 1/2 participa da transdução de sinais que levam à apoptose de células THP-1, tratadas com SNOG 1mM. ERK é uma serina/treonina quinase classicamente descrita na proliferação celular, entretanto, a ativação prolongada de ERK 1/2 e a participação desta MAP quinase no processo de morte celular foram relatadas em células da linhagem neuronal B65 quando tratadas com a neurotoxina 6-hidroxi-dopamina. Além da ativação prolongada de ERK 1/2, o bloqueio dessa via com inibidor de MEK conferiu citoproteção a essas células (KULICH; CHU, 2001).

Uma vez observada a participação de ERK em nosso sistema, prosseguimos investigando as outras MAP quinases. Conforme verificamos, a maior ativação de JNK ocorreu após 2 horas de estímulo com SNOG. O inibidor

específico de JNK; CEP11004 (MURAKATA et al., 2001) promoveu diminuição significativa da ativação de JNK de 8 horas e estímulo com SNOG por 2 horas (Figura 24). A inibição da ativação de p38 foi obtida com SB22025, um inibidor específico dessa quinase (Figura 25). Verificamos diminuição significativa da ativação de p38 após pré-tratamento com SB22035 1 μ M, durante 2 horas e estímulo com SNOG 1mM por 2 horas (Figura 26).

Ao contrário do sucedido aconteceu após a inibição de MEK; as inibições de JNK e p38 não alteraram de modo significativo a morte das células THP-1 induzida por NO $\cdot$. Tais dados sugerem que, nesse sistema, ERK 1/2 participam do processo de morte celular e provavelmente estimulam a fosforilação de fatores de transcrição nuclear que promovem esse processo.

Comparamos também a ativação das três MAP quinases nas células transfectadas com plasmídeos C118S e Wt, e estimuladas com o doador de NO $\cdot$, nas mesmas condições utilizadas nas células parentais. A ativação de JNK e p38 não apresentou diferença significativa quando comparamos C118S e Wt, além de apresentarem o mesmo padrão de resposta das células parentais; ou seja, ativação significativamente maior após 2 horas de estímulo com SNOG e diminuição da resposta após 4 horas (Figuras 20 e 21). Entretanto, quando comparamos a ativação de ERK 1/2, observamos diminuição da fosforilação de ERK 1/2 nas células que expressam p21Ras^{C118S} (Figura 19), quando comparadas às células Wt. A partir desses resultados, questionamo-nos por quê a única MAP quinase a apresentar correlação direta entre sua ativação e morte por apoptose induzida por NO $\cdot$ foi ERK 1/2, uma vez que JNK e p38 também são dependentes de Ras. Uma possível explicação reside no fato de ERK 1/2 ser ativada exclusivamente via Ras (VOJTEK, et al., 1993), e JNK e p38 poderem ser ativadas por outras proteínas trocadoras de GTP de baixo peso molecular presentes na membrana plasmática; por exemplo, Rac ou Cdc42, que hipoteticamente também poderiam ser ativadas por nitrosonação. Rac e Cdc42 são membros da família Rho de proteínas trocadoras de GTP e regulam a montagem de estruturas de actina no citoesqueleto associadas a

motilidade celular e metástase, bem como a atividade NADPH oxidase fagocitária. Na forma ativa, Rac e Cdc42 ligam-se e ativam um grupo de serina/treonina quinases em células de mamíferos; as Paks. Paks não fosforilam diretamente p38 e JNK, ambas requerem dupla fosforilação de resíduos de treonina e tirosina. Essa dupla fosforilação é mediada por MAP quinases; MKKKs e MKKs.

Entretanto, apesar de termos observado ativação das duas MAP quinases, esta ativação não se correlacionou com a morte por apoptose. Observações recentemente publicadas (RÔMASHKO et al., 2003) apontam para um papel preponderante das MAP quinases JNK e p38 na apoptose induzida por H₂O₂. Nestas condições, ERK 1/2 não desempenham qualquer papel, sugerindo uma ativação preferencial das duas MAP quinases quando a apoptose era induzida por condições de estresse oxidativo. Com base em nossos resultados poderíamos sugerir que sob condições de estresse nitrosativo (elevado fluxo de NO), a MAP quinase mediadora da apoptose resultante são as ERK 1/2.

Uma vez definida que a via Ras/ Raf/ MEK/ ERK estava envolvida na apoptose das células THP-1 induzida por SNOG, questionamo-nos por quê uma via que classicamente está relacionada à proliferação, também sinaliza para a morte celular. De fato, existe um número similar de características morfológicas entre mitose e apoptose, incluindo, destacamento celular da matriz, arredondamento e diminuição do tamanho celular e condensação da cromatina, salvas as devidas diferenças (o DNA é fragmentado na apoptose, ao passo que, na mitose, é duplicado e separado). A proliferação e a apoptose compartilham de proteínas comuns, entre elas, c-myc, p53, pRb, Ras, proteínas da família Bcl-2, ciclinas, ciclinas dependentes de quinases (CDKs), e inibidores do complexo ciclina-Cdk (CDKIs) (VERMEULEN et al., 2003).

O ciclo celular é dividido em quatro fases distintas, denominadas: G1, S, G2 e M. Durante G1, as células fazem as preparações necessárias para a

síntese do DNA, que ocorre na fase S. Na fase G2, as células preparam-se para a mitose, que ocorre na fase M, durante a qual o material genético é segregado em duas células filhas idênticas. A regulação da divisão celular é dependente de vários estímulos extracelulares, que incluem fatores de crescimento, diferenciação e estresse celular. Em G0 as células estão quiescentes e competentes para responder aos estímulos de crescimento e prosseguir para G1. Uma vez que as células atingiram um determinado ponto em G1, denominado, “ponto de restrição”, elas comprometem-se a prosseguir para S e G2/M (SHERR, 1996).

Todas as fases do ciclo celular são controladas pela interação entre ciclinas e ciclinas dependentes de quinase (Cdks). A atividade das Cdks regulam sinais promotores de crescimento e antiproliferativos. A ativação das Cdks requer a fosforilação de resíduos conservados de treonina. No ponto de restrição em G1, a proteína supressora de tumor do retinoblastoma (Rb) impede a transição da fase G1 para S. Essa supressão da proliferação está relacionada à habilidade da proteína Rb se ligar e seqüestrar uma seqüência específica do fator de transcrição E2F. Para as células prosseguirem de G1 para S, Rb deve estar inativado; isso ocorre quando Rb é fosforilado pelas Cdks. Quando as células quiescentes são estimuladas a re-entrar no ciclo celular, Rb é inativado pela fosforilação catalisada por Cdk4 e Cdk6 (STEVENS; THANGUE, 2003).

Cdk4 é ativada durante a metade de G1 pela ciclina D1. Cdk4 ativada fosforila Rb e a inativa, esta, por sua vez, libera E2F. E2F promove a expressão de uma série de genes necessários para a transição entre G1 tardio e início de S, incluindo ciclina E, que é induzida na fase G1 tardia. Ciclina E liga-se a Cdk2 ativando-a. Rb inibe a progressão do ciclo celular ao interagir com o fator de transcrição E2F; quando Rb é fosforilado, E2F é liberado e estimula a proliferação. Além da inibição do ciclo celular através da supressão de E2F, Rb também inibe a apoptose. Entretanto, camundongos deficientes em Rb demonstraram extensa apoptose hepática, do sistema hematopoiético e neurológico (MORGENBESSER et al., 1994). O mecanismo pelo qual Rb/E2F

influencia a apoptose continua indeterminado e pode ser dependente ou independente de p53. Estudos demonstraram que E2F induz a expressão da proteína pró-apoptótica Apaf-1 que regula a liberação de citocromo c do espaço intramembranar mitocondrial (BLATTNER et al., 1999).

O fator de transcrição p53 regula a progressão do ciclo celular, apoptose, reparo de DNA e diferenciação celular. Em condições normais, p53 tem uma rápida taxa de renovação e seus níveis estão aumentados sob condições de hipóxia, dano ao DNA e estresse celular. A proteína p53 aparece mutada em pelo menos 50% dos tumores, tornando as mutações em p53 a modificação genética mais comum em tumores humanos (WIMAN, 1997).

Os complexos ativos ciclina-Cdk são inibidos pela ligação de proteínas inibidoras de Cdks (CDKIs), que são expressas em resposta a uma variedade de sinais antiproliferativos, tais como; dano ao DNA e sinais de diferenciação (SHERR; ROBERTS, 1999). Algumas dessas CDKIs incluem: p21^{Cip1}, p27^{kip1} e proteínas da família INK4 (p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} e p19^{INK4d}). A CDKI p16^{INK4a} é uma inibidora seletiva dos complexos ciclina D-Cdk4 e ciclina D-Cdk6, o que impede a fosforilação e inativação de Rb. Mutações em p16^{INK4A} são freqüentemente encontradas em culturas de células imortalizadas, ao passo que, a super-expressão de p16^{INK4A} promove a senescência celular irreversível (MEDEMA et al., 1997). A atividade do complexo ciclina-E-Cdk2 é suprimida pela CDKI p27^{kip1}, que se encontra em grandes quantidades nas células quiescentes e deve ser degradada pela ubiquitina/proteassoma para que as células saiam de G1 e entrem em S (SHEAFF et al., 1997). Outro inibidor de Cdks é p21^{Cip1}, ativado por vias p53 dependente e independente, em resposta a danos ao DNA e está super-expresso em células senescentes. p21^{Cip1} inibe os complexos ciclina D-Cdk4/6 e ciclina E-Cdk2 (SHERR, 1995) (figura 28).

Outro fator de transcrição que pode participar da proliferação celular e apoptose e pode ser fosforilado por ERK1/2 é c-myc. Esse fator de transcrição nuclear que exerce papel crítico na progressão do ciclo celular, especialmente

durante a transição da fase G1 para S (SPENCER; GROUDINE et al., 1991), e tem efeitos regulatórios na transcrição de genes importantes no controle do ciclo celular, ciclina D1, ciclina D2, ciclina E, ciclina A, Cdk1, Cdk2, Cdk4 e E2F, por exemplo (BORN et al., 1994; BEIER et al., 2000). Além de favorecer a proliferação celular, c-myc também transcreve proteínas importantes na apoptose. c-myc induz a liberação de citocromo c e regula a transcrição de Bax (DUELLI, LAZEBNIK, 2000; MITCHELL et al., 2000; SOUCIE et al., 2001). Um modelo que explica a habilidade de c-myc conduzir a apoptose e mitose sugere que diferentes sub-regiões de c-myc no domínio N-terminal podem controlar funções biológicas distintas (CHANG et al, 2000; CONZEN et al, 2000; NESBIT et al, 2000).

A participação da via Ras/Raf/MEK/ERK, em resposta a danos ao DNA, foi observada em células tumorais ovarianas incubadas com cisplatina (PERSONS et al., 2000). Células das linhagens NIH3T3 e MCF7, em resposta aos quimioterápicos, etoposide e adriamicina ativam ERK 1/2, que por sua vez ativam p21^{Cip1}, inibidor do complexo ciclina D-Cdk4 e ciclina E-Cdk2 que impede a fosforilação e inativação de Rb; conseqüentemente, E2F não é liberado e o ciclo celular não pode prosseguir. Na presença de PD98059, ocorre diminuição da ativação de p21^{Cip1} e progressão do ciclo celular. A quantificação da apoptose pelo método do TUNEL, revelou diminuição significativa do número de células apoptóticas quando estas foram pré-incubadas com PD98059 e expostas ao etoposide (TANG et al., 2002).

A duração do tempo de ativação das MAP quinases parece regular a expressão de fatores de transcrição, tal como p21^{Cip1}, o que explicaria a ativação tardia de ERK na morte celular e ativação rápida na proliferação celular. Outros estudos demonstraram que a ativação transiente das MAP quinases é suficiente para induzir a expressão da ciclina D1 e permitir a progressão do ciclo celular; enquanto a ativação sustentada das MAP quinases induz a fosforilação de p21^{Cip1}, o que bloqueia a progressão do ciclo (WOODS, et al., 1997; SEWING et al., 1997). A introdução de proteínas Ras em

fibroblastos de camundongos e humanos provocou arraste do ciclo celular e expressão elevada de p21^{Cip1} e p16^{INK4a} (SERRANO et al., 1997; ZHU et al., 1998; LIN et al., 1998).

Assim, a partir dos dados obtidos, propomos o seguinte mecanismo de sinalização celular no processo de apoptose induzido por NO em células THP-1 (figura 29 e 30).

Figura 28: Ciclo celular. Todas as fases do ciclo são controladas pela interação entre ciclinas e cdks. No ponto de restrição em G1, Rb é fosforilada pelos complexos ciclinas-cdks, tornando-se inativada, conseqüentemente E2F é liberado e promove a expressão de genes necessários para a transição entre G1 e S. As CDKIs (p16^{INK4a}, p21^{Cip1} e p27^{kip1}) são proteínas inibidoras dos complexos ciclina-CDK.

Figura 29: Mecanismo proposto na apoptose de células THP-1 induzida por NO. A proteína Ras, após ser nitrosada na cisteína 118, ativa as MAP quinases ERK1/2, JNK e p38. A inibição dessas vias com a utilização dos respectivos inibidores, PD98059, CEP11004 e SB220024 demonstrou que apenas a inibição de MEK provocou diminuição da exposição de fosfatidilserina, indicando ser essa a via que regula o processo de apoptose induzido por NO nas células THP-1. Uma hipótese para a ativação de JNK e p38 é a possível S-nitrosação de Rac e Cdc42.

Figura 30: Possível mecanismo na apoptose regulada via Ras/Raf/MEK/ERK. A ativação sustentada de ERK 1/2 modula a expressão de p21^{Cip1}, o que bloqueia a progressão do ciclo através da inibição do complexo ciclina D-Cdk4/6 e ciclina E-Cdk2, o que impede a fosforilação e inativação de Rb; conseqüentemente E2F não é liberado e o ciclo não prossegue.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- O doador de NO $\cdot$, SNOG, na concentração 1mM induziu apoptose das células THP-1 evidenciada por: exposição de fosfatidilserina, formação de corpos apoptóticos e ativação de caspase-3.
- A proteína Ras medeia o processo de apoptose induzida por NO $\cdot$ nas células THP-1.
- A cisteína 118 é essencial para a ativação de Ras durante o processo de apoptose induzido por NO $\cdot$.
- O processo de apoptose em células THP-1 induzida por NO $\cdot$ é dependente da MAP quinase ERK e independente de JNK e p38.

ANEXOS

7 ANEXOS

Ensaio H33258

Dependentes = Células vivas Núcleos picnóticos Corpos apoptóticos

Independentes = Situação Tempo

Interação = Situação x Tempo

Estatísticas Simples

Observações Válidas = 18

Distribuição dos dados

Efeito	Identificação	Dados
SITUAÇÃO	1 - Controle	9
SITUAÇÃO	2 - Snog 1mM	9
TEMPO	4hs	6
TEMPO	6hs	6
TEMPO	12hs	6

Interações	Identificação	Dados
SITUAÇÃO X TEMPO	1 4	3
SITUAÇÃO X TEMPO	1 6	3
SITUAÇÃO X TEMPO	1 12	3
SITUAÇÃO X TEMPO	2 4	3
SITUAÇÃO X TEMPO	2 6	3
SITUAÇÃO X TEMPO	2 12	3

Análise de Variância

Células vivas (Gráfico 2)

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
SITUAÇÃO	1	17236.06	17236.06	1846.720	0.00000
TEMPO	2	2011.000	1005.500	107.732	0.00000
SITUAÇÃO x TEMPO	2	1119.444	559.7222	59.970	0.00000
Resíduo	12	112.0000	9.333333		
Coeficiente de Variação =		5.022			

TUKEY

Variável = CÉLULAS VIVAS (9.333333)

TEMPO (horas)	Dados	Médias	Comparações 5%
4	6	75.5000	A
6	6	56.0000	B
12	6	51.0000	C

Q(.050, 12)= 3.770 Dms = 4.7020

TUKEY

Variável = CÉLULAS VIVAS (9.333333)

Interação SITUAÇÃO x TEMPO Comparações 5%

TEMPO (horas)	Controle	SNOG 1mM
4	95.33 A	55.67 B
6	91.67 A	20.33 B
12	88.33 A	13.67 B

TUKEY

Variável = CÉLULAS VIVAS (9.333333)

Interação TEMPO x SITUAÇÃO Comparações 5%

SITUAÇÃO	4	6	12
Controle	95.33 a	91.67 ab	88.33 b
SNOG 1mM	55.67 a	20.33 b	13.67 c

Núcleos apoptóticos (Gráfico 3)

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
SITUAÇÃO	1	6272.000	6272.000	548.039	0.00000
TEMPO	2	1627.444	813.7222	71.102	0.00000
SITUAÇÃO x TEMPO	2	2623.000	1311.500	114.597	0.00000
Resíduo	12	137.3333	11.44444		
Coeficiente de Variação = 13.067					

TUKEY

Variável = NÚCLEOS PICNÓTICOS (11.44444)

TEMPO (horas)	Dados	Médias	Comparações 5%
6	6	38.1667	A
4	6	24.5000	B
12	6	15.0000	C

Q(.050, 12)= 3.770 Dms = 5.2067

TUKEY

Variável = NÚCLEOS PICNÓTICOS (11.44444)

Interação SITUAÇÃO x TEMPO Comparações 5%

TEMPO (horas)	Controle	SNOG 1mM
4	4.67 A	44.33 B
6	5.33 A	71.00 B
12	11.67 A	18.33 B

TUKEY

Variável = NÚCLEOS PICNÓTICOS (11.44444)

Interação TEMPO x SITUAÇÃO Comparações 5%

SITUAÇÃO	4	6	12
Controle	4.67 a	5.33 a	11.67 a
SNOG 1mM	44.33 b	71.00 a	18.33 c

Corpos apoptóticos (Gráfico 4)

Fontes de Variação	G.L	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
SITUAÇÃO	1	2938.889	2938.889	4069.231	0.00000
TEMPO	2	4109.778	2054.889	2845.231	0.00000
SITUAÇÃO x TEMPO	2	4109.778	2054.889	2845.231	0.00000
Resíduo	12	8.666667	0.7222222		
Coeficiente de Variação =		6.651			

TUKEY

Variável = CORPOS APOPTÓTICOS (0.7222222)

TEMPO (horas)	Dados	Médias	Comparações 5%
12	6	34.0000	A
6	6	4.3333	B
4	6	0.0000	C

Q(.050, 12)= 3.770 Dms = 1.3080

TUKEY

Variável = CORPOS APOPTÓTICOS (0.7222222)

Interação SITUAÇÃO x TEMPO Comparações 5%

TEMPO (horas)	Controle	SNOG 1mM
4	0.00 A	0.00 A
6	0.00 A	8.67 B
12	0.00 A	68.00 B

Exposição de fosfatidilserina nas células: parental, C118S e Wt incubadas com SNOG (Figura 14)

Procedimento = Análise para modelos lineares

Objetivo = Análise de variância

Distribuição dos dados

Efeito	Identificação	Dados
C118S	1	6
PARENTAL	2	6
Wt	3	6
Controle	1	9
SNOG 1mM 4hs	2	9

Análise de variância

SITUAÇÕES = CONTROLE E TRATAMENTO COM SNOG

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
TIPO CELULAR	2	166.9216	83.46082	11.047	0.00190
SITUAÇÃO	1	585.9606	585.9606	77.556	0.00000
TIPO CELULAR x SITUAÇÃO	2	144.2156	72.10782	9.544	0.00331
Resíduo	12	90.66373	7.555311		
Coeficiente de Variação = 34.966					

TUKEY

Variável = EXPOSIÇÃO DE FOSFATIDILSERINA (7.555311)

TIPO CELULAR	Dados	Médias	Comparações 5%
PARENTAL	6	11.0500	A
Wt	6	8.7733	A
C118S	6	3.7600	B

 $Q(.050, 12) = 3.770$ Dms = 4.2305

TUKEY

Variável = EXPOSIÇÃO DE FOSFATIDILSERINA (7.555311)

Interação TIPO CELULAR x SITUAÇÃO Comparações 5%

SITUAÇÃO	Parental	C118S	Wt
Controle	2.07 a	1.68 a	2.72 a
SNOG 1mM	20.03 a	2.07 b	14.83 a

TUKEY

Variável = EXPOSIÇÃO DE FOSFATIDILSERINA (7.555311)

Interação SITUAÇÃO x TIPO CELULAR Comparações 5%

TIPO CELULAR	Controle	SNOG 1mM
Parental	2.07 A	20,03 B
C118S	1.68 A	5.84 A
Wt	2.72 A	14.83 B

Exposição de fosfatidilserina nas células: parental, C118S e Wt incubadas com H₂O₂ (Figura 15)

Procedimento = Análise para modelos lineares

Objetivo = Análise de variância

Distribuição dos Dados

Efeito	Identificação	Dados
C118S	1	6
PARENTAL	2	6
Wt	3	6
CONTROLOE	1	9
H ₂ O ₂	2	9

Análise de Variância

SITUAÇÕES = CONTROLE E INCUBAÇÃO COM SNOG

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
TIPO CELULAR	2	15.19701	7.598506	2.769	0.10262
SITUAÇÃO	1	4056.603	4056.603	1478.219	0.00000
TIPO CELULAR x SITUAÇÃO	2	20.30281	10.15141	3.699	0.05604
Resíduo	12	32.93100	2.744250		
Coeficiente de Variação = 9.233					

Exposição de fosfatidilserina nas células: parental, C118S e Wt pré-incubadas com PD98059 e incubadas com SNOG (Figura 23)

Procedimento = Análise para modelos lineares

Objetivo = Análise de variância

Dependentes = EXPOSIÇÃO DE FOSFATIDILSERINA

Independentes = TIPO CELULAR E SITUAÇÃO

Interação = TIPO CELULAR x SITUAÇÃO

Distribuição dos Dados

Efeito	Identificação	Dados
C118S	1	12
PARENTAL	2	12
Wt	3	12
CONTROLE	1	9
PD98059 50 mM 4hs + SNOG 1mM 4hs	2	9
PD98059 50 mM 4hs	3	9
SNOG 1mM 4hs	4	9

Análise de Variância

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
TIPO CELULAR	2	846.1054	423.0527	53.771	0.00000
SITUAÇÃO	3	4172.307	1390.769	176.770	0.00000
TIPO CELULAR x SITUAÇÃO	6	1020.677	170.1129	21.622	0.00000
Resíduo	24	188.8237	7.867656		

Coeficiente de Variação = 25.494

TUKEY

Variável = EXPOSIÇÃO DE FOSFATIDILSERINA (7.867656)

TIPO CELULAR	Dados	Médias	Comparações 5%
Wt	12	15.4225	A
Parental	12	13.3308	A
C118S	12	4.2533	B

 Q(.050, 24)= 3.530 Dms = 2.8583

TUKEY

Variável = EXPOSIÇÃO DE FOSFATIDILSERINA (7.867656)

SITUAÇÃO	Dados	Médias	Comparações 5%
4	9	28.5300	A
2	9	11.1478	B
1	9	2.4589	C
3	9	1.8722	C

 Q(.050, 24)= 3.900 Dms = 3.6464

TUKEY

Variável = EXPOSIÇÃO DE FOSFATIDILSERINA (7.867656)

Interação TIPO CELULAR x SITUAÇÃO Comparações 5%

SITUAÇÃO	Parental	C118S	Wt
Controle	2.74 a	1.65 a	2.98 a
SNOG	36.34 a	9.54 b	39.71 a
PD	2.64 a	0.94 a	2.04 a
PD + SNOG	11.60 a	4.89 b	16.96 a

TUKEY

Variável = EXPOSIÇÃO DE FOSFATIDILSERINA (7.867656)

Interação SITUAÇÃO x TIPO CELULAR Comparações 5%

TIPO CELULAR	Controle	SNOG	PD	PD + SNOG
Parental	2.74 C	36.34 A	2.64 CB	11.60 BB
C118S	1.65 B	9.54 AB	0.94 B	4.89 AB
Wt	2.98 CB	39.71 A	2.04 C	16.96 BB

Exposição de fosfatidilserina nas células: parental, C118S e Wt pré-incubadas com CEP11004 e incubadas com SNOG (Figura 25)

Procedimento = Análise para modelos lineares

Objetivo = Análise de variância

Dependentes = EXPOSIÇÃO DE FOSFATIDILSERINA

Independentes = SITUAÇÃO

Estatísticas Simples

Observações Perdidas = 0

Observações Válidas = 12

Distribuição dos Dados

Efeito	Identificação	Dados
CEP 300nM	1	3
CEP 300nM+SNOG 1mM	2	3
Controle	3	3
SNOG 1mM	4	3

Análise de Variância

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
SITUAÇÃO	3	165.8803	55.29343	116.597	0.00000
Resíduo	8	3.793800	0.4742250		

Coeficiente de Variação = 13.335

TUKEY

Variável = EXPOSIÇÃO DE FOSFATIDILSERINA (0.4742250)

SITUAÇÃO	Dados	Médias	Comparações 5%
SNOG 1mM	3	8.8900	A
CEP 300nM+SNOG 1mM	3	8.8633	A
CEP 300nM	3	1.7367	B
Controle	3	1.1667	B

Q(.050, 8)= 4.530 Dms = 1.8011

Exposição de fosfatidilserina nas células: parental, C118S e Wt pré-incubadas com SB220025 e incubadas com SNOG (Figura 27)

Procedimento = Análise para modelos lineares

Objetivo = Análise de variância

Dependentes = Exposição de fosfatidilserina

Independentes = SITUAÇÃO

Estatísticas Simples

Observações Perdidas = 0

Observações Válidas = 12

Distribuição dos Dados

Efeito	Identificação	Dados
Controle	1	3
SB1220025 1µM 2hs + SNOG 1mM 2hs	2	3
SB220025 1µM 2hs	3	3
SNOG 1mM	4	3

Nome	Média	Desvio
EXPOSIÇÃO DE FOSFATIDILSERINA	5.432500	3.949060

Análise de Variância

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
SITUAÇÃO	3	169.9762	56.65872	288.768	0.00000
Resíduo	8	1.569667	0.1962083		
Coeficiente de Variação = 8.154					

TUKEY

Variável = EXPOSIÇÃO DE FOSFATIDILSERINA (0.1962083)

SITUAÇÃO	Dados	Médias	Comparações 5%
SB1220025 1µM 2hs + SNOG 1mM 2hs	3	9.2533	A
SNOG1mM	3	9.1333	A
SB2200251µM 2hs	3	1.8667	B
Controle	3	1.4767	B

 $Q(.050, 8) = 4.530$ $Dms = 1.1585$

REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALESSI, D.R.; CUENDA, A.; COHEN, P.; DUDLEY, D.T.; SALTIEL, A., R.
PD098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. **J. Biol. Chem.**, v.17, p.27489-94, 1995.
- ASCENZI, P.; COLASANTI, M.; PERSICHINI, T.; MUOLO, M.; POLITICELLI, F.; VENTURINI, G.; BORDO, D.; BOLOGNESI, M. Re-evaluation of amino acid sequence and structural consensus rules for cysteine-nitric oxide reactivity. **J. Biol. Chem.**, v.381, p.623-627, 2000.
- ASSEFA, Z.; GARMYN, M.; VANTIEGHEM, A.; DEELERCQ, W.; VANDENABEELE, P.; VANDENHEEDE, J.R.; AGOSTINUS, P. Ultraviolet B radiation-induced apoptosis in human keratinocytes: cytosolic activation of procaspase-8 and the role of Bcl-2. **FEBS Lett.**, v.540, p.125-132, 2003.
- AVILA, M.A.; MINGORANCE, J.; MARTINEZ-CHARITAR, M.L.; CASADO, M., MARTIN-SANZ, P.; BOSCA, L.; MATO, J.M. Regulation of rat liver S-adenosyl-methionine synthetase during septic shock role of nitric oxide. **Hepatology**, v.25, p.391-396, 1997.
- BEIER, R.; BURGIN, A.; KIERMAIER, A.; FERRO, M.; KARSUNKY, H.; SAFFRICH, R.; MOROY, T.; ANSORGE, W.; ROBERTS, J.; ERILERS, M. Induction of cyclin E-cdk2 kinase activity, E2F-dependent transcription and cell growth by Myc are genetically separable events. **EMBO J.**, v.19, p.5813-5823, 1999.
- BLATTNER, C.; SPARKS, A.; LANE, D. Transcription factor E2F-1 is upregulated in response to DNA damage in a manner analogous to that of p53. **Mol. Cell Biol.**, v.19, p.3704-3713, 1999.

- BONFOCO, E.; KRAINC, D.; ANKARCRONA, M.; NICOTERA, P.; LIPTON, S.A.
Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.92, p.7162-7166, 1995.
- BORN, T.L.; FROST, J.A.; SCHONTHAL, A.; PRENDERGAST, G.C.;
FERAMISCO, J.R. c-Myc cooperates with activated Ras to induce the cdc2 promoter. **Mol. Cell Biol.**, v.14, p.5710-5718, 1994.
- BOURNE, H.R.; SANDERS, D.; MCCORNICK, F. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions, **Nature**, v.348, p.125-132, 1991.
- BROCKHAUS, F.; BRÜNE, B. U937apoptotic cell death by nitric oxide: Bcl-2 downregulation and caspase activation. **Exp. Cell. Res.**, v.238, p.33-41, 1998.
- BRÜNE, B.; VON KNETHEN, A.; SANDAU, K.B. Nitric oxide (NO): an effector of apoptosis. **Cell Death and Differ.**, v.6, p.969-975, 1999.
- BURDON, R.H.; RICE-EVANS, C. Free radicals and the regulation of mammalian cell proliferation. **Free Radic. Res. Commun.**, v.6, p.345-358, 1989.
- BUTTKE, T.M.; SANDSTROM P.A. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. **Immunol. Today**, v.15, p.7-10, 1994.
- CAIN, K.; BROWN, D.G.; LANGLAIS, C. COHEN, G.M. Caspase activation involves the formation of the apoptosome, a large (approximately 700kDa) caspase-activating complex. **J. Biol. Chem.**, v.274, p.22686-22692, 1999.

- CALLSEN, D.; BRÜNE, B. Role of mitogen-activated protein kinases in S-nitrosoglutathione-induced macrophage apoptosis. **Biochemistry**, v.38, p.2279-2286, 1999.
- CANTOR, S.; URANO, T.; FEIG, L.A. Identification and characterization of Ral-binding protein 1 a potential downstream target of Ral GTPases. **Mol. Cell Biol.**, v.15, p.4578-4584, 1995.
- CHANG, D.W.; CLASSEN, G.F.; HANN, S.R.; COLE, M.D. The c-Myc transactivation domain is a direct modulator of apoptotic versus proliferative signals. **Mol. Cell Biol.**, v.20, p.4309-4319, 2000.
- CONZEN, S.D.; GOTTLOB, K.; KANDELL, E.S.; KHANDURI, P.; WAGNER, A.J.; O'LEARY, M.; HAY, N. Induction of cell cycle progression and acceleration of apoptosis are two separable functions of c-Myc: transrepression correlates with acceleration of apoptosis. **Mol. Cell Biol.**, v.20, p.6008-6018, 2000.
- DARZYNKIEWICZ, Z.; JUAN, G.; LI, X.; GORCZYCA, W.; MURAKAMI, T.; TRAGANOS, F. Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). **Cytometry**, v.27, p.1-20, 1997.
- DE ROOIJ, J.; BOS, J.L. Minimal Ras-binding of Raf1 can be used as an activation-specific probe for Ras. **Oncogene**, v.14, p.623-625, 1997.
- DERIJARD, B.; HIBI, M.; WU, I-H.; BARRETT, T.; SU, B.; DENG, T.; KARIN, M.; DAVIS, R.J. JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. **Cell**, v.76, p.1025-1037, 1994.

DIMMELER, S.; ZEIHNER, A.M. Nitric oxide and apoptosis: another paradigm for the double-edged role of nitric oxide. **Nitric oxide**, v.4, p.275-81, 1997.

DUELLI, D.M.; LAZEBNIK, Y.A. Primary cells suppress oncogene-dependent apoptosis. **Nat. Cell Biol.**, v.12, p.859-862, 2000.

EGAN, S.E.; WEINBERG, R.A. The pathway to signal achievement. **Nature**, v.65, p.781-783, 1993.

ELLIS, H.M.; HORVITZ, H.R. Programmed cell death in nematode *C. elegans*. **Cell**, v.44(6), p.817-829, 1986.

ESTEVEZ, A.G.; RADI, R.; BARBEITO, L.; SHIN, J.T.; THOMPSON, J.A.; BECKMAN, J.S. Peroxynitrite-induced cytotoxicity in PC12 cells: evidence for an apoptotic mechanism differentially modulated by neurotrophic factors. **J. Neurochem.**, v.65, p.1543-1550, 1995.

FADOK, V. A.; VOELKER, D.R.; CAMPBELL, P.A.; COHEN, J.J.; BRATON, D.L.; HENSON, P.M. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. **J. Immunol.**, v.148, p.2207-16, 1992.

FLEMING, I.; RUSSE, R. Signal transduction of eNOS activation. **Cardiovasc. Res.**, v.43, p.532-541, 1999.

FOSTER, M.W.; MC MAHON, T.J.; STAMLER, J.S. S-nitrosylation in health and disease. **Trends. Mol. Med.**, v.9, p.160-168, 2003.

- GALLAGHER, K.E.; BETTERIDGE, L.J.; PATEL, M.K.; SHACTER, M. Effects of oxidants on vascular smooth muscle proliferation. **Biochem. Soc. Trans.**, v.21, p.98, 1993.
- GU, Z.; KAUL, M.; YAN, B.; KRINDEL, S.J.; CUI, J.; STRONGIN, A.; SMITH, J.W.; LIDDINGTON, R.C.; LIPTON, S.A. S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. **Science**, v.297, p.1186-1190, 2002.
- HALL, B.E.; YANG, S.; BORJACK-SJODIN, P. A.; KURIYAN, J.; BAR-SAGI, D. Structure-based mutagenesis reveals distinct functions for switch 1 and switch 2 in Sos-catalyzed guanine nucleotide exchange, **J. Biol. Chem.**, v.276, p.27629- 27637, 2001.
- HAN, J.; LEE, J-D.; BIBBS, L.; ULEVITCH, R.J. A MAP kinase targeted by endotoxin and hiperosmolarity in mammalian cells. **Science**, v.265, p.808-811, 1994.
- HANCOCK, J.F.; MAGEE, A.I.; CHILDS, J.E.; MARSHALL, C.J. All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitolated. **Cell**, v.57, p.1167-1177, 1989.
- HAY, B.A.; WASSARMAN, D.A.; RUBIN, G.M. Drosophila homologs of baculovirus of apoptosis proteins function to block cell death. **Cell**, v.83, p.1253-1262, 1995.
- HESS, D.T.; MATSUMOTO, A.; NUDELMAN, R.; STAMLER, J.S. S-Nitrosylation: spectrum and specificity. **Nat. Cell. Biol.**, v.3, p46-49, 2001.

HOOG, N. The biochemistry and physiology of S-nitrosothiols. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v.42, p.585-600, 2002.

JACKSON, J.H.; COCHRANE, C.G.; BOURNE, J.R.; SOLSKI P.A.; BUSS, J.E.; DER, C.J. Farnesol modification of kirsten-ras exon 4Bprotein is essential for transformation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.87, p.3042-3046, 1990.

JACKSON, J.R.; BOLOGNESE, B.; HILLEGASS, L.; KASSIS, S.; ADAMS, J.; GRISWOLD, D.E.; WINKLER, T.D. Pharmacological effects of SB 220025, a selective inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase, in angiogenesis and chronic inflammatory disease models. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.284, p.687-692, 1998.

JEKABSONE, A.; DAPKUNAS, Z.; BROWN, G.C.; BORUTAITE, V. S-nitrosothiol- induced rapid cytochrome c release, caspase activation and mitochondrial permeability transition in perfused heart. **Biochem. Pharmacol.**, v.66, p.1513-1519, 2003.

KAUFFMAN-ZEH, A.; RODRIGUEZ-VICIANA, P.; ULRICH, E.; GILBERT, C.; COFFER, P.; DOWNWARD, J.; EVAN, G. Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signaling through PI(3)K and PKB. **Nature**, v.385, p.544-548.

KERR, J.F.R. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. **Cancer**, v.73(8), p.2013-2026, 1994.

KERR, J.F.R.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br. J.Cancer**, v.26, p.239-257, 1972.

- KIM, Y.M.; CHUNG, H.T.; KIM, S.S.; HAN, J.A.; YOO, Y.M.; KIM, K.M.; LEE, G.H.; YUN, H.Y.; GREEN, A.; LI, J.; SIMMONS, R.L.; BILLIAR, T.R. Nitric oxide protects PC12 cells from serum deprivation-induced apoptosis by cGMP-dependent inhibition of caspase signaling. **J. Neurosci.**, v.19, p.6740-6747, 1999.
- KNOWLES, R.G.; MONCADA, S. Nitric oxide synthases in mammals. **Biochem. J.**, v.298, p.249-258, 1994.
- KOOPMAN, G.; REUTELINGSPERGER, C.P.; KEEHNEN, R.M.; PALS, S.T.; Van OERS, M.H. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. **Blood**, v.84, p.1415-20, 1994.
- KOSHIO, O.; AKANUMA, Y.; KASUGA, M. Hydrogen peroxide stimulates tyrosine phosphorylation of the insulin receptor and its tyrosine kinase activity in intact cells. **Biochem. J.**, v.265, p.2896-2902, 1990.
- KULICH, S.M.; CHU, C.T. Sustained extracellular signal-regulated kinase activation by 6-hydroxydopamine: implications for Parkinson's disease. **J. Neurochem.** v.77, p.1058-66, 2001.
- KYRIASKIS, J.M.; BANERJEE, P.; NIKOLAKI, E.; DAI, T.; RUBIE, E.A.; AHMAD, M.F.; AVRUCH, J.; WOODGETT, J.R. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. **Nature**, v.369, p.156-160, 1994.
- LANDER, H.M.; HAJJAR, D.P.; HEMPSTEAD, B.L.; MIRZA, U.A.; CHAIT, B.T.; CAMPBELL, S.; QUILLIAM, L.A. A molecular redox switch on p21(ras). Structural basis for the nitricoxide-p21^{ras} interaction. **J. Biol. Chem.**, v.272, p.4323-4326, 1997.

- LANDER, H. M.; JACOVINA, R.; DAVIS, R.J.; TAURAS, J.M. Differential activation of mitogen-activated protein kinase by nitric oxide-related species. **J. Biol. Chem.**, v.271, p19705-19709, 1996.
- LANDER, H.M.; OGISTE, J.S.; TENG, K.K.; NOVOGRODSKY, A. p21^{ras} as a common signalling target of reactive free radical and celular redox stress. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p.21195-21198, 1995.
- LANDER, H. M.; SEHAJPAL, P.; LEVINE, D.M.; NOVOGRODSKY, A. Activation of human peripheral blood mononuclear cells by nitric oxide-generating compounds. **J. Immunol.**, v.150, p.1509-1516, 1993.
- LANE, P.; HAO, G.; GROSS, S.S. S-nitrosylation is emerging as a specific and fundamental posttranslational protein modification: head-to-head comparison with O-phosphorylation. **Sci. STKE.**, v.12(86), RE1, 2001.
- LI, H.; ZHU, H.; XU, C.J.; YUAN, J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. **Cell**, v.94, p.491-501, 1998.
- LIN, A.W.; BARRADAS, M.; STONE, J.C.; VAN AELST, L.; SERRANO, M.; LOWE, S.W. Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEKMAPK mitogenic signaling. **Genes Dev.**, v.12, p.3008-3019, 1998.
- LIN, K.T.; XUE, J.Y.; NOMEN, M.; SPUR, B.; WONG, PY. Peroxynitrite-induced apoptosis in HL-60 cells. **J. Biol. Chem.**, v.270, p.16487-90, 1995.
- LIU, L.; STAMLER, S.J. NO: an inhibitor of cell death. **Cell Death Differ.**, v.6, p937-942, 1999.

LIU, X.; MILLER, M.J.; JOSHI, M.S.; THOMAS, D.D.; LANCASTER, J.R.

Accelerated reaction of nitric oxide with O₂ within the hydrophobic interior of biological membranes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.95, p.2175-2179, 1998.

MANNICK, J.B.; HAUSLADEN, A.; LIU, L.; HESS, D.T.; ZENG, M.; MIAO, Q.X.; KANE, L.S.; GOW, A.J.; STAMLER, J.S. Fas-induced caspase denitrosylation. **Science**, v.284, p.651-654, 1999.

MANNICK, J.B.; SCHONHOFF, C.; PAPETA, N.; GHAFORIFAR, P.; SZIBORN, M.; FANG, K.; GASTON, B. S-nitrosylation of mitochondrial caspases. **J. Cell. Biol.**, v.154, p.1111-1116, 2001.

MARONEY, A.C.; FINN, J.P.; CONNORS, T.J.; DURKIN, J.T.; ANGELES, T.; GESSNER, G.; XU, Z.; MEYER, S.L.; SAVAGE, M.J.; GREENE, L.A.; SCOTT, R.W.; VAUGHT, J.L. Cep-1347 (KT7515), a semisynthetic inhibitor of the mixed lineage kinase family. **J. Biol. Chem.** v.276, p.25302-25308, 2001.

MEDEMA, R.H.; HERRERA, R.E.; LAM, F.; WEINBERG, R.A. Growth suppression by p16ink4 requires functional retinoblastoma protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.92, p.6289-6293, 1995.

MEGSON, I.L. Nitric oxide donor drugs. **Drugs of the future**, v.25(7), p.701-715, 2000.

MESSMER, U.K.; BRÜNE, B. Nitric oxide-induced apoptosis: p53-dependent and p53-independent signaling pathways. **Biochem. J.**, v.319, p.299-305, 1996.

MESSMER, U.K.; REIMER, D.M.; BRUNE, B. Protease activation during nitric oxide-induced apoptosis: comparison between poly (ADP-ribose) polymerase and U1-70kDa cleavage. **Eur. J. Pharmacol.**, v.349, p.333-343, 1998.

MITCHELL, K.O.; RICCI, M.S.; MIYASHITA, T.; DICKER, D.T.; JIN, Z.; REED, J.C.; EL-DEIRY, W.S. Bax is a transcriptional target and mediator of c-myc-induced apoptosis. **Cancer Res.**, v.60, 6318-25, 2000.

MONTEIRO, H.P.; GRUIA-GRAU, J.; PERANOVICH, T.M.; DE OLIVEIRA, L.C.; STERN, A. Nitric oxide stimulates tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase, Src kinase, and mitogen-activated protein kinases in murine fibroblasts. **Free Radic. Biol. Med.**, v.28, p.174-182, 2000.

MONTEIRO, H.P.; IVASCHENKO, Y.; FISHER, R.; STERN, A. Inhibition of protein tyrosine phosphatase activity by diamide is reversed by epidermal growth factor in fibroblasts. **FEBS Lett.**, v.295, p.146-148, 1991.

MONTEIRO, H.P.; PERANOVICH, T.M.S.; FRIES, D.M.; STERN, A.; SILVA, A.M. Nitric oxide potentiates EGF-stimulated tyrosine kinase activity in 3T3 cells expressing human EGF receptors. Asada, K.; Yoshikawa, T., eds. **Frontiers of reactive oxygen species in Biology and Medicine.**, Amsterdam: Elsevier Science, p.215-218, 1994.

MORGENBESSER, S.D.; WILLIAMS, B. O.; JACKS, T.; DEPINHO, R. A. p53-dependent apoptosis produced by Rb-deficiency in the developing mouse lens. **Nature**, v.371, p.72-74, 1994.

MURAKATA, C.; KANEKO, M.; GESSNER, G.; ANGELES, T.S.; ATOR, M.A.; O'KANE, T.M.; MCKENNA, B.A.; THOMAS, B.A.; MATHIASSEN, J.R.; SAPORITO, M.S.; BOZYCZKO-COYNE, D.; HUDKINS, R.L. Mixed lineage

- kinase activity of indolocarbazole analogues. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v.12, p.147-50, 2002.
- NATHAN, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **FASEB J.**, v.6, p.3051-3064, 1992.
- NESBIT, C.E.; TERSAK, J.M.; GROVE, L.E.; DRZAL, A.; CHOI, H.; PROCHOWNIK, E.V. Genetic dissection of c-myc apoptotic pathways. **Oncogene**, v.19, p.3200-3212, 2000.
- NGUYEN, T.; BRUNSON, D.; CRESPI, C.L.; PENMAN, B.W.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, v.89, p.3030-4, 1992.
- NICHOLSON, D.W.; THORNBERRY, N.A. Caspases-killer proteases. **Trends. Biochem. Sci.**, v.22, p.299-306, 1997.
- NUNEZ, G.; DEL PESO, L. Linking extracellular survival signals and the apoptotic machinery. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v.8(5), p.613-618, 1998.
- OLIVEIRA, C.J.; SCHINDLER, F.; VENTURA, A.M.; MORAIS, M.S.; ARAI, R.J.; DEBBAS, V.; STERN, A.; MONTEIRO, H.P. Nitric oxide and cGMP activate the Ras-MAP kinase pathway-stimulating protein tyrosine phosphorylation in rabbit aortic endothelial cells. **Free Radic. Biol. Med.**, v.35, p.381-96, 2003.
- OLSON, M.F.; ASHWORTH, A.; HALL, A. An essential role for Rho, Rac and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. **Science**, v.269, p.1270-1272, 1995.

PARK H.S.; HUH, S.H.; KIM, M.S.; LEE, S.H.; CHOI, E.J. Nitric oxide negatively regulates c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase by means of S-nitrosylation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.97, p.14382-14387, 2000.

PERANOVICH, T.M.S.; DA SILVA, A.M.; FRIES, D.M.; STERN, A.; MONTEIRO, H.P. Nitric oxide stimulates tyrosine phosphorylation in murine fibroblasts in the absence and presence of epidermal growth factor. **Biochem. J.**, v.305, p.613- 619, 1995.

PEREZ-MATO, I.; CASTRO, C.; RUIZ, F.A.; CORRALES, F.J.; MATO, J.M. Methionine adenosyltransferase S-nitrosylation is regulated by the basic and acid amino acids surrounding the target thiol. **J. Biol. Chem.**, v.274, p.17075-17079, 1999.

PERSONS, D.L.; YAZLOVITSKAYA, E.M.; PELLING, J.C. Effect of extracellular signal-regulated kinase on p53 accumulation. **J. Biol. Chem.**, v.275, p.35778-35785, 2000.

PINKOSKI, M.J.; GREEN, D.R. Fas ligand, death gene. **Cell Death Differ.**, v.6, p1174-1181, 1999.

REED, J.C.; KROEMER, G. Mechanisms of mitochondrial membrane permeabilization. **Cell Death Differ.**, v.7, p.1145, 2000.

ROMASHKO, J., 3rd; HOROWITZ, S.; FRANEK, W.R.; PALAIA, T.; MILLER, E.J.; LINA, A.; BIRRER, M.J.; SCOTT, W.; MANTELL, L.L. MAPK pathways mediate hyperoxia-induced cell death in lung epithelial cells. **Free Radic. Biol. Med.**, v.15, p.978-993, 2003.

- ROUSE, J.; COHEN, P.; TRIGON, S.; MORANGE, M.; ALONSO-LLAMAZARES, A.; ZAMANILLO, D.; HUNT, T.; NEBRED, A.R. A novel kinase cascade triggered by chemical stress and heat shock which stimulates MAP kinase-activated protein kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. **Cell**, v.78, p.1027-1037, 1994.
- SALGO, M.G.; SQUADRITO, G.L.; PRYOR, W.A. Peroxynitrite causes apoptosis in rat thymocytes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.215, p.1111-1118, 1995.
- SCAFFIDI, C.; FULDA, S.; SRINIVASAN, A.; FRIESEN, C.; LI, F.; TOMASELLI, K.J.; DEBATIN, K.M.; KRAMMER, P.H.; PETER, M.E. Two CD95 (APO-1/Fas) signalling pathways. **EMBO J.**, v.17, p.1675-1678, 1998.
- SCHLESSINGER, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. **Cell**, v.103, p. 211-225, 2000.
- SCHWALL, R.H.; ROBBINS, K.; JARDIEU, P.; CHANG, L.; LAI, C.; TERREL, T.G. Activin induces cell death in hepatocytes in vitro and in vivo. **Hepatology**, v.18, p.347-356, 1993.
- SERRANO, M.; LIN, A.W.; MCCURRACH, M.E.; BEACH, D.; LOWE, S.W. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. **Cell**, v.88, p.593-602, 1997.
- SETTLEMAN, J.; NARASIMHAN, V.; FOSTER, L.C.; WEINBERG, R.A. Molecular cloning of cDNA encoding the GAP-Associated protein p190: implications for a signaling pathway from Ras to the nucleus. **Cell**, v.69, p.539-549, 1992.

- SEWING, A., WISEMAN, B.; LLOYD, A.C.; LAND, H. High-intensity Raf signal causes cell cycle arrest mediated by p21Cip1. **Mol. Cell Biol.**, v.17, p.5588-5597, 1997.
- SHEAFF, R.J.; GROUDINE, M.; GORDON, M.; ROBERTS, J.M.; CLURMAN, B.E. Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27kip1. **Genes Dev.**, v.11, p.1464-1478, 1997.
- SHERR, C.J. Cancer cell cycles. **Science**, v.274, p.1672-1677, 1996.
- SHERR, C.J. Mammalian G1 cyclins and cell cycle progression. **Proc. Assoc. Am. Physicians.**, v.107, p.181-186, 1995.
- SHERR, C.J.; ROBERTS, J.M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. **Genes Dev.**, v.13, p.1501-1512, 1999.
- SOUCIE, E.L.; ANNIS, M.G.; SEDING, J.; FILMUS, J.; LEBER, B.; ANDREWS, D.W.; PENN, L.Z. Myc potentiates apoptosis by stimulating Bax activity at the mitochondria. **Mol. Cell Biol.**, v.21, p.4725-4736, 2001.
- SPENCER, C.A.; GROUDINE, M. Control of c-myc regulation in normal and neoplastic cells. **Adv. Cancer Res.**, v.56, p.1-48, 1991.
- STAMLER, J.S. Redox signaling nitrosylation and related interactions of nitric oxide. **Cell**, v.78, p. 931-936, 1994.
- STAMLER, J.S.; TOONE, E.J.; LIPTON, S.A.; SUCHER, N.J. (S)NO signals: translocation, regulation, and a consensus motif. **Neuron.**, v.18, p.691-696, 1997.

STEVENS, C.; LA THANGUE, N.B. E2F and cell cycle control: a double-edged sword. **Arch. Biochem. Bioph.**, v.412, p.157-169, 2003.

SUN, J.; XIN, C.; EU, J.P. STAMLER, J.S.; MEISSNER, G. Cysteine-363S is responsible for skeletal muscle ryanodine receptor modulation by NO. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.98, p.11158-11162, 2001.

TANG, D.; WU, D.; HIRAO, A.; LAHTI, J.M.; LIU, L.; MAZZA, B.; KIDD, V.J.; MAK, T.W.; INGRAM, J.A. ERK activation mediates cell cycle arrest and apoptosis after DNA damage independently of p53. **J. Biol. Chem.**, v.277, p.12710-12717, 2002.

THORNBERRY, N.A., ET AL. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. **J. Biol. Chem.**, v.272, p.17907-17911, 1997.

TODA, T.; UNOI, I.; ISHIKAWA, T.; POWERS, S.; KATAOKA, T.; BROEK, D.; CAMERON, S.; BROACH, J.; MATSUMOTO, K.; WIGLER, M. In yeast, RAS proteins are controlling elements of adenylate cyclase. **Cell**, v.40, p. 27-36, 1985.

VAUX, D.L.; WEISSMAN, I.L.; KIM, S.K. Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2. **Science**, v.258, p.1955-1957, 1992.

VERMEULEN, K.; BERNEMAN, Z.N.; VAN BOCKSTAELE, D.R. Cell cycle and apoptosis. **Cell Prolif.**, v.36, p.165-175, 2003.

- VOJTEK, A.B.; HOLLENBERG, S.M.; COOPER, J.A. Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. **Cell**, v.16, p.205-214, 1993.
- VUCIC, D.; KAISER, W.J.; HARVEY, A.J.; MILLER, L.K. Inhibition of reaper-induced apoptosis by interaction with inhibitor of apoptosis proteins (IAPs). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.94, p.10183-10188, 1997.
- WEINBERG, R.A. The retinoblastoma protein and cell cycle control. **Cell**, v.81, p.323-330, 1995.
- WILLIAMS, J.G.; PAPPU, K.; CAMPBELL, S.L. Structural and biochemical studies of p21^{Ras} S-nitrosylation and nitric oxide-mediated guanine nucleotide exchange. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.100, p.6376-6381, 2003.
- WIMAN, K.G. p53: Emergency brake and target for cancer therapy. **Exp. Cell Res.**, v.237, p.14-18, 1997.
- WOODS, D.; PARRY, D.; CHERWINSKI, H.; BOSH, E.; LEES, E.; McMAHON, M. Raf-induced proliferation or cell cycle arrest is determined by the level of Raf activity with arrest mediated by p21Cip1. **Mol. Cell Biol.**, v.17, p.5598-5611, 1997.
- YABUKI, M.; KARIYA, S.; INAI, Y.; HAMAZAKI, K.; YOSHIOKA, T.; YASUDA, T.; HORTON, A.A.; UTSUMI, K. Molecular mechanisms of apoptosis in HL-60 cells induced by nitric oxide-releasing compound. **Free Radic. Res.**, v.27, p.325-335, 1997.
- ZHU, J.; WOODS, D.; McMAHON, M.; BISHOP, J.M. Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf. **Genes Dev.**, v.12, p.2997-3007, 1998.