

JOÃO WOSNIAK JÚNIOR

Influência de lesão do DNA mitocondrial na atividade e expressão de NAD(P)H oxidase da membrana celular em células musculares lisas vasculares

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

Área de Concentração: Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Francisco Rafael Martins Laurindo

São Paulo
2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Wosniak Júnior, João

Influência de lesão do DNA mitocondrial na atividade e expressão da NAD(P)H oxidase da membrana celular em células musculares lisas vasculares / João Wosniak Júnior. -- São Paulo, 2008.

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

Área de concentração: Cardiologia.

Orientador: Francisco Rafael Martins Laurindo.

Descritores: 1.DNA mitocondrial 2.NADPH oxidase 3.Miócitos de músculo liso
4.Espécies de oxigênio reativas 5.Envelhecimento celular 6.Etídio

USP/FM/SBD-002/08

À Deus

*Aos meus pais João e Maria,
pelo amor e apoio incondicional
a todos os meus projetos de vida.*

À Juliana

Aos meus irmãos Josilene e Juliano,

Aos meus cunhados Sérgio e Cristiane,

Ao pequeno Eduardo Henrique.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Francisco Rafael Martins Laurindo, pela paciência e incentivo em me guiar pelos caminhos da ciência, e pela confiança e investimento em minha formação pessoal e profissional.

À Dra. Fernanda Knudsen, por me ajudar a ingressar na pós-graduação e pelos conselhos valiosos.

Ao grande amigo Dr. Célio X. Santos, pela imprescindível motivação e orientação, que foram essenciais para o meu desenvolvimento e amadurecimento científico.

À Dra. Denise Fernandes, colega que se tornou grande amiga, pela ajuda nos vários momentos desses anos de doutoramento, e exemplo de dedicação pessoal e profissional.

À Maria Bertoline, pela preocupação e inestimável auxílio na organização do laboratório e em alguns experimentos.

Ao Prof. Dr. Bernard Lassègue, Emory University (EUA), por colaborar com as seqüências das Noxes e me ensinar pessoalmente a técnica de PCR em tempo real.

Ao Dr. Roberto Arai e Victor Debbas, pelo auxílio no início das reações de PRC.

Ao aluno Estêvão Bassi, pelo auxílio na extração de artérias para o cultivo de células primárias.

À Laura Ventura, pela quantificação de nitrito e nitrato no analisador de óxido nítrico.

À Prof. Dra. Alicia Kowaltowski, Camile Caldeira e Erich Tahara do Departamento de Bioquímica da USP, que me ajudaram na realização das medidas de consumo de oxigênio.

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

Ao Prof. Dr. Antônio Sesso do Departamento de Patologia da FMUSP, pelo auxílio na realização dos experimentos de microscopia eletrônica.

Ao Prof. Dr. Hugo Monteiro, pela colaboração junto ao Departamento de Bioquímica da UNIFESP no meu ingresso na pós-graduação.

À Neusa, Juliana e Eva, da Secretaria de Pós-graduação do Departamento de Cardiopneumologia da FMUSP, pelo suporte nos trâmites burocráticos da pós-graduação.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Vascular pela contribuição cada um à sua maneira: Angélica, Antônio Marcus, Cláudia, Elídia, Heloísa, Leonora, Luciana, Leonardo, Marcel, Maria Cristina, Paulo Ramires, Thaíz, Vanda e Victor Pastro.

Este projeto recebeu apoio financeiro da FAPESP, CNPq Milênio Redoxoma e SOCESP.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Geração mitocondrial de ROS	2
1.2. Alterações no DNA mitocondrial.....	4
1.3. NAD(P)H oxidase vascular	9
1.4. Estresse do Retículo Endoplasmático.....	12
1.5. Convergência entre mitocôndria e complexo NAD(P)H oxidase	13
2. OBJETIVOS	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3.1. Reagentes	16
3.2. Cultura celular	16
3.3. Obtenção de células pseudo- ρ^0 de linhagem muscular lisa vascular	16
3.4. Medida de consumo de oxigênio	17
3.5. Obtenção da fração particulada de membrana celular	17
3.6. Atividade da NADPH oxidase em fração de membrana de VSMC	18
3.6.1. Análise por quimiluminescência da lucigenina: medida da produção de $O_2^{\cdot -}$	18
3.6.2. Análise da oxidação da DHE por HPLC: medida da produção $O_2^{\cdot -}$	18
3.6.3. Análise por fluorescência total de DHE em microplaca: medida da produção $O_2^{\cdot -}$	19
3.6.4. Análise pela oxidação da resorufina: medida da produção H_2O_2	20
3.7. Análise da produção total de ROS em VSMC pela análise por HPLC da oxidação da DHE.....	20
3.8. Quantificação de GSH intracelular por HPLC	21
3.9. Quantificação de nitrito e nitrato em meio de cultura.....	22
3.10. Medida da atividade da enzima superóxido dismutase em VSMC	22
3.11. Produção celular total de H_2O_2	23

3.12. Microscopia confocal das subunidades da NAD(P)H oxidase.....	23
3.13. Análise estrutural das VSMC por microscopia eletrônica.....	24
3.14. Análise da expressão de mRNA das Noxes por PCR quantitativa	24
3.15. Western Blotting	26
3.16. Análise estatística.....	26
4. RESULTADOS	28
4.1. Caracterização do modelo de VSMC pseudo- ρ^0	28
4.1.1. Efeitos na proliferação e apoptose	28
4.1.2. Alterações causadas por EtBr no mtDNA em VSMC	32
4.1.3. Redução do consumo de oxigênio em VSMC pseudo - ρ^0	35
4.2. Efeitos da disfunção mitocondrial no estado redox das VSMC	37
4.3. Efeitos da disfunção mitocondrial induzida por EtBr na expressão das isoformas NAD(P)H oxidase.....	44
4.4. Co-localização da mitocôndria com a Nox1.....	48
4.5. Efeitos da disfunção mitocondrial induzida por EtBr na expressão/tráfego da PDI	51
5. DISCUSSÃO.....	54
6. CONCLUSÃO	65
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
CURRICULUM VITAE	74

LISTA DE ABREVIATURAS

All	angiotensina II
células ρ^0	células rho zero com deleção total do mtDNA
células ρ^-	células rho menos com deleção parcial do mtDNA
células <i>pseudo</i> ρ^0	células com lesão mínima do DNA
DCF	Diclorofluoresceína
DHE	dihidroetidina, hidroetidina, dihidroetídio
D-loop	alça deslocada (<i>displacement loop</i>)
DTPA	<i>N,N,N',N''</i> -penta-acetato-dietilenotriamina
2-EOH	2-hidroxietídio
EDTA	etilenodiaminatetraacetato de sódio dihidratado
EGTA	etileno-bis(oxietilenonitrila)tetraacetato de sódio
Ero1	Oxidoreductase do RE (<i>Endoplasmic reticulum oxidoreductase 1</i>)
FBS	soro fetal bovino
GAPDH	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GRP	<i>proteína responsiva a glicose (glucose response protein)</i>
GSH	glutathiona reduzida
GSSG	glutathiona oxidada
HRP	peroxidase de raiz forte (horse radish peroxidase)
H₂O₂	peróxido de hidrogênio
HEK 293	células humanas embrionárias de rim (<i>human embryonic kidney</i>)
HPLC	<i>high performance liquide chromatography</i>
mtDNA	DNA mitocondrial
Nox	oxidase não fagocítica (<i>Non-phagocityc oxidase</i>)
PDI	dissulfeto isomerase protéica
O₂^{•-}	ânion radical superóxido
ROS	espécies reativas de oxigênio (<i>reactive oxygen species</i>)
RE	retículo endoplasmático
RT-PCR	reação de polimerase em cadeia por transcriptase reversa
SOD	superóxido dismutase
VSMC	células musculares lisas vasculares (<i>vascular smooth muscle cells</i>)
Tn	tunicamicina
UPR	resposta a proteínas mal enoveladas (<i>unfolded prtein response</i>)
UA	unidades arbitrárias

RESUMO

WOSNIAK JJr. Influência de lesão do DNA mitocondrial na atividade e expressão de NAD(P)H oxidase da membrana celular em células musculares lisas vasculares [Tese]. São Paulo. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2008. 76p.

Lesão do DNA mitocondrial (mtDNA) promove disfunção desta organela, contribuindo para a gênese do envelhecimento e fisiopatologia de doenças como aterosclerose e diabetes. A mitocôndria é a principal fonte quantitativa de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células, e o complexo NAD(P)H oxidase a principal fonte de ROS envolvidas na sinalização celular. A possível inter-relação entre estas duas importantes vias produtoras de ROS não está definida. O objetivo deste estudo foi investigar o perfil de alterações na expressão e atividade da NAD(P)H oxidase de células musculares lisas vasculares (VSMC) em resposta a perturbações mínimas da função mitocondrial análogas às esperadas em doenças crônico-degenerativas vasculares. Inicialmente, validamos modelo *in vitro* de disfunção mitocondrial induzida por incubação de VSMC com brometo de etídio (24 – 72 h). Lesões mínimas do mtDNA foram documentadas por alterações nos produtos de amplificação (PCR) da região repetitiva da *D-loop* e redução da taxa de consumo de oxigênio total em ~15% vs. basal ($p < 0,05$). Este grau de lesão não foi suficiente para induzir alterações morfológicas evidentes ou apoptose, e foi associado ao retardo de 25 - 30% no aumento de população celular induzido por soro fetal bovino. Nestas condições, não se detectou aumento da produção basal de superóxido ou mudanças nos níveis de glutathiona, óxidos de nitrogênio, ou da atividade superóxido dismutase. A produção basal de peróxido de hidrogênio aumentou ~15%. Após disfunção mitocondrial, houve significativo aumento (30 - 45%) na atividade basal do complexo NAD(P)H oxidase em fração de membrana de VSMC. Entretanto, a ativação da oxidase pela AII, conhecido agonista da oxidase vascular, foi essencialmente abolida, indicando dependência funcional da ativação da oxidase com a integridade da mitocôndria. Em sintonia com esses dados, na condição basal, ocorreu aumento de expressão da isoforma Nox4 da oxidase, enquanto o aumento do mRNA da Nox1 normalmente visto após AII foi minimizado. Por outro lado, o aumento da atividade da NADPH oxidase

causado pelo estressor do RE tunicamicina (indutor de Nox4) foi também abolido pela disfunção mitocondrial, entretanto, ocorreu aumento do mRNA da Nox4, indicando que as alterações funcionais da oxidase nesta situação não decorrem apenas de mudanças da expressão. Dissociação semelhante entre expressão e atividade ocorreu após exposição de 72 horas ao EtBr (i.e., durante adaptação). Nesta, ocorreu maior expressão do mRNA de Nox1 e Nox4 com All, sem aumento da atividade da oxidase em membranas. Incubação do EtBr por 24 horas não induziu per se aumento consistente nos índices de estresse do RE e induziu inversão do padrão do tráfego subcelular da dissulfeto isomerase protéica (PDI), uma chaperona redox descrita recentemente como reguladora da NADPH oxidase. Após 72 horas de incubação com EtBr, a expressão de chaperonas marcadoras de estresse do RE foi bastante diminuída e o tráfego da PDI teve o padrão restaurado. Demonstramos por microscopia confocal evidências preliminares de possível co-localização entre Nox1 e mitocôndria. Estes dados sugerem uma relevante inter-relação funcional entre mitocôndria e complexo NAD(P)H oxidase, associada pelo menos a alterações de expressão e/ou tráfego subcelular de subunidades catalíticas e reguladoras desse complexo.

Descritores: 1.DNA mitocondrial, 2.NADPH oxidase, 3.Miócitos de músculo liso, 4. Espécies de oxigênio reativas, 5. Envelhecimento celular, 6. Etídio

SUMMARY

WOSNIAK JJr. Influence of mitochondrial DNA damage on NAD(P)H oxidase activity and expression in vascular smooth muscle cells [Thesis]. São Paulo. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2008. 76p.

Mitochondrial DNA (mtDNA) damage induces dysfunction of this organelle, contributing to the genesis of aging and to the pathophysiology of diseases such as atherosclerosis and diabetes. Mitochondria are the main quantitative source of reactive oxygen species (ROS) in cells, while NAD(P)H oxidase complex is a major source of cell signaling-associated ROS. The possible crosstalk between these two relevant sources of ROS is unclear. The aim of this study was to investigate changes in activity and/or expression of vascular smooth muscle cell (VSMC) NAD(P)H oxidase in response to minor perturbations of mitochondrial function similar to those expected to occur in chronic degenerative vascular diseases. Initially, we validated an *in vitro* model of mitochondrial dysfunction in VSMC, through incubation with ethidium bromide (24 – 72 h). Minimal mtDNA damage after EtBr was shown by distinct amplification patterns (at PCR) of D-loop repetitive region and by ~ 15% oxygen consumption decrease vs. basal ($p < 0.05$). Such mtDNA damage was not sufficient to induce morphologic changes or apoptosis, whereas serum-stimulated increase in cell number was prevented by 25-30%. Under those conditions, baseline superoxide production, as well as levels of glutathione or nitrogen oxides or superoxide dismutase activity were unchanged. Baseline hydrogen peroxide production increased ~15%. VSMC membrane fraction NADPH oxidase activity was increased by 30-45% after mitochondrial dysfunction. However, oxidase activation due to AII (100 nM, 4h) was markedly abrogated, indicating that A-II-driven oxidase activation requires integrity of mitochondrial function. Accordingly, there were increases in baseline mRNA expression of Nox4 oxidase isoform, while the expected increase in Nox1 by AII was minimized. On the other hand, the NADPH oxidase activity induced by the endoplasmic reticulum stressor tunicamycin (Nox4 inducer) after mitochondrial dysfunction was abrogated, however simultaneously with increased Nox4 mRNA, thus indicating that the observed functional alterations in the oxidase complex in these conditions cannot be

associated only to mRNA expression changes. After VSMC EtBr incubation for 72 h, similar dissociation between expression and activity was observed, with increase in Nox 1 and Nox4 mRNA by AII, without parallel increase in membrane fraction oxidase activity. Although there was little change in ER stress markers after 24h EtBr, protein disulfide isomerase (PDI), a redox chaperone recently described by us as a novel NAD(P)H oxidase regulator, exhibited a reversal of its subcellular traffic pattern. After 72 h EtBr, the expression of ER markers was strongly decreased and normal PDI traffic was restored. Confocal microscopy suggested possible co-localization between Nox1 and mitochondria. These results suggest a functionally relevant crosstalk between mitochondria and NADPH oxidase complex associated at least to changes in expression and/or subcellular traffic of catalytic or regulatory subunits of this complex.

Descriptors: 1. DNA, mitochondrial 2. NADPH oxidase 3. Myocytes, smooth muscle 4. Reactive oxygen species 5. Aging cell 6. Ethidium

1. INTRODUÇÃO

Espécies reativas de oxigênio (*ROS*) são espécies transientes que incluem radicais livres como ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$, formado pela redução do oxigênio por um elétron), e outros intermediários reativos derivados de oxigênio como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , formado pela dismutação do $O_2^{\bullet-}$, catalisada pela enzima superóxido dismutase). Normalmente *ROS* em altas concentrações são consideradas deletérias aos organismos vivos e podem causar dano à maior parte dos constituintes celulares. Entretanto, em concentrações moderadas e controladas está bem estabelecido que *ROS* exercem um importante papel como segundo mensageiros reguladores e mediadores de vias de sinalização celular (FINKEL 1999; CLEMPUS & GRIENDLING et al, 2006). Os eventos celulares regulados por processos redox podem ser fisiológicos ou patológicos e incluem proliferação, crescimento, diferenciação, senescência e apoptose (IRANI et al, 2000; JONES, 2006).

Fontes enzimáticas de *ROS* que controlam a produção destas espécies no decorrer de eventos celulares têm papel central em vias de sinalização celular. Neste contexto, desequilíbrios nas fontes enzimáticas de *ROS* podem levar a produção excessiva, descompartmentalizada ou não compensada dessas espécies, alterando sinalização redox. Esta quebra de homeostase redox constitui a base fisiopatológica de inúmeras doenças, incluindo-se as vasculares, como aterosclerose, hipertensão arterial,

diabetes e reestenose pós-angioplastia (GRIENDLING et al, 2000) e podem estar associadas a alterações da regulação das vias enzimáticas produtoras de *ROS*. Entretanto, os mecanismos que promovem a regulação de sistemas enzimáticos produtores de *ROS* em processos patológicos, inclusive durante a disfunção mitocondrial, são incompletamente conhecidos.

1.1. Geração mitocondrial de ROS

A mitocôndria é o principal sítio de produção de energia em forma de ATP (adenosina trifosfato). Para a contínua geração de ATP, a mitocôndria utiliza NADH como doador de elétrons, os quais são transferidos para o oxigênio via cadeia respiratória mitocondrial, que é um conjunto especializado de complexos enzimáticos interligados de modo a promover um fluxo seqüencial de elétrons. Além da síntese de ATP, a mitocôndria está envolvida em importantes processos celulares, incluindo o metabolismo lipídico, controle dos níveis de cálcio, e particularmente, sinalização da iniciação e execução da morte celular programada (KOWALTOWSKI, 2000).

A completa redução de uma molécula de oxigênio durante a fosforilação oxidativa envolve quatro elétrons. Assim, o oxigênio é reduzido a água na mitocôndria pela citocromo c oxidase, mas, a liberação de compostos intermediários parciais da redução do oxigênio praticamente não é detectável nesse processo devido à alta afinidade de ligação dos intermediários ao citocromo c (TURRENS, 1997). Entretanto, na cadeia respiratória mitocondrial, pequenas quantidades do $O_2^{\bullet-}$ são geradas pela redução monoeletrônica do oxigênio molecular (BOVERIS & CHANCE,

1973). Essa pequena, mas contínua produção de radical superóxido torna a mitocôndria uma das principais fontes geradoras de espécies reativas de oxigênio na célula. A redução monoelétrica do oxigênio resultante na geração de *ROS* mitocondrial ocorre principalmente nos complexos I e III da cadeia respiratória mitocondrial, que são capazes de gerar $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 em correlação direta com o estado de redução dos componentes da cadeia (BOVERIS & CHANCE, 1973; TURRENS, 1997).

A mitocôndria possui uma constante geração de radical superóxido e um eficiente sistema antioxidante, que é composto por enzimas como superóxido dismutase (MnSOD), catalase e glutathione peroxidase (LI et al, 1995; GREEN & O'BRIEN, 1970). Em condições usuais, o sistema antioxidante mantém os componentes mitocondriais em homeostase redox, prevenindo danos moleculares. A importância destes mecanismos antioxidantes é sugerida pela letalidade de camundongos *knock-out* homozigotos para MnSOD (LI et al, 1995). Entretanto, em condições não fisiológicas, a excessiva produção mitocondrial de *ROS* pode levar a alterações do estado redox celular, acarretando consequências fisiopatológicas. Dentre essas, é importante o estímulo para o aumento do cálcio citosólico causado pela abertura do poro de transição de permeabilidade da membrana mitocondrial, envolvido em pelo menos alguns processos de morte celular associada a estresse oxidativo mitocondrial (KOWALTOWSKI & VERCESI, 1999). A hipótese de que a produção de *ROS* por mitocôndrias seja um processo controlado e que o peróxido de hidrogênio gerado na mitocôndria possa exercer sinalização redox

extramitocondrial tem sido considerada (BROOKES & DARLEY-USMAR, 2002), embora as evidências neste sentido sejam escassas.

1.2. Alterações no DNA mitocondrial

Na célula, além do genoma nuclear, existe um segundo genoma na mitocôndria (mtDNA), em forma circular e em dupla fita, com aproximadamente 17 Kb, o que corresponde a aproximadamente 10.000 KDa (ANDERSON et al, 1981) e na maioria das células representa aproximadamente 0,5 -1% do DNA total. A existência deste sistema genético extra-cromossomal confere à mitocôndria a capacidade de síntese de proteínas e de replicação de uma maneira semi autônoma, ou seja, independente do genoma nuclear, que permite, por exemplo, sua replicação durante altas demandas de energia. (ATTARDI & SCHATZ,1988). Há evidências de que a biogênese mitocondrial promova significativa proteção contra estresse oxidativo (ST-PIERRE et al, 2006). O mtDNA codifica 37 genes, que incluem 22 tRNAs, e 13 polipeptídeos essenciais para o funcionamento dos quatro complexos da cadeia respiratória mitocondrial e 2 rRNAs (Figura 1). Os demais genes envolvidos na fosforilação oxidativa são codificados pelo DNA nuclear, traduzidos no citoplasma e importados para a mitocôndria (FERNANDEZ et al, 2003).

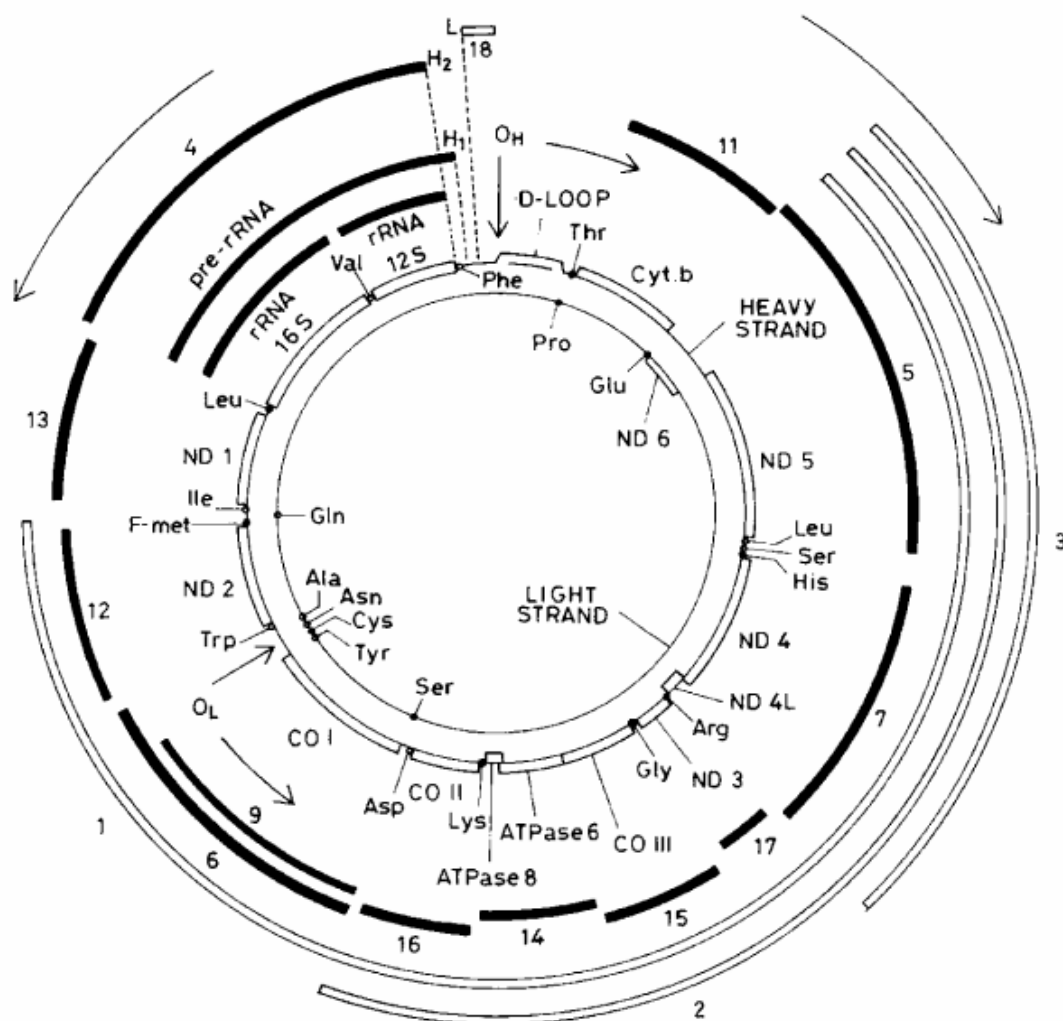


Figura 1. Figura esquemática do mapa do mtDNA humano. Os dois círculos internos representam as fitas do mtDNA com o genes codificados. E os círculos externos representam os RNAs transcritos da fita pesada (linhas em preto) e a fita leve (linhas sem preenchimento). Abreviações: 12S e 16S, RNAs ribossomais 12S e 16S; ND1 até ND6, subunidades 1–6 da NADH desidrogenase (complexo I); cyt b, citocromo *b* subunidade do complexo III; CO I, CO II e CO III, subunidades da citocrome *c* oxidase (complexo IV); ATPase 6 e ATPase 8, subunidades da ATP sintase (complexo V). Os genes tRNA são indicados por três letras que correspondem aos aminoácidos H1, H2 e L que indicam pontos de início de transcrição da H- e L-fita, respectivamente. OH e OL representam origem de replicação da fita H- (pesada) e fita L-(leve), respectivamente. As setas indicam a direção da transcrição ou replicação (FERNANDEZ et al, 2003).

Como o mtDNA está localizado próximo da membrana mitocondrial interna, onde as ROS são produzidas pela cadeia respiratória mitocondrial, ele é um alvo altamente suscetível para lesão oxidativa, com conseqüentes

alterações e/ou mutações do mtDNA. Esta vulnerabilidade do mtDNA ao dano oxidativo é exacerbada pela ausência da proteção por histonas, além de um sistema de reparo incompleto e menos eficiente quando comparado ao DNA nuclear. Isto gera assim, a possibilidade de que o acúmulo de moléculas mutadas de mtDNA pode levar, além de outras conseqüências potenciais, a uma disfunção na cadeia respiratória mitocondrial, com aumento na produção de *ROS*. Este acúmulo, por sua vez, geraria mais mtDNA mutado, constituindo um ciclo vicioso (TURRENS, 2003).

Aparentemente, uma pequena região não codificadora (~1kb) expressa no genoma mitocondrial é necessária para sinalizar expressão de proteínas responsáveis pela manutenção da função bioenergética. Em células metabolicamente ativas, uma alta proporção de mtDNA contém uma estrutura em forma de tripla fita dentro da região não codificadora, denominada região D-loop (Figura 2).



Figura 2. Esquema representativo da estrutura de tripla fita, região D-loop, no mtDNA. A fita de deslocamento está representada por uma linha em negrito, e a fita deslocada está representada pela linha curva com barras (KASAMTSU, 1971).

A região D-loop é uma região altamente variável tanto em sequência como em tamanho, quando comparada entre diferentes espécies, embora contenha alguns elementos conservados com possíveis funções regulatórias, como por exemplo, a replicação do mtDNA (ATTARDI &

SCHATZ, 1988; SHADEL & CLAYTON, 1997). Essas variações ocorrem na forma de mutações pontuais, inserções/deleções de nucleotídeos ou como uma ampla escala de rearranjos no mtDNA. Por estes motivos, a região D-loop tem sido considerada um significativo marcador de alterações no mtDNA em processos patológicos (BARTHELEMY et al, 2002).

Mutações, deleções ou modificações do mtDNA têm sido documentadas no envelhecimento (WEI, 1998) e várias outras condições patológicas, em particular aterosclerose (BALLINGER et al, 2000; YAO et al, 2001) e diabetes (MAECHLER & WOLHEIM, 2001). Nestas situações patológicas vasculares, é possível que a disfunção mitocondrial seja um evento primário de circuitos viciosos de sinalização redox e/ou dano molecular. Foi descrito por Zhao e colaboradores, uma reação de estresse mitocondrial na qual são superexpressas chaperoninas específicas desta organela. A própria disfunção mitocondrial deve estar associada a este estresse (YONEDA et al, 2001).

O brometo de etídeo (EtBr) é um composto aromático (Figura 3), que tem carga positiva, interage fortemente com os grupamentos fosfato do DNA por interações eletrostáticas e também intercala-se ao DNA das células por interações hidrofóbicas (GARBETT et al, 2004). Este intercalamento do EtBr entre as bases leva a inibição da replicação do DNA. Quando acrescentado a células, é possível obter seletividade de indução de mutações para o mtDNA mediante o uso de concentrações relativamente baixas (0,1- 2 µg/mL). Nestas concentrações, não se consegue documentar intercalamento no DNA nuclear (KING & ATTARDI, 1989). Células em cultura com

deficiências no mtDNA (ρ^0), tornam-se dependentes exclusivamente da via glicolítica para suprir suas necessidades energéticas. Assim, estas células necessitam de pirimidinas (uridina) devido à deficiência da cadeia respiratória mitocondrial dependente da dihidroorato desidrogenase (GRÉGOIRE et al, 1984), cuja expressão é dependente do DNA mitocondrial. Este complexo com atividade desidrogenase está localizado na membrana mitocondrial, catalisa a oxidação do dihidroorato para orato, que parece ser necessário na interação da ubiquinona para reciclar o FAD (ARMAND et al, 2004). Além disso, com a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial disfuncionante, há um acúmulo de NADH no citosol e o piruvato auxilia na utilização do excesso de NADH pela via da lactato desidrogenase, catalisando a conversão do piruvato para lactato.

Devido à conservação entre as espécies da estrutura do mtDNA, das similaridades na função e composição dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial, muitas espécies e organismos mais simples como, o *C. elegans* são usados como modelo para investigar processos fisiológicos e patológicos relacionados ao mtDNA. (TSANG & LEMIRE, 2002). Esses modelos também são desenhados para células em cultura, como as células ρ^0 , que são células com deleções totais do mtDNA, e/ou ρ^- , com deleções parciais no mtDNA. Essas deleções podem ser induzidas, por exemplo, pelo brometo de etídio. É possível reproduzir funcionalmente pelo menos alguns efeitos destas deleções mediante o uso de concentrações ou tempos menores do agente intercalante (HAENDELER, comunicação pessoal), constituindo as denominadas células pseudo- ρ^0 , células com mínimas lesões

do mtDNA. Estas constituem possivelmente um modelo mais próximo ao encontrado em condições fisiopatológicas, como por exemplo, envelhecimento e aterosclerose.

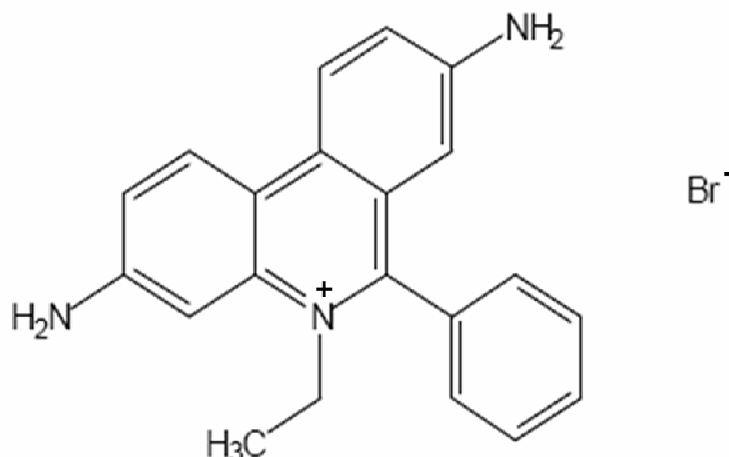


Figura 3. Estrutura química do brometo de etídio. O etídio liga-se fortemente aos grupos fosfato da cadeia do DNA celular devido à sua carga positiva, intercalando-se nas bases do DNA, promovendo mutações/deleções do DNA.

1.3. NAD(P)H oxidase vascular

A principal fonte de *ROS* sinalizadoras em células vasculares é o complexo NAD(P)H oxidase, que gera como produto principal o $O_2^{\bullet-}$, e como produto secundário o H_2O_2 , formado por sua vez pela dismutação do $O_2^{\bullet-}$ pela enzima superóxido dismutase. Ambos os produtos estão envolvidos em processos de sinalização redox celular (CLEMPUS & GRIENDLING et al, 2006) tanto em condições fisiológicas como em processos fisiopatológicos, tais como aterosclerose, diabetes e hipertensão (GUZIK, 2000).

O complexo da NAD(P)H oxidase vascular é composto por diversas subunidades parcialmente homólogas à oxidase de fagócitos, conforme Tabela 1.

Tabela 1: A NAD(P)H oxidase vascular

Subunidades Catalíticas	Nox1	Nox2	Nox4
Subunidades regulatórias associadas	p22 ^{phox} Noxo1 Noxa1	p22 ^{phox} p47 ^{phox} p67 ^{phox} p40 ^{phox} (?)	p22 ^{phox} - -
Principal efeito celular	Proliferação, migração	Proliferação, migração, inflamação	Diferenciação, apoptose

Obs.: A dependência da presença da subunidade p40^{phox} na atividade da NADPH oxidase ainda não está clara.

Nox = “*Non-phagocytic oxidase*”

A NAD(P)H oxidase vascular tem um papel central na manutenção da homeostase vascular, e a correlação entre a sua atividade e a presença de subunidades específicas em compartimentos celulares peculiares tem sido um dos principais temas de investigação na literatura (USHIO-FUKAI, 2006). Por exemplo, enquanto a isoforma Nox1 está presente em cavéolas e *lipid rafts*, a isoforma Nox4 encontra-se em adesões focais, conforme verificado por experimentos de microscopia confocal em células musculares lisas (HILENSKI et al, 2004). Empregando-se um anticorpo anti-Nox4 marcado com proteína fluorescente (GFP, *Green Fluorescent Protein*), Ambasta e colaboradores (2004) mostraram que esta isoforma se acumula no retículo endoplasmático. Em particular, estudo recente em células de osteosarcoma humano sugeriu que a Nox1 localiza-se preferencialmente na região perinuclear de células associada à superfície de mitocôndrias (DESOUKI, 2005). A presença de Nox1 perinuclear pode ter um papel mutagênico sobre o DNA via ROS, levando a um fenótipo tumoral (CHAMULITRAT et al, 2003).

A variação da expressão das isoformas da NAD(P)H oxidase vascular reflete diferentes processos celulares. Particularmente, as isoformas Nox1 e

Nox4 parecem estar envolvidas em processos celulares opostos. Enquanto a isoforma Nox1 está preferencialmente envolvida com a proliferação celular em resposta a estímulos como a AII e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (CLEMPUS & GRIENDLING, 2006), a Nox4 parece ser a isoforma predominante na atividade basal, e está envolvida em processos de diferenciação e apoptose celular (MAHADEV et al, 2004). Em adição, discute-se sobre os produtos efetores das duas isoformas vasculares Nox1 e Nox4, havendo sugestões de que o produto preferencial da primeira seja $O_2^{\cdot-}$ enquanto eventos celulares mediados por Nox4 parecem envolver primariamente H_2O_2 , provavelmente formado pela rápida conversão do $O_2^{\cdot-}$, produzido por esta isoforma (KNAUS, 2006).

Recentemente, nosso laboratório demonstrou que a dissulfeto isomerase protéica (PDI), uma tiol-oxidoreductase pertencente à superfamília da tioredoxina, bastante conservada e abundante no lúmen do retículo endoplasmático (NOIVA, 1999; CLISSOLD & BICKNELL, 2003), tem estreita interação física/funcional com o complexo NAD(P)H oxidase (JANISZEWSKI et al, 2005). Além das subunidades da NAD(P)H oxidase (Nox1, Nox2, Nox4 e $p22^{phox}$) co-localizarem e imunoprecipitarem com a PDI, a interação funcional foi mostrada pela redução da atividade da NAPH oxidase (induzida pela AII, um clássico agonista da oxidase) em 60% pelo antisenso da PDI em células musculares lisas (JANISZEWSKI et al, 2005). Estudos em andamento sugerem que esta interação PDI/NAD(P)H oxidase ocorra no contexto de um acoplamento entre estresse oxidativo e estresse do retículo endoplasmático (SANTOS et al, 2006).

1.4. Estresse do Retículo Endoplasmático

A função primordial do retículo endoplasmático é a montagem e processamento de proteínas que são secretadas ou que constituem a membrana de células eucarióticas. No interior do retículo, ocorre o enovelamento adequado de proteínas, que inclui a constituição de pontes dissulfeto em locais específicos mediante oxidação e isomerização de tióis. Esta função é primariamente executada pela uma ditiol-dissulfeto oxidoreductase PDI, que no lúmen do retículo endoplasmático é capaz de transferir equivalentes oxidantes a proteínas, equivalentes estes fornecidos pelo sistema Ero1 (*Endoplasmic reticulum oxidoreductase 1*). O retículo é ainda o sítio em que ocorrem várias modificações pós-traducionais de proteínas, como *N*-glicosilação. Quaisquer perturbações nestes processos de enovelamento e processamento da proteína geram uma situação denominada de estresse do RE, que acarreta respostas adaptativas sinalizadas por uma cascata de reações que integram o retículo e o núcleo (HARDING et al, 2003). Esta cascata é conhecida como resposta a proteínas mal-enoveladas (UPR). A UPR é essencialmente uma resposta adaptativa homeostática, porém quando exacerbada ou sustentada, pode desencadear apoptose, que ocorre por meio da caspase-12.

Nosso laboratório tem demonstrado em células musculares lisas uma convergência entre estresse oxidativo e estresse do retículo endoplasmático, indicando que estresse oxidativo integra-se a outros tipos de estresse em uma resposta geral celular. Em condições fisiopatológicas, como aterosclerose e resistência à insulina, já foi demonstrado que o estresse do

retículo endoplasmático sustentado leva ao estresse oxidativo (RON & WALTER, 2007; KAUFMAN, 2002). O estresse do retículo endoplasmático conecta-se com estresse oxidativo por vias anti-apoptóticas, como PERK(P)/ATF4 e PERK(P)/Nfr2/Keap (que ativa o fator de transcrição Nrf-2, codificador de vários genes antioxidantes) ou por vias pró-apoptóticas como a mediada pelo CHOP, que aumenta, nas fases adiantadas do estresse do RE, a expressão da flavo-oxidase do retículo endoplasmático Ero1 (MARCINIAK & RON, 2006). Nosso laboratório tem demonstrado que a convergência entre a PDI e a isoforma Nox4 da NADPH oxidase promove uma produção precoce e sustentada de ROS durante a UPR (SANTOS et al, 2006). Além disso, evidências de uma possível via entre uma disfunção da cadeia respiratória mitocondrial, dependente de óxido nítrico, e o estresse do RE, foram demonstradas pela diminuição da resposta do estresse do retículo mediada pelo óxido nítrico, em células ρ^0 (XU et al, 2004).

1.5. Convergência entre mitocôndria e complexo NAD(P)H oxidase

Conforme discutido acima, a mitocôndria é quantitativamente o principal produtor de ROS celular (TURRENS, 1997) e um determinante crucial do estado redox da célula. Por outro lado, o envolvimento da mitocôndria em processos finamente regulados de sinalização celular está bem menos claro. Assim, tornou-se relevante investigar a inter-relação entre a mitocôndria e o complexo NAD(P)H oxidase, um dos principais geradores extramitocondriais de ROS com função de sinalização celular. O

entendimento desta convergência é essencial para uma compreensão mais ampla da homeostase redox celular, com implicações no esclarecimento da fisiopatologia de várias condições patológicas, particularmente aquelas em que se acumulam mutações do DNA mitocondrial.

A conexão entre função mitocondrial e o complexo NAD(P)H oxidase é sugerida por escassas evidências da literatura, enquanto os possíveis mecanismos responsáveis por tal via são muito pouco estudados. Em células de carcinoma de ovário, a inativação de genes mitocondriais leva a menor expressão da Nox1, levando à hipótese de que a perda de controle dessa sinalização contribua para a tumorigênese (DESOUKI, 2005). Outra evidência dessa inter-relação é o estímulo da ativação de Nox1 por *ROS* originadas da mitocôndria após privação induzida de soro, levando a uma produção sinérgica sustentada de *ROS* e morte celular envolvendo ambos os sistemas enzimáticos. A ativação da Nox1 pela mitocôndria parece envolver a via da PI3K e a subunidade Rac1 (LEE et al, 2006). Além disso, a indução de disfunção mitocondrial por agentes farmacológicos ou depleção do mtDNA leva a redução da trans-ativação do receptor de EGF mediada especificamente por administração exógena de peróxido de hidrogênio (CHEN et al, 2004). Evidências preliminares (BLOCK, comunicação pessoal) indicam que a Nox4 localiza-se de modo importante na superfície mitocondrial e sua ativação pode amplificar a disfunção mitocondrial no diabetes.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi explorar a convergência entre função mitocondrial e atividade/expressão do complexo NAD(P)H oxidase em células vasculares.

Os objetivos específicos consistiram em:

- i)* caracterizar um modelo de disfunção mitocondrial (células *pseudo-ρ⁰*) em células musculares lisas, com alterações mínimas no DNA mitocondrial análogas às esperadas em doenças crônico-degenerativas.
- ii)* investigar neste modelo as alterações da produção de ROS e da atividade do complexo NAD(P)H oxidase em condições basais ou após incubação com agonistas da oxidase.
- iii)* estudar alterações na expressão de diferentes isoformas da NAD(P)H oxidase nas células *pseudo-ρ⁰*.
- iv)* investigar a influência da disfunção mitocondrial na expressão da PDI e de indicadores de estresse do RE.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes

Dihidroetidina, AmplexRed[®], DCF e os materiais para reação de PCR foram adquiridos da Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA). Todos os outros reagentes, incluindo brometo de etídio, uridina foram comprados da Sigma (St. Louis, MO, EUA). Penicilina/estreptomicina, soro fetal bovino, tripsina, pancreatina da Gibco BRL-Life Technologies (Grand Island, EUA). Todas as soluções foram preparadas com água purificada em sistema Milli-Q, e eventualmente tratadas com Chellex-100 para remoção de metais de transição contaminantes.

3.2. Cultura celular

As células musculares lisas aórticas de coelhos (VSMC) foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dra. Helena Nader, do Departamento de Bioquímica da UNIFESP. Esta é uma linhagem celular estabelecida e imortalizada por seleção pelo Prof. V. Buonassisi (BUONASSISSI et al, 1976).

3.3. Obtenção de células pseudo- ρ^0 de linhagem muscular lisa vascular

VSMC foram crescidas em placas de 100 mm (10^6 células), e mantidas em meio F-12 Coon's com penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 μ M), suplementado com 10% (v/v) de SFB (Gibco BRL-Life

Technologies Grand Island, EUA). Após atingir confluência de 90%, as VSMC foram incubadas com brometo de etídio a 250 ng/mL por 24 ou 72 horas, em meio de cultura F-12, contendo 10% (v/v) de SFB e suplementado com 50 µg/mL de uridina.

3.4. Medida de consumo de oxigênio

Os estudos de consumo de oxigênio foram monitorados ao longo do tempo em suspensões de VSMC (4×10^6 células/mL) em PBS pH 7,4, sob agitação contínua a 37 °C, com o uso de um eletrodo de oxigênio (Clark, Hansatech, Norfolk, Inglaterra), previamente calibrado com ditionito de sódio. A concentração de saturação oxigênio molecular em solução nesta temperatura considerada foi de 210 µM (ROBINSON & COOPER, 1970).

3.5. Obtenção da fração particulada de membrana celular

Homogenatos de fração de membrana foram obtidos por ultracentrifugação seqüencial como descrito anteriormente (LAURINDO et al, 2002). Resumidamente, VSMC lavadas com PBS gelado, raspadas em presença de tampão de lise (Tris 50 mM pH 7,4 contendo EDTA 0,1 mM, EGTA 0,1 mM, aprotinina 10 µg/mL, leupeptina 10 µg/mL e fluoreto de fenilmetilsulfonila 1 mM). AS células em suspensão foram sonicadas (3 ciclos a 8W de 10 segundos), os homogenatos obtidos foram centrifugados para retirada de mitocôndrias e núcleos (18.000g por 15 min), e os sobrenadantes foram centrifugados a 100.000 g por 1h para obtenção da

fração enriquecida de membranas celulares. As dosagens de proteína foram realizadas com reagente Bradford (BioRad). As frações de membrana foram usadas em ensaios para medida da atividade NADPH oxidase, como descrito nos iten 3.6.

3.6. Atividade da NADPH oxidase em fração de membrana de VSMC

3.6.1. Análise por quimiluminescência da lucigenina: medida da produção de $O_2^{\cdot -}$

A quimiluminescência amplificada por lucigenina foi analisada nas frações de membrana de células VSMC. Resumidamente, 20 μ L do particulado (20 μ g proteína) foram adicionados em 1 mL de solução de PBS/10 μ M EDTA , após termostatização a 37 °C, foi adicionado 5 μ M de lucigenina. Após contagem basal, 300 μ M de NADPH foram adicionados e as contagens de luminescência foram registradas continuamente por 5 minutos, em um luminômetro Berthold 9505 (GE & Instruments GmbH, Munique, Alemanha). Os sinais da linha de base foram subtraídos daqueles obtidos após a adição de NADPH, e os resultados foram normalizados pela quantidade de proteína e descritos como cpm x mg^{-1} x min^{-1} .

3.6.2. Análise da oxidação da DHE por HPLC: medida da produção $O_2^{\cdot -}$

Para análise por HPLC, como descrito anteriormente por Fernandes e colaboradores (2007), fração de membrana das VSMC (cerca de 20 μ g de

proteína) foi incubada com DHE (50 μM) a 37°C (volume final de 120 μL) e NADPH (300 μM) em PBS/100 μM DTPA no escuro. Após 30min, as amostras foram mantidas em gelo, no escuro, até a análise por HPLC (Waters volume de injeção de 100 μL) com detecção por absorbância e fluorescência. A separação foi realizada em coluna NovaPak C₁₈, com gradiente entre acetonitrila pura e mistura de água/acetonitrila (9:1 v/v, contendo ácido trifluoroacético 0,1%), com fluxo de 0,4 mL/min. Dihidroetidina foi monitorada por absorção na região UV a 245nm, enquanto que os compostos fluorescentes 2-EOH e etídio foram monitorados por detecção por fluorescência (λ_{exc} 510 nm, λ_{em} 595 nm). A quantificação dos compostos foi realizada por comparação das integrais das áreas dos picos correspondentes com as integrais obtidas com padrões autênticos submetidos às mesmas condições cromatográficas. A concentração dos padrões foi quantificada pela absorvidade molar de cada composto (etídio $\epsilon_{285\text{nm}} = 5.740 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e DHE $\epsilon_{265\text{nm}} = 1.963 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). O padrão de 2-EOH foi preparado conforme descrito anteriormente por Fernandes e colaboradores (2007).

3.6.3. Análise por fluorescência total de DHE em microplaca: medida da produção $\text{O}_2^{\cdot-}$

A fração de membrana das VSMC (10 μg de proteína) foi incubada com DHE (10 μM) e DNA de timo de bezerro (1,25 $\mu\text{g/mL}$) em PBS/100 μM DTPA, em presença de NADPH (50 μM) por 30 min (volume final de 120 μL) a 37°C, no escuro. A fluorescência total foi medida empregando-se dois

filtros diferentes: (a) rodamina (λ_{exc} 490 nm, λ_{em} 590 nm) e (b) acridina (λ_{exc} 490 nm, λ_{em} 570 nm), em espectrofluorímetro de placa de 96 poços (Wallac Victor² 1420-Multilabel Counter, EUA, PerkinElmerTM). (FERNANDES et al, 2007).

3.6.4. Análise pela oxidação da resorufina: medida da produção H₂O₂

A medida de oxidação da resorufina, em fração de membrana, utilizando o reagente AmplexRed[®], foi outro método para avaliar atividade da NADPH oxidase, por medir a produção H₂O₂ nos homogenatos. A fração de membrana (20 μ g) foi incubada com NADPH (250 μ M) em PBS (pH 7,4 contendo EDTA 100 μ M) na presença de HRP (10 U/mL) e reagente AmplexRed[®] (250 μ M) a 37°C no escuro em placa de 96 poços (volume final de 120 μ L). A absorbância foi acompanhada a 575nm por 60 min em leitor de Elisa (Spectramax 340, Molecular Devices).

3.7. Análise da produção total de ROS em VSMC pela análise por HPLC da oxidação da DHE

As VSMC foram tratadas conforme descrito por Fernandes e colaboradores (2007). Resumidamente, após a incubação com EtBr, as placas contendo as células VSMC foram incubadas em PBS/DTPA (0,5 mL) contendo DHE (50 μ M). Após 30 min, as células foram lavadas com PBS /DTPA para retirada da DHE que não foi incorporada, raspadas em presença de 0,5 mL de acetonitrila, e o extrato de células obtido foi centrifugado

(12.000 g por 10 min a 4°C) para retirada de debris. Os sobrenadantes dos extratos foram secos sob vácuo (Speed VacR Plus SC-110A, Thermo Savant) e os resíduos armazenados a -20°C no escuro até análise. As amostras foram ressuspensas em 120 µL de PBS/DTPA e injetadas no sistema de HPLC (100 µL). Os dados foram expressos como 2-hidroxietídio normalizado pela DHE consumido (EOH/DHE) e etídio por DHE consumido (E/DHE). A DHE consumida foi calculado como a diferença entre a concentração inicial de DHE adicionada às células e a DHE remanescente no extrato celular quantificado por HPLC. Vale ressaltar que todas as etapas foram realizadas em ausência de luz.

3.8. Quantificação de GSH intracelular por HPLC

As VSMC foram lavadas com PBS/EDTA e raspadas em tampão acetato (10 mM pH 6,5, 0,5% Triton e 100 µM EDTA). A análise de GSSG foi realizada indiretamente pela sua redução enzimática a GSH pela glutathione redutase (0,6 U/ml)/ NADPH (0,2 mg/ml) por 30 minutos. A reação foi paralizada com a centrifugação das amostras (10.000 rpm /5 min) em ácido trifluoroacético 10%. Os sobrenadantes foram injetados em sistema HPLC (Waters Corp. Milford, MA), com detecção eletroquímica o GSH foi identificado e quantificado pela comparação do tempo de retenção da amostra com padrão autêntico submetido às mesmas condições cromatográficas. Os resultados foram normalizados pela concentração de proteína e expressos em nmol/mg proteína. A quantificação de GSSG foi inferida pela diferença de GSSG total reduzida em relação à GSH total das

mesmas amostras, considerando-se a estequiometria 2GSH/GSSG (HIRAKU et al, 2002).

3.9. Quantificação de nitrito e nitrato em meio de cultura

As concentrações de nitrito e nitrato foram medidas por quimioluminescência pelo analisador de óxido nítrico (NOATM 280, Sievers). Para dosagem de nitrito, a solução na cela de reação continha KI/HAc (temperatura ambiente) e para dosagem de nitrato, a solução continha VaCl_3/HCl ($T = 95^\circ\text{C}$). Após injeção de 20 μL de meio de cultura, calculou-se a concentração baseando-se em curvas de calibração feitas no mesmo dia com soluções-padrão de NaNO_2 (0,5 - 7,5 μM) ou NaNO_3 (1 - 30 μM).

3.10. Medida da atividade da enzima superóxido dismutase em VSMC

A atividade superóxido dismutase foi medida pela inibição da redução do citocromo c^{3+} para citocromo c^{2+} acompanhando-se a absorbância a 550 nm a 25°C . Homogenatos das células (10-15 μg) foram adicionados à cubeta contendo tampão fosfato (50 mM, pH 7,8, contendo EDTA 0,1 mM), xantina (0,5 mM), xantina oxidase (cerca de 0,2 U/mL) e citocromo c^{3+} (20 μM). A redução de 50% da oxidação do citocromo c^{3+} pelo homogenato foi considerada 1U de SOD (Imley & Fridovich, 1991).

3.11. Produção celular total de H₂O₂

O acúmulo de H₂O₂ em VSMC intactas foi realizado pelo reagente Amplex Red® e também pela fluorescência da diclorofluoresceína. As células foram cultivadas em lamínulas com confluência de 70%. VSMC (70% de confluência) foram lavadas com PBS para a retirada do meio de cultura e foram incubadas com 5 µM de DCF, em câmara úmida a 37°C por 20 min. Depois as VSMC foram lavadas e colocadas sobre lâminas e a fluorescência foi medida no filtro FITC (excitação = 450-490 nm; emissão = 515 nm) em microscópio Zeiss Axiovert 200M, com a aquisição das imagens pelo software Axiovision 3.0

3.12. Microscopia confocal das subunidades da NAD(P)H oxidase

As VSMC, com confluência foram lavadas fixadas com glutaraldeído 3% por 15 minutos a 37°C, seguido de permeabilização com Nonidet P40 0,1% 15 minutos a 37°C e bloqueio com PBS contendo albumina 1% por 5 minutos. O próximo passo foi a incubação com o anticorpo primário anti-Nox1 (1:150 de cabra, Santa Cruz); ou o anti-PDI (1:2000 de coelho, Stressgen) em PBS albumina 1% a 37°C por 1 hora. Após incubação com o anticorpo secundário anti-cabra ou anti-coelho conjugado com Rodamina (1:100, Calbiochem), por 90 minutos a 4°C, foi realizada nova incubação com o indicador de mitocôndrias MitoTracker Green® da Molecular Probes por 30 minutos a 37°C. Finalmente, incubou-seas VSMC com o marcador específico de núcleo, 4'6-diamidina-2-fenilindol (DAPI, 10 µg/mL, Sigma). A

análise das lamínulas foi feita em um microscópio confocal LSM 510 Meta (Zeiss).

3.13. Análise estrutural das VSMC por microscopia eletrônica

Após tratamentos as VSMC foram descoladas da placa com solução de tripsina/EDTA 250 mg% por 5 minutos a 37°C, lavadas com PBS por centrifugações (2500 rpm por 5 min). O precipitado de células foi fixado com glutaraldeído 3% por 3 horas a 4°C. A pós-fixação foi feita com solução de tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato pH 7,3. Os passos seguintes foram: a) nova lavagem com solução salina 0,9% com 1,78% de sacarose, para contrastação em bloco com solução de acetato de uranila 0,5% com 13,3% de sacarose; b) desidratação, feita em série crescente de etanol; c) inclusão em resina de araldite; d) triagem dos blocos e preparo dos cortes semi finos (0,5 µm) em lâmina, corados com uma mistura de 1:1 de azul de metileno 1% em bórax 1% em água e azul 1% em água quente, para a escolha do melhor bloco para o corte ultrafino (60 nm em telas de cobre de 200 *mesh*); e) contraste dos cortes ultrafinos em citrato de chumbo; análise em Microscópio Eletrônico Phillips Tecnai 10.

3.14. Análise da expressão de mRNA das Noxes por PCR quantitativa

O mRNA total das VSMC foi purificado com o *kit SpinMini RNA isolation (GE)*. A quantificação do mRNA foi feita por absorbância a 260 nm (NanoDrop) e a pureza confirmada pela análise das bandas de rRNA em gel

de agarose 0,8% contendo brometo de etídio. O mRNA (3-5 µg) foi convertido em cDNA pela incubação com OligodT₍₁₂₋₁₈₎ (25 ng/µL), dNTP (500 µM de cada), DTT (5 µM), RNase OUT (2 U/µL) e SuperScript II, a 42°C por 50 min.

Para quantificar as isoformas da NADPH oxidase de células de coelho, colaboramos com o Prof. Bernard Lassègue (Emory University, Atlanta, EUA) que já havia clonado as seqüências das Nox1 e Nox4 de coelho e tornou-as disponíveis para nossos estudos (pois não estão ainda publicadas no PubMed). Estas seqüências permitiram a obtenção de padrões (em plasmídeos) e o desenho de primers de altas temperaturas para RT-PCR em tempo real, que foram gentilmente cedidos ao nosso grupo. Os clones foram obtidos a partir de amostras de cólon (Nox1) e rim (Nox4) de coelho. Os plasmídeos foram amplificados em bactérias competentes e purificados (Kit MidPrep/Qiagen). As soluções de reação para as corridas de Real Time PCR foram realizadas com: plasmídeo (entre 10³ a 10⁷ cópias/reação), primers (200 nM), cDNA (150 ng) e reagente Sybr MasterMix (Invitrogen) conforme especificações sugeridas pelo fabricante. Os *primers* testados que apresentaram melhores curvas de calibração foram: Nox1, *right*: CATCATGGAAGGAAGGAGA, *left*: GCTTCCGGATAAACTCCACA; Nox4, *right*: CCACAGACTTGGCTTTGGAT, *left*: TACTGGCCAGGTCTTGCTTT e GAPDH, *right*: TCACCATCTTCCAGGAGCGA, *left*: CACAATGCCGAAGTGGTCGT. As reações foram realizadas no equipamento RG 6000 (Corbett).

3.15. Western Blotting

Homogêntos celulares ou fração de membrana (30 µg de proteína por canaleta) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (7,5 a 12%, conforme o caso). A seguir, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (sistema de transferência “semi-dry” Amersham Pharmacia Biotech). A membrana foi bloqueada com TBS (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, e NaCl 150 mM) contendo 0,05% de Tween 20, e leite desnatado 5% (ou albumina bovina), por uma hora e meia, a temperatura ambiente. A seguir, a membrana foi incubada, durante a noite a 4°C, em solução contendo anticorpo primário. A membrana foi posteriormente incubada por 1 hora com anticorpo secundário (IgG anti Ig de camundongo, cabra ou rato, conjugada com peroxidase 1:2000, Calbiochem) a temperatura ambiente. A revelação foi feita por quimiluminescência, utilizando kit ECL da Amersham Pharmacia Biotech e a membrana foi exposta, em câmara escura, ao filme fotográfico durante diferentes tempos. As proteínas estudadas foram marcadores de estresse do retículo endoplasmático anti-PDI (Stressgen e ABR), anti-KDEL(Stressgen) e anti-GRP94 (Stressgen) em diluição de 1:1000, e o controle de carregamento anti-β-actina (1:2000).

3.16. Análise estatística

Os valores foram expressos como média ± desvio da média. As comparações estatísticas foram realizadas através de teste *t* de Student para valores não pareados ou análise de variâncias (ANOVA), seguida por teste Student-Newman Keuls, com significância estatística de 5%. O

software utilizado foi The Primer of Biostatistics, de Staton A. Glantz, versão 3.01, McGraw-Hill, 1992.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização do modelo de VSMC pseudo- ρ^0

4.1.1. Efeitos na proliferação e apoptose

Vários experimentos, descritos a seguir, foram realizados para caracterizar aspectos fisiológicos observados em VSMC incubadas com EtBr por 24 e 72 horas, conforme modelo descrito em Métodos (KING & ATTARDI, 1989, HAENDELER comunicação pessoal).

Para calcular a IC_{50} do EtBr em VSMC e caracterizar a necessidade de suplementação dessas células com uridina e piruvato (v. Introdução), VSMC foram incubadas com concentrações de $25 - 10^3$ ng/mL, em meio suplementado com uridina e piruvato como indicado na literatura (KING & ATTARDI, 1989), possibilitando assim o cálculo de IC_{50} (Figura 4). Esses dados indicam tolerância de VSMC a altas concentrações de EtBr, correspondendo a $IC_{50} = 845$ ng/mL. Estes experimentos indicaram o valor de 250 ng/mL como concentração ideal de EtBr, pois, apesar dessa concentração ser mais alta que a anteriormente sugerida por Haendeler para células HEK293, está significativamente abaixo da IC_{50} .

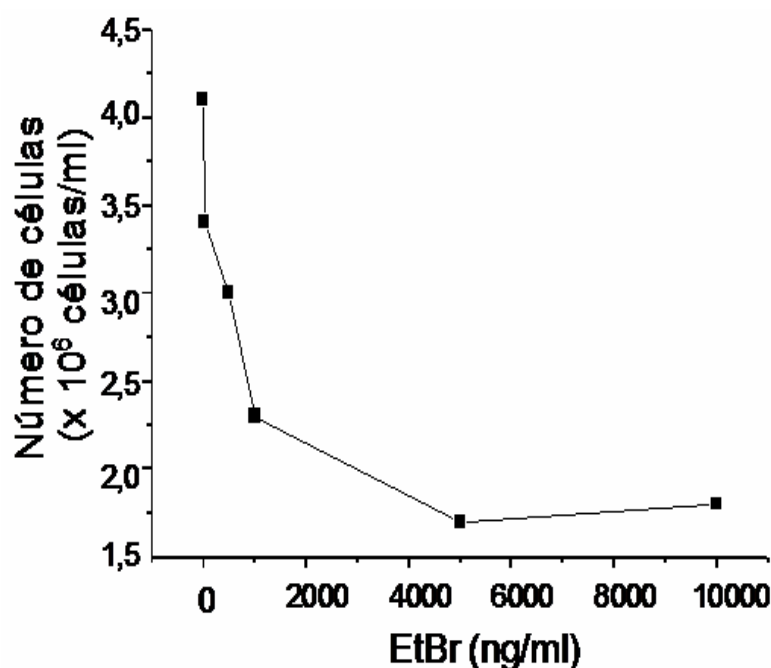


Figura 4. Crescimento celular vs. concentrações crescentes de EtBr adicionado ao meio de cultura das VSMC. Contagem do número de VSMC, em câmara de Neubauer, após 5 dias de incubação com EtBr, nas concentrações de 25, 50, 500, 1000, 5000 e 10000 ng/mL, com troca do meio F-12 a cada 2 dias, o número de células inicial foi de 10^4 células/mL.

Conforme citado no parágrafo anterior, durante a indução da disfunção mitocondrial (EtBr, 24 h), o meio de cultura era suplementado com piruvato (1mM) e uridina (50 μ g/mL). Tem sido repetidamente sugerido na literatura que a presença destes suplementos é necessária para a sobrevivência das células com lesões no DNA mitocondrial (conforme KING & ATTARDI, 1989). Observamos que as células lesadas por EtBr apresentavam maior atividade da NAD(P)H oxidase e maior proliferação. Para compreender melhor a interferência individual de cada suplemento, medimos a atividade da NAD(P)H oxidase e a proliferação celular adicionando cada suplemento bem como o EtBr, separadamente. Os resultados demonstraram que na ausência de EtBr, o piruvato aumenta tanto a atividade da NAD(P)H oxidase (Figura 5) quanto a proliferação celular.

Estudos utilizando o acetato (produto de decomposição do piruvato) como controle, revelaram que este aumento decorre quase exclusivamente da diminuição do pH do meio de cultura. Assim, decidimos não adicioná-lo mais ao meio de cultura, que já contem 2 mM de piruvato, concentração próxima à média daquela sugerida como suplementação na literatura. Em contrapartida, a suplementação do meio F-12 feita com solução de uridina preparada no dia, não interfere na atividade da NAD(P)H oxidase (Figura 5), nem na proliferação celular (Figura 6).

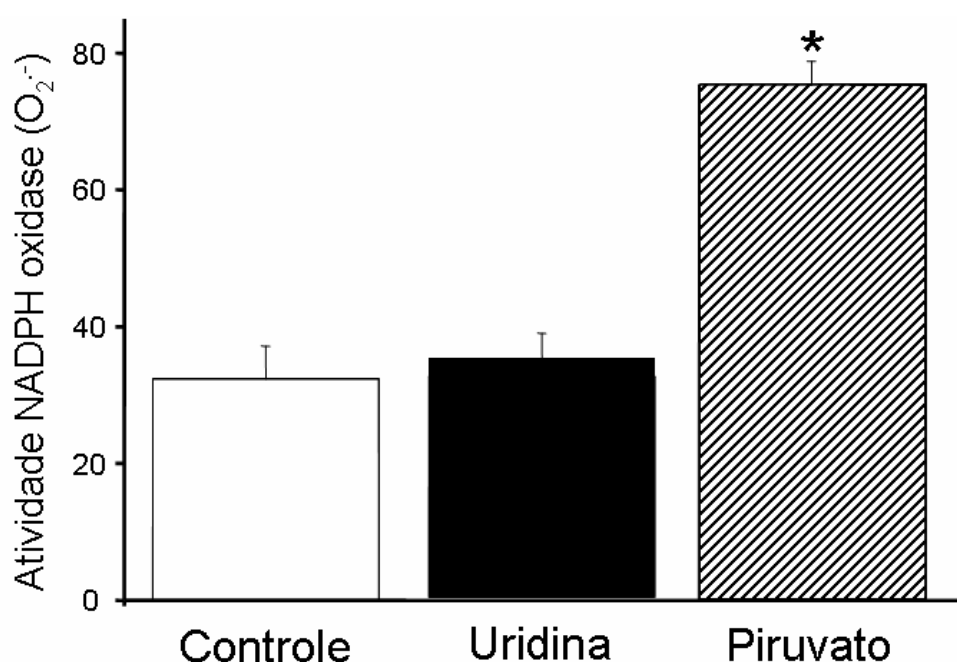


Figura 5. Atividade da NAD(P)H oxidase em fração de membrana de VSMC pelo método da lucigenina. As células foram incubadas com suplementos necessários para células com disfunção mitocondrial, em meio F-12 com: uridina (50 μ g/mL) ou piruvato (1 mM) por 24 horas, a 37°C . ANOVA, seguido de Newman-Keuls * $p < 0,05$ vs controle; N = 3.

Um fato importante, é que a exposição das VSMC ao EtBr induziu uma redução do crescimento celular quando o ensaio de proliferação foi

realizado na presença de soro fetal bovino 10%, sugerindo que a disfunção /estresse mitocondrial interfere na homeostase celular e desencadeia mudanças fenotípicas (Figura 6).

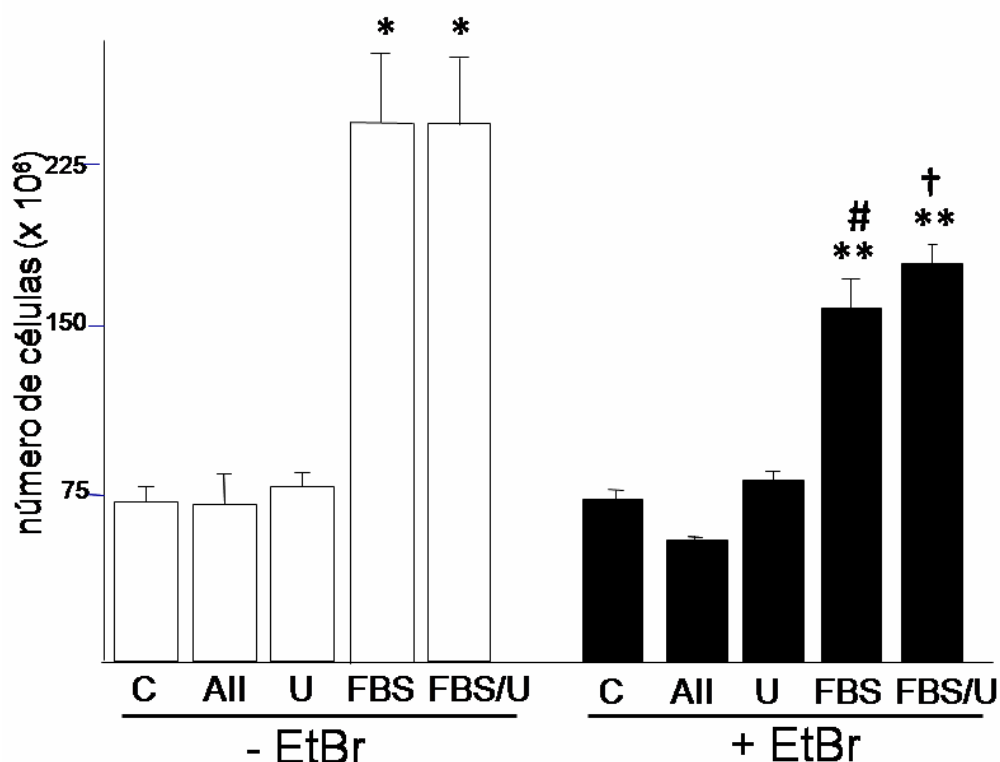


Figura 6. Retardo do crescimento celular das VSMC após incubação com EtBr. Contagem do número de VSMC presença e na ausência da EtBr (72 h) em câmara de Neubauer. Abreviaturas: C = meio F-12 sem FBS, AII = angiotensina II (100 nM), U = meio F-12 suplementado com uridina (50 µg/mL) e controle positivo com FBS 10%, para confirmar a proliferação das células. ANOVA, seguido de Newman-Keuls *p< 0,05 vs controle(-EtBr); **p<0,05 vs controle(+EtBr); #p<0,05 vs FBS (-EtBr), e † p<0,05 vs FBS/U(-EtBr). N = 5.

Também verificamos que a suplementação com uridina não induziu estresse do RE, uma vez que documentamos expressão similar às células controle de chaperonas residentes do retículo endoplasmático: GRP78, GRP94 e PDI (Figura 7).

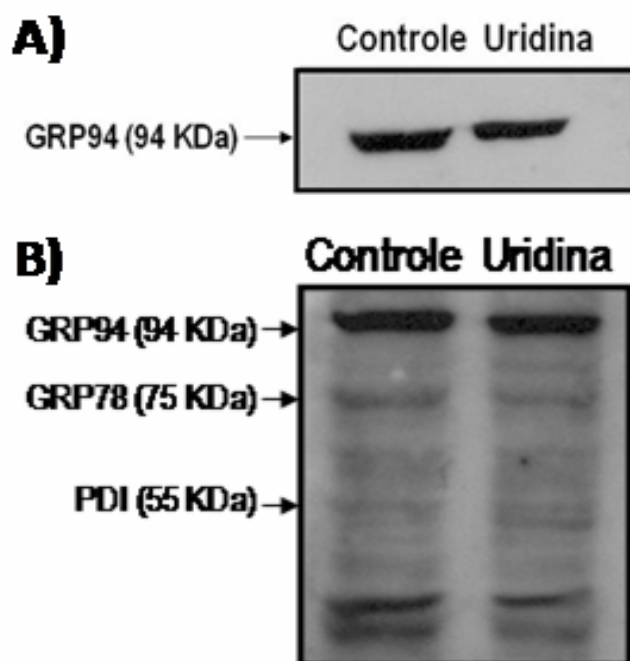


Figura 7. A suplementação com uridina no meio de cultura não induziu estresse do retículo endoplasmático nas VSMC. Western blotting representativo da suplementação com uridina em VSMC, pela expressão de marcadores de estresse RE. **(A)** Anti-GRP94. **(B)** Anti-KDEL. Homogenatos totais de VSMC cultivadas em meio F-12 com uridina (50 $\mu\text{g/mL}$) por 24 horas. Figura representativa de três experimentos independentes.

Estes resultados demonstram que a uridina não interfere no metabolismo das VSMC; portanto, validamos o protocolo de suplementação das células incubadas com EtBr com uso somente de uridina (50 $\mu\text{g/mL}$) e soro fetal bovino (10%).

4.1.2. Alterações causadas por EtBr no mtDNA em VSMC

Para comprovar a existência de mutações e/ou deleções no mtDNA, verificamos a expressão de algumas subunidades mitocondriais conhecidas, como citocromo c oxidase, citocromo b, ATP sintase 6, NADH5, associadas

a produtos de aproximadamente 400 bp. Utilizamos várias combinações de *primers* para cobrir toda extensão do mtDNA (Figura 8), como *primers* flanqueando regiões maiores, incluindo regiões intergênicas (o mtDNA não apresenta íntrons), chegando a tamanhos entre 4 – 8 Kb. Nessas regiões inicialmente estipuladas, nossos resultados confirmaram a amplificação de vários destes produtos, porém, sem diferenças qualitativas ou quantitativas detectáveis entre as VSMC na condição basal e as incubadas com EtBr (dados não mostrados). Como controle, pelo ao fato de nossa VSMC ser uma célula imortalizada, além de cultura primária de células de aorta de coelho, averiguamos também prováveis deleções resultantes do intercalamento do EtBr no mtDNA humano em células HEK293 e em células de cultura primária de aorta murina.

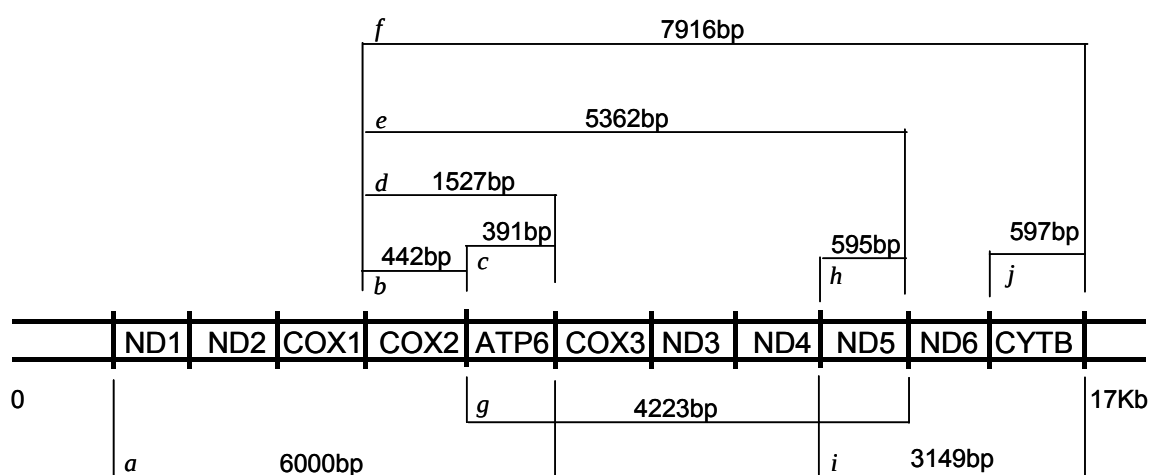


Figura 8. Figura esquemática das regiões e subunidades do mtDNA. Essas regiões foram abrangidas com a combinação dos diferentes *primers*. As letras de *a-j* indicam cada combinação utilizada e o respectivo tamanho do produto da reação de PCR, cobrindo assim todo o mtDNA.

Para verificar a existência do intercalamento do EtBr no mtDNA, e assim confirmar a efetiva ação do EtBr nas concentrações utilizadas,

submetemos as células HEK293, as quais a indução de deleções do mtDNA foi previamente demonstrada por Haendeler (comunicação pessoal), ao mesmo protocolo das VSMC. Neste caso, obtivemos o desaparecimento da banda na altura do produto de PCR encontrado na célula controle (Figura 9), o que demonstra a acuidade do nosso protocolo de indução de lesão no mtDNA por incubação com EtBr. O completo desaparecimento da banda de amplificação da PCR pode ser devido a deleção de porções significativas do mtDNA ou apenas a deleção de alguns pares de base do DNA específicos da região causada pela exposição ao EtBr, e assim alteração de *frame* do *primer*.

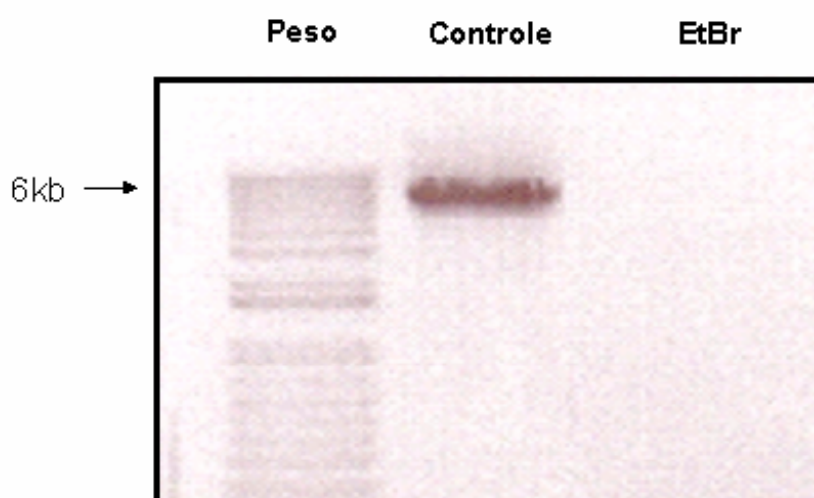


Figura 9. Deleção do mtDNA de células HEK293 após incubação com EtBr. Detecção por reação de PCR em DNA total de células HEK23, após exposição ao EtBr (50 ng/mL, 24 h). *Primers* flanqueando as subunidades NADH1 e ATP6 (~6Kb). Notar a ausência de amplificação nas células ρ^0 (expostas a EtBr). Figura representativa de três experimentos independentes.

Entretanto, a reprodução desse dado da Figura 9, em VSMC, bem como em células de cultura primária de aorta de rato e coelho, não foi detectada (dados não mostrados), o que não descarta a existência de

pequenas deleções ou alterações nestas células. Estes dados sugerem que esse protocolo de exposição ao EtBr induziu apenas alterações/deleções mínimas no mtDNA, que podem interferir com a transcrição de proteínas essenciais, ou por outro lado levando à formação de proteínas anômalas ou mal enoveladas não funcionais na forma de uma reação de estresse mitocondrial (YONEDA et al, 2004).

Essas mínimas alterações de mtDNA são capazes de interferir em vários processos fisiopatológicos e na sequência da região D-loop do mtDNA, que é um importante marcador de alterações do mtDNA, e possui blocos de repetições conservados, além de também conter alguns dos principais elementos regulatórios envolvidos na regulação da replicação de mtDNA (ATTARDI & SCHATZ, 1988; SHADEL & CLAYTON, 1997). Pouco se sabe sobre como a variação de nucleotídeos acontece na região D-loop do mtDNA, e a detecção dessas alterações pontuais por reações de PCR é de difícil visualização. Entretanto, com um par de *primers* desenhado para se ligar em regiões repetitivas da região D-loop do mtDNA, obtivemos uma alteração no padrão de bandas dos produtos da reação de PCR das VSMC expostas ao EtBr, com a expressão acentuada em VSMC incubadas com EtBr + All (Figura 10).

4.1.3. Redução do consumo de oxigênio em VSMC pseudo - ρ^0

Uma vez demonstrado o dano ao mtDNA das VSMC pelo EtBr (Figura 10), estudamos a influência desta lesão na função respiratória total pela medida do consumo de oxigênio, para assim caracterizar a disfunção

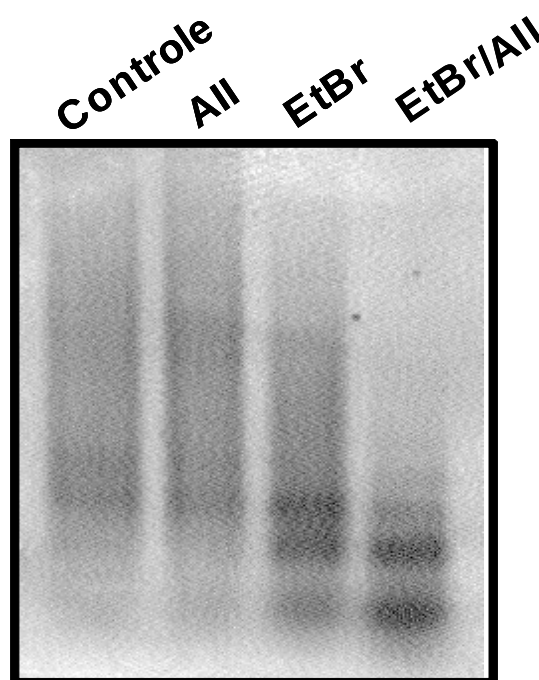


Figura 10. Alterações na região D-loop do mtDNA de VSMC após incubação com EtBr. Reação de PCR de um dos blocos de repetição da região D-loop, mostrando uma alteração de padrão de bandas, com o aumento de intensidade na expressão de produtos inespecíficos após a exposição das células ao EtBr (24 h), que parece pronunciar após o estímulo com All (100 nM, 4h). Figura representativa de quatro experimentos independentes.

mitocondrial causada nestas condições. Encontramos uma redução significativa de aproximadamente 15% na taxa de consumo de oxigênio nas pseudo - ρ^o VSMC vs basal (Figura 11). Essa taxa foi calculada pelo consumo de oxigênio total das VSMC pelo consumo de oxigênio total das VSMC (4×10^6 células/cubeta) em presença de oligomicina (20 $\mu\text{g/mL}$). Vale ressaltar que as medidas foram realizadas em VSMC não permeabilizadas, pois essas células são descoladas da placa com uma solução de tripsina

que foi suficiente para permeabilizar a membrana dessas células nestes experimentos (dados não mostrados).

Assim, esses dados (Figuras 10 - 11) confirmaram que em nosso modelo as VSMC, além de apresentar lesão de mtDNA, também apresentaram uma significativa disfunção na respiração mitocondrial após incubação com EtBr por 24 horas.

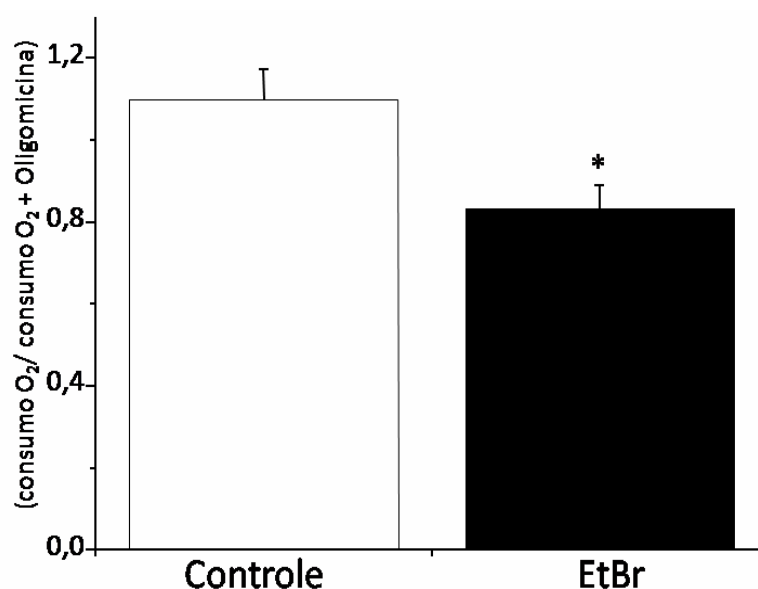


Figura 11. Medida de consumo de oxigênio como marcador de disfunção mitocondrial em VSMC após incubação com EtBr. Figura demonstrando redução significativa do consumo de oxigênio celular total, em VSMC inteiras vs VSMC pseudo - p^o . Método: VSMC em PBS (pH 7,4), medida de O₂ por eletrodo de Clark a 37°C, sob agitação. Valor basal de respiração das VSMC controle foi de 37 pmols O₂ s⁻¹10⁶ células. Incubação com EtBr (24 h), Oligomicina 20 µg/mL. ANOVA, seguido de Newman-Keuls * $p < 0,015$ controle vs EtBr. N = 6.

4.2. Efeitos da disfunção mitocondrial no estado redox das VSMC

As frações de membrana de homogenatos de VSMC previamente incubadas com EtBr (24 h) apresentaram alterações variáveis e não

significativas na atividade NAD(P)H oxidase em relação ao basal (Figura 12). É importante ressaltar que o presente protocolo de exposição de VSMC ao EtBr não alterou o estado redox total celular, como demonstrado pela relação de 2GSH/GSSG, GSH total (Tabela 2).

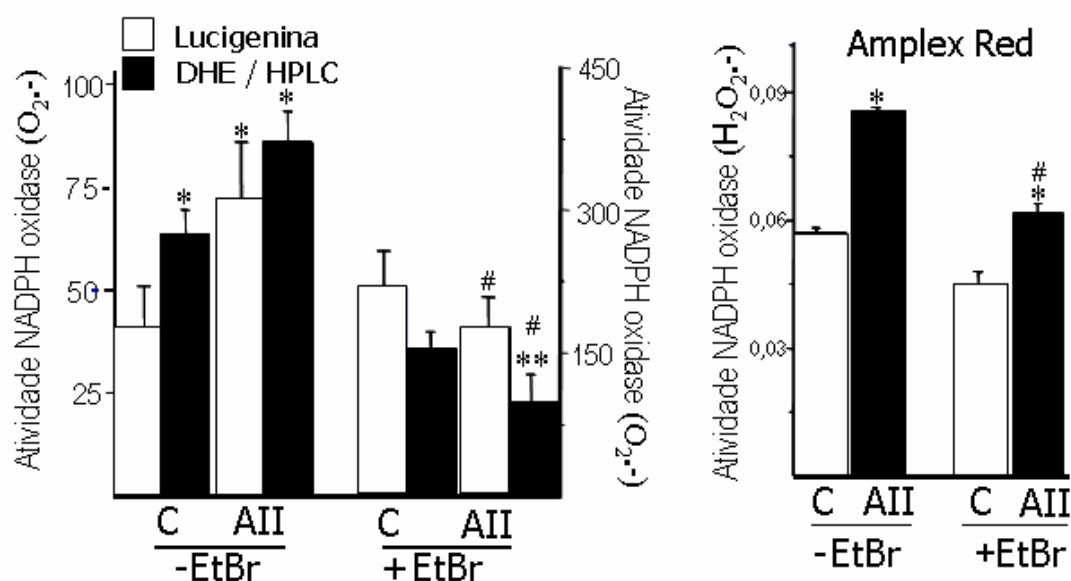


Figura 12. Diferentes medidas da atividade da NADPH oxidase em fração de membrana de VSMC após EtBr. VSMC foram incubadas ou não com EtBr (24 h), frente ao agonista da oxidase AII (100 nM por 4 h). Métodos: **A)** Medida de produção de superóxido pela fração de membrana estimulada com NADPH por lucigenina ou oxidação da DHE (quantificação de 2-EOH medida por HPLC), **B)** Medida da produção de H₂O₂ pela fração de membrana estimulada com NADPH (reagente Amplex Red®). ANOVA, seguido de Newman-Keuls *p<0,05 vs controle (-EtBr); **p<0,05 vs controle (+EtBr) e #p<0,05 vs AII (-EtBr). N = 4.

Tabela 2. Medidas da razão GSH/GSSG intracelular em VSMC após incubação com EtBr^a

Sistema	nmolGSH/ mg proteína	2GSH/GSSG
Controle	48,6 ± 9,4	11,2 ± 1,3
EtBr	53,1 ± 11,1	10,9 ± 2,2

^a Análise de homogenatos de VSMC incubadas com EtBr (24 h) vs controle. As medidas foram realizadas por análise de HPLC com detecção eletroquímica. Todos os dados representam a média ± DM de 6 experimentos independentes.

Uma possível explicação para a manutenção ou pequena alteração do estado redox celular seria um possível aumento da atividade da enzima superóxido dismutase e da produção de óxido nítrico (detectado por óxidos de nitrogênio estáveis) em VSMC expostas ao EtBr. Entretanto, verificamos que a incubação com EtBr não induziu alteração da atividade superóxido dismutase em homogenatos totais das VSMC (Figura 13).

A quantificação de nitrito e nitrato nos meios de cultura em VSMC na presença e ausência de EtBr, por quimiluminescência, no Analisador de NO Sievers 280, também não mostrou alterações significativas (Tabela 3).

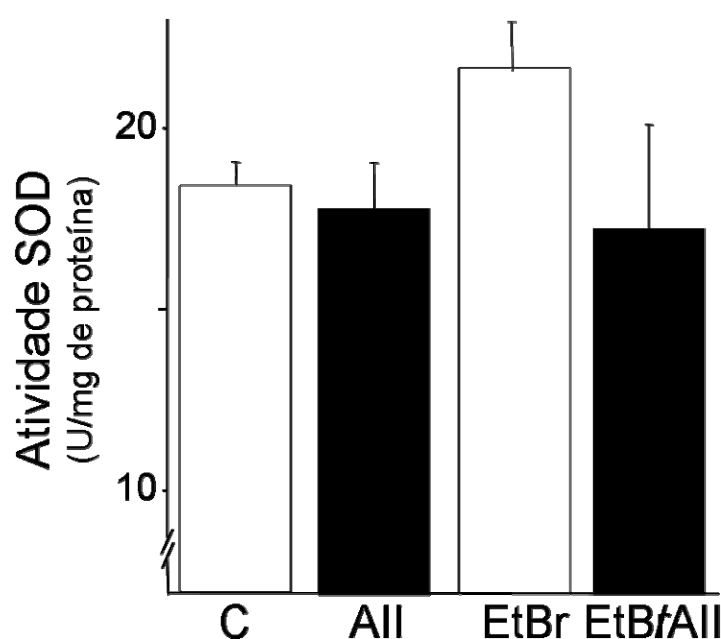


Figura 13. Atividade enzimática da SOD em homogenatos de VSMC após EtBr. VSMC foram incubadas ou não com EtBr (24 h). As medidas foram realizadas por análise da inibição da redução do citocromo $c3^+$ ($\epsilon_{550nm} = 2,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Todos os dados representam a média $\pm$ DM de três experimentos independentes.

Tabela 3. Medida dos níveis de nitrito e nitrato em meio de cultura de VSMC após incubação com EtBr^a

	NO ₂ ⁻ (μM)	NO ₃ ⁻ (μM)
Controle	2,6 ± 0,3	9,3 ± 2,0
All	1,9 ± 0,2	11,0 ± 1,9
EtBr	2,7 ± 0,7	10,5 ± 2,7
EtBr/All	2,3 ± 0,1	10,5 ± 0,8

^a Análise do meio de cultura de VSMC incubadas com EtBr (24h) vs controle. As medidas foram realizadas por análise de quimiluminescência no Sievers NO Analyzer. Todos os dados representam a média ± DM de 6 experimentos independentes.

Um dos principais resultados do nosso estudo (Figura 12) é a importante inibição da ativação do complexo NAD(P)H oxidase em resposta ao conhecido agonista All nas células com disfunção mitocondrial induzido por EtBr. Interessante, foi que este mesmo perfil de inibição a agonistas, se manteve em resposta ao estressor do RE a tunicamicina (que é, de acordo com resultados de nosso laboratório, um indutor de Nox4). Neste caso, o aumento da ativação do complexo NAD(P)H oxidase em fração de membrana induzido pela tunicamicina foi também essencialmente abolido após EtBr (Figura 14). Demonstrando assim, uma importante perda de resposta da ativação da NADPH oxidase a agonistas, neste contexto disfunção mitocondrial causada pelo EtBr.

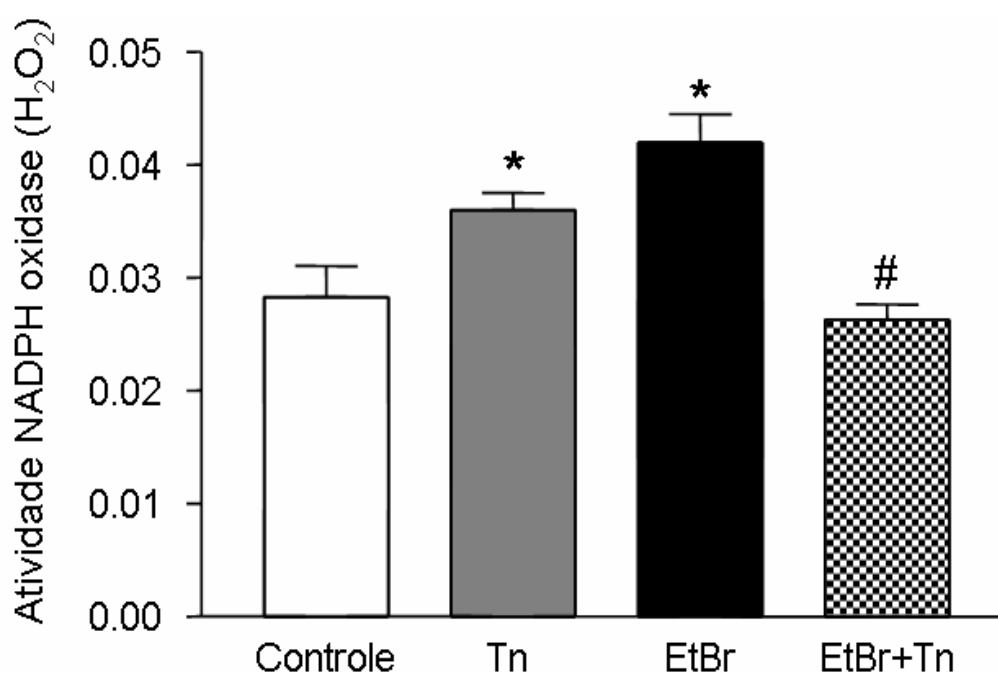


Figura 14. Atividade da NADPH oxidase em fração de membrana de VSMC após EtBr e o estressor do retículo endoplasmático tunicamicina. Medidas da atividade da NAD(P)H oxidase em fração de membrana de VSMC incubadas com ou sem EtBr (24 h), frente a tunicamicina (Tn, 0,5 μ g/mL por 24 h). Método: reagente Amplex Red®. ANOVA, seguido de Newman-Keuls * $p < 0,05$ vs. controle e # $p < 0,05$ vs. EtBr. N = 3.

Para verificar se essa inibição seria uma resposta apenas ao estresse agudo por EtBr, mantivemos as células sob as mesmas condições por um período de 72 horas (Figura 15) e o mesmo perfil de inibição da resposta à All se manteve. Estes resultados sugerem a presença de vias integrativas de sinalização que possibilitariam a ativação da NADPH oxidase em resposta à All dependente da preservação de determinados aspectos da função mitocondrial.

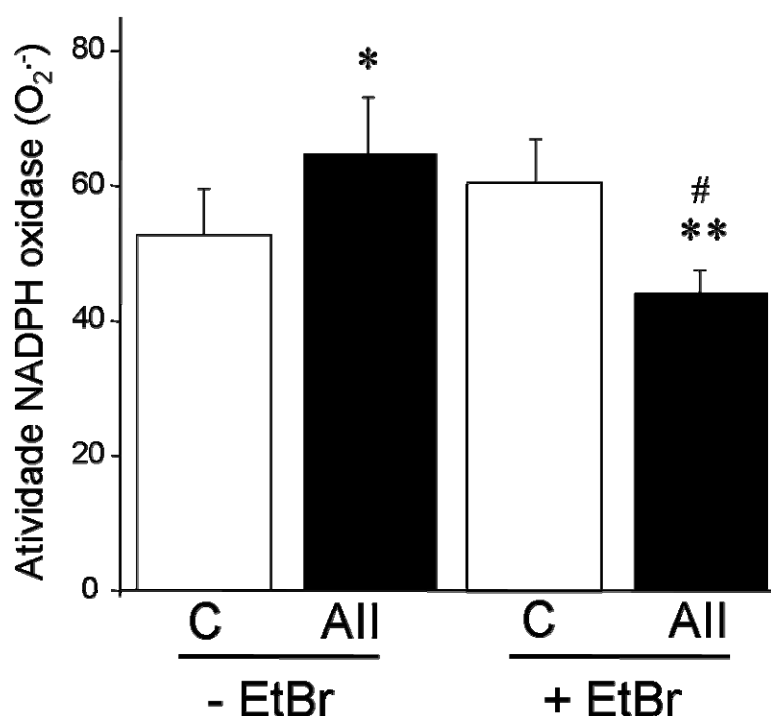


Figura 15. Atividade da NADPH oxidase em fração de membrana de VSMC após 72 horas de incubação com EtBr. Medida da atividade da NAD(P)H oxidase em homogenatos de fração de membrana de VSMC na presença e na ausência de EtBr (72 h), e estimuladas com All (100nM, 4 h). A produção $O_2^{\cdot-}$ foi medida pela fluorescência derivada da oxidação da DHE em microplaca (ex. 490nm, em: 590 nm). ANOVA, seguido de Newman-Keuls * $p < 0,05$ vs controle (-EtBr); ** $p < 0,05$ vs controle (+EtBr) e # $p < 0,05$ vs All (-EtBr). N=3.

Avaliamos também a produção total de ROS em VSMC intactas por meio da análise dos produtos de oxidação da DHE por HPLC. Corroborando outros achados do estado redox celular, não detectamos alteração significativa na produção de radical superóxido, como verificado pela ausência de alteração das taxas de oxidação de DHE para 2-EOH e etídio (Figura 16A). Experimentos para a medida da produção celular total de peróxido de hidrogênio (Figura 16 B) que detecta preferencialmente H_2O_2 extracelular e microscopia de fluorescência por DCF em células intactas (Figura 17) mostraram aumento discreto, porém significantes nas células

expostas ao EtBr, mostrando assim que o protocolo de disfunção mitocondrial do presente estudo não induziu um marcante desequilíbrio redox celular, que poderia levar a várias alterações inespecíficas. Por outro lado, este dado levantou uma possível sugestão de que a disfunção mitocondrial poderia induzir a ação de uma isoforma da NADPH oxidase envolvida em estágios de senescência e diferenciação, cujo principal produto seria preferencialmente peróxido de hidrogênio (MARTYN et al, 2006), características estas sugestivas da isoforma Nox4.

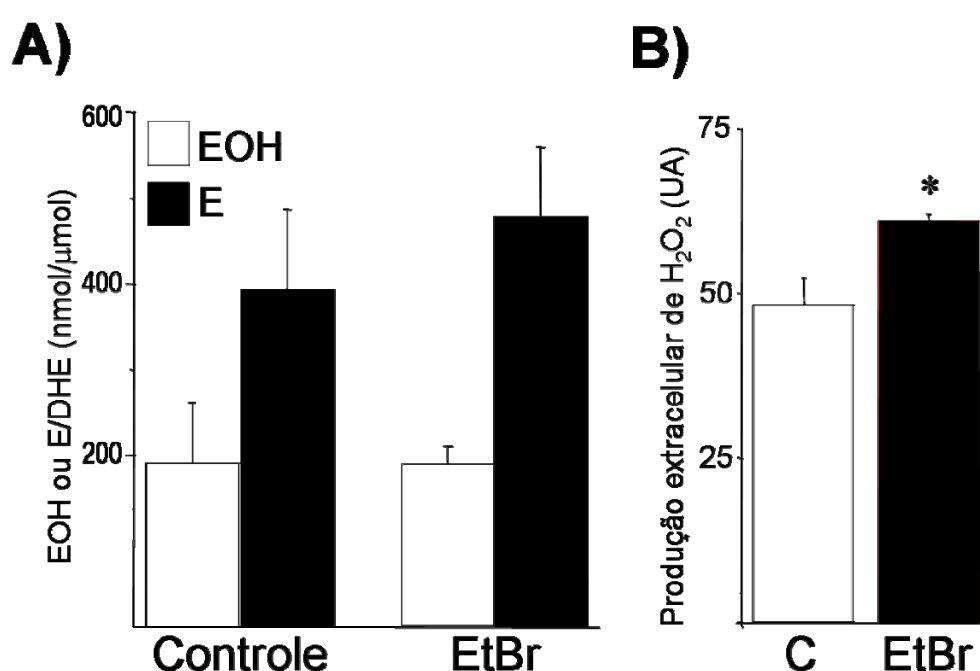


Figura 16. Produção de ROS em VSMC intactas. (A) Medida dos produtos de oxidação da DHE pelo método de HPLC e (B) análise da produção de peróxido de hidrogênio pelo reagente AmplexRed® em VSMC intactas incubadas com ou sem EtBr (24 h). ANOVA, seguido de Newman-Keuls * $p < 0,05$ vs controle (-EtBr). N = 3.

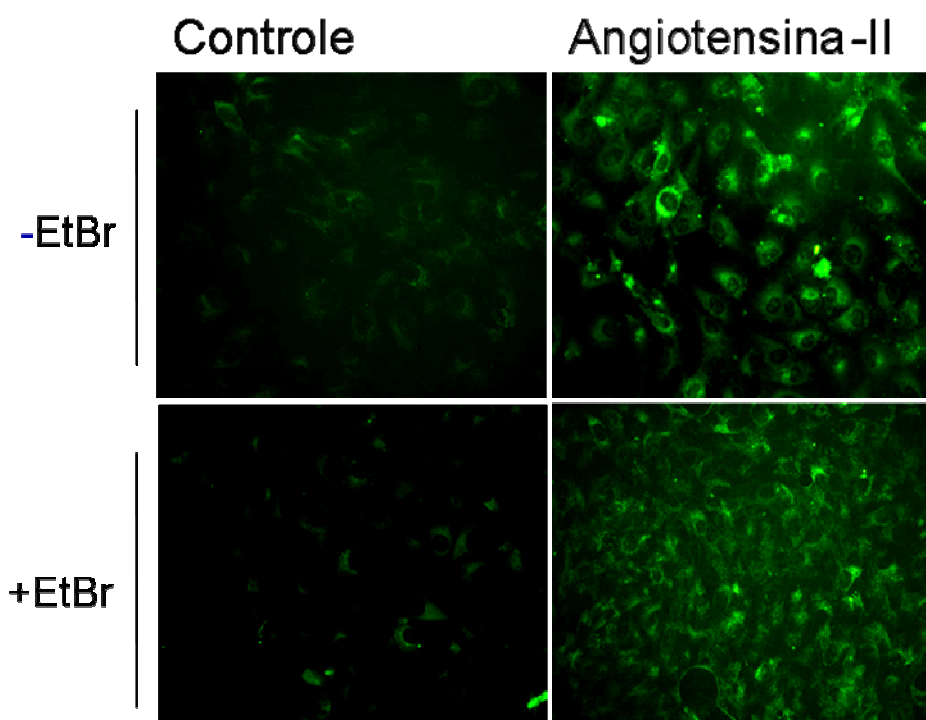


Figura 17. Fluorescência derivada da diclorofluoresceína em VSMC após incubação com EtBr. Produção de H_2O_2 em VSMC na presença e na ausência de EtBr (24 h), e estimuladas pela AII (100 nM, 4 h). Por microscopia de fluorescência, pela intensidade de emissão do fluoróforo (DCF) no filtro FITC (ex. 450 - 490 nm). Figura representativa de dois experimentos independentes.

4.3. Efeitos da disfunção mitocondrial induzida por EtBr na expressão das isoformas NAD(P)H oxidase

Para avaliar a hipótese da ocorrência de uma mudança no padrão de expressão de isoformas da NADPH oxidase, com aumentos relativos da Nox4, medimos de forma semi-quantitativa a expressão do mRNA das Noxes após a indução de disfunção mitocondrial por EtBr de forma aguda (24 h) e sustentada (72 h) (Figura 18). Estes experimentos por RT-PCR convencional sugeriram uma mudança no padrão geral de expressão: nas células intactas, predominou a indução da isoforma Nox1 pela AII, fato já amplamente conhecido (GRIENDLING, 2000), entretanto, já na condição

basal, a indução de disfunção mitocondrial acarretou aumento significativo na expressão da Nox4. Esta expressão não foi aumentada pela exposição à All, condizente com a conhecida falta de resposta da Nox4 a este fator de crescimento/hipertrofia (CLEMPUS & GRIENDLING, 2006).

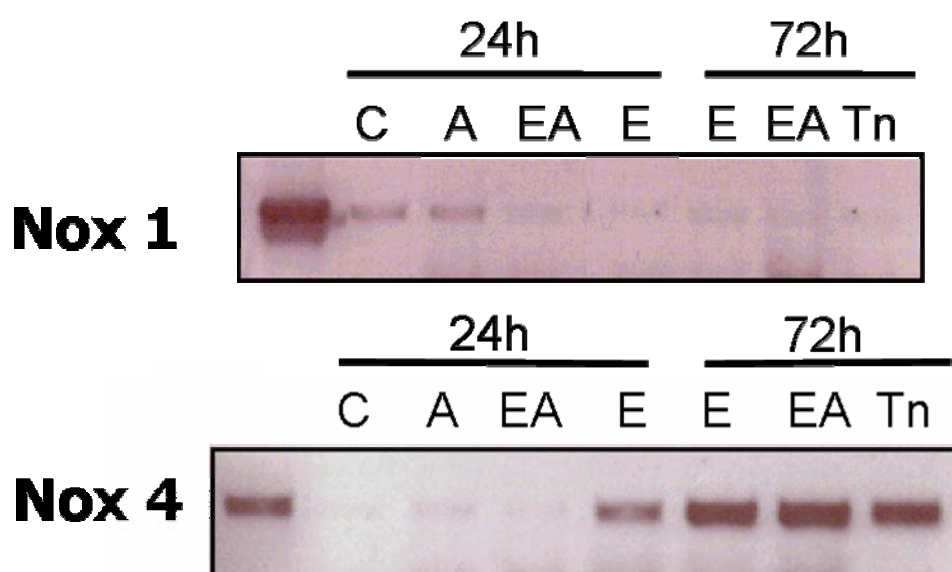


Figura 18. Expressão do mRNA das isoformas Nox1 e Nox4 da NA(P)H oxidase por RT-PCR em VSMC após incubação com EtBr. VSMC foram cultivadas na presença e na ausência de EtBr (24 ou 72h). Abreviaturas: C=controle, A= angiotensina II (100 nM, 4h), E= EtBr, EA= EtBr+All e Tn= tunicamicina; 0,5 µg/mL por 24 h). Figura representativa de dois experimentos independentes.

Em experimentos por PCR quantitativa, confirmamos um significativo aumento na expressão do mRNA da isoforma Nox1 em resposta ao estímulo com All vs. condição basal (Figura 19 A). Nas VSMC expostas ao EtBr (24 h), apesar do pequeno (não-significativo) aumento na expressão do mRNA de Nox1 vs. basal, houve uma importante redução do aumento desta isoforma após estímulo com All. Este resultado indica que a ativação da

NADPH oxidase em resposta à AII requer integridade da função mitocondrial e que a disfunção mitocondrial pode alterar o perfil de resposta da NAD(P)H oxidase por interferência com mudanças da expressão. Confirmando os dados obtidos PCR comum, na análise quantitativa houve um significativo aumento na expressão da isoforma Nox4, induzido pela incubação com EtBr (24 h). Corroborando aos dados da literatura, não houve aumento na expressão de mRNA de Nox4 com o estímulo com AII (CLEMPUS & GRIENDILING, 2006)(Figura 19 B). O aumento da ativação do complexo NAD(P)H oxidase em fração de membrana em resposta ao estressor do RE tunicamicina (que é, de acordo com resultados de nosso laboratório, um indutor de Nox4), Figura 14, foi também essencialmente abolido no contexto da disfunção mitocondrial (EtBr, 24 h). Entretanto, neste caso, a expressão do mRNA após tunicamicina mostrou aumento (Figura 19), indicando que a disfunção mitocondrial implica em alterações do complexo NAD(P)H oxidase independentes apenas da expressão.

No modelo sustentado de exposição ao EtBr (72 h), o mesmo perfil de redução ao estímulo com AII permaneceu. Houve, também, semelhante aumento na atividade da NAD(P)H oxidase (Figura 16 B) e na expressão basal de Nox4 (Figura 19 B). Entretanto, o perfil de resposta do mRNA das isoformas Nox1 e Nox4 após 72 horas foi distinto, com aumento de ambas após AII (Figura 19 A e 19 B), novamente indicando uma dissociação entre atividade da oxidase e expressão do mRNA de suas subunidades catalíticas induzido possivelmente no contexto de uma adaptação ao estado de estresse celular sustentado.

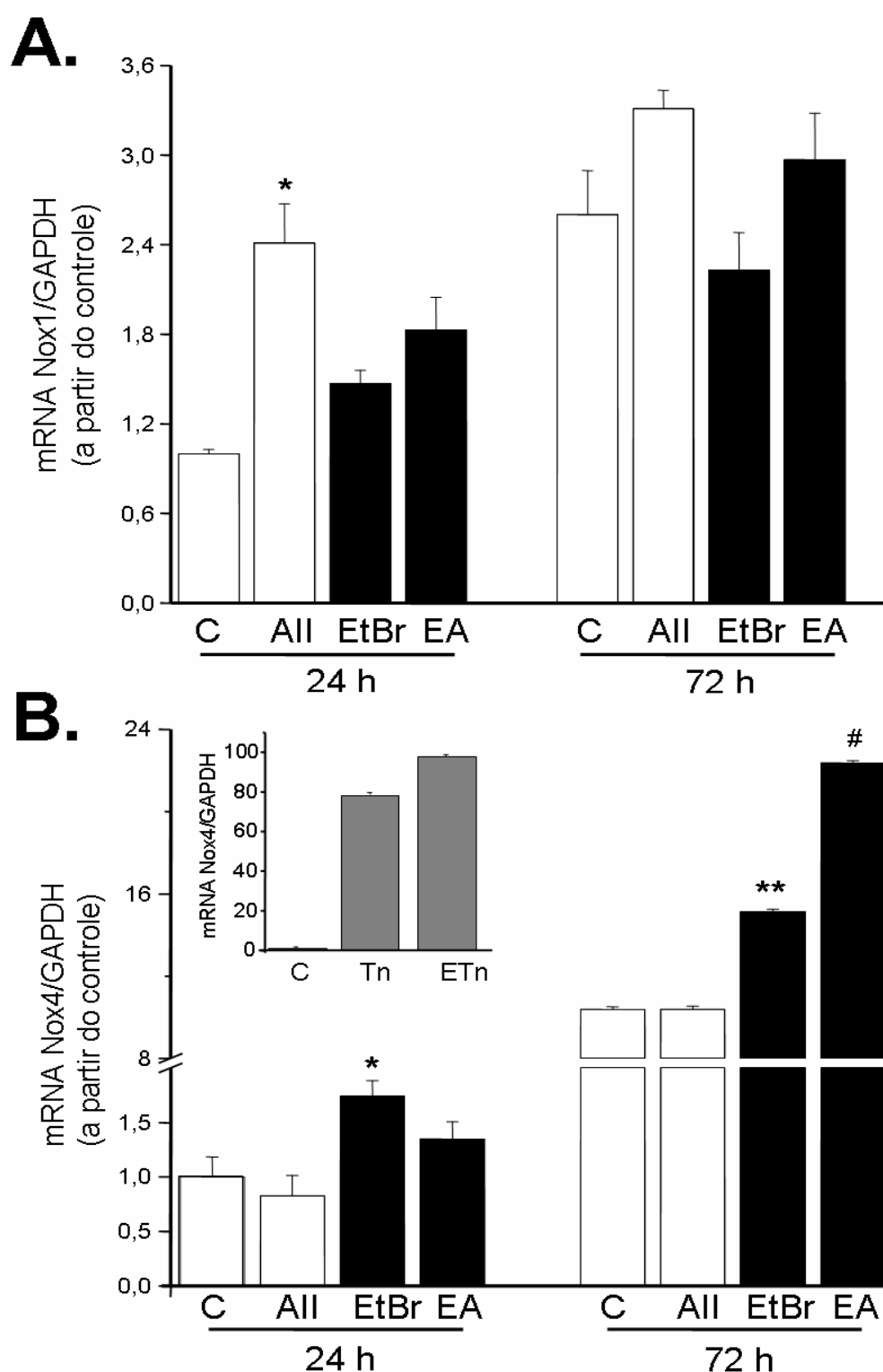


Figura 19. Quantificação do mRNA das isoformas Nox1 e Nox 4 por PCR em tempo real. As medidas foram realizadas em cDNA de VSMC incubadas ou não com EtBr (24h e 72 h), All (100 nM, 4 h) e Tn (0,5 µg/mL, 24 h). C=controle, EA= EtBr + All e ETn = EtBr + Tn). ANOVA, seguido de Newman-Keuls * $p < 0,05$ vs controle (24 h), ** $p < 0,05$ vs controle (72 h) e # $p < 0,05$ vs EtBr (72 h). N = 3.

4.4. Co-localização da mitocôndria com a Nox1

A localização subcelular das diferentes isoformas da NAD(P)H oxidase é motivo de várias investigações, embora permaneça em aberto (HILENSKI et al, 2004). Em trabalho recente foi demonstrado por Desouki e colaboradores (2005), a possível interação da isoforma Nox1 com a mitocôndria. Através de microscopia confocal, obtivemos resultados que sugerem (pela primeira vez em células vasculares) essa co-localização (Figura 20). Cabe mencionar, entretanto, que a co-localização entre um anticorpo (para a Nox1) e um marcador fluorescente não imunológico (MitoTracker Green®) é um experimento tecnicamente desafiador e os resultados não podem ser admitidos como definitivos. A Figura 20 mostra a marcação do núcleo com DAPI, a marcação da mitocôndria com Mitotracker Green®, anti-Nox1 e a sobreposição de imagens.

Nos mesmos moldes, verificamos a possível co-localização da mitocôndria com a PDI, uma importante chaperona que está relacionada à modulação da atividade da NAD(P)H oxidase e que pode contribuir para a organização funcional da mesma (JANISZEWSKI et al, 2005) (Figura 21). Os experimentos sugerem, embora não de forma tão marcante como a Nox1, algum grau de co-localização da PDI com a mitocôndria.

Um fato intrigante que observamos nestes experimentos foi a marcação para o Mitotracker Green® demonstrada em pontos específicos distribuídos pelo núcleo (Figura 20 e 21). Embora não possamos descartar uma marcação inespecífica para nucléolos, notamos um aumento expressivo

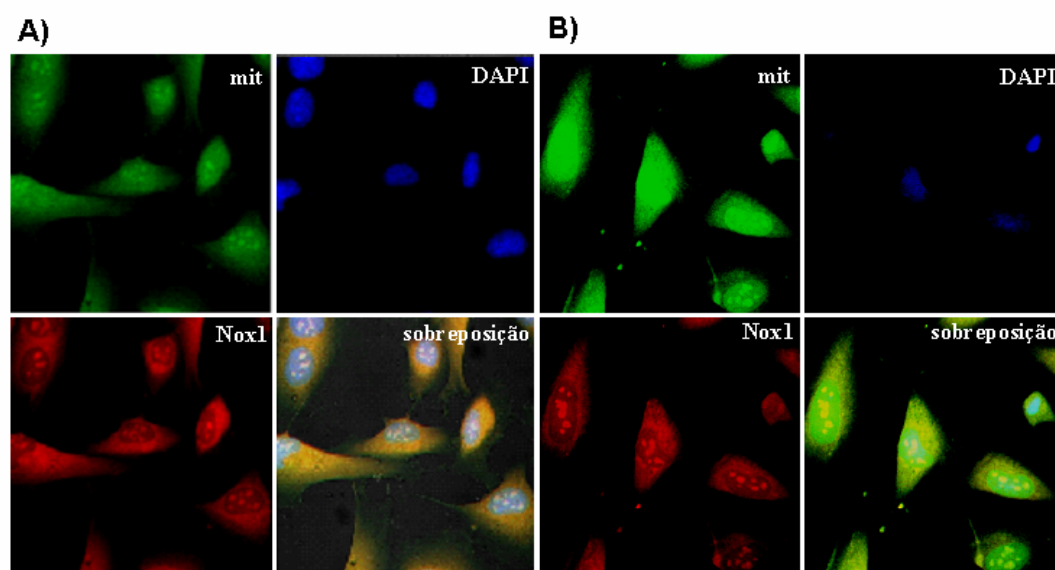


Figura 20. Microscopia confocal da marcação da mitocôndria e da NAD(P)H oxidase em VSMC. Figura (A) localização por microscopia confocal Mitocôndria (mit) (Mitotracker Green®), da isoforma Nox1 (anti-Nox1), do núcleo (DAPI) e a co-localização dos três marcadores está em amarelo (sobreposição). Na figura (B) os mesmos marcadores em VSMC incubadas com o agonista da oxidase AII (100 mM, 4 h). Figura representativa de dois experimentos independentes.

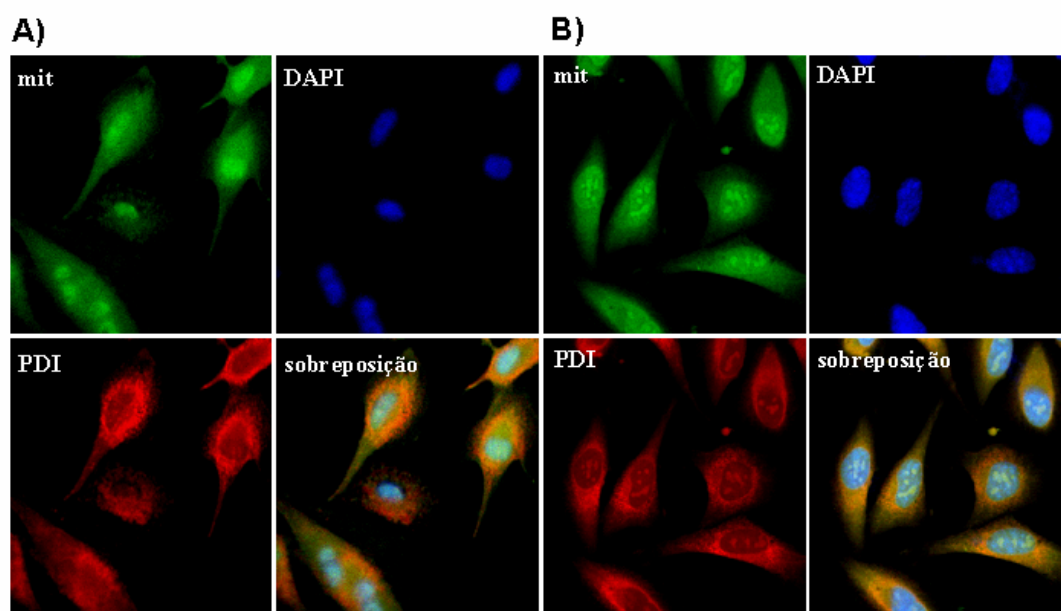


Figura 21. Microscopia confocal da marcação da mitocôndria e da PDI em VSMC. Figura (A) localização por microscopia confocal da Mitocôndria (mit) (Mitotracker Green®), da PDI (anti-PDI), do núcleo (DAPI) e co-localização dos três marcadores (sobreposição). Na figura (B) os mesmos marcadores em VSMC incubadas com o agonista da oxidase AII (100 mM, 4 h). Figura representativa de dois experimentos independentes.

desta marcação nas células nas quais a disfunção mitocondrial foi provocada. Levantamos a hipótese de que tal marcação poderia corresponder a invaginações da membrana nuclear presentes nas células musculares lisas. Uma revisão da literatura indicou que tais invaginações de fato estão presentes em cardiomiócitos (TOMOYUKI et al, 2004) e células musculares lisas, além de certas células tumorais. Assim, avaliamos essa possibilidade por análise morfológica em microscopia eletrônica de transmissão. Os resultados indicaram a presença de invaginações da membrana nuclear, o que pode justificar talvez a presença de mitocôndria dentro dessas invaginações (Figura 22), embora a observação desta ocorrência tenha sido rara. Interessante, a exposição ao EtBr aumentou significativamente o número destas invaginações. O significado funcional das invaginações permanece obscuro no momento, embora, em cardiomiócitos, elas tendam a aumentar conforme o grau de diferenciação da célula (TOMOYUKI et al, 2004).

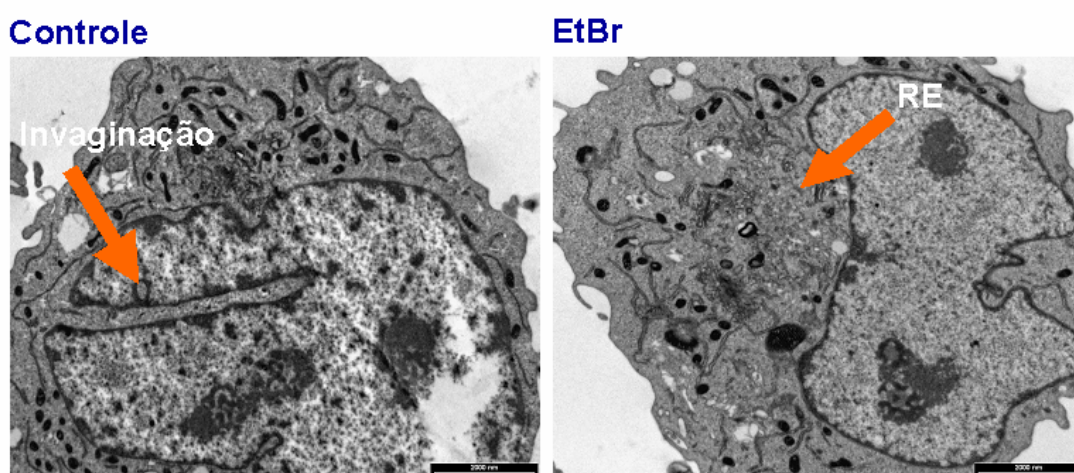


Figura 22. Análise estrutural por microscopia eletrônica de VSMC. Figura representativa da possibilidade de mitocôndrias no núcleo, mostrando as invaginações da membrana nuclear em VSMC em condições basais. Em VSMC com EtBr (24h), há indícios de aumento de reticulo endoplasmático. Figura representativa de três experimentos independentes.

4.5. Efeitos da disfunção mitocondrial induzida por EtBr na expressão/tráfego da PDI

Recentemente, foi demonstrado que a disfunção mitocondrial pode estar conectada a um concomitante estresse do RE (RON & WALTER, 2007). Considerando que o estresse do RE gera significantes alterações da atividade da NADPH oxidase (estudos em andamento do nosso laboratório), realizamos ensaios para investigar a ocorrência de estresse do retículo endoplasmático.

A análise de marcadores de estresse do RE (chaperonas com a sequência KDEL, como GRP78/94 e calreticulina) por western blotting mostrou que a disfunção mitocondrial não induziu aparente estresse do retículo endoplasmático após 24 horas (Figura 23). Interessante, contudo,

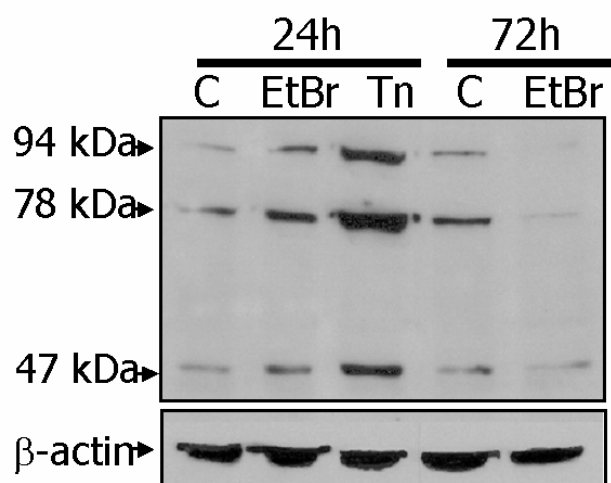


Figura 23. A disfunção mitocondrial não induziu estresse do retículo endoplasmático em VSMC. Western-blotting representativo de extratos totais de VSMC na presença e na ausência de EtBr (24 e 72 h). Marcadores de estresse do RE com anticorpo anti-KDEL. Tunicamicina (Tn 5 μ g/mL por 4 h) controle positivo indução do estresse do retículo endoplasmático. Figura representativa de dois experimentos independentes.

após 72 horas de tratamento com EtBr, ocorreu uma marcante redução da expressão destas chaperonas, indicando uma possível adaptação celular a esse tipo de estresse.

Recentemente descrevemos que a PDI pode estar relacionada com a atividade da oxidase vascular (JANISZEWSKI et al, 2005). A análise por western blotting mostrou aumento da expressão da PDI após indução da disfunção mitocondrial (Figura 24 A). Por outro lado, a translocação da PDI para outros compartimentos celulares foi evidente após 24 horas de tratamento (Figura 24 B). Particularmente, ocorre migração importante da PDI para fração de membrana na condição basal e a AII induz, contrariamente à célula normal, uma redução da PDI ligada a membranas. Estas alterações são significativamente revertidas após 72 horas de EtBr.

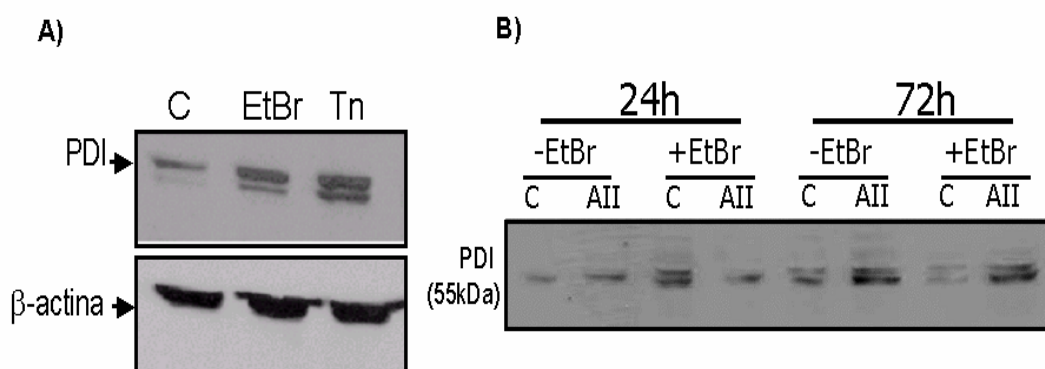


Figura 24. Expressão de PDI total (A) e em fração de membrana (B) em VSMC após EtBr. Western-blotting representativo do efeito da disfunção mitocondrial. (A) expressão de PDI em extrato total de VSMC e (B) migração PDI para fração de membrana de VSMC na presença e na ausência de EtBr (24 e 72 h) e incubadas com AII (100 nm, 4 h). Figura representativa de três experimentos independentes

A disfunção mitocondrial induz uma marcante diminuição da PDI nos compartimentos nucleares e mitocondrial (Figura 25). A importância deste dado ainda não está clara.

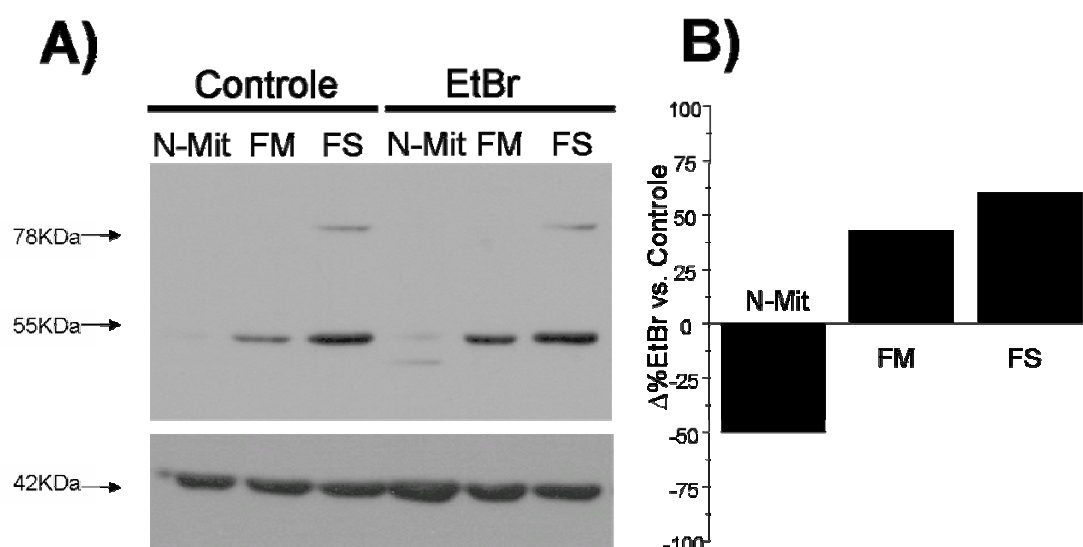


Figura 25. Migração de PDI em diferentes compartimentos celulares em VSMC após EtBr. (A) Western-blotting representativo da expressão e localização da PDI em homogenatos obtidos por centrifugação fracionada de VSMC na presença e na ausência EtBr (24h). Abreviaturas: (N-Mit) fração de núcleo e mitocôndria, (FM) fração de membrana e (FS) fração solúvel. **(B)** Figura representativa da quantificação da expressão da PDI nas diferentes frações entre as VSMC em presença de EtBr e as VSCM em condições basais. Figura representativa de dois experimentos independentes.

Em suma, a disfunção mitocondrial parece promover uma redistribuição da PDI do retículo endoplasmático para outros compartimentos celulares, particularmente para a fração de membranas (incluindo as endomembranas e membrana plasmática) onde cooperaria na modulação da atividade NAD(P)H oxidase vascular e mesmo na modulação redox de possíveis efeitos da PDI (JANISZEWSKI et al, 2005).

5. DISCUSSÃO

Recentemente, ocorreu importante ressurgimento da pesquisa sobre a mitocôndria, acompanhando em parte a constatação de que disfunção mitocondrial está envolvida em inúmeros distúrbios metabólicos e particularmente no envelhecimento celular e orgânico. Parte destes efeitos são classicamente atribuídos ao aumento da produção de *ROS* mitocondrial bem como àqueles reportados em modelos de disfunção desta organela na presença de inibidores da cadeia respiratória (LENAZ et al, 2002). Contudo, estudos da produção de *ROS* por outras fontes que não a mitocôndria durante a condição de estresse mitocondrial foram ainda pouco explorados. Particularmente, nosso trabalho de lesão do DNA mitocondrial por EtBr fornece um modelo adequado para a investigação destas possíveis vias em condições de lesão de mtDNA análogas às que provavelmente ocorrem em doenças crônico-degenerativas vasculares, i.e., lesões relativamente discretas, não imediatamente letais ou proapoptóticas e não indutoras de um profundo estresse oxidativo generalizado. Ao contrário, este modelo compreende alterações mínimas da morfologia celular e do próprio equilíbrio redox. Em paralelo, com a disfunção mais sustentada, ocorre uma resposta de VSMC possivelmente adaptativa, caracterizada basicamente por diminuição da proliferação celular.

A produção de *ROS* pela NAD(P)H oxidase regula inúmeros processos celulares como sobrevivência, proliferação, diferenciação,

senescência e apoptose (JONES, 2006). Particularmente, é bem conhecido que o aumento da expressão da isoforma Nox1 do complexo da NADPH oxidase de células musculares lisas é regulado por AII e que resulta em hipertrofia (aumento de síntese de proteínas) destas células. Nas células pseudo ρ^0 em nosso estudo, ocorreram importantes mudanças desta regulação, com aumento da atividade da NADPH oxidase em fração de membrana essencialmente abolido após AII. Dados recentes de nosso laboratório mostram que a indução de estresse do RE por tunicamicina está associada a importante aumento de expressão do mRNA da isoforma Nox4, que apresenta várias diferenças funcionais com a Nox1, especialmente o fato de a Nox4 estar envolvida em processos de diferenciação e apoptose das células vasculares e não de proliferação (CLEMPUS & GRIENDLING, 2006; KNAUS et al, 2006). O aumento da atividade da NADPH oxidase na fração de membrana após estresse do RE foi também essencialmente abolido pela indução de disfunção mitocondrial em nosso estudo. Em paralelo, a disfunção mitocondrial provocou alterações importantes na expressão do mRNA das isoformas Nox1 e Nox4. Após 24 horas de incubação com EtBr, a principal alteração foi o aumento da expressão basal de Nox4 e a redução significativa da resposta da Nox1 à AII. Estes dados indicam, desta forma, uma inter-relação funcional importante entre a mitocôndria e o complexo NADPH oxidase, envolvendo pelo menos em parte alterações de expressão. Com relação à Nox4, o aumento basal da expressão do mRNA foi também acompanhado de aumento da atividade da NADPH oxidase na fração de membrana. De fato,

dados prévios do laboratório indicam que a indução de estresse do RE por tunicamicina é acompanhada simultaneamente por aumento da atividade da NADPH oxidase em fração de membrana e da expressão do mRNA da Nox4. Por outro lado, no caso da tunicamicina ocorreu uma dissociação entre a atividade da NADPH oxidase na fração de membrana (redução) e expressão do mRNA da Nox4 (aumento). Embora a explicação deste fato não esteja clara, é provável que esta dissociação envolva uma inibição ou bloqueio do tráfego da Nox4 para a fração de membrana, ou mesmo uma degradação da proteína. Tal degradação está em sintonia com estudos mostrando associação entre disfunção mitocondrial e ativação do proteasoma (TORRES & PEREZ, 2007) ou autofagia (CHEN, 2007). Além disso, é bem conhecido que o tráfego das subunidades da oxidase para membrana é um evento importante durante a ativação do complexo (CLEMPUS & GRIENDILING, 2006). Uma dissociação semelhante ocorreu com a AII após 72 horas de incubação do EtBr. Neste caso, ocorreram aumentos da expressão do mRNA de Nox1 e Nox4 em resposta a este agente, sem aumentos paralelos na atividade da NADPH oxidase em fração de membrana. Deve-se considerar ainda que a confluência celular, que tende aumentar durante o período de 72 horas de observação, é um fator que pode influenciar na expressão de isoformas da oxidase. Em conjunto, estes resultados indicam que a inter-relação entre a função mitocondrial e o complexo NADPH oxidase, tanto na fase imediata como durante a adaptação à disfunção mitocondrial, não envolve apenas alterações da expressão do mRNA de subunidades do complexo da oxidase.

Na indução aguda de disfunção mitocondrial (EtBr por 24h), não detectamos no estado basal maior produção de superóxido intracelular quando utilizamos o ensaio da oxidação da DHE, um marcador mais específico para detecção deste radical em células intactas (FERNANDES et al, 2007). Entretanto, houve um discreto, mas significativo acúmulo de H_2O_2 intracelular. A origem desta produção pode ser múltipla, mas com maior probabilidade se resume a duas fontes, especificamente a própria produção mitocondrial de *ROS* decorrente da disfunção desta organela, assim como maior expressão/atividade de Nox4. É conhecido que a atividade de Nox4 produz preferencialmente peróxido de hidrogênio e não superóxido (MARTYN et al, 2006). A produção do peróxido de hidrogênio pela Nox4 deve representar não catálise direta e sim associação da Nox4 com condições ou componentes (p.ex., pH, associação com SOD) que possam catalisar a dismutação do superóxido e formação de peróxido de hidrogênio. Apesar de a disfunção mitocondrial ter induzido mínimo aumento (não estatisticamente significativo) da atividade da SOD, a possibilidade de aumento das concentrações em estado estacionário de peróxido de hidrogênio devido à SOD tem argumentação duvidosa sob o ponto de vista cinético e é pouco sustentável por dados experimentais (LIOCHEV, 2007). É importante notar que o acúmulo de H_2O_2 não foi suficiente para alterar o estado redox total celular, conforme indicado pela manutenção da razão GSH/GSSG. Este dado é interessante no sentido de indicar que distúrbios mínimos da mitocôndria levam, direta ou indiretamente, a alterações redox

celulares sem mudanças substanciais do estado redox celular total, quadro este consistente com o conceito de sinalização redox (GO et al, 2004).

A inter-relação entre a função mitocondrial e o sistema NAD(P)H oxidase descrita em nosso estudo está em sintonia com outros relatos da literatura. Após indução de privação de soro, há evidência de que o estímulo da ativação de Nox1 por ROS originadas da mitocôndria leva a uma produção sinérgica sustentada de ROS e morte celular envolvendo ambos os sistemas enzimáticos. Tal ativação da Nox1 pela mitocôndria parece envolver a via da PI3K e a subunidade Rac1 (LEE et al, 2006). Em outro estudo, a indução de disfunção mitocondrial por agentes farmacológicos ou depleção do mtDNA levou a redução da transativação do receptor de EGF mediada por administração exógena de peróxido de hidrogênio (CHEN et al, 2004). Este fato é análogo à observação do presente estudo de que a resposta da NADPH oxidase à AII requer integridade mitocondrial. Portanto, nossos resultados estão em concordância e ampliam tais observações da literatura.

Um fato intrigante -e ainda sob investigação- é que nesta condição mínima de lesão, alterações nas regiões repetitivas da D-loop foram acentuadas na presença de AII. Considerando que em células não expostas ao EtBr não houve alterações detectáveis do padrão de migração das bandas da D-loop pela AII, este dado indica que a AII pode provavelmente acentuar uma disfunção mitocondrial pré-existente, embora não se possa

excluir a influência de uma baixa sensibilidade do método como explicação para não detecção em células controle. De fato, recentemente foram relatadas evidências de que a All induz disfunção mitocondrial em células endoteliais (DOUGHAN AK, et al, 2007).

Os mecanismos pelos quais a perturbação da mitocôndria induz as alterações observadas no complexo da NAD(P)H oxidase permanecem em aberto e podem ser múltiplas. Uma questão básica neste sentido é se tal comunicação envolve ou não processos redox dependentes da própria mitocôndria. De fato, ocorreu aumento pequeno, porém significativo da produção basal de peróxido de hidrogênio após incubação EtBr. É conhecido que a exposição celular ao peróxido de hidrogênio é capaz de induzir ativação de NADPH oxidase (LI et al, 2001), particularmente da Nox4 (MARTYN et al, 2006). Esta ativação é acompanhada de aumentos da expressão. Mesmo a exposição crônica (7 a 14 dias) ao peróxido de hidrogênio induz aumentos de 1,5-2 vezes da relação Nox4/Nox1 do mRNA em células musculares lisas (LIBERMAN et al, 2008). Assim, é possível que a disfunção mitocondrial tenha gerado suficiente quantidade de ROS para induzir aumentos extra-mitocondriais destas espécies, gerando eventos de sinalização que incluem mudanças de expressão de Nox.

Dentre os eventos não primariamente redox que poderiam estar também envolvidos na comunicação entre mitocôndria e NADPH oxidase, pode-se postular um papel de níveis de ATP, metabolismo e produção de energia e cálcio intracelular. A produção de ATP pode ser importante não

apenas pelo controle do transporte de elétrons e enzimas acopladoras intramitocondriais (que se refletiriam nos níveis de *ROS*), mas potencialmente por afetar a atividade de ATPases controladoras do tráfego vesicular (TERADA, 2006) ou mesmo a atividade do proteasoma, que é dependente de ATP (TORRES & PEREZ, 2007). Estes dois últimos fatores poderiam induzir efeitos indiretos no complexo NAD(P)H oxidase. Embora os efeitos da disfunção mitocondrial no metabolismo sejam conhecidos, o efeito de alterações metabólicas no complexo NAD(P)H oxidase foi muito pouco estudado. É, porém, razoável supor que a supressão da síntese de ácidos graxos e aumento da glicólise, eventos típicos de disfunção mitocondrial (KING & ATTARDI, 1989) possam governar a disponibilidade de equivalentes redutores (LEOPOLD & LOSCALZO, 2005) ou, por meio da ativação da AMP quinase (NAGATA et al, 2004), eventos de sinalização que afetem o tráfego subcelular da NAD(P)H oxidase. Quanto aos níveis de cálcio, é sabido que a oxidase é em termos gerais independente das concentrações intracelulares desse íon (TERADA, 2006). Entretanto, várias proteases e/ou processos que governam tráfego de proteínas são fortemente dependentes de cálcio e, em situações específicas, poderiam afetar a atividade do complexo da oxidase.

Finalmente, a disfunção mitocondrial poderia afetar a NAD(P)H oxidase por desencadear respostas celulares mais gerais, por exemplo, ativação de vias proteolíticas, como proteasoma (TORRES & PEREZ, 2007) ou autofagia (CHEN, 2007). Além disso, foi descrita recentemente uma reação de estresse mitocondrial que promove adaptação celular sob

condições em que o enovelamento correto de proteínas mitocondriais está deficiente (YONEDA, 2004). A correlação entre esta via de sinalização e as respostas celulares verificadas em nosso estudo não está clara.

Durante a disfunção mitocondrial, há aumento da expressão de fatores de transcrição como NFkB e CREB e CHOP (VANKONINGSLOO, 2005; CARRIÈRE, 2004). Em particular, a ativação destes dois últimos fatores está também relacionada com disfunção de retículo endoplasmático (ou estresse de ER) (RON & WATER, 2007). Assim, para investigar associação entre a disfunção mitocondrial e UPR, estudamos a expressão das chaperonas GRP 78 e 94, marcadores de estresse de RE. A disfunção mitocondrial não alterou de forma consistente a expressão destes marcadores após 24 horas, indicando que o estresse do RE não tem papel na comunicação primária entre a mitocôndria e o complexo NAD(P)H oxidase. Por outro lado, a exposição prolongada ao EtBr resultou em importante diminuição da expressão destas chaperonas, indicando que a supressão de pelo menos parte da UPR está envolvida na adaptação de células a estresse. Apesar de o estresse do RE não ter sido ativado nas primeiras 24 horas após EtBr, a comunicação entre mitocôndria e função do RE é sugerida pela maior migração da PDI para fração de membrana induzida na condição de disfunção mitocondrial. Além disso, dados de microscopia confocal sugeriram redistribuição da PDI do retículo para outros compartimentos celulares como mitocôndria e membrana plasmática. Dados prévios de nosso laboratório mostram que a PDI se co-localiza com a Nox1

nas membranas celulares (JANISZEWSKI et al, 2005) e, no presente estudo, em mitocôndrias (possivelmente na membrana externa). A provável presença da proteína da Nox4 nestes estudos permanece em aberto, pois não há até o momento anticorpos específicos anti-Nox4. Entretanto, estudos de outro laboratório (BLOCK, comunicação pessoal) mostraram resultados preliminares sugestivos de que a Nox4 tem importante localização na membrana mitocondrial e pode modular a função desta organela. Certamente, é relevante a realização de mais estudos para identificação dos mecanismos e consequências das possíveis alterações do tráfego subcelular das Nox após disfunção mitocondrial.

O papel da PDI no controle da atividade e expressão da NAD(P)H oxidase durante disfunção mitocondrial pode ser complexo, uma vez que estudos recentes de nosso laboratório indicam que tais efeitos possam resultar não apenas da simples expressão da PDI, mas do seu tráfego subcelular, assim como de eventos pós-traducionais de fosforilação e interação com vias de degradação pelo proteasoma. De fato, verificamos que células vasculares com disfunção mitocondrial são muito mais sensíveis ao estresse de RE quando o proteasoma foi inibido por MG132 (resultados preliminares e dados não mostrados).

Nossos resultados sugeriram alterações peculiares do complexo NAD(P)H oxidase mediante exposição sustentada ao EtBr. Nestas condições, é provável que as alterações observadas reflitam não apenas a

comunicação entre mitocôndria e NAD(P)H oxidase, mas também a adaptação celular a uma condição de estresse sustentado. Ocorreu aumento dos níveis de mRNA da Nox1 ou Nox4 em resposta aos agonistas específicos, sem que a atividade da NAPH oxidase em fração de membrana estivesse paralelamente aumentada após AII. Estas alterações sugerem um mecanismo adaptativo de sub-regulação de proteínas do complexo, envolvendo suspensão no tráfego para membranas, degradação por proteólise, ou ainda redução da estabilidade do mRNA durante a tradução. Especulamos que tais alterações tenham a função de blindar as células contra mudanças extremas no estado redox celular em situação de especial vulnerabilidade. É possível que este processo seja parte de um conjunto de vias que caminham para senescência celular. Entretanto, dados preliminares indicam ausência de aumento de expressão de p21 após disfunção mitocondrial em nosso modelo (dados não mostrados). É interessante notar que nas fases adiantadas da reparação vascular após lesão, verificamos um perfil redox bastante semelhante (i.e., indução simultânea de Nox1 e Nox4 e aumento basal de ROS), tanto em vasos intactos (dados de nosso laboratório e SZOCS et al, 2002), como em células neointimais cultivadas (THIESEN et al, dados não publicados).

Nossos resultados têm implicações potenciais quanto ao entendimento de aspectos redox relacionados ao envelhecimento celular. De fato, é bem conhecido que a própria função mitocondrial possa talvez contribuir para a senescência celular e que a disfunção mitocondrial acelera

este processo (PASSOS et al 2007). Os principais modelos de envelhecimento prematuro em roedores são aqueles envolvendo mutações de proteínas ligadas à mitocôndria, p.ex., p66shc (NEMOTO et al, 2006). Eventualmente, em uma escala menor, é possível que pequenas alterações da função mitocondrial possam estar envolvidas em processos de diferenciação celular por meio de alterações de expressão da Nox4, que é reconhecidamente um indutor de tal diferenciação (CLEMPUS et al, 2007). O presente estudo sugere que alterações do complexo NAD(P)H oxidase possam contribuir de forma sinérgica ou como mecanismo adaptativo de tais processos.

6. CONCLUSÃO

Em suma, nossos resultados indicam a importante inter-relação entre a função mitocondrial e a atividade e perfil de expressão do complexo NAD(P)H oxidase. A produção de *ROS* dependente de NADPH oxidase desencadeada pela AI requer a integridade de vários aspectos da função mitocondrial, que podem incluir, porém não necessariamente se limitar, à função redox. A disfunção mitocondrial gera tendência de maior expressão da isoforma Nox4 da NADPH oxidase, um processo que pode corroborar e ampliar o papel da mitocôndria no envelhecimento celular. A ativação do complexo NAD(P)H oxidase no contexto do estresse do retículo endoplasmático é também dependente da integridade de função mitocondrial. Nessas situações, a comunicação entre a mitocôndria e o complexo NAD(P)H oxidase envolve alterações correlatas da expressão das subunidades catalíticas, mas claramente envolve outros mecanismos adicionais relacionados possivelmente ao tráfego, processamento ou degradação dessas proteínas. Em conjunto, estes resultados abrem importantes perspectivas para o entendimento da integração de processos redox celulares envolvendo sinalização fina de mudanças de programas fisiológicos e indicam novas vias para o entendimento da fisiopatologia redox de doenças vasculares e envelhecimento.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, J.I.; BERK, B.C. Reactive oxygen species as mediators of signal transduction in cardiovascular disease. **Trends Cardiovasc Med.** 8:59-63,1998.
- AMBASTA, R.K.; KUMAR, P.; GRIENDLING, K.K.; SCHMIDT, H.H.; BUSSE, R.; BRANDES, R.P. Direct interaction of the novel Nox proteins with p22phox is required for the formation of a functionally active NADPH oxidase. **J Biol Chem.** 279:45935-41, 2004.
- ANDERSON, S.; BANKIER, A.T.; BARRELL, B.G.; DE BRUIJN, M.H.; COULSON, A.R.; DROUIN, J.; EPERON, I.C.; NIERLICH, D.P.; ROE, B.A.; SANGER, F.; SCHREIER, P.H.; SMITH, A.J.; STADEN, R.; YOUNG, I.G. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. **Nature.** 290:457-65, 1981.
- ARMAND, R.; CHANNON, J.Y.; KINTNER, J. The effects of ethidium bromide induced loss of mitochondrial DNA on mitochondrial phenotype and cultrastructure in a human leukemia T-cell line (MOLT-4 cells). **Toxicol Appl Pharmacol.** 196:68–79, 2004.
- ATTARDI, G.; SCHATZ, G. Biogenesis of mitochondria. **Annu Rev Cell Biol.** 4:289-333, 1988.
- BALLINGER, S.W.; PATTERSON, C.; YAN, C.N.; DOAN, R.; BUROW, D.L.; YOUNG, C.G.; YAKES, F.M.; VAN HOUTEN, B.; BALLINGER, C.A.; FREEMAN, B.A.; RUNGE, M.S. Nydrogen peroxide- and peroxynitrite- induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in vascular endothelial and smooth muscle cells. **Circ Res.** 12: 86:960-966, 2000.
- BARTHELEMY, C.; DE BAULNY, H.O.; LOMBES, A. D-loop mutations in mitochondrial DNA: link with mitochondrial DNA depletion? **Hum Genet.** 110:479-87, 2002.
- BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochem J.** 134:707-716, 1973.
- BROOKES, P.; DARLEY-USMAR, V.M. Hypothesis: the mitochondrial NO signaling pathway, and the transduction of nitrosative to oxidative cell signals: an alternative function for cytochrome c oxidase. **Free Radic Biol Med.** 32:370-374, 2002.

- BUETTNER, G.R.; NG CF, WANG, M.; RODGERS, V.G.; SCHAFER, F.Q. A new paradigm: manganese superoxide dismutase influences the production of H₂O₂ in cells and thereby their biological state. **Free Radic Biol Med.** 41:1338-50, 2006.
- BUONASSISI, V.; VENTER, J.C. Hormone and neurotransmitter receptors in an established vascular endothelial cell line. **Proc Natl Acad Sci USA.** 73:1612-1616, 1976.
- CARRIERE, A.; CARMONA, M.C.; FERNANDEZ, Y.; RIGOLET, M.; WENGER, R.H.; PENICAUD, L.; CASTEILLA, L. Mitochondrial reactive oxygen species control the transcription factor CHOP-10/GADD153 and adipocyte differentiation: a mechanism for hypoxia-dependent effect. **J Biol Chem.** 279:40462-9, 2004.
- CHAMULITRAT, W.; SCHMIDT, R.; TOMAKIDI, P.; STREMMEL, W.; CHUNGLOK, W.; KAWAHARA, T.; ROKUTAN, K. Association of gp91phox homolog Nox1 with anchorage-independent growth and MAP kinase-activation of transformed human keratinocytes. **Oncogene.** 22:6045-53, 2003.
- CHEN Y, MCMILLAN-WARD E, KONG J, ISRAELS SJ, GIBSON SB. Mitochondrial electron-transport-chain inhibitors of complexes I and II induce autophagic cell death mediated by reactive oxygen species. **J Cell Sci.** 120:4155-66, 2007.
- CHEN, K.; THOMAS, S.R.; ALBANO, A.; MURPHY, M.P.; KEANEY, J.F. Mitochondrial function is required for hydrogen peroxide-induced growth factor receptor transactivation and downstream signaling. **J Biol Chem.** 279:35079-86, 2004.
- CLEMPUS RE, SORESCU D, DIKALOVA AE, POUNKOVA L, JO P, SORESCU GP, SCHMIDT HH, LASSÈGUE B, GRIENDLING KK. Nox4 is required for maintenance of the differentiated vascular smooth muscle cell phenotype. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 27:42-8, 2007.
- CLEMPUS, R.E.; GRIENDLING, K.K. Reactive oxygen species signaling in vascular smooth muscle cells. **Cardiovasc Res.** 71:216-225, 2006.
- CLISSOLD, P.M.; BICKNELL, R. The thioredoxin-like fold: hidden domains in protein disulfide isomerases and other chaperone proteins. **Bioessays.** 5:603-11, 2003.
- DESOUKI, M.M.; KULAWIEC, M.; BANSAL, S.; DAS, G.M.; SINGH, K.K. Cross talk between mitochondria and superoxide generating NADPH oxidase in breast and ovarian tumors. **Cancer Biol Ther.** 4:1367-73, 2005.

- DOUGHAN AK, HARRISON DG, DIKALOV SI. Molecular Mechanisms of Angiotensin II Mediated Mitochondrial Dysfunction. Linking Mitochondrial Oxidative Damage and Vascular Endothelial Dysfunction. **Circ Res.** 2007
- FERNANDES, D.C.; WOSNIAK, J.JR.; BETOLINE, M.; LIBERMAN, M.; LAURINDO, F.R.M.; SANTOS, C. X.C. Analysis of DHE-derived oxidation products by HPLC in the assessment of superoxide production and NADPH oxidase activity in vascular systems. **Am J Physiol Cell Physiol.** 292:C413-22, 2007.
- FERNANDEZ-SILVA, P.; ENRIQUEZ, J.A.; MONTOYA, J. Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. **Exp Physiol.** 88:41-56, 2003.
- GARBETT, N.C.; HAMMOND, N.B.; GRAVES, D.E. Influence of the amino substituents in the interaction of ethidium bromide with DNA. **Biophys J.** 87:3974-81, 2004.
- GO, Y.M.; GIPP, J.J.; MULCAHY, R.T.; JONES, D.P. H₂O₂-dependent activation of GCLC-ARE4 reporter occurs by mitogen-activated protein kinase pathways without oxidation of cellular glutathione or thioredoxin-1. **J Biol Chem.** 279:5837-45, 2004.
- GREEN, R.C.; O'BRIEN, P.J. The cellular localisation of glutathione peroxidase and its release from mitochondria during swelling. **Biochim Biophys Acta.** 197:31-39, 1970.
- GRÉGOIRE, M.; MORAIS, R.; QUILLIAM, A.M.; GRAVEL, D. On auxotrophy for pyrimidines of respiration-deficient chick embryo cells. **Eur J Biochem.** 142:49-45, 1984.
- GRIENDLING, K.K.; SORESCU, D.; USHIO-FUKAI, M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. **Circ Res.** 86:494-501, 2000.
- GUZIK, T.J.; WEST, N.E.; BLACK, E.; MCDONALD, D.; RATNATUNGA, C.; PILLAI, R.; CHANNON, K.M. Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. **Circ Res.** 86:E85-90, 2000.
- HAENDELER, J.; HOFFMANN, J.; DIEHL, J.F.; VASA, M.; SPYRIDOPOULOS, I.; ZEIHNER, A.M.; DIMMELER, S. Antioxidants inhibit nuclear export of telomerase reverse transcriptase and delay replicative senescence of endothelial cells. **Circ Res.** 94:768-75, 2004.

- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. 3ª edição, **Oxford University Press**, 2000.
- HARDING, H.P.; ZHANG, Y.; ZENG, H.; NOVOA, I.; LU, P.D.; CALFON, M.; SADRI, N.; YUN, C.; POPKO, B.; PAULES, R.; STOJDL, D.F.; BELL, J.C.; HETTMANN, T.; LEIDEN, J.M.; RON, D. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. **Mol Cell**. 11:619-33, 2003.
- HILENSKI, L.L.; CLEMPUS, R.E.; QUINN, M.T.; LAMBETH, J.D.; GRIENDLING, K.K. Distinct subcellular localizations of Nox1 and Nox4 in vascular smooth muscle cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 24:677-83, 2004.
- HIRAKU, Y.; MURATA, M.; KAWANISHI, S. Determination of intracellular glutathione and thiols by high performance liquid chromatography with a gold electrode at the femtomole level: comparison with a spectroscopic assay. **Biochim Biophys Acta**.1570:47-52, 2002.
- IMLAY, J.A.; FRIDOVICH, I. Assay of metabolic superoxide production in Escherichia coli. **J Biol Chem**. 266:6957–6965.
- IRANI, K. Oxidant signaling in vascular cell growth, death and survival. A review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. **Circ Res**. 87:179-183, 2000.
- JANISZEWSKI, M.; LOPES, L.; CARMO, A.; LIMA, T.; PEDRO, M.; LAURINDO, F.R. Protein disulfide isomerase acts as a novel regulatory subunit of vascular smooth muscle cell NAD(P)H oxidase. **J Biol Chem**. 280:40813-40819, 2005.
- JONES, D.P. Redefining oxidative stress. **Antioxid. Redox Signal**. 9-10:1865-79, 2006.
- KASAMATSU, H.; ROBBERSON, D.L.; VINOGRAD, J. A novel closed-circular mitochondrial DNA with properties of a replicating intermediate. **Proc. Nat. Acad. Sci**. 68:2252-2257, 1971.
- KAUFMAN, R.J. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. **J Clin Invest**. 110:1389-98, 2002.
- KING, M.; ATTARDI, G. Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. **Science**. 246: 500-503, 1989.

- KOWALTOWSKI, A.J.; VERCESI, A.E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. **Free Radic Biol Med.** 26:463-71, 1999.
- KOWALTOWSKI, A.J. Alternative mitochondrial functions in cell physiopathology: beyond ATP production. **Braz J Med Biol Res.** 33:241-250, 2000.
- LAURINDO, F.; SOUZA, H.; PEDRO, M.; JANISZEWSKI, M. Redox aspects of vascular response injury. **Methods Enzymol.** 37:432-454, 2002.
- LASSEGUE, B.; CLEMPUS, R.E. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 285:R277-97, 2003.
- LASSEGUE, B.; GRIENDLING, K.K. Nox is playing with a full deck in vascular smooth muscle, a commentary on "Noxa1 is a central component of the smooth muscle NADPH oxidase in mice". **Free Radic Biol Med.** 41: 185-187, 2006.
- LEE, S.R.; KWON, K.S.; KIM, S.R.; RHEE, S.G. Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor. **J Biol Chem.** 273: 15366-15372, 1998.
- LEE, S.B.; BAE, I.H.; BAE, Y.S.; UM, H.D. Link between mitochondria and NADPH oxidase 1 isozyme for the sustained production of reactive oxygen species and cell death. **J Biol Chem.** 281:36228-35, 2006.
- LENAZ, G.; BOVINA, C.; D'AURELIO, M.; FATO, R.; FORMIGGINI, G.; GENOVA, M.L.; GIULIANO, G.; MERLO PICH, M.; PAOLUCCI, U.; PARENTI CASTELLI, G.; VENTURA, B. Role of mitochondria in oxidative stress and aging. **Ann N Y Acad Sci.** 959:199-213, 2002.
- LEOPOLD JA, LOSCALZO J. Oxidative enzymopathies and vascular disease. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 25:1332-40, 2005.
- LI, Y.; HUANG, T.T.; CARLSON, E.J.; MELOV, S.; URSELL, P.C.; OLSON, J.L.; NOBLE, L.J.; YOSHIMURA, M.P.; BERGER, C. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. **Nat Genet.** 11:376-381, 1995.
- LI WG, MILLER FJ JR, ZHANG HJ, SPITZ DR, OBERLEY LW, WEINTRAUB NL. Enhanced H₂O₂-induced O₂ production by a non-phagocytic NAD(P)H oxidase causes oxidant injury. **J Biol Chem.** 276:29251-6, 2001.

- LIBERMAN M, BASSI E, MARTINATTI MK, LARIO FC, WOSNIAK JR J, POMERANTZEFF PM, LAURINDO FR. Oxidant Generation Predominates Around Calcifying Foci and Enhances Progression of Aortic Valve Calcification. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** [online] 2007.
- LIOCHEV, S.I.; FRIDOVICH, I. The effects of superoxide dismutase on H₂O₂ formation. **Free Radic Biol Med.** 15; 42:1465-9, 2007.
- MAECHLER, P.; WOLLHEIM, C.B. Mitochondrial function in normal and diabetic beta-cells. **Nature.** 414:807-812, 2001.
- MAHADEV, K.; MOTOSHIMA, H.; WU, X.; RUDDY, J.M.; ARNOLD, R.S.; CHENG, G.; LAMBETH, J.D.; GOLDSTEIN, B.J. The NAD(P)H oxidase homolog Nox4 modulates insulin-stimulated generation of H₂O₂ and plays an integral role in insulin signal transduction. **Mol Cell Biol.** 24:1844-54, 2004.
- MARCINIAK, S.J.; RON, D. Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. **Physiol Rev.** 86:1133-49, 2006.
- MARTYN, K.D.; FREDERICK, L.M.; VON LOEHNEISEN, K.; DINAUER, M.C.; KNAUS, U.G. Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases. **Cell Signal.** 18:69-82, 2006.
- NAGATA D, TAKEDA R, SATA M, SATONAKA H, SUZUKI E, NAGANO T, HIRATA Y. AMP-activated protein kinase inhibits angiotensin II-stimulated vascular smooth muscle cell proliferation. **Circulation.** 110:444-51, 2004.
- NEMOTO S, COMBS CA, FRENCH S, AHN BH, FERGUSON MM, BALABAN RS, FINKEL T. The mammalian longevity-associated gene product p66shc regulates mitochondrial metabolism. **J Biol Chem.** 15:10555-60, 2006.
- NOIVA, R. Protein disulfide isomerase: the multifunctional redox chaperone of the endoplasmic reticulum. **Semin Cell Dev Biol.** 10:481-493, 1999.
- PASSOS JF, SARETZKI G, VON ZGLINICKI T. DNA damage in telomeres and mitochondria during cellular senescence: is there a connection? **Nucleic Acids Res.** 35:7505-13, 2007.

- ROBINSON J, COOPER JM. Method of determining oxygen concentrations in biological media, suitable for calibration of the oxygen electrode. **Anal Biochem.** 33: 390-9, 1970.
- RON, D.; WALTER, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. **Nature.** 8 review, 2007.
- SANTOS, C.X.C; MURATA, V.; PESCATORE, L.A.; THIESEN, K.; LAURINDO, F.R.M. Protein disulfide isomerase (PDI)/NAD(P)H oxidase interaction is a pathway bridging the unfolded protein reaction (UPR) to oxidative stress in vascular smooth muscle cells (VSMC). **In Cold Spring Harb Mol Chaperones & Heat Shock Response.** 162, 2006.
- SHADEL, G.S.; CLAYTON, D.A. Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. **Annu Rev Biochem.** 66:409-35, 1997.
- SEIDEL-ROGOL, B.L.; SHADEL, G.S. Modulation of mitochondrial transcription in response to mtDNA depletion and repletion in HeLa cells. **Nucleic Acids Res.** 30:1929–1934, 2002.
- SITIA, R.; BRAAKMAN, I. Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory. **Nature.** 426: 891-4, 2003.
- ST-PIERRE, J.; DRORI, S.; ULDRY, M.; SILVAGGI, J.M.; RHEE, J.; JAGER, S.; HANDSCHIN, C., ZHENG, K.; LIN, J.; YANG, W.; SIMON, D.K.; BACHOO, R.; SPIEGELMAN, B.M. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. **Cell.** 127:397-408, 2006.
- TERADA. LS. Specificity in reactive oxidant signaling: think globally, act locally. **J Cell Biol.** 174:615-23, 2006.
- TORRES CA, PEREZ VI. Proteasome modulates mitochondrial function during cellular senescence. **Free Radic Biol Med.** 2007.
- TU, B.P.; WEISSMAN, J.S. Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences. **J Cell Biol.** 164:341-6, 2004.
- TURRENS, J.F. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. **Biosci Rep.** 17: 3-8, 1997.
- TURRENS, J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **J Physiol.** 15; 552:335-44, 2003.

- TSANG, W.Y.; LEMIRE, B.D. Mitochondrial genome content is regulated during nematode development. **Biochem Biophys Res Commun.** 291:8-16, 2002.
- USHIO-FUKAI, M. Localizing NADPH oxidase-derived ROS. **Sci STKE.** 2006:re8, 2006.
- VANKONINGSLOO, S.; DE PAUW, A.; HOUBION, A.; TEJERINA, S.; DEMAZY, C.; DE LONGUEVILLE, F.; BERTHOLET, V.; RENARD, P.; REMACLE, J.; HOLVOET, P.; RAES, M.; ARNOULD, T. CREB activation induced by mitochondrial dysfunction triggers triglyceride accumulation in 3T3-L1 preadipocytes. **J Cell Sci.** 119:1266-82, 2006.
- WEI, Y.H. Oxidative stress and mitochondrial DNA mutations in human aging. **Proc Soc Exp Biol Med.** 217:53-63, 1998.
- XU, W.; LIU, L.; CHARLES, I.G.; MONCADA, S. Nitric oxide induces coupling of mitochondrial signalling with the endoplasmic reticulum stress response. **Nat Cell Biol.** 6:1129-34, 2005.
- YAO, P.M.; TABAS, I. Free cholesterol loading of macrophages is associated with widespread mitochondrial dysfunction and activation of the mitochondrial apoptosis pathway. **J Biol Chem.** 276:42468-42476, 2001.
- YONEDA, T.; BENEDETTI, C.; URANO, F.; CLARK, S.G.; HARDING, H.P.; RON, D. Compartment-specific perturbation of protein handling activates genes encoding mitochondrial chaperones. **J Cell Sci.** 117:4055-66, 2004.
- ZHAO, Q.; WANG, J.; LEVICHKIN, I.V.; STASINOPOULOS, S.; RYAN, M.T.; HOOGENRAAD, N.J. A mitochondrial specific stress response in mammalian cells. **EMBO J.** 21:4411-92, 2002.

CURRICULUM VITAE

João Wosniak Júnior

Nascimento: 11 de março de 1977, Ponta Grossa - PR

Formação

Pós-Graduação – Doutorado (2002-2008)

Área: Ciências – Cardiologia

Orientação: Prof. Dr. Francisco Rafael Martins Laurindo

Instituição: Faculdade de Medicina – Instituto do Coração – USP

Graduação (1996-2001)

Curso: Farmácia e Bioquímica

Habilitação: Análises Clínicas

Instituição: Universidade Estadual de Ponta Grossa - PR

Ocupação

Especialista em Laboratório – (início: 2006)

Instituição: Faculdade de Medicina – Instituto do Coração – USP

Bolsista – Auxílio - Doutorado (2007-2008)

Agência Financiadora: SOCESP/FAPESP

Orientação: Prof. Dr. Francisco Rafael Martins Laurindo

Instituição: Faculdade de Medicina – Instituto do Coração - USP

Bolsista – Doutorado (2002-2005)

Agência Financiadora: FAPESP

Orientação: Prof. Dr. Francisco Rafael Martins Laurindo

Instituição: Faculdade de Medicina – Instituto do Coração - USP

Bolsista – Iniciação Científica (1998-2000)

Agência Financiadora: CNPq

Orientação: Profa. Dr. Luis Antônio Esmerino

Instituição: Universidade Estadual de Ponta Grossa - PR

Publicações

LIBERMAN M, BASSI E, MARTINATTI MK, LARIO FC, WOSNIAK JR J, POMERANTZEFF PM, LAURINDO FR. Oxidant Generation Predominates Around Calcifying Foci and Enhances Progression of Aortic Valve Calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 (*online*).

FERNANDES DC, WOSNIAK J, PESCATORE LA, BERTOLINE MA, LIBERMAN M, LAURINDO F. Analysis of dihydroethidium-derived oxidation products by HPLC in the assessment of superoxide production and NADPH oxidase activity in vascular systems. *Am J Physiol Cell Physiol*, 292: 413-422, 2007.

Resumos publicados em anais de congresso

WOSNIAK, JJr; SANTOS, C.X.C.; LAURINDO, FRM. Crosstalk between mitochondria and NAD(P)H oxidase in vascular smooth muscle cell ROS generation. V Meeting of SFRBM, South American Group, Montevideo, Uruguai, 2007.

WOSNIAK, JJr SANTOS, C.X.C. ; LAURINDO, FRM . Functional crosstalk between mitochondria and NAD(P)H oxidase-dependent vascular smooth muscle cell ROS generation. 14th SFRBM's Annual Meeting, Washington DC, EUA, 2007

WOSNIAK, JJr; SANTOS, C.X.C.; LAURINDO, FRM. Crosstalk between mitochondrial damage and NAD(P)H oxidase activity in vascular smooth muscle cells. Experimental Biology FASEB, San Francisco, USA, 2006.

FERNANDES, D.C.; WOSNIAK, JJr; LIBERMAN, M.; LAURINDO, FRM ; SANTOS, C.X.C. Dihydroethidium oxidation by vascular NAD(P)H oxidase: Implications for assesement of ROS production in vascular system. IV Meeting of the South American Group of the Society for Free Radical Biology and Medicine, Águas de Lindóia, SP, 2005.

FERNANDES, D.C.; WOSNIAK, JJr; LIBERMAN, M.; BERTOLINE, M.A.; LAURINDO, FRM ; SANTOS, C.X.C. Assesement of superoxide production and

NAD(P)H oxidase activity in vascular cells and tissues: usefulness and confounding factors of HPLC analysis of dihydroethidium-derived oxidation products. SFRBM's 12th Annual Meeting, Austin, EUA, 2005.

WOSNIAK, JJr; SANTOS, C.X.C.; LAURINDO, FRM. Evidence for endoplasmic reticulum stress due to mitochondrial dysfunction and its decrease by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. IV Meeting of the South American Group of the SFRBM, Águas de Lindóia, SP, 2005.

WOSNIAK, JJr; SANTOS, C.X.C.; DEBBAS, V.; LAURINDO, FRM. Crosstalk between mitochondrial electron transport and plasma membrane NADPH oxidase activity. XXXIII Reunião Anual da SBBq, Caxambu, MG, 2004.

WOSNIAK, JJr; SANTOS, C.X.C.; LAURINDO, FRM. Crosstalk between mitochondrial electron transport and plasma membrane NADPH oxidase activity. Workshop em Estresse Oxidativo, Rio de Janeiro, RJ, 2004.

WOSNIAK, JJr; SILVA, J. C.; KNUDSEN, F. S.; LAURINDO, FRM. Interaction between mitochondrial function and plasma membrane oxidases in vascular smooth muscle cells. XXXII Reunião Anual da SBBq, Caxambu, MG, 2003.

Apresentação oral de trabalho em congresso

WOSNIAK, JJr; SANTOS, C.X.C.; LAURINDO, FRM. Crosstalk between mitochondrial damage and NAD(P)H oxidase activity in vascular smooth muscle cells. Experimental Biology FASEB, San Francisco, USA, 2006.