

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

**A FUNÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO NO PROCESSO DE ANGIOGÊNESE
ATRAVÉS DO CONTROLE DA ATIVIDADE DO RECEPTOR DE EGF**

Miriam Santos de Moraes

Tese de Doutorado

Orientador: Prof. Dr. Hugo Pequeno Monteiro

SÃO PAULO

31 de Março de 2008

“Sempre que reflito sobre a belíssima ordem que observamos no mundo, como cada coisa se origina de outra, sinto-me como se estivesse lendo um texto divino, escrito não com letras mas com objetos, que dissesse: Homem, amplia tua razão, para que possas compreender.” (Johannes Kepler, astrônomo)

“Vivendo se aprende; mas o que se aprende, mais, é só a fazer outras maiores perguntas”. (Guimarães Rosa – Grande Sertão: Veredas).

Aos meus amores, Márcio, Luíza e Francisco

Aos meus pais e irmãos

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Hugo Pequeno Monteiro, que ao convidar-me para desenvolver o meu doutorado em seu laboratório, contribuiu em muito para o meu desenvolvimento.

Ao Prof. Francisco Laurindo e seus alunos por nos receber em seu laboratório durante o período em que fomos “labless“.

Ao Prof. Hugo Aguirre Armelin por tudo que tive oportunidade de aprender em seu laboratório e que foi muito útil no desenvolvimento deste projeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo, pelo suporte do projeto e da minha bolsa de estudos.

Aos colegas de laboratório, Marli Curcio, Fernando Ogata, Roberta Eller Borges, Paulo Eduardo Costa, Luana, Rodrigo, Wagner, Roberto Jun Arai, pelas discussões construtivas, pelos momentos divertidos, pela ajuda e pelo companheirismo.

Aos amigos e colegas de outros laboratórios, Edlaine Linares, Simone Ferderbar, Silvana, Fábio Nascimento, Thaysa, Victor Debbas e às meninas superpoderosas do Prof. Luiz Eugênio Mello.

À querida Roberta Eller Borges, pela amizade, pela força, por dividir boas risadas e também as frustrações e momentos difíceis. Pela ajuda na hora de lisar tantas placas e fazer tantos Westerns.

À querida Marli Curcio, pela ajuda com Src, pelas músicas bregas que nos distraía e nos fazia rir a toa, pelos bons DVDs (que tantas vezes distraiu as crianças e contribui para o desenvolvimento deste projeto), pelo companheirismo.

À Simone Ferderbar, por sua companhia agradável e ajuda, principalmente, na hora de montar aulas no Power point.

Ao Paulo, por salvar-me quando o computador resolvia se rebelar, pelos improvisos quando algum equipamento parava de funcionar justamente quando mais se precisava dele.

À Thayssa pela ajuda com os ensaios de formação de tubo em matrigel, por ser a fotógrafa das minhas células.

À Ayumi e o seu pessoal, Vinicius, Luciane, pela colaboração nos experimentos de shear stress.

Ao técnico Maurício Santos por ajudar-me com as dosagens de NO, por sua bondade e companheirismo.

Ao querido Fernando Ogata, pelos experimentos de Real Time PCR apresentados nesta tese.

Ao meu amigo Ivan Tadeu Rebutini, que mesmo de longe, sempre esteve muito presente, ajudando-me sempre que necessário.

Aos meus amigos Eliza Terada, Helena e Alan Durhan, Aufra Araújo, Paula Asprino, Érico Costa, Kátia Rocha, Carolina Bigarella, pelo carinho e apoio.

À minha irmã Marilda e minha mãe, sem as quais seria quase impossível desenvolver este projeto.

Ao Márcio, por sua paciência, por agüentar-me nos momentos de mau-humor e frustração quando as coisas não iam bem.

A todos da seção de pós-graduação, em especial ao Milton, Emiliano e Marcelo.

Enfim, a todos que de uma forma ou outra contribuiu para que este projeto se tornasse uma tese.

Índice Geral

ABREVIATURAS.....	7
RESUMO	8
ABSTRACT	9
I. INTRODUÇÃO	10
PRÓLOGO	10
I.1 - RECEPTORES DE TIROSINA CINASE – RECEPTOR PARA O FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO (EGFR).....	11
I.2 - RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNA G (GPCR).....	15
I.3 - TRANSATIVAÇÃO DO RECEPTOR DE EGF INDUZIDA PELA ATIVAÇÃO DE RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G (GPCR).....	18
I.4 - A SINALIZAÇÃO POR RTK E GPCR CONVERGEM NA CASCATA DE MAP CINASE	20
1.4.1 - <i>MAP cinases: função e regulação.....</i>	<i>20</i>
I.5 - FOSFATASES EM TRANSDUÇÃO DE SINAL	21
1.5.1 - <i>Proteínas tirosina fosfatases (PTPs) em sinalização celular</i>	<i>22</i>
I.6 - O ÓXIDO NÍTRICO (NO[•]).....	23
1.6.1 - <i>Óxido nítrico e seus alvos</i>	<i>26</i>
I.7 - ATIVAÇÃO DE RECEPTORES DE TIROSINA CINASE MEDIADA POR ESTRESSE CELULAR	28
I.8 - CÉLULAS ENDOTELIAIS	31
1.8.1 - <i>Bradicinina</i>	<i>32</i>
1.8.2 - <i>Shear Stress</i>	<i>33</i>
I.9 - O PROCESSO DE ANGIOGÊNESE.....	34
1.9.1 - <i>O papel de NO em angiogênese.....</i>	<i>35</i>
OBJETIVOS	36
II.1 – OBJETIVO GERAL	36
II.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
II.3 - VIABILIDADE E RELEVÂNCIA	36
II.3 - VIABILIDADE E RELEVÂNCIA	36
III. MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
III.1 - MATERIAIS.....	38
III.1.1 - <i>Plasmídeos:</i>	<i>38</i>
III.1.2 - <i>Anticorpos:.....</i>	<i>38</i>
III.1.3 - <i>Hormônios, Fatores de Crescimento e Outros</i>	<i>39</i>
III.1.4 - <i>Inibidores de Fosfatases e Proteases</i>	<i>39</i>
III.1.5 - <i>KITS.....</i>	<i>40</i>
III.1.6 - <i>Drogas e Antibióticos:</i>	<i>40</i>
III.1.7 - <i>Soro e meio de cultura:</i>	<i>40</i>
III.1.8 - <i>Soluções:.....</i>	<i>40</i>
III.1.9 - <i>Enzimas.....</i>	<i>42</i>
III.1.10 - <i>Primers Real Time PCR</i>	<i>42</i>
III.2.1 - Cultura Celular	42
III.2.2 - <i>Manipulação de bactérias e preparação de plasmídeos</i>	<i>43</i>
III.2.3 - <i>Transfecção de células RAEC com prK5EGFR-WT e prK5EGFR-KD.....</i>	<i>44</i>
III.2.4 - <i>Estímulo da produção endógena de NO em células endoteliais</i>	<i>44</i>
III.2.5 - <i>Estimativa das concentrações de NO geradas após estímulos das células endoteliais</i>	<i>45</i>
III.2.6 - <i>Experimento de Fluxo – “shear stress”</i>	<i>45</i>
III.2.7 - <i>Fosforilação de ERK1/2</i>	<i>46</i>
III.2.8 - <i>Estudo da fosforilação do receptor de EGF</i>	<i>46</i>
III.2.9 - <i>Imunoprecipitação de PTP 1C.....</i>	<i>47</i>
III.2.10 - <i>SDS-PAGE.....</i>	<i>47</i>

III.2.11 - <i>Western Blot</i>	48
III.2.12 - <i>Ensaio de Proliferação Celular</i>	49
III.2.13 - <i>Ensaio de Entrada em S por incorporação de BrdU</i>	49
III.2.14 - <i>Ensaio de Angiogênese sobre Matrigel</i>	50
III.2.15 - <i>Extração de RNA</i>	51
III.2.16 - <i>Síntese de cDNA</i>	51
III.2.17 - <i>PCR em tempo real</i>	51
III.2.18 - <i>Análise estatística</i>	52
IV. RESULTADOS	53
IV.1 - GERAÇÃO DE CLONES DE CÉLULAS RAEC EXPRESSANDO O RECEPTOR DE EGF FUNCIONAL OU MUTADO	54
IV.2 - CINÉTICA DE ATIVAÇÃO DO RECEPTOR DE EGF APÓS ESTIMULO COM BRADICININA EM CÉLULAS RAEC E HUVEC	56
IV.3 - BRADICININA ESTIMULA A PRODUÇÃO DE NO EM CÉLULAS ENDOTELIAIS	60
IV.4 - ATIVIDADE TIROSINA CINASE DO RECEPTOR DE EGF INDUZIDA POR BK/NO NA PRESENÇA DE INIBIDORES DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE EM CÉLULAS RAEC/HUVEC	61
IV.5 - ATIVAÇÃO DE ERK1/2 POR BRADICININA	65
IV.6 - BRADICININA PROMOVE A FOSFORILAÇÃO DO RECEPTOR DE EGF EM SÍTIOS DE FOSFORILAÇÃO DE RECONHECIDOS ERK	71
IV.7 - PAPEL DE SRC CINASE NAS RESPOSTAS DESENCADEADAS POR BRADICININA.....	77
IV.8 - HEPARINA BLOQUEIA A TRANSATIVAÇÃO DE EGFR POR BRADICININA	81
IV.9 - BRADICININA ESTIMULA A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS	83
IV.10 - EFEITOS DE BK SOBRE O PROCESSO DE ANGIOGÊNESE EM CÉLULAS HUVEC	87
IV.11 - L-NAME E BIBX BLOQUEIAM A FORMAÇÃO DE TUBO INDUZIDA POR BRADICININA	88
IV.12 - A TRANSFECCÃO DE HUVEC COM O RECEPTOR DE EGF COM O DOMÍNIO CINASE INATIVO (EGFR KD) REVERTE À FORMAÇÃO DE ESTRUTURAS TUBULARES DESENCADEADA POR BK.	92
IV.13 - EXPRESSÃO DOS FATORES DE CRESCIMENTO bFGF E VEGF-A (VEGF) EM CÉLULAS ENDOTELIAIS HUVEC	94
IV.14 - VEGF PARTICIPA DA INDUÇÃO DE ANGIOGÊNESE PROMOVIDA POR BRADICININA.....	96
IV.15 - MODELO PROPOSTO PARA A ANGIOGÊNESE INDUZIDA POR BRADICININA	97
IV.16 - INDUÇÃO NA ATIVAÇÃO DO RECEPTOR DE EGF EM CÉLULAS ENDOTELIAIS APÓS ESTÍMULO POR “SHEAR STRESS”.....	99
IV.17 - “SHEAR STRESS” AUMENTA A FOSFORILAÇÃO DA SER1177 DE ENOS COM UMA CINÉTICA SEMELHANTE A PRODUÇÃO DE NO	100
IV.18 - “SHEAR STRESS” LEVA À ATIVAÇÃO DAS ERK1/2.....	102
IV.19 - AUMENTOS NOS NÍVEIS DE NO ENDÓGENO - “SHEAR STRESS”-DEPENDENTE - LEVAM A UM AUMENTO NA FOSFORILAÇÃO EM RESÍDUOS DE TIROSINA DO RECEPTOR DE EGF	103
IV.20 - L-NAME E BIBX BLOQUEIAM A FORMAÇÃO DE ESTRUTURAS TUBULARES INDUZIDA POR “SHEAR STRESS”	104
V. DISCUSSÃO	108
VI. CONCLUSÕES	117
VII. BIBLIOGRAFIA	118
VIII. CURRICULUM VITAE	142

Abreviaturas

ADAM: <u>ad</u> isintegrin and <u>met</u> alloproteinase	NMDA: N-ethyl-D-aspartate
BK: bradykinin	NO: nitric oxide
CaM: calmodulin	NOS: nitric oxide synthase
cAMP: adenosine-3', 5' cyclic monophosphate	NOSIP: nitric oxide synthase inhibitor protein
cDNA: complementary deoxyribonucleic acid	NSF: N-ethylmaleimide (NEM)-sensitive factor
DAG: diacyl-glycerol	PAGE polyacrylamide gel electrophoresis
DDAH: dimethylarginine dimethylaminohydrolases	PDGF: platelet-derived growth factor
DMSO: dimethyl-sulfoxide	PI3K: phosphoinositide 3-OH kinase
DNA: deoxyribonucleic acid	PKA: protein kinase A
EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid	PKC: protein kinase C
EGF: epidermal growth factor	PLC: phospholipase C
EGFR: epidermal growth factor receptor	PTK: protein tyrosine kinase
ERK: extracellular regulatory kinase	PTP: protein tyrosine phosphatase
FAK: focal adhesion kinase	PTX: pertussis toxin
bFGF: basic fibroblast growth factor	RSK: ras supressor kinase
GDP: guanosine 5' -diphosphate	RTK: receptor tyrosine kinase
GEF: guanine-nucleotide exchange factor	SDS: sodium dodecyl-sulphate
GH: growth hormone	Ser: serine
GPCR: G protein-coupled receptor	SHP-2: Src homology 2 domain-containing PTP
GST: glutatione S-transferase	TGF- α : transforming growth factor - α
GTP: guanosine 5' -triphosphate	Thr: threonine
HB-EGF: heparine binding-EGF	Trx: thioredoxin
HER: Human EGF receptor	Tyr: tirosine
HIF: hyposia-inducible factor	VEGF: vascular endothelial growth factor
Hsp: heat shock protein	VEGFR: vascular endothelial growth factor receptor
IP3: inositol 1,4,5-triphosphate	
JAK: janus activating kinase	
JNK: c-Jun NH ₂ -terminal kinase	
MAPK: mitogenic activating protein kinase	
mRNA: messenger ribonucleic acid	
NEM: N-ethylmaleimide	
NF- κ B: nuclear factor- κ B	
NGF: nerve growth factor	

Resumo

Moraes, M. S. A função do óxido nítrico no processo de angiogênese através do controle da atividade do receptor de EGF. 2008. 144 pág. Dissertação de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Instituto de Química, Universidade de São Paulo, SP.

Óxido nítrico (NO) obtido a partir de fontes exógenas estimula a via de sinalização Ras/MAP cinases ERK1/2 em células endoteliais de coelho (RAEC). A ativação desta via também envolve a transativação do receptor de EGF (EGFR) mediada por ERK1/2 (Oliveira, 2003). Agora, nós avaliamos os efeitos de NO gerado endogenamente por bradicinina e “shear stress” sobre a fosforilação de resíduos de tirosina em EGFR e no processo de angiogênese; Nós encontramos que após estímulo com bradicinina (1 μ M) ou “shear stress” (16 dynes/cm²) a isoforma endotelial de NO sintetase (eNOS) foi ativada em células RAEC e HUVEC. Além disso, o aumento na produção de NO correlaciona-se com um aumento na fosforilação em resíduos de tirosina de EGFR conforme verificado por imunoprecipitação e western blot. Para determinar a capacidade angiogênica da via de sinalização NO-EGFR, nós usamos um ensaio in vitro baseado em Matrigel®. Em adição nós analisamos as vias de sinalização envolvidas no processo. Nós mostramos que bradicinina e “shear stress” induz a formação de estruturas semelhantes a capilares em células HUVEC cultivadas em Matrigel®. Células HUVEC expressando um mutante de EGFR com atividade de tirosina cinase defectiva não forma estruturas semelhantes a capilares após estímulo com bradicinina ou “shear stress”. Reunidos, estes achados nos sugerem que a ativação da via de NO e EGFR é necessária na promoção de angiogênese em células HUVEC.

Palavras-chave: angiogênese, bradicinina, células endoteliais, óxido nítrico, receptor de EGF, shear stress.

Abstract

Moraes, M. S. 2008. A critical role for NO-mediated, epidermal growth factor receptor-dependent angiogenesis in endothelial cells. 144 pág. PhD Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, SP.

Nitric oxide (NO) obtained from exogenous sources stimulated the Ras/MAP kinases ERK1/2 signaling pathway in rabbit endothelial cells (RAEC). Activation of this pathway also involved the transactivation of the EGF receptor (EGF-R) mediated by ERK1/2 (FRBM 35:381; 2003). Now, we evaluate the effects of endogenously generated NO elicited by bradykinin and fluid laminar “shear stress” on tyrosine phosphorylation of the EGF receptor and in the process of angiogenesis. We found that upon stimulation with bradykinin (1 μ M) or under shear stress conditions (16 dynes/cm²) the endothelial isoform of NO synthase was activated in RAEC and in human endothelial cells (HUVEC). Furthermore, increase in NO production correlated with enhanced phosphorylation of tyrosine residues of the EGF-R as seen by immunoprecipitation and western blot analysis. To determine the importance of the NO-EGFR signaling pathway in angiogenesis, we used the Matrigel®-based *in vitro* assay for angiogenesis. In addition, we analyzed the signaling pathway involved in the process. We showed that bradykinin and shear stress induced the formation of capillary-like structures in HUVEC cultures grown in Matrigel®. HUVEC expressing a mutant of the EGF-R lacking tyrosine kinase activity did not form capillary-like structures upon stimulation with bradykinin or shear stress conditions. Taken together, these findings suggest that the activation of the NO-EGFR signaling pathway is necessary to promote angiogenesis in HUVEC.

Keywords: angiogenesis, bradykinin, EGF receptor, endothelial cells, nitric oxide, shear stress.

I. Introdução

Prólogo

Angiogênese, a formação de novos vasos capilares a partir de células endoteliais, é essencial para o crescimento de tumores e para a formação de metástase (Folkman, 1971). Vários fatores de crescimento e citocinas que podem afetar a proliferação e migração de células endoteliais foram implicados em angiogênese associada a tumores (Jain, 2003; Ferrara e Kerbel, 2005). A angiogênese não está apenas envolvida no desenvolvimento e disseminação de tumores, mas também em vários processos fisiológicos e patológicos. Ela é essencial no desenvolvimento de órgãos, na cura de ferimentos e em processos inflamatórios, sendo rigorosamente controlada pelo organismo. De fato, a angiogênese é controlada por reguladores positivos e negativos cujo balanço determina a velocidade de formação do vaso (Ferrara e Kerbel, 2005).

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é o principal indutor de angiogênese, apesar de outros fatores adicionais como interleucina-8 (IL-8) e o fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF), também desempenharem um papel neste processo. Além destes, as vias de sinalização desencadeadas pelo receptor do fator de crescimento epidérmico (EGF) regulam em células tumorais, a síntese e secreção de alguns fatores de crescimento angiogênicos, incluindo VEGF, IL-8 e bFGF (Hirata et al., 2002; Perrotte et al., 1999). Além disso, a expressão e função do receptor de EGF (EGFR) em células endoteliais também já foram descritas (Hirata et al., 2002). Portanto, o EGFR pode regular o processo de angiogênese por diferentes mecanismos, os quais incluem efeitos diretos e indiretos sobre células endoteliais.

Existem evidências substanciais de que o processo de angiogênese requer a síntese de

óxido nítrico (NO). Diversos fatores angiogênicos promovem a expressão da enzima NO sintase (NOS) e estimulam a liberação de NO pelo endotélio (Hood et al., 1998; van der Zee et al., 1997). A liberação de NO mediada por fatores angiogênicos parece ter um papel essencial em seus efeitos. A formação de tubos capilares por estes fatores é bloqueada pelo antagonista de NOS, N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (Babaei et al., 1998; Papapetropoulos et al., 1997). Estes estudos sugerem que o NO é um mediador crítico do processo de angiogênese. Suas ações poderiam ser assim enumeradas:

(1) NO é um fator de sobrevivência endotelial, inibindo o processo de apoptose (Dimmeler et al., 1999; Rossig et al., 1999) e estimulando a proliferação de células endoteliais (Morbidelli et al. 1996; Ziche et al., 1997; Rocha Oliveira et al., 2008).

(2) NO estimula a migração celular (Ziche et al., 1994; Murohara et al., 1999).

(3) Deve ser notado que NO pode induzir a síntese e liberação de VEGF a partir de células vasculares (Dulak et al., 2000).

(4) Finalmente, NO obtido de doadores exógenos estimula a transativação do receptor de EGF em células endoteliais (Rocha Oliveira et al, 2003).

Antes de iniciarmos a descrição das evidências experimentais encontradas ao longo do processo de desenvolvimento deste trabalho, passamos ao processo de conceituação dos vários elementos que constituíram este trabalho.

I.1 - Receptores de tirosina cinase – Receptor para o fator de crescimento epidérmico (EGFR)

Receptores tirosina cinase (RTKs) são os mediadores primários de respostas celulares fisiológicas como, proliferação, diferenciação, mobilidade ou sobrevivência e têm sido extensivamente investigados (Hunter, 2000). Com base em suas características estruturais, os RTKs podem ser divididos em 20 subfamílias as quais compartilham um domínio homólogo

que especifica a função de tirosina cinase. A fosforilação de distintos resíduos de tirosina no receptor ativado cria sítios de ligação para muitas proteínas sinalizadoras intracelulares, as quais podem se tornar ativadas após a ligação ao receptor (Hunter, 2000).

Células em um organismo complexo estão sob um fluxo contínuo de informações oriundas de seu ambiente externo e das células vizinhas. É crucial para a homeostase, sobrevivência e adaptação de uma única célula, bem como do organismo como um todo, a correta interpretação e integração de todas essas informações. Durante a evolução, várias ferramentas celulares foram desenvolvidas para alcançar este objetivo; receptores presentes na membrana são exemplos importantes. Estes receptores com atividade tirosina cinase formam uma grande família, capaz de transduzir a informação de um ligante em uma mensagem intracelular, a qual controla a expressão gênica, e deste modo o resultado biológico.

A subclasse I da superfamília de receptores tirosina cinase é formada pelos receptores para os fatores de crescimento epidérmico (EGF) ou ErbB e inclui 4 membros: EGFR/ErbB1/HER1, ErbB2/Neu/HER2, ErbB3/HER3 e ErbB4/HER4. Todos os membros têm em comum uma região extracelular de ligação ao ligante, e um domínio citoplasmático contendo atividade de proteína tirosina cinase. Sob condições fisiológicas normais, a ativação dos receptores ErbBs é controlada espacial e temporalmente pela expressão de seus ligantes, membros da família de fatores de crescimento relacionados a EGF (Riese and Stern, 1998).

EGFR e seus ligantes estão envolvidos em mais do que 70% de todos os cânceres. Devido a sua superexpressão, co-expressão do receptor e seus ligantes, bem como, mutações ativadoras, a atividade aumentada do receptor é marca de muitos carcinomas humanos (Yarden, 2001). Em muitos tipos de tumores, incluindo, pulmão, mama, próstata, ovário, tumores gastrointestinais e tumores de cabeça e pescoço, o EGFR encontra-se, aproximadamente, 100 vezes mais expresso que em células normais. A superexpressão de

pelo menos dois destes receptores, o EGFR e ErbB2, foi associada com um comportamento clínico mais agressivo (Alroy and Yarden, 1997). Ainda, a expressão de níveis elevados destes receptores em linhagens celulares não malignas leva ao fenótipo transformado. Portanto, não é surpreendente que desde cedo EGFR tenha sido identificado como um alvo importante para o desenvolvimento de drogas (Yarden, 2001; Yaish, et al, 1988; Baselga, 2002).

A transmissão de sinal mediada por receptores ErbB a partir do exterior para o interior da célula compreende algumas etapas. A primeira etapa da sinalização por ErbB é a ligação do ligante a receptores específicos, o que induz sua mudança conformacional e dimerização. Os receptores ErbB do tipo transmembrana após ativação conduzem o sinal através de proteínas sinalizadoras presentes no citoplasma culminando com o envio do sinal para o núcleo da célula onde mudanças na expressão gênica permitem a célula se adaptar à nova situação. Este fluxo de sinal ocorre via cascatas de fosforilação, iniciando-se a partir de modificações no próprio receptor e terminando com modificações nos fatores de transcrição. Um esquema simplificado da via de sinalização de ErbB encontra-se ilustrado na Figura 1.

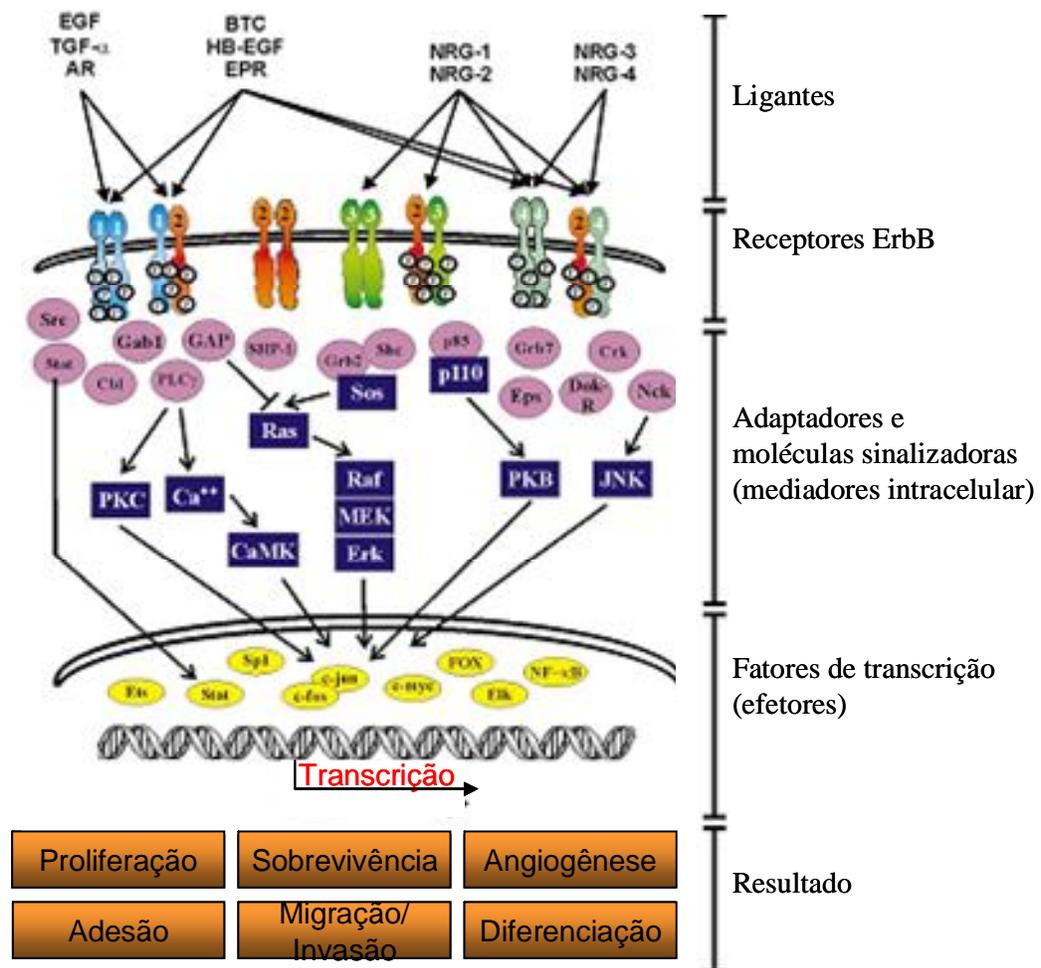


Figura 3: **Vias de sinalização de ErbB (Holbro & Hynes, 2004)**. Após ativação do receptor, várias moléculas (violeta) com função adaptadora ou enzimática são diretamente recrutadas pelo receptor. Estas, então, ativam componentes sinalizadores abaixo delas (azul escuro), que por sua vez irão promover alterações na atividade de diversos fatores de transcrição (amarelo).

Estudos da cascata de sinalização mediada por EGF permitiram o estabelecimento de um modelo de via de transdução de sinal desencadeada por fatores de crescimento peptídicos (Ullrich and Schlessinger, 1990; Schlessinger, 2000). Quando EGF se liga ao seu receptor ocorre a autofosforilação em resíduos de tirosina presentes no domínio citoplasmático do receptor. Receptores e não-receptores com atividade de tirosina cinase quando fosforilados em

resíduos de tirosina funcionam como sítios de ancoragem para proteínas contendo domínios SH2 e SH3 (domínios 2 e 3 de homologia a Src). A ativação induzida por ligante e a fosforilação de resíduos de tirosina leva a formação de complexos de sinalização. A montagem destes complexos envolve, primariamente, a associação de resíduos de tirosina fosforilados, a outras proteínas que apresentam os domínios SH2 e proteínas que apresentem seqüências ricas em prolina que irão se associar aos domínios SH3 (Schlessinger, 2000). Os eventos de sinalização procedem “downstream” em relação a estas proteínas adaptadoras (em geral, Grb2 e SOS) resultando na ativação da proteína G de baixo peso molecular, p21Ras. A partir deste ponto, inicia-se uma cascata de fosforilação envolvendo as proteínas cinases, Raf, MEK e MAP cinases - MAPK (Figura 1). As MAPKs irão fosforilar fatores de transcrição, outras proteínas cinases e também receptores com atividade de tirosina cinase (por exemplo, EGF, PDGF, etc) (Schlessinger, 2000), conectando, assim, receptores para fatores de crescimento a fatores de transcrição (Gille et al., 1992; Davis, 1993).

I.2 - Receptores acoplados a proteína G (GPCR)

Muitos fatores de crescimento são conhecidos por ligarem-se e ativarem ou receptores que possuem uma atividade de tirosina cinase intrínseca, por exemplo, EGFR (Yarden et al., 1986) ou aqueles que transmitem sinais para o citoplasma através da interação com proteínas G heterotriméricas (proteínas G). Os últimos são coletivamente conhecidos como receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) e compreende o maior grupo de receptores de superfície celular. Estes receptores exibem um motivo estrutural comum consistindo de sete domínios transmembranares com uma porção amino terminal extracelular e uma porção carboxi terminal citoplasmática (Dohlman et al, 1987). Uma extensa variedade de estímulos, incluindo, luz, odores, neurotransmissores, hormônios e peptídeos vaso ativos, podem induzir

mudanças conformacionais nas α -hélices transmembranares, o que resulta na ligação e ativação de proteínas G heterotriméricas (Bourne, 1997). Estes receptores podem ser ativados por uma grande diversidade de moléculas sinalizadoras extracelulares, incluindo hormônios, mediadores locais ou neurotransmissores. Estas moléculas são tão variadas em estrutura como o são em função: elas podem ser proteínas, pequenos peptídeos ou derivados de aminoácidos ou de ácidos graxos, e para cada uma delas existe um receptor ou conjunto de receptores específicos. A ativação de GPCRs por estas moléculas leva a uma profunda mudança nas α hélices transmembranares, afetando deste modo a conformação das alças intracelulares (Altenbach et al, 1996; Bourne, 1997; Weiss, 1997). Os domínios citoplasmáticos dos receptores ativados transduz sinais para ativar a troca de nucleotídeo guanina de uma ou mais proteínas G triméricas encontradas no lado interno da membrana celular. A ativação estimula a troca de GDP por GTP pela subunidade α ($G\alpha$) e a dissociação do complexo $G\beta\gamma$. $G\alpha$ e o complexo $G\beta\gamma$ então agem para regular a atividade de diversas moléculas efetoras, por exemplo, adenilato ciclase, fosfolipase $C\beta$, fosfodiesterase e vários canais iônicos (figura 2).

Nos últimos anos tornou-se claro que estes receptores, os quais se encontram expressos em células proliferando, podem promover respostas mitogênicas por meio do estímulo da cascata das MAPKs (van Biesen et al., 1996; Gutkind, 1998; Luttrell et al., 1999). O alvo final desta família melhor estudado é ERK1 e ERK2 (também conhecidas como p44 e p42), as quais se encontram classicamente associadas aos receptores tirosina cinase, tais como EGFR.

O estímulo de ERK por GPCRs pode ser mediada por diferentes classes de proteínas G, incluindo G_s , G_i e $G_q/11$. Uma extensa literatura indica que GPCR pode induzir a via de ERK por meio de mecanismos dependente e independente de PKC (Gutkind et al., 1988; Miller e Lefkowitz, 2001). Uma via importante utilizada por muitos GPCR, é a transativação

do receptor de EGF, que leva a ativação de ERK em uma variedade de tipos celulares (para uma melhor análise ver figura 2).

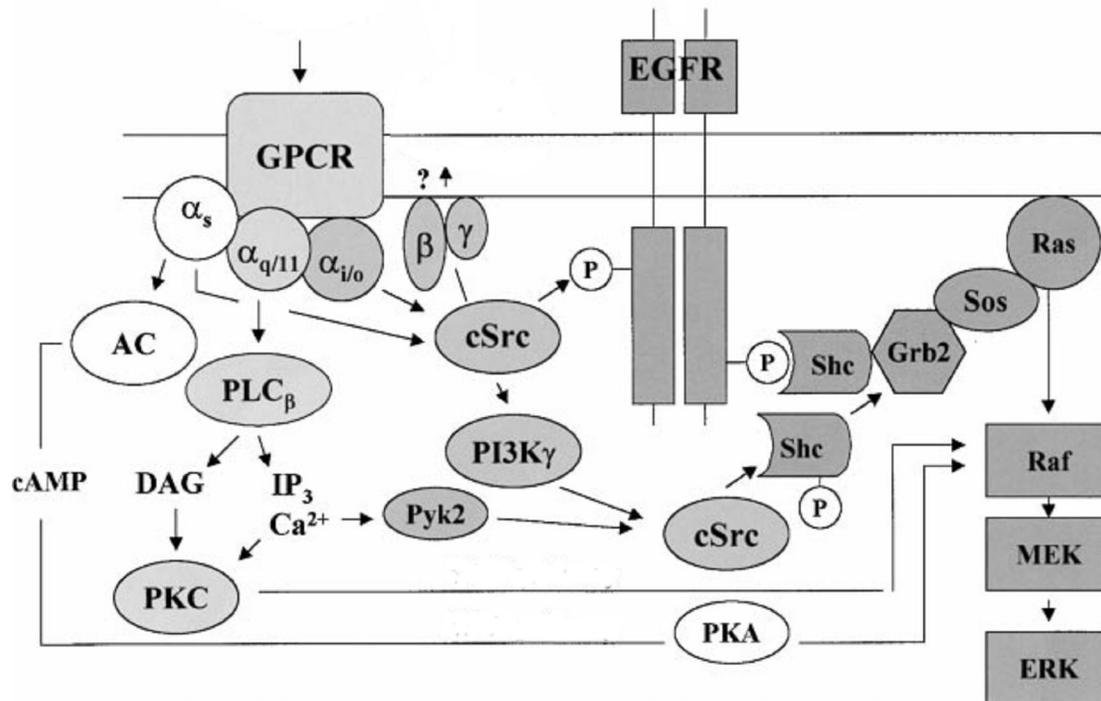


Figura 2: Ativação de ERK mediada por GPCR. Classicamente, receptores tirosina cinase (EGFR, por exemplo) atuam por uma cascata de sinalização na qual uma MAPK é ativada por uma cinase, a qual é, em retorno, ativada por uma MAPK cinase cinase. A figura ilustra o caso para a via de ERK, onde ERK 1 e 2 (MAPKs) são ativadas por MEKs (MAPK cinase), as quais em retorno são fosforiladas por Raf (MAPK cinase cinase) “downstream” a Ras. Muitos (se não todos) GPCRs ativam a subunidade α de Gs para estimular adenilato ciclase (AC) e PKA, portanto, ativando Raf. Receptores acoplados a Gq/11 podem ativar fosfolipase C (PLC), ativando, portanto, PKC e provocando a ativação de ERK por meio da ativação de Raf por PKC. Eles também podem mediar a ativação de PyK2 através do dímero $\beta\gamma$. Ainda, o dímero $\beta\gamma$ das proteínas G heterotriméricas, (particularmente G_i) é capaz de ativar a via de ERK por alguns modos, incluindo a ativação de um membro da família de Src cinase.

I.3 - Transativação do receptor de EGF induzida pela ativação de receptores acoplados a proteínas G (GPCR)

A comunicação entre diferentes classes de receptores oferece uma maior diversidade de respostas de sinalização celular. Erbs são bons exemplos de integradores de sinal porque eles são alvos de eventos de sinalização desencadeados por outras classes de receptores. A transativação de ErbB é caracterizada por uma rápida fosforilação do receptor em resíduos de tirosina e subsequente estímulo de vias de sinalização.

Em diferentes tipos celulares a transativação de EGFR pode mediar a ativação das vias de Ras/Raf/MEK/ERK/p90RSK e PI3-cinase/Akt induzida por GPCR (Cunnick et al., 1998; Santiskulvong et al., 2001; Buchanan et al., 2003; Santiskulvong and Rozengurt, 2003; Chiu et al., 2005; Amorino et al., 2007), e portanto contribui para o acoplamento entre GPCRs e progressão do ciclo celular (figura 3).

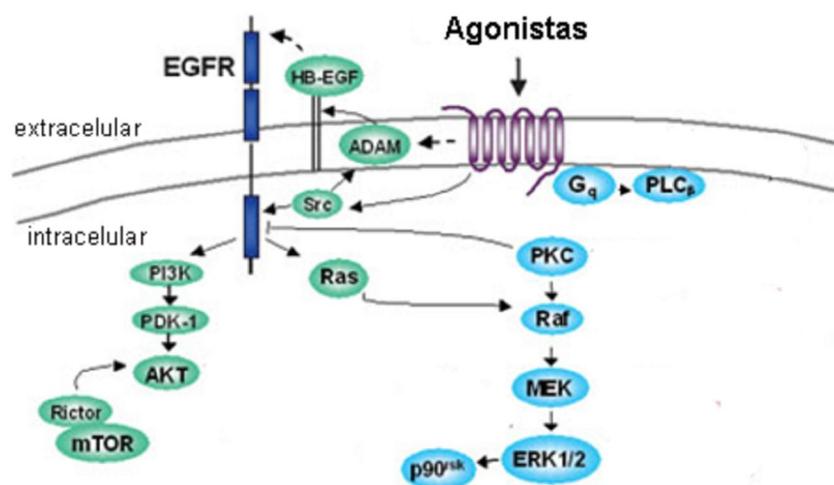


Figura 3: **Vias ativadas pela ligação de um agonista mitogênico a GPCR.** Transativação de EGFR pode ser mediada pela liberação de formas precursoras de ligantes para EGFR através da ativação de metaloproteínas da família ADAM. EGFR também pode ser diretamente fosforilado por Src cinase. A transativação de EGFR induzida por GPCR pode modular as vias de Ras/Raf/MEK/ERK/p90RSK e PI3-cinase/Akt.

Em muitos casos, a transativação de EGFR induzida por GPCR é mediada pela liberação de formas precursoras de ligantes de EGFR: HB-EGF, TGF- α , e/ou anfiregulina (Prenzel et al., 1999; Gschwind et al., 2003; Santiskulvong and Rozengurt, 2003; Schafer et al., 2004a) por meio da ativação de membros da família das metaloproteinases (ADAM) (Asakura et al., 2002; Sunnarborg, et al., 2002; Yan et al., 2002; Gschwind et al., 2003; Schafer et al., 2004b; Amorino et al., 2007). O mecanismo pelo qual GPCR estimula a ativação de ADAM ainda permanece pouco claro (Ohtsu et al., 2006).

Em adição aos múltiplos sítios de autofosforilação, EGFR também é fosforilado na Tyr-845, um sítio exclusivo de fosforilação para Src (Biscardi et al., 1999; Tice et al., 1999). Como indicado acima, agonistas para GPCR induzem uma rápida e transiente ativação de membros da família Src em uma variedade de tipos celulares (Rodrigues-Fernández and Rozengurt, 1996; Amorino, et al., 2007) pelo menos em parte através do recrutamento de β -arrestina para o GPCR estimulado (Luttrell et al., 1999; Buchanan et al., 2006) e este induz a fosforilação da Tyr-845 em EGFR (Santiskulvong and Rozengurt, 2003). Interessantemente, o inibidor de amplo espectro para metaloproteinases, GM6001, evita a fosforilação de EGFR na Tyr-845 de um modo tão eficiente quanto ele bloqueia a fosforilação de Tyr-1068 um conhecido sítio de autofosforilação (Santiskulvong and Rozengurt, 2003). Resultados similares foram encontrados recentemente em outro tipo celular (Amorino et al., 2007). Estes resultados levantam a possibilidade de que agonistas de EGFR gerados pela clivagem de seus precursores presentes na membrana através de ADAM colaboram com Src cinases na promoção da transativação de EGFR induzida por GPCR. Uma vez que Src proporciona a liberação de ligantes de EGFR em alguns modelos celulares (Pierce et al., 2001), é plausível que Src contribua para a transativação de EGFR desencadeada por GPCR em várias etapas

deste mecanismo de “cross-talk” entre receptores, como indicado na figura 3.

A transativação de EGFR em resposta a GPCR também pode ser mediada por meio de mecanismos que independem de ADAM, pelo menos em alguns tipos celulares. Por exemplo, em células de câncer de colo, a transativação de EGFR em resposta a prostaglandina (PGE_2) parece ocorrer através de uma via envolvendo o receptor para prostaglandina (GPCR- EP_2), arrestina e Src (Buchanan et al., 2006). Interações entre os receptores para angiotensina II e EGFR também foi implicada no estímulo da transativação do receptor de EGF (Hunyady and Catt, 2006).

Reunidos, estes resultados apontam uma série de mecanismos que podem potencialmente contribuir para a transferência de GPCRs para RTKs. Assim, proteínas cinases, “scaffold” proteínas e proteínas tirosina fosfatases (PTPs – cuja participação em vias de sinalização celular será discutida em seções posteriores desta Tese) deveriam ser consideradas como mediadores desta comunicação cruzada entre GPCR/RTK em adição aos mecanismos tradicionais (metaloproteinases e liberação de fatores de crescimento).

I.4 - A sinalização por RTK e GPCR convergem na cascata de MAP cinase

Moléculas com um papel crucial na transmissão de sinais proliferativos são membros da família das MAPK, a qual inclui as cinases reguladas por sinal extracelular (ERKs). A atividade enzimática das ERKs aumenta em resposta a estímulos mitogênicos. A ativação de receptores de tirosina cinase promove a ativação de MAPKs em um processo com várias etapas como descrito abaixo.

1.4.1 - MAP cinases: função e regulação

As proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) encontram-se, geralmente, em

todos os tipos celulares, elas regulam respostas específicas que diferem de um tipo celular para outro. As MAPKs mais estudadas são ERK 1 e 2 (daqui em diante frente ERK1/2), p38 (p38 α , β , γ e δ), JNK 1, 2 e 3 (c-Jun N-terminal kinase) e ERK5.

ERK1/2 MAP cinases, são cinases de resíduos serina/treonina altamente conservadas que fosforilam diversos substratos, incluindo outras proteínas cinases (p90rsk, Raf-1, MEK), fatores de transcrição (c-myc, c-jun, c-fos, HIF1, p62TCF), enzimas (cPLA₂) e proteínas da superfície celular (EGFR), tendo, deste modo, muitos efeitos sobre a fisiologia celular e expressão gênica (Chang and Karin, 2001; Pouyssegur and Lenormand, 2003). Em células de mamíferos, ERKs são ativadas a partir do estímulo de receptores tirosina cinase, receptores acoplados a proteínas G e integrinas (Widmann et al., 1999).

ERKs são ativadas através de fosforilações seqüenciais, em resposta a uma extensa variedade de estímulos extracelular, estando envolvidas em diversas atividades celulares. Seu papel na progressão do ciclo celular estimulada por fator de crescimento é bem conhecida, mas também ERK regula diferenciação celular, migração, sobrevivência e outros processos biológicos (Marshall et al., 1995; Bonni et al., 1999; Tunquist and Maller, 2003; Huang et al., 2004). A ativação de ERK pode, então, dependendo da situação, resultar em efeitos opostos: proliferação celular/parada do ciclo celular, sobrevivência/morte celular, e assim por diante (Traverse et al., 1994; Le Gall et al., 2000; Zugasti et al., 2001). Evidências crescentes têm demonstrado que diferença na duração, magnitude e compartimentalização de ERK determina a especificidade da resposta.

1.5 - Fosfatases em transdução de sinal

O equilíbrio celular da fosforilação de proteínas em resíduos de tirosina é conseguido através da ação de PTKs (proteínas tirosina cinase) e PTPs (proteínas tirosina fosfatases). A

percepção de que o rompimento deste equilíbrio de fosforilação das proteínas em resíduos de tirosina causa diversas doenças exemplifica a importância de controlar a atividade de PTKs e PTPs (Tonks, 2006).

A distinta, mas complementar função destas enzimas é enfatizada por estudos recentes nos quais as cinases têm sido implicadas em controlar a amplitude de uma resposta celular, enquanto as fosfatases parecem desempenhar um importante papel em controlar a velocidade e a duração da resposta (Hornber et al, 2005).

I.5.1 - Proteínas tirosina fosfatases (PTPs) em sinalização celular

Proteínas tirosina fosfatases (PTPs) são conhecidas por remover grupos fosfato e regular a atividade de proteínas fosforiladas em resíduos de tirosina envolvidas em inúmeras vias de sinalização celular (Neel and Tonks, 1997; Denu and Dixon, 1998). Membros da família PTPase são caracterizadas por uma seqüência no sítio ativo altamente conservada, conhecida como HC(X₅)R(S/T), onde o ambiente ao redor do grupo tiol da cisteína reduz o pKa em algumas ordens de magnitude (Neel and Tonks, 1997; Denu and Dixon, 1998; Tonks and Neel, 2001; den Hertog et al., 2005). A reatividade aumentada resultante do pKa menor torna a cisteína presente no sítio catalítico um alvo para modificação por oxidação e esta modificação bloqueia a capacidade destas enzimas de defosforilar seus alvos, uma vez que esta reação é mediada pela transferência do grupo fosfato do substrato para esta cisteína, seguida de rápida hidrólise do fosfato. De fato, a inibição de PTPase por oxidação mostrou ser importante na regulação do nível de fosforilação de componentes-chaves de algumas vias de sinalização. Peróxido de hidrogênio ou superóxido produzidos em resposta à ativação de EGFR ou IR (receptor de insulina) inibe PTPase e aumenta a fosforilação em resíduos de tirosina destes receptores (Lee et al, 1999; Mahadev et al, 2001; Bae et al, 2000).

Inúmeros estudos têm mostrado a inibição de PTPs por espécies reativas de oxigênio produzidas endógenamente, e também que a exposição de PTPs purificadas a doadores do óxido nítrico (radical livre com propriedades sinalizadoras que será melhor descrito nas próximas seções desta Introdução) leva a reversível inibição destas enzimas (Xian et al., 2000; Li and Whorton, 2003).

I.6 - O óxido nítrico (NO[•])

Óxido nítrico (NO[•]) é um radical livre gasoso produzido universalmente por organismos distribuídos por todos os filos, indo de bactéria a humanos. O NO tem um elétron desemparelhado e é por esta razão um radical livre capaz de reagir com outras moléculas. Este fato faz com que o NO tenha uma meia vida curta. Apesar disto ele é um potente mensageiro biológico participando em uma grande diversidade de funções biológicas. A descoberta de novos alvos do NO como regulador fisiológico de diversas funções vitais em vertebrados superou as expectativas sobre a versatilidade das ações deste mensageiro biológico, o qual foi primeiro reconhecido devido a sua participação relevante no controle do tônus vascular. Após a caracterização do NO como o fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF) (Furchgott et al., 1980; Palmer et al, 1987; Ignarro, 2002), diversas linhas de pesquisas sobre o NO e suas funções vem se desenvolvendo e pelo menos mais duas funções essenciais para este radical já foram bem caracterizadas, a funcionalidade dos neurônios (Prast and Philippu, 2001) e a resposta imune (MacMicking, et al., 1997).

O NO é gerado a partir do aminoácido L-arginina e O₂, em uma reação catalisada pelas enzimas óxido nítrico sintetase - NOS (Figura 4), e potencialmente pela redução de espécies de óxido de nitrogênio (NO_x) que são derivadas de fontes endógena e exógenas. Genes separados codificam para NOS neuronal (nNOS ou NOS1) e para NOS endotelial

(eNOS ou NOS3), as quais foram nomeadas de acordo com o tecido no qual foram originalmente descobertas, bem como para NOS induzível/ Ca^{2+} independente (i-NOS ou NOS2). Apesar de nNOS e eNOS serem expressas constitutivamente (c-NOS), seus níveis de expressão podem ser estimulados, e paradoxalmente iNOS pode ser expressa constitutivamente. As células podem expressar mais que uma isoforma de NOS, em diferentes compartimentos celulares (Ignarro, 1990; Moncada et al., 1991).

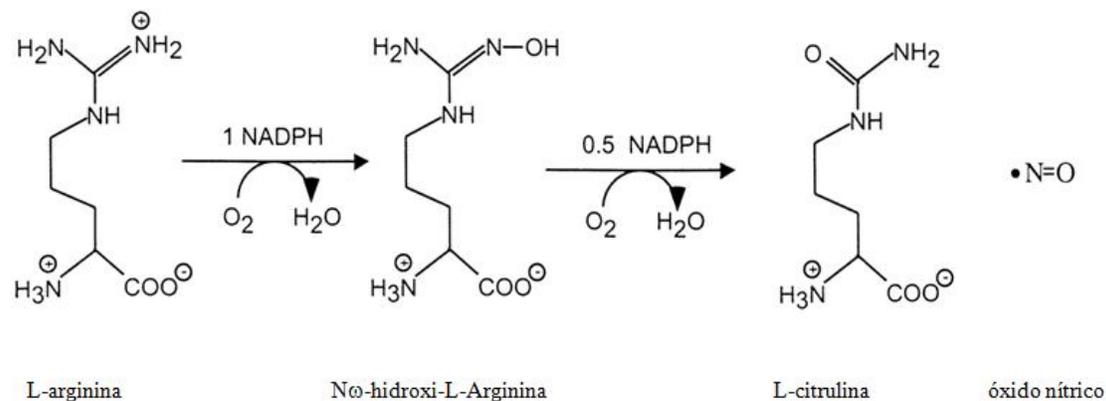


Figura 4: **As reações de síntese do óxido nítrico catalisadas por NOS.** Também são mostrados o NADPH e o oxigênio utilizados na reação.

Substâncias que elevam a concentração de cálcio intracelular como trombina, ADP, acetilcolina, e o ionóforo de cálcio A23187 (Nathan et al, 1992; Moncada and Higgs, 1993), são capazes de ativar as c-NOS. A c-NOS de células endoteliais possui sítios de ligação para calmodulina (CaM) e sofre modificações pós-tradução (miristilação, isoprenilação, fosforilação) que podem regular a sua localização na célula e sua atividade (Michel and Li, 1993). Por outro lado, a isoforma induzível que se encontra, entre outros tipos celulares, em macrófagos e em células do tecido muscular liso é independente de cálcio podendo ser induzida por lipolissacarídeo de parede bacteriana (LPS), interleucina 1 β (IL-1 β), interferon γ ou ainda pela combinação destas citocinas com a endotoxina (Nathan, 1992). Marezin et al,

1993, mostraram que a síntese de NO em células musculares lisas de aorta de rato estimuladas com LPS ou IL-1 β é suprimida na presença de inibidores da atividade de tirosina cinase. Estas observações sugerem o envolvimento destas atividades, na indução de expressão da i-NOS nestas células, tanto por LPS como por IL-1 β . iNOS é controlada por mediadores inflamatórios e citocinas e produz um fluxo elevado de NO, enquanto nNOS e eNOS produzem pequenas quantidades de NO.

A expressão da eNOS é regulada por mecanismos de natureza transcricional e pós-transcricional em resposta a um extenso número de estímulos (Fleming and Busse, 2003). Apesar da atividade de eNOS está acoplada a mudanças nos níveis de cálcio, somente um aumento nas quantidades de Ca²⁺ não é suficiente para afetar a atividade da enzima, porque a ligação a CaM (Bredt and Snyder, 1990; Forstermann et al., 1991) e o fluxo de elétrons a partir da redutase para o domínio oxigenase da enzima é dependente da fosforilação e defosforilação da enzima. Dois aminoácidos parecem ser particularmente importantes na regulação da atividade de eNOS, a saber: um resíduo de serina 1177 (sequência eNOS bovina, ser1179 eNOS humana) localizado dentro do domínio redutase e um resíduo de treonina 495 localizado dentro do domínio de ligação a CaM (Thr495). Alterações simultâneas na fosforilação de Ser1177 e Thr495 são reguladas por inúmeras cinases e fosfatases que se associam e dissociam-se do complexo de sinalização de eNOS. Proteínas associadas à eNOS, tais como caveolina-1 (Garcia-Cardena et al., 1997; Bucci et al., 2000), proteína de choque térmico – Hsp90 (Garcia-Cardena et al., 1998; Gratton et al., 2000; Russel et al., 2000), proteína de interação a NOS – NOSIP (Dedio et al, 2001) e, possivelmente, também proteínas motoras (Cao, 2001), fornecem a plataforma para a formação do complexo de sinalização de eNOS e também sua localização intracelular.

I.6.1 - Óxido nítrico e seus alvos

Diversos trabalhos têm demonstrado a existência de uma série de alvos celulares para o NO e espécies químicas relacionadas a este. Dentro deste grupo de proteínas e enzimas com propriedades sinalizadoras capazes de serem ativadas e desativadas por NO, a primeira a ser caracterizada foi a forma solúvel da enzima guanilato ciclase (Gruetter, 1980).

Além disso, logo foi reconhecido que além da bem caracterizada ligação de NO ao ferro heme da guanilato ciclase, o NO pode modificar as proteínas por S-nitrosilação, que é a adição de NO ao grupo tiol de uma cisteína (para gerar um S-nitrosotiol, SNO) (Stamler et al., 1992). Nas últimas décadas o número de comunicações sobre substratos modificados por S-nitrosilação tem crescido significativamente (Stamler et al., 2001) (Tabela 1), o que é consistente com a ampla distribuição e a presença de tióis em posições regulatórias e/ou sítio ativo em diversas classes de proteínas. Estudos iniciais baseavam-se em grande extensão sobre análises *in vitro* usando fontes exógenas de NO, o que não necessariamente recapitula o ambiente celular. No entanto, um número substancial de trabalhos recentes, tem implicado diretamente a reação de S-nitrosilação na regulação de inúmeras vias de sinalização em sistemas celulares intactos, e evidências genéticas recentes dão suporte a uma diversidade de papéis reguladores para esta modificação pós-tradução (Arnelle and Stamler, 1995; Jaffrei et al., 2001; Liu et al., 2004; de Jesús-Berríos et al., 2003; Hess et al., 2005).

Tabela1. Alvos conhecidos de óxido nítrico em sinalização redox

Proteína sinalizadora	Referências
Caspases: pró-caspase3	Mannick, 1999
Fosfatases: PTP1B, SHP1, SHP2	Caselli, 1995; Calsen, 1999; Xian, 2000
Enzimas do metabolismo arginina: DDAH	Leiper, 2002; Hao, 2004
Tiorredoxina	Haendeler, 2002; Arai, 2006
JNK	Park, 2000
Src	Hoffman, 2001; Monteiro, 2000; Akhand, 1999
NSF ATPase	Matsushita, 2003
GTPases monoméricas: p21 Ras; Dexas	Lander, 1995; Jaffrey, 2002
Receptor NMDA	Lipton, 1993; Choi, 2000
Fatores de transcrição: OxyR, HIF1	Hausladen, 1996; Kim, 2002; Yasinska, 2003
p53, NF- κ B	Schonhoff, 2002; dela Torre, 1999; Marshall and Stamler, 2001
Metaloproteinases	Gu, 2002; Zhang, 2000

O cenário atual reflete uma consciência crescente de que S-nitrosilação é uma modificação pós-tradução que é precisamente regulada no tempo e no espaço (Stamler et al., 2001; Foster et al., 2003; Lane et al., 2001; Boehning and Snyder, 2003; Barouch et al., 2002; Gow et al., 2002). A regulação temporal (acoplada a estímulo) de S-nitrosilação/denitrosilação e a regulação espacial (distribuição dos alvos) de S-nitrosilação dentro e entre proteínas conferem especificidade aos efeitos derivados de NO.

Exposição de células intactas a NO/SNO exógeno ou indução de iNOS inibe a atividade de PTP e resulta em um aumento nos níveis de proteínas fosforiladas em tirosina - os substratos de PTP (Caselli et al., 1995; Calsen et al., 1999; Xian et al., 2000). Estudos usando proteínas isoladas e células intactas indicam que a proteína tirosina fosfatase (PTP-1B), é um substrato para S-nitrosilação (Xian et al., 2000; Li and Whorton, 2003). Evidências para a regulação fisiológica de PTPs por S-nitrosilação foram demonstradas por Mikkelsen and Wardman, que descreveu a S-nitrosilação de resíduos de cisteína presentes no sítio ativo de SHP-1 e SHP-2, após estímulo por meio de irradiação.

A nitrosilação do ferro heme da guanilato ciclase, pode elevar os níveis de guanilil mono fosfato cíclico (cGMP), ativando a proteína cinase dependente de cGMP (Ignarro, 1990). O NO produzido por células endoteliais promove o relaxamento de células musculares lisas através da reação com o ferro-heme presente no sítio ativo da guanilato ciclase, controlando desta maneira o tônus muscular (Murad, 1994). Elevação dos níveis intracelulares de cGMP por ação do NO em plaquetas humanas inibe a agregação das mesmas (Salvemini and Botting, 1993).

Lander et al., (1995) mostraram que a proteína p21Ras também pode ser ativada pela ação direta do NO, resultando em níveis mais elevados de p21Ras-GTP (forma ativada de Ras). Esta ativação é reversível e ocorre através da S-nitrosilação de um resíduo de cisteína essencial, Cys118. A nitrosilação deste resíduo provoca em Ras a troca de GDP por GTP, fazendo com que o NO comporte-se como um fator de troca de nucleotídeos guanina (GEF). A proteína Ras ativada (Ras-GTP) atua como um intermediário central no fluxo de informações gerado a partir de proteínas com atividade de tirosina cinase (receptores ou não receptores) que se fosforilam e dão início a uma cascata de reações catalisadas por outras proteínas cinases.

I.7 - Ativação de receptores de tirosina cinase mediada por estresse celular

Os RTKs podem ser ativados na ausência de ligantes fisiológicos. O primeiro exemplo para tal ativação foi relatado em 1989, quando se verificou que choque hiperosmótico estimula a fosforilação em resíduos de tirosina dos receptores para o fator de crescimento epidérmico (EGFR) e HER2/c-erbB2 (outro membro da família) (King et al., 1989). Mais tarde foi mostrado que, as radiações ultravioleta (UV) e γ , vários oxidantes como H_2O_2 , permanganato e metais pesados, bem como o agente alquilante de grupos tióis, iodoacetamida

induzem rápida fosforilação em resíduos de tirosina em vários RTKs e presumivelmente de todos aqueles que são expostos na superfície celular (Knebel et al., 1996; Weiss et al., 1997). Uma característica comum destes diversos estímulos é que eles podem interferir com a ação de PTPs seja diretamente ou através de agentes secundários. Isto ocorre ou por inibição reversível da atividade de defosforilação por oxidação de um grupo SH cataliticamente importante nestas enzimas ou irreversivelmente por alquilação deste mesmo resíduo de cisteína.

Várias evidências experimentais reportadas na literatura suportam este modo de geração de sinal através de RTKs (Knebel et al., 1996; Lee et al, 1998; Cunnick et al, 1998), o que leva a conclusão que a fosforilação em resíduos de tirosina e ativação de RTK (e possivelmente em proteínas tirosina cinases citoplasmáticas) necessita ser antagonizada pela ação das PTPs. A eliminação deste controle negativo por mecanismos fisiológicos ou não fisiológicos resulta na liberação de seu potencial sinalizador. Experimentos com o precursor de glutationa, N-acetil-L-cisteína, o qual previne a ativação de EGFR por radiação UV, ácido iodo acético ou H_2O_2 , e também pelo ligante natural EGF (Knebel et al., 1996; Huang et al., 1996; Monteiro and Stern, 1996) evidenciam o modo de regulação de RTKs baseado em PTPs e estabelecem um papel crucial de elementos de regulação celular redox na sinalização por RTKs em condições fisiológicas.

Trabalhos anteriores de nosso grupo mostraram que o nível intracelular de proteínas fosforiladas em tirosina é incrementado em células HER14 de fibroblastos de camundongo, quando incubadas com SNP ou SNAP (Peranovich et al, 1995). Quando células HER14 são incubadas com doadores de NO, um grupo de proteínas com peso molecular aparente de 126, 56 e 43 kDa são fosforiladas em resíduos de tirosina. A pré-incubação das células com oxihemoglobina ou azul de metileno bloqueia o incremento de fosforilação. A inibição pelo

azul de metileno sugere a participação de cGMP no processo. Esta hipótese foi confirmada quando da utilização do 8-Br cGMP, um análogo estável de cGMP, que estimulou a fosforilação do mesmo grupo de proteínas fosforiladas sob ação dos doadores de NO. Em trabalho publicado posteriormente pelo grupo, as três proteínas foram identificadas como sendo as PTKs, FAK e Src cinase, de 126 e 56 kDa, respectivamente; e a proteína de 43 kDa que foi identificada como sendo uma das ERKs (Monteiro et al, 2000).

Além da ação direta sobre fosforilação, NO é capaz de estimular a atividade de tirosina cinase de EGFR. Quando as células são incubadas simultaneamente com SNP e EGF ocorre a fosforilação em resíduos de tirosina do mesmo grupo de proteínas fosforiladas por ação direta do doador de NO, entretanto, deve ser salientado que nestas condições experimentais, não foi observado estímulo da autofosforilação do receptor de EGF acima dos níveis obtidos somente com o fator de crescimento (Peranovich et al., 1995). Em trabalho recente do nosso grupo de pesquisa (Oliveira et al, 2003), demonstramos que tanto cGMP (de maneira indireta) quanto NO (diretamente) ativam p21Ras. Como consequência desta ativação, p21Ras interage com a proteína cinase Raf-1, desencadeando a cascata de sinalização compreendida por Raf-1 / MEK / ERK. Mostramos também que um alvo importante desta cascata de sinalização é o EGFR que se autofosforila no processo (Figura 5). Estes resultados sugeriram fortemente que a sinalização mediada por NO através de p21Ras tem como resultado a ativação do EGFR. Estes eventos de sinalização podem estar relacionados à participação do NO no processo de angiogênese. Apesar da participação importante do cGMP, as proteínas cinases G, aparentemente, não desempenham um papel relevante no modelo experimental estudado.

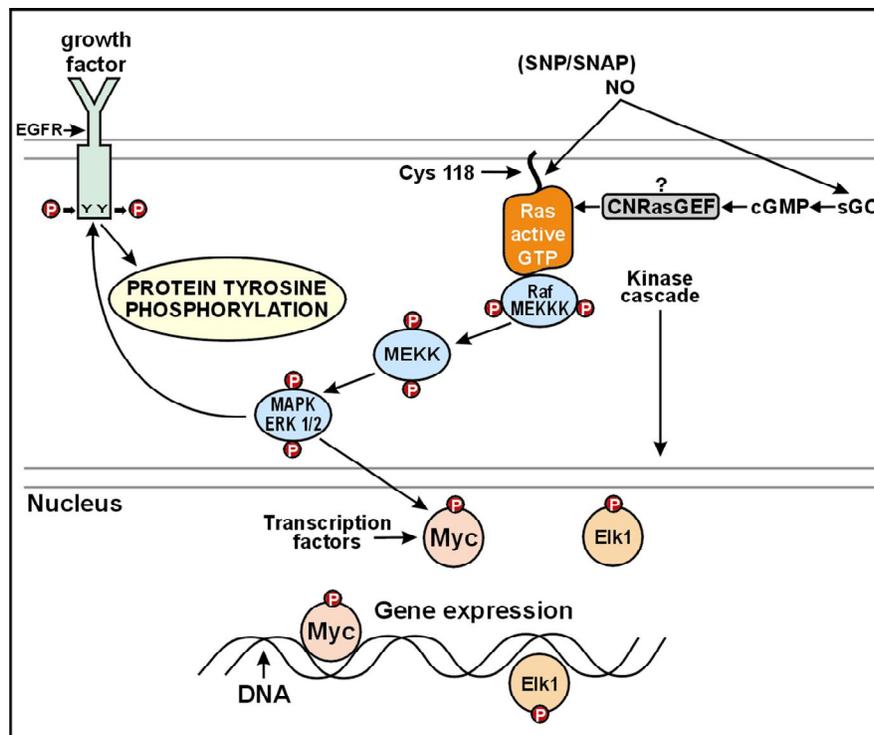


Figura 5: Participação de NO em algumas vias de sinalização em células endoteliais de aorta de coelho (RAEC). De acordo com este modelo, três vias distintas estão integradas: ativação da guanilato ciclase, ativação da proteína G de baixo peso molecular p21Ras e estímulo da atividade do EGFR.

I. 8 - Células endoteliais

O sistema vascular é uma complexa rede de vasos conectando o coração com diversos órgãos e tecidos para manter sua homeostase em resposta a mudanças fisiológicas e patológicas. Células endoteliais constituem a chamada camada íntima da parede arterial e desempenham um papel muito importante no desenvolvimento e no remodelamento do sistema vascular, na manutenção do tônus, fluidez sangüínea, coagulação, troca de nutriente e desenvolvimento de órgãos. Além disso, de maneira similar às células musculares lisas, as células endoteliais são muito importantes em processos inflamatórios. Estas células, sob

estímulo físico, químico ou hormonal, produzem uma variedade de fatores tais como: o óxido nítrico (NO), o ânion superóxido (O_2^-), prostaciclina, endotelina, fator ativador de plaquetas, fator de hiperpolarização derivado do endotélio, interleucinas, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF) (Flavahan, 1992).

I.8.1 - Bradicinina

Bradicinina (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) é gerada a partir da ação de calicreínas sobre seu substrato cininogênio e age via pelo menos 2 subtipos de receptores, B1 e B2, membros da família de receptores acoplados a proteína G (GPCR) (Bhoola et al., 1992). O receptor B2 é constitutivamente expresso em vários tecidos e é responsável pela maioria dos efeitos de BK. Em contraste, o receptor B1 tem maior afinidade pelos metabólicos de cininas, e sua expressão é induzida sob condições patológicas Regoli and Barabé, 1980; Mencke et al., 1994.

A maioria das ações biológicas de bradicinina é mediada através de receptores B2, os quais sinalizam via proteína $G_{q/11}$ levando a um aumento nas $[Ca^{2+}]_i$ e ativação de PKC em diferentes tipos celulares Enomoto et al., 1995; Ankorina-Stark et al., 1997; Wiernas et al., 1998). Receptores B2 para bradicinina em células endoteliais modulam vasodilatação, mudanças na permeabilidade vascular, mitogênese, e a expressão de moléculas de adesão, entre outras respostas (Kaplan, 1998). A complexa rede de respostas celulares geradas por bradicinina, inclui o estímulo da cascata de MAPK e a ativação da eNOS.

Alguns dos transdutores que são essenciais para a resposta a bradicinina, (o receptor B2 de bradicinina, componentes da via das MAPK e eNOS), podem estar localizados em cavéolos em células endoteliais. Cavéolos servem como sítios para o seqüestro de diversas proteínas sinalizadoras, incluindo receptores acoplados a proteína G, receptores para fatores

de crescimento, proteínas G, proteínas cinases, e NOS (Shaul and Anderson, 1998).

I.8.2 - Shear Stress

As células endoteliais vasculares estão expostas a uma variedade de forças mecânicas *in vivo*, resultantes do fluxo sanguíneo pulsátil. Dentre essas forças, destaca-se a força de shear stress, a qual é tangencial à parede do vaso, e é produzida pelo atrito com o fluxo sanguíneo viscoso. O fluxo sanguíneo é desorganizado e inconstante em regiões propensas a aterosclerose (pontos ramificados e áreas curvas) em contraste ao relativamente simples fluxo laminar nas partes retas da aorta. Assim, neste trabalho o termo “shear stress” é usado para designar a força resultante do fluxo laminar simples (usualmente com um shear stress de 10 a 20 dinas/cm²).

Células endoteliais agem com uma interface sensora para transmitir forças hidrodinâmicas. Diversos estudos sugerem que integrinas, receptores tirosina cinase (RTKs), canais iônicos, receptores acoplados a proteínas (GPCR), proteínas G triméricas e moléculas de adesão estão envolvidas na detecção do shear stress por células endoteliais (Li et al., 2005).

Estudos sobre os eventos de sinalização intracelular em células endoteliais mostram que o shear stress ativa diversas moléculas sinalizados, incluindo, proteína cinase C (PKC), FAK, c-Src, GTPases da família de Rho, PI3K e MAPKs. Deste modo, shear stress pode ativar múltiplas moléculas mecano sensoras e levar ao início e propagação de sinais através de uma rede de vias, as quais modulam expressão gênica e funções celulares como, proliferação, apoptose e migração.

Esta força afeta a estrutura das células endoteliais e função, e é a principal determinante do remodelamento vascular, tônus arterial e aterogênese (Davies, 1995; Gimbrone et al., 2000). Fisiologicamente, shear stress é o mais importante estímulo para a

contínua formação de NO nos vasos (Rubanyi et al., 1986; Kuchan and Frangos, 1994). O NO derivado do endotélio tem um papel crítico na regulação local da homeostase vascular. Um decréscimo na disponibilidade de NO é um aspecto característico em pacientes com doença arterial coronária e promove o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas (Moroi et al., 1998). Em adição, fluxo sanguíneo e NO parecem ter um importante papel em angiogênese (Carmeliet, 2000; Ziche, et al., 1994; Papapetropoulos, et al., 1997).

I.9 - O processo de angiogênese

O processo de angiogênese é complexo e envolve duas fases distintas. A fase inicial se caracteriza pela ativação do crescimento de células endoteliais, proliferação, migração e formação do tubo (Folkman and Shing, 1992). Fatores de crescimento como bFGF e VEGF são potentes estimuladores de proliferação e migração. A fase posterior envolve a rediferenciação das células endoteliais. Alguns estudos mostraram que o NO é responsável pela produção do bFGF, podendo ser a molécula chave desta ativação (Goldman et al, 1993).

Angiogênese é regulada, predominantemente, por cascatas de sinalização iniciadas por receptores com atividade de tirosina cinase estimulados por seus respectivos ligantes. Além disso, recentemente, foi relatado sobre o papel de p21Ras-GTP na ativação do receptor de EGF em células tumorais da epiderme. Os autores também demonstraram que a sinalização a partir do receptor de EGF é responsável pela indução de VEGF o qual em retorno promove angiogênese (Casanova et al, 2002). Estes achados foram corroborados em outro estudo, onde os autores descrevem as propriedades anti-angiogênicas de ZD1839, um inibidor seletivo da atividade de tirosina cinase do receptor de EGF (Hirata et al, 2002). Portanto, as evidências apontam para um papel positivo do receptor de EGF sobre proliferação de células endoteliais microvasculares. Provavelmente, através da indução de fatores angiogênicos tais como VEGF

(Casanova et al, 2002; Hirata et al, 2002).

I.9.1 - O papel de NO em angiogênese

Em adição, NO também pode ter um importante papel em angiogênese, visto que foi mostrado que NO media os efeitos mitogênicos estimulados por VEGF em células endoteliais microvasculares (Morbideilli et al, 1996). Alguns estudos in vitro estabeleceram diretamente o papel de NO em angiogênese (Ziche et al., 1994; Ziche et al., 1997). Foi mostrado que tratamento de células HepG2 com o doador de NO SNAP, aumenta a expressão do mRNA de VEGF. Por outro lado, existe também considerável evidência que NO regula negativamente a expressão do gene de VEGF (Tsurumi, 1997; Sogawa, 1998). Apesar de algumas observações conflitantes, acredita-se que a ativação de angiogênese em monócitos humanos é dependente de NO (Leibovich, 1994). Uma correlação positiva foi encontrada entre óxido nítrico sintetase, níveis de cGMP e angiogênese em tumores de cabeça e pescoço (Gallo et al, 1998). Entretanto, o papel de NO em angiogênese é ainda controverso, pois se um número significativo de estudos demonstra que NO pode estimular a proliferação de células endoteliais, outros falharam em provar tal mecanismo e sugerem um efeito inibitório de NO sobre proliferação de células endoteliais (Garg and Hassid, 1990; Gooch, 1997).

II. Objetivos

II.1 – Objetivo geral

O presente estudo investigou a participação do NO produzido endogenamente como um modulador da atividade de EGFR em células endoteliais. Ainda, verificamos se uma vez ativado, EGFR desempenhava alguma função no processo de angiogênese.

II.2 – Objetivos específicos

- verificar de que modo NO está modulando a atividade de EGFR;
- verificar a expressão de VEGF e se este contribui para a resposta desencadeada pela transativação do EGFR.

II.3 - Viabilidade e Relevância

O processo de angiogênese é predominantemente regulado por cascatas de sinalização que envolvem a participação de receptores com atividade de tirosina cinase estimulados por bFGF e VEGF. Além disso, recentemente, foi relatado o papel de p21Ras ativada na estimulação do EGFR em células tumorais da epiderme. Os autores também demonstraram que a sinalização a partir do EGFR é responsável pela indução de VEGF o qual, em retorno, promove angiogênese (Casanova et al., 2002). Estes achados foram corroborados em outro estudo, onde os autores descrevem as propriedades anti-angiogênicas de ZD1839, um inibidor seletivo da atividade de tirosina cinase do receptor de EGF (Hirata et al., 2002). Portanto, as evidências apontam para um papel positivo do receptor de EGF na proliferação de células endoteliais. Em adição, diversos trabalhos relacionam aumentos na produção de NO ao processo de angiogênese.

Resultados obtidos em nosso laboratório apontam para uma integração das diferentes cascatas de sinalização mediadas por NO. Esta integração inclui a via clássica que envolve a ativação da enzima guanilato ciclase, e outra que começa a ser detalhada envolvendo a fosforilação de resíduos de tirosina e S-nitrosilação. Assim, com os resultados que obtivemos delineamos o seguinte modelo: 1) NO e cGMP podem agir em conjunto para estimular a atividade de p21Ras e esta ativação é requerida para a fosforilação em resíduos de tirosina estimulada por NO/cGMP em células endoteliais de aorta de coelho; 2) p21Ras ativado por NO/cGMP transmite seus efeitos através da via Raf-1, MEK1 e ERK1/2; 3) a ativação das ERK1/2 antecede a ativação do receptor de EGF, o qual tem um importante papel nas vias de sinalização desencadeadas por NO/cGMP, presentemente descritas (figura 5; Oliveira et al., 2008).

Agora, faz-se necessário verificar como e se estes eventos se relacionam com a ativação do receptor de EGF, e ainda, se a ativação deste receptor por NO é suficiente para promover proliferação e angiogênese em células endoteliais.

III. Materiais e Métodos

III.1 – Materiais

III.1.1 - Plasmídeos:

prK5EGF-R WT – contém a seqüência original para o receptor de EGF humano (HER) sob o controle do promotor de citomegalovírus (pCMV).

prK5EGF-R KD – contém uma mutação pontual no aminoácido 745, onde houve a troca de uma lisina por uma alanina (HER K745A), a qual elimina a atividade de cinase do receptor.

prK5 – vetor de expressão em células de mamíferos, onde foi clonada a seqüência para o receptor de EGF selvagem e mutado

pSV2neo – contém marca de resistência para geneticina, será co-transfectado com o vetor de expressão

III.1.2 - Anticorpos:

Anti-EGF Receptor – anti IgG monoclonal - Sigma

Anti-EGF Receptor – anti IgG monoclonal – Upstate

Anti-rabbit IgG e anti mouse IgG conjugados com peroxidase - Amersham Pharmacia

Ant- Fosfo-ERK1 e ERK2 – anti IgG policlonal – New England Biolabs

Anti-ERK 1 e ERK2 – anti IgG policlonal – New England Biolabs

Anti-fosfo 527 src – anti IgG policlonal – Cell Signaling

Anti-PY20 - anti IgG monoclonal - Upstate Biotechnology

Anti-fosfo 416 src – anti IgG policlonal – Cell Signaling

Anti-src total – anti IgG monoclonal – Cell Signaling

Ant- β -actina – anti IgG monoclonal - Upstate

Anti-mouse IgG conjugado com FITC

Anti-bromodeoxiuridina – anti IgG monoclonal – Amershan Pharmacia

Anti-fosfo-treonina-prolina (PTP101) – anti IgG monoclonal – Cell Signaling

Anti-PTP 1C – anti IgG monoclonal – Signal Transduction

Anti-nitrosocisteínas – anti IgG monoclonal –

Anti Fosfo-eNOS – anti IgG policlonal – Cell Signaling

Anti eNOS – anti IgG polyclonal – Cell Signaling

III.1.3 - Hormônios, Fatores de Crescimento e Outros

Bradicinina (Sigma) - solução estoque 10^{-6} M

EGF (Sigma) – 0.1 μ g/ml em 1% BSA

L-NAME (N^G -nitro-L-arginine methyl éster - Sigma) – 500 mM em água

ODQ - 1H-[1,2,4]Oxodiazolo[4m3-a]quinoxalin-1-one (Calbiochem) – 50 mM em DMSO

Bisindolilmaleimida I (Calbiochem) – 2,5mM em DMSO

PD98059 – 50 mM em DMSO

BIBX – 4 mM em DMSO

SU 5416 – 10 mM em DMSO

NEM – N-ethylmaleimida - 1 mM em água

III.1.4 - Inibidores de Fosfatases e Proteases

Ortovanadato de sódio ativado – solução estoque 200 mM em água bidestilada

Aprotinina – solução estoque 1 mg/ml em 0,01 M HEPES pH 7,0

Leupeptina – solução estoque 1mg/ml em etanol absoluto

PMSF – solução estoque 1 mg/ml em isopropanol

NaF – solução estoque 500 mM

NaPyr – solução estoque 100 mM

III.1.5 - KITS

ECL Western blotting (Amersham Pharmacia) - Western blot

Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate

Gene Juice Transfection Reagent - Novagen

SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)

III.1.6 - Drogas e Antibióticos:

Ampicilina (Sigma) - solução estoque 100 mg/ml em água, seleção de bactérias transformadas com plasmídeos contendo marca de resistência para ampicilina

Streptomicina/Penicilina (Sigma) – 100 U/ml streptomicina/100µg/ml penicilina

Geneticina (Gibco) - solução estoque 100 mg/ml em água, seleção de clones de células de mamíferos.

III.1.7 - Soro e meio de cultura:

F-12 – Meio de Cultura (Gibco)

RPMI 1640 – Meio de Cultura (Gibco)

FCS - Fetal Calf Serum (Cultilab)

III.1.8 - Soluções:

LB - Luria Bertani Medium - (Tripton 10 g/l, extrato de levedura 5 g/l, NaCl 10 g/l pH 7,5)

SOB – 20 g de bacto triptona, 5 g de extrato de levedura, 10 ml NaCl 1 M, 5 ml KCl 0,5 M, 10 ml MgCl₂ 1M, 10 ml MgSO₄ 1 M, pH 7,0

Tripsina – 1L diluente de tripsina (8,2g NaCl, 0,2g KCl, 1,14g Na₂HPO₄, 0,2g KH₂PO₄, 0,29g Na₂EDTA), 1,5 ml vermelho de fenol 1%, 1g tripsina

Pancreatina 4X – diluída em EBSS

EBSS – Earle's Balanced Salt Solution – Gibco BRL

PBS - NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ anidro 8 mM e KH₂PO₄ 1,5 mM (pH 7,4)

TBE (10X) – 450 mM Tris-borato, 10 mM EDTA, pH8,0

Tampão de amostra para DNA (5X) - 50% glicerol, 1 mM EDTA, 0,125% azul de bromofenol, 0,125% xileno cianol

Tampão de Amostra de SDS-PAGE (4X) - Tris.Cl 100 mM, ditiotreitól 200 mM, SDS 4%, azul de bromofenol 0,2%, glicerol 20%

Tampão de Transferência para Proteína - glicina 39 mM, Tris base 48 mM, SDS 0,037%, metanol 20%

TBS-T - 150 mM NaCl, 50 mM Tris.HCl, 0,1% Tween-20, pH 7,5

Tampão RIPA – 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,25% deoxicolato de sódio, 1% NP-40, 1mM EDTA

Tampão Hepes – 50 mM Hepes pH 7,5; 150 mM Nacl, 10% glicerol; 1,2% Triton X-100; 1,5 mM; 1,5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA

Tampão de corrida para SDS-PAGE – 25 mM Tris-base, 250 mM glicina, 0,1% SDS, pH 8,3

Corante Ponceau - 0,1% Ponceau, 10% ácido acético glacial

Reagente de Bradford - Bio-Rad Protein Assay, Dye Reagent Concentrate

III.1.9 - Enzimas

Superscript – Invitrogen

Taq DNA Polimerase – Invitrogen

RNase H – Invitrogen

III.1.10 - Primers Real Time PCR

bFGF sense: GTC AAA CTA CAA CTC CAA GCA GAAG (TM 56,0°C) – IDT, inc

bFGF antisense: AGC CAG CAG CCG TCC ATC (TM 60,9) – IDT, Inc

VEGF sense: CCT TCG TCC TCT CCT TAC C (TM 54,1°C) – IDT, Inc

VEGF antisense: ACA CAC AGC CAA GTC TCC (TM 54,8°C) – IDT, Inc

III.2 – Métodos

III.2.1 - Cultura Celular

Rabbit aortic endothelial cells (RAEC) foram cultivadas em meio de cultura F-12 suplementado com 1,176 g/l de bicarbonato de sódio, 25 mg/l de penicilina, 100 mg/l de estreptomicina e 10% de soro bovino fetal (FCS). Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) foram mantidas em RPMI 1640 suplementado com 2,0 g/l de bicarbonato de sódio, 2,38 g/l de HEPES, 25 mg/l de penicilina, 100 mg/l de estreptomicina e 10% de FCS. Ambos os tipos celulares foram mantidos em estufa com circulação de mistura de ar e 5% de CO₂.

O meio de cultura das garrafas foi trocado a cada três ou quatro dias. Quando necessário, as células foram subcultivadas ou expandidas. O procedimento consiste em aspirar ao meio da garrafa, lavar as células com PBS, soltar as células do substrato através da digestão com pancreatina. A suspensão foi diluída em meio de cultura, acrescido de 10% FCS

e distribuída em várias garrafas, no caso de expansão ou uma fração é transferida para outra garrafa, no caso de subcultura. O mesmo procedimento é utilizado para plaqueamentos e a suspensão de células é distribuída em placas de Petri com meio de cultura.

O carenciamento é feito com as células em subconfluência (80 a 95%) e consiste em lavar a placa duas vezes com PBS e uma vez com meio de cultura sem FCS e então se adiciona o volume adequado de meio de cultura sem FCS ou qualquer outro fator de crescimento. A adição de drogas ou fatores de crescimento utilizados nos experimentos é feita após 24 (HUVEC) ou 48 (RAEC) horas de carenciamento. Para os estudos com inibidores, as células, mantidas em meio sem soro, foram pré-tratadas com os vários inibidores por 30 minutos e, então, estimuladas com bradicinina ou shear stress.

III.2.2 - Manipulação de bactérias e preparação de plasmídeos

Os vetores prK5, prK5EGFR-WT e prK5EGFR-KD foram usados para transformar bactérias DH5 α . A transformação destas bactérias confere resistência a ampicilina. Para tanto, para cada 100 μ l de bactérias competentes acrescentou-se 10 ng de plasmídeo e transformou-as por eletroporação. A seguir as bactérias transformadas foram colocadas em 1ml de meio SOB e colocadas por 1 hora em shaker a 37°C para recuperação. Após este período, 100 μ l desta suspensão foi plaqueada em placas com meio LB/Agar mais 100 μ g/ml de ampicilina. As placas foram colocadas em estufa a 37°C overnight. Das colônias obtidas, pegou-se uma e colocou-se em 3 ml de meio LB. Esta suspensão foi utilizada para amplificação dos vetores. Para a obtenção dos plasmídeos em grande escala utilizou-se o protocolo descrito por Sambrook et al, 1989. A identidade de cada vetor foi confirmada por digestão com enzimas de restrição, segundo o protocolo de cada fabricante.

III.2.3 - Transfecção de células RAEC com prK5EGFR-WT e prK5EGFR-KD

As células RAEC foram crescidas em meio de cultura F-12 suplementado com 10% de soro fetal. Para a transfecção, as células foram plaqueadas em uma densidade de 10^4 células/ml (aproximadamente 50% de confluência). A transfecção de DNA foi efetuada com lipofectina conforme recomendações do fornecedor (Gibco BRL). Como o plasmídeo prK5 não carrega um marcador de seleção, 9 μ g deste plasmídeo foram co-transfectados com 1 μ g de pSV2Neo para conferir resistência a G418 (geneticina) às células transfectadas. As células transfectadas foram subcultivadas para três placas em meio contendo G418 (1mg/ml) três dias após a exposição ao DNA. Colônias resistentes foram isoladas depois de quatro a seis semanas de tratamento com G418 e foram propagadas na presença de G418.

Para transfecção de RAEC, além do plasmídeo prK5EGFR-WT ou KD, o qual contém a forma selvagem ou mutante do receptor de EGF, respectivamente, foi também utilizado o plasmídeo prK5 vazio, o qual não contém a região codificadora para o receptor de EGF, como controle.

III.2.4 - Estímulo da produção endógena de NO em células endoteliais

Para explorar a relevância do NO endógeno no processo de ativação da atividade tirosina cinase do receptor de EGF, células RAEC e/ou HUVEC foram carenciadas por, e uma hora antes do estímulo propriamente dito, substituiu-se o meio de carenciamento por meio fresco sem FCS, após este período adicionou-se 0,1 μ M de bradicinina ou por “shear stress” pelo período de tempo indicado em cada experimento.

III.2.5 - Estimativa das concentrações de NO geradas após estímulos das células endoteliais

As concentrações de NO geradas durante o estímulo da atividade da eNOS nas células endoteliais, RAEC foram estimadas utilizando-se o “NO Analyzer (Model 280) da Siever’s” que através de quimiluminescência, determina as concentrações de nitrito e nitrato acumulados no sobrenadante das culturas. Amostras (1 ml) foram coletadas das placas após estímulo e mantidas no escuro dentro do gelo até o momento da realização do ensaio. Para cada experimento, uma curva padrão foi construída usando de 50 a 250 nmol/l de NaNO₃ para cálculo do conteúdo de óxidos de nitrogênio (nitrito/nitrato) para cada amostra. Para cada ponto foram retirados 30µl de meio e feito a leitura, este processo foi repetido três vezes. Os resultados foram normalizados por, arbitrariamente, atribuir ao controle valor igual a um. As leituras de nitrito/nitrato foram realizadas pelo técnico Maurício do laboratório da Prof. Dulcinéia Abdalla da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP.

III.2.6 - Experimento de Fluxo – “shear stress”

Células RAEC e/ou HUVEC foram plaqueadas em placas de 150 mm e mantidas em meio F12 com 10% de soro até alcançar subconfluência, sendo então, carenciadas por 48 ou 24 horas. Uma hora antes de começar o experimento o meio era substituído por 40 ml meio de carenciamento fresco, e se requerido, pré-tratado por 30 minutos com os inibidores. As placas foram então transferidas a um sistema de placa cônica (Malek, 1992; Malek, 1993) e exposta a um fluxo laminar constante de 12 dinas/cm² enquanto os controles foram mantidos em repouso durante o tempo de realização do experimento. Os experimentos de “shear stress” foram realizados no laboratório do Prof. Dr. José Eduardo Krieger sob a supervisão da pesquisadora associada Dra. Ayumi Áurea Miyakawa

III.2.7 - Fosforilação de ERK1/2

Células foram lisadas em tampão de lise para MAPK gelado, centrifugado 14.000 rpm, a 4°C, por 10 minutos. O sobrenadante foi sonicado por 15 segundos. A ativação de ERK foi detectada por Western Blot usando-se um anticorpo policlonal contra fosfo-p44/p42 MAPK; ERK total foi detectada usando-se um anticorpo policlonal contra p44/p42 MAPK.

III.2.8 - Estudo da fosforilação do receptor de EGF

O estado de fosforilação do receptor de EGF e sua associação com as proteínas ERK1 e ERK2 foi medida por estudos de imunoprecipitação/Western Blot. Células carenciadas, crescidas em placas de 150 mm, foram tratadas com 1 μ M de bradicinina por 5, 10 ou 30 minutos ou 100 ng/ml de EGF 5 minutos e lisadas em tampão (20 mM Tris-HCl, pH 7.9, 1% Triton X-100, 137 mM NaCl, EDTA, EGTA, 10 mM fluoreto de sódio, 2 mM pirofosfato de sódio, 1mM Na_3VO_4 , 10 μ g/ml de aprotinina, 10 μ g/ml de leupeptina e 50 mM β -glicerofosfato). O lisado (1 μ g/1 μ l) foi incubado com 4 μ g de EGF-R monoclonal (Sigma) overnight a 4°C, sob agitação. Os imunocomplexos foram capturados incubando-se com 100 μ l de proteína G 50%, incubando-se por mais 2 horas a 4°C. Os beads de agarose foram coletados por centrifugação a 12000 rpm por 2 minutos. Em cada centrifugação os beads eram lavados com PBS mais 2 mM de ortovanadato. Este processo foi repetido três vezes. Após as lavagens os beads foram ressuspensos em 60 μ l de tampão de amostra 2X, fervido por 5 minutos e sujeito a SDS-PAGE 7%. Depois da transferência para membrana de nitrocelulose em cuba semi-seca a membrana foi incubada com anticorpo anti fosfotirosina clone PY20 (BD-Transduction) para determinar o estado de fosforilação de EGFR. Para examinar a possibilidade que ERK1/2 associa-se com EGFR para ativá-lo, nos também efetuamos

Western Blotting com anticorpo anti-ERK1/2 (Cell Signaling).

III.2.9 - Imunoprecipitação de PTP 1C

Células HUVEC carenciadas, foram estimuladas com 0,1 μ M de bradicinina em diferentes tempos, na presença ou não de 2 mM L-NAME. Após estímulo as células foram lisadas (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,25% deoxicolato de sódio, 1% NP-40, 1 mM EDTA) na presença de inibidores (menos inibidores de fosfatase). Neste ensaio, as células foram lisadas na presença de 20 mM de NEM para bloquear irreversivelmente todos os grupos tiol em cisteínas e prevenir posterior oxidação no ar a qual pode ocorrer durante o processamento das amostras. O lisado (1 μ g/1 μ l) foi incubado com 4 μ g de anti-PTP 1C monoclonal (Signal Transduction) overnight a 4°C, sob agitação. Os imunocomplexos foram capturados incubando-se com 50 μ l de proteína G 50%, incubando-se por mais 2 horas a 4°C. Os beads de agarose foram coletados por centrifugação a 12000 rpm por 2 minutos. Em cada centrifugação os beads foram lavados com PBS. Este processo foi repetido três vezes. Após as lavagens os beads foram ressuspensos em 30 μ l de tampão de amostra 2X, fervido por 5 minutos e sujeito a SDS-PAGE 10%. Depois da transferência para membrana de nitrocelulose em cuba semi-seca a membrana foi incubada com anticorpo anti-nitrosocisteína (AG Scientific) para determinar se PTP 1C encontrava-se nitrosilada. A quantidade de PTP 1C imunoprecipitada foi controlada através da utilização de um anticorpo monoclonal anti-PTP 1C (Signal Transduction).

III.2.10 - SDS-PAGE

A 50 μ g de lisados contendo proteínas totais adicionou-se 1X (V/V) tampão de

amostra para proteína (5X). A seguir os lisados foram aquecidos a 95°C por 5 minutos. As proteínas foram resolvidas em gel de poliacrilamida 7,5% a 13% – 16 mA overnight.

III.2.11 - Western Blot

Fez-se a transferência das proteínas para membrana de PVDF aplicando-se 250 V, 200 mA por 1h em cuba de transferência “semi-seca”. A membrana foi corada com Ponceau para verificação da eficiência da transferência. Para o immunoblotting usando o anticorpo anti-fosfo-tirosina, bloqueou-se a membrana em 20 ml de TBS-T/5% BSA por 1 hora à temperatura ambiente. Fizeram-se três lavagens com TBS-T e incubou-se com o anticorpo primário diluído 1:1000 em TBS-T 5% BSA overnight. Lavou-se a membrana três vezes novamente com TBST e incubou-se com o anticorpo secundário Horseradish Peroxidase (HRP) anti-mouse (diluído 1:1000 em TBST por 1 hora).

Para a detecção do receptor de EGF (total) a membrana foi bloqueada por 30 minutos em PBS 3% leite, enxaguada, brevemente, três vezes com água e incubada overnight com anti EGF-R (Upstate) 1:1000 em PBS 3% leite. A seguir, lavou-se a membrana, brevemente, com água e incubou-se com anticorpo secundário horseradish peroxidase (HRP) anti-mouse (diluído 1:2000 em PBS por 1 hora e 30 minutos) e lavou-se uma vez, por dez minutos, com TBS-T, e, brevemente, por duas vezes, com água.

Para detecção de fosfo-ERK e ERK total, a membrana foi bloqueada por 2 horas em TBS-T 5% leite, lavada três vezes com TBS-T, e incubada com o anticorpo primário (1:2000), overnight em TBS-T 5% BSA, após este período a membrana foi lavada 3 vezes de 10 minutos cada em TBS-T.

Para a detecção de PTP 1C, fosfo-Src tyr-416, fosfo-Src tyr-527, Src total, fosfo eNOS e proteínas nitrosiladas, a membrana foi bloqueada 1 hora com 5% de BSA em TBS-T, lavada 3

vezes, brevemente, com TBS-T e incubada overnight a 4°C em 5% BSA em TBS-T, diluído 1:1000. A membrana foi, então, incubada no anticorpo secundário anti-rabbit ou anti-mouse (1:2000) em TBST durante 1 hora, sendo novamente lavada 3 vezes de 10 minutos cada em TBST. Após as lavagens fez-se a detecção com o kit ECL (Enhanced Chemiluminescence) ou Supersignal. O tempo de exposição dos filmes variou de 5 segundos a 30 minutos. Onde indicado, as membranas foram “stripped” e incubadas com outro anticorpo. A análise densitométrica dos filmes foi efetuada pelo programa Scion NIH Image. Os resultados foram normalizados por arbitrariamente atribuir o valor 1 às células controle.

III.2.12 - Ensaio de Proliferação Celular

Células HUVEC ($1,5 \times 10^4$) foram plaqueadas em placas para cultura de célula (60 mm) e mantidas em meio RPMI acrescido de 10% de FCS. Depois de 48 horas, o meio foi substituído por meio sem soro acrescido de 0,1 μM de bradicinina na presença ou não de inibidores. As células foram mantidas sob estas condições por 24 horas a 37°C e 5% de CO_2 . Depois de 24 horas, as células foram tratadas com PBS/0,02% EDTA (HUVEC) ou pancreatina (RAEC) coradas com tripan blue e contadas em câmara de Neubauer.

III.2.13 - Ensaio de Entrada em S por incorporação de BrdU

Lamínulas circulares contidas em placas de 100 mm de diâmetro foram plaqueadas com células e mantidas em meio de cultura com 10% FCS até alcançarem a densidade de aproximadamente $1,5 \times 10^4$ células por lamínula. Após vinte e quatro horas as placas foram lavadas duas vezes com PBS e uma vez com meio sem FCS e duas lamínulas, para cada ponto, foram transferidas para uma nova placa contendo meio sem FCS. Após carenciamento por até 48 horas e estímulo por 12 horas, adicionou-se 100 μM de bromodeoxiuridina (BrdU)

ao meio de cultura e incubou-se por mais horas, completando-se 24 horas de estímulo. As células foram então fixadas e processadas para a detecção de bromodeoxiuridina. Após a incorporação de BrdU, as células foram lavadas duas vezes com PBS e fixadas durante 10 minutos em metanol gelado. Após este procedimento foram feitas três lavagens com PBS e adicionou-se 2 ml de HCl 1,5 M, mantendo-se as lamínulas por 30 minutos a temperatura ambiente sob agitação constante. A seguir, lavaram-se as lamínulas três vezes com PBS e incubou-se 30 minutos com anticorpo anti-BrdU a temperatura ambiente. As lamínulas foram lavadas três vezes com PBS por cinco minutos sob agitação e a seguir incubadas com anticorpo IgG-FITC por trinta minutos sob agitação ao abrigo da luz. Fez-se nova lavagem como descrito anteriormente, mantendo-se as lamínulas no escuro. Incubou-se com DAPI (5µg/ml) por 20 minutos. Após lavagem com PBS as lamínulas foram montadas e mantidas em geladeira, no escuro, até serem analisadas em microscópio de fluorescência utilizando-se filtros de excitação UV 330-380nm e UV 420-490nm (para visualizar núcleos marcados com BrdU/fluoresceína e DAPI, respectivamente).

III.2.14 - Ensaio de Angiogênese sobre Matrigel

10 µl de Matrigel foram adicionados em cada poço de uma placa de 96-well e permitiu-se a polimerização por 1 hora a 37°C. Células HUVEC foram plaqueadas sobre o matrigel em uma densidade de 1×10^4 por well e crescida em RPMI suplementado com 0,1% de FCS e sem suplemento de fatores de crescimento por 18 horas em estufa a 37°C, 5% CO₂. Onde indicado, as células foram cultivadas na presença de 1 µM de bradicinina com ou sem L-NAME, este era adicionada uma hora antes de BK, na concentração de 1 mM. Após 18 horas, a formação de tubo foi observada em um microscópio de luz, e as imagens eram fotografadas e as imagens transferidas para o computador. Em uma tentativa de automatizar o

procedimento, as imagens foram processadas pelo programa NIH Image 1.62 para contar o número total de “pixels”. O número de pixel foi contado em três campos diferentes, e um valor médio foi determinado para cada amostra. A amostra controle foi definida como 100%, calculou-se para cada amostra a porcentagem de aumento ou decréscimo na formação do tubo em relação ao controle.

III.2.15 - Extração de RNA

Células HUVEC plaqueadas em placas de 100 mm, subconfluentes, carenciadas, foram estimuladas por 6 horas com 0,1 μ M de bradicinina. Após os estímulos as células foram lavadas duas vezes com PBS gelado e lisadas em 1 ml de Trizol. O RNA foi obtido de acordo com o protocolo do fabricante (Invitrogen).

III.2.16 - Síntese de cDNA

A 5 μ g de RNA total adicionou-se 1 μ l de oligo dT e 12 μ l de água MilliQ estéril. As amostras foram aquecidas por 10 minutos a 70. Após breve centrifugação adicionou-se 4 μ l de tampão 5X, 2 μ l de 0,1 M de DTT e 1 μ l de 10 mM de dNTPs e incubou-se a 42°C por 2 minutos, seguindo-se a isso a adição de 1 μ l de Superscript e incubação por 50 minutos a 42°C. A remoção do RNA complementar foi feita com a adição de 1 μ l de RNase H e incubação a 37°C por 20 minutos. O cDNA obtido foi usado como molde na reação de Real Time PCR.

III.2.17 - PCR em tempo real

As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando-se o SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) em um equipamento ABI Prism 5700 Sequence Detection

System (Applied Biosystems). Os primers específicos são: GTC AAA CTA CAA CTC CAA GCA GAAG e AGC CAG CAG CCG TCC ATC para bFGF, CCT TCG TCC TCT CCT TAC C e ACA CAC AGC CAA GTC TCC para VEGF e GTG GTT CGG CAC CTC GAT e CAC CCC AAC CCT TGG AAA CT para o normalizador. Todas as reações de PCR em tempo-real serão realizadas em triplicata com 2 µg do cDNA sintetizado diluído 1:10, primer R (reverse) 600 nM, primer F (forward) 600 nM, 12,5 µl de SYBR Green PCR Master Mix e água milli-Q autoclavada para 25 µl. O ciclo para as reações de PCR em tempo real foi otimizado iniciando-se com incubações a 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos seguido de anelamento a 60°C por 1 minuto. A especificidade dos produtos amplificados será analisada pelas curvas de dissociação geradas pelo equipamento. Utilizar-se-ão controles negativos em paralelo para confirmar a ausência de qualquer tipo de contaminante no meio reacional. A análise dos dados será feita pelo método de $2(-\Delta\Delta Ct)$ (Livak & Schmittgen, 2001).

III.2.18 - Análise estatística

Os resultados são dados como média±desvio padrão. As diferenças entre os grupos foram analisadas usando o teste “one-way” ANOVA e como pós-teste Newman Keuls. O valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

IV. Resultados

Os experimentos que motivaram o desenvolvimento deste projeto foram realizados em células endoteliais de aorta de coelho (RAEC), usando-se o nitrotiol SNAP(Oliveira et al., 2003). Assim, resolvemos verificar se o óxido nítrico, produzido sob condições endógenas era capaz de desempenhar algum papel na fosforilação do receptor de EGF, como verificado quando da utilização de SNAP (Oliveira, 2003). Devido às dificuldades de se conseguir detectar o receptor de EGF em células RAEC, provavelmente devido aos níveis de expressão deste, e também devido ao fato que muitos dos anticorpos monoclonais disponíveis no mercado são específicos para a forma humana deste receptor, não reconhecendo o receptor expresso em células de coelho, decidimos transfectar estas células com um plasmídeo que expressa a forma selvagem do receptor de EGF, de origem humana. Além disso, como um dos nossos objetivos é determinar a função do receptor de EGF no processo de angiogênese, transfectamos as células RAEC com uma forma mutada do receptor de EGF, o qual não apresenta atividade de tirosina cinase.

Foi recentemente relatado, que células endoteliais são localmente especializadas em suas características funcionais. Estas células expressam subtipos específicos de genes de acordo com o tecido de origem e também com sua fonte (artéria versus veia ou grandes vasos versus microvasculatura) (Chi et al. 2003). Levando-se isso em consideração, resolvemos testar nosso modelo, também em células endoteliais de veia humana (HUVEC), para verificar se haveria alguma diferença no tipo de resposta obtida.

IV.1 - Geração de clones de células RAEC expressando o receptor de EGF funcional ou mutado

Células RAEC foram transfectadas ou com o vetor prk5EGFR-WT ou com o vetor prk5EGFR-KD, ou com o vetor vazio, prk5, usando-se lipofectina. Em todos os casos, estes vetores foram co-transfectados com o vetor pSV2-neo, o qual confere resistência a geneticina. As células transfectadas com o receptor de EGF mutado (RAEC KD) apresentou uma maior dificuldade na seleção, tendo-se que analisar diversos clones até encontrar um que expressasse o receptor de EGF humano, o mesmo não sendo observado para o clone expressando a proteína selvagem (RAEC WT).

Após a transfecção os clones de RAEC foram analisados quanto à expressão do receptor de EGF por Western Blot. Alguns destes clones são mostrados na figura 6. A partir desta podemos observar que os clones que foram transfectados com o vetor para a proteína mutada (RAEC KD) não apresentam níveis de expressão muito superior àquele apresentado pela célula parental e também à célula transfectada com o vetor vazio. Podemos notar ainda que os clones que expressam o receptor de EGF mutado, quando comparado aos clones que expressam a proteína selvagem, apresentam uma expressão menor, sugerindo que os clones que apresentavam níveis muito altos foram selecionados negativamente.

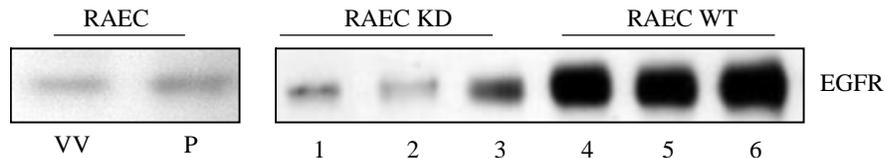


Figura 6: **Supereexpressão do receptor de EGF selvagem (WT) e mutado (KD) em células RAEC.** Células RAEC transfectadas por lipofectina e selecionadas com o antibiótico G418 foram lisadas e analisadas quanto à expressão do receptor de EGF. 50 µg de proteína de cada clone crescendo em 10% de FSC foram separadas por SDS-PAGE e analisadas quanto à expressão da proteína exógena por Western Blot, utilizando o anticorpo anti-EGF-R upstate (clones RAEC), o qual é específico para a proteína humana, ou o anticorpo mAb 108 (RAEC). VV – Células RAEC transfectadas com o vetor prK5. P – Célula RAEC Parental.

Dois clones de cada tipo foram selecionados para que fossem realizados experimentos relativos à modulação da fosforilação de EGFR em resíduos de tirosina sob estímulo do próprio fator de crescimento. Para isso, o receptor de EGF foi imunoprecipitado e a fosforilação em resíduos de tirosina foi analisado por Western Blot usando um anticorpo que reconhece proteínas fosforiladas em resíduos de tirosina. Observando-se a figura 7 podemos notar que a tanto a célula parental quanto os clones transfectados com o receptor selvagem responderam ao estímulo (EGF 20 ng/ml) enquanto que clones expressando o EGFR desprovido de atividade de tirosina cinase apresentaram incremento significativo nos níveis de fosforilação em resíduos de tirosina deste receptor após estímulo de EGF, quando comparado à célula parental e também aos clones RAEC WT.

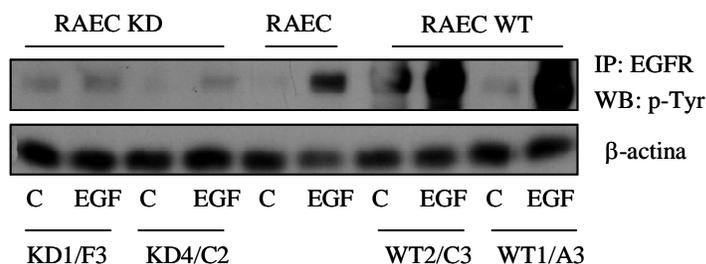


Figura 7: **Bradicinina e EGF induzem a fosforilação em resíduos de tirosina em clones superexpressando o receptor de EGF.** Células RAEC e seus clones foram estimulados com 20 ng/ml de EGF por 5 minutos. As células foram lisadas e o receptor de EGF foi obtido por imunoprecipitação utilizando-se o anticorpo anti-EGFR. A imunoprecipitação dos lisados celulares foi seguida por immubloting com o anticorpo anti-fosfotirosina. C – Célula mantida em condições de careciamento

O modelo delineado utilizando-se doador de óxido nítrico e células RAEC sugeria que NO, via ativação da via de Ras/ERK1/2 promove um aumento na fosforilação do receptor de EGF e por meio desta ativação a passagem de células endoteliais através do ciclo celular. Assim, tendo-se obtido os clones de RAEC demos início a verificação de como isto está ocorrendo em células endoteliais (RAEC e HUVEC) após o estímulo destas células por BK ou “shear stress”.

IV.2 - Cinética de ativação do receptor de EGF após estímulo com Bradicininina em células RAEC e HUVEC

Diversos trabalhos fazem menção à transativação de receptores com atividade de tirosina cinase por receptores acoplados a proteína G. Entre estes trabalhos, diversos relatam a participação de bradicinina na modulação da atividade de RTKs (Parenti, et al., 2001; Muckhin et al., 2006). A influência de BK sobre estes receptores é diversificada e depende do tipo celular avaliado. Além disso, apesar de alguns deles já relatarem a transativação de EGFR ou a ativação de eNOS e conseqüente aumento na produção de NO, induzida por BK, nenhum

deles faz uma correlação entre esses dois eventos. Para verificarmos a ocorrência ou não desta correlação, realizamos alguns experimentos em as células foram estimuladas com BK, lisadas e o EGFR foi imunoprecipitado usando anticorpo anti-EGFR, seguindo-se a isto imunoblot com anticorpo anti-fosfotirosina. No caso de RAEC parental, devido ao fato de que a maioria dos anticorpos disponíveis serem específicos para a forma humana do receptor, não conseguimos achar uma condição ideal com a qual conseguíssemos detectar o EGFR, apesar de conseguir imunoprecipitá-lo (mas mesmo neste caso utilizamos outro anticorpo, mAb 108, o qual ao é comercial e nos foi gentilmente cedido pelo Prof. Joseph Schlessinger). Neste caso, usávamos como controle interno β -actina.

Observando a figura 8 podemos perceber que o tratamento tanto de RAEC (parental e clone) como de HUVEC com BK resulta em uma rápida fosforilação do receptor de EGF em resíduos de tirosina. RAEC parental e clone apresentam cinética de ativação semelhante, porém a intensidade do sinal é maior para o clone WT1/A3 que superexpressa o EGFR (aumenta em torno de 3 vezes quando comparado à célula em condição de carenciamento), provavelmente devido aos níveis mais elevados de expressão do receptor. Corroborando esta observação, um outro clone que também superexpressa o EGFR, porém, em níveis menores, apresenta níveis de fosforilação estimulados mais próximos àqueles observados na célula parental. No entanto, o clone KD4/C2 apresenta uma diminuição na fosforilação de EGFR (28% sobre a célula mantida em carenciamento) em relação à célula parental após tratamento com BK (semelhante ao já observado após estímulo com EGF), sugerindo que a expressão do receptor mutado está interferindo com a resposta a BK e também, que um receptor com atividade de tirosina cinase funcional é importante para que bradicinina promova a transativação de EGFR.

Por outro lado, HUVEC, apresenta níveis de fosforilação de EGFR, além de cinética

de fosforilação semelhante àquela observada no clone de RAEC WT1/A3. Com estes resultados podemos sugerir que os níveis de expressão de EGFR interferem na intensidade da resposta e também na velocidade como esse sinal decai. Assim, podemos observar que os níveis de fosforilação para HUVEC e para o clone WT1/A3 após estímulo com BK por 30 minutos, ao contrário do que observamos em RAEC parental, ainda se mantêm superiores àquela observada em células mantidas em condições de carenciamento.

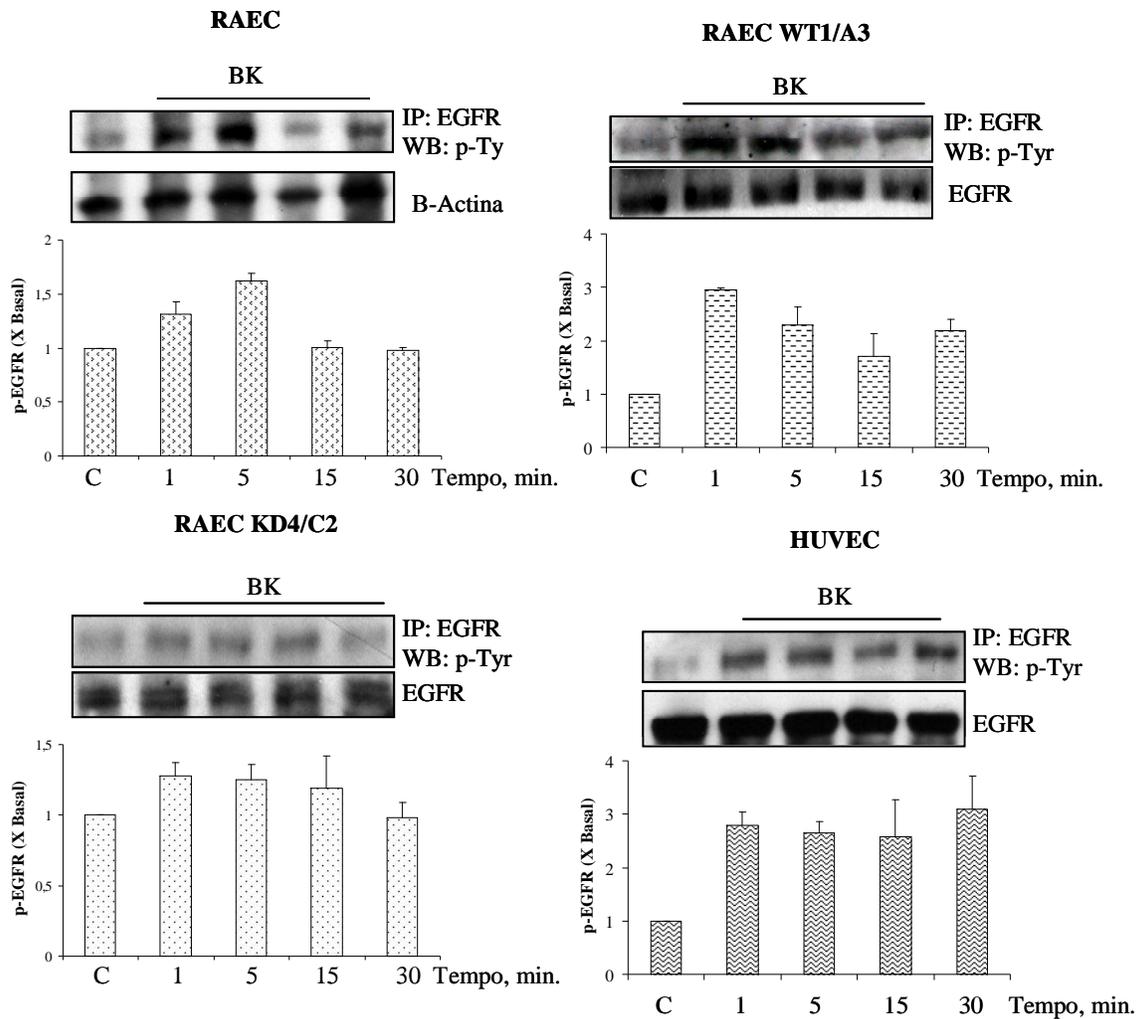


Figura 8: **Bradicinina induz ativação da fosforilação em resíduos de tirosina do receptor de EGF.** Células RAEC e HUVEC foram estimuladas com 0,1 μ M de bradicinina durante o período de tempo indicado (1, 5, 15 e 30 minutos). As células foram lisadas e o receptor de EGF foi obtido por imunoprecipitação utilizando-se o anticorpo anti-EGFR. A imunoprecipitação dos lisados celulares foi seguida por immublotting com o anticorpo anti-fosfotirosina. C – células mantidas em meio de careciamento sem qualquer estímulo. A quantidade de EGFR imunoprecipitado era controlada através da utilização de um anticorpo anti-EGFR (WT1/A3 e HUVEC) ou β -actina (RAEC). A fosforilação foi quantificada densitometricamente como a proporção de EGFR fosforilado e EGFR total. Em cima, autoradiografia de Western Blot; embaixo, gráfico de barras obtido a partir de análises densitométricas. Cada amostra refere-se a uma média \pm desvio padrão entre pelo menos três experimentos.

IV.3 - Bradicinina estimula a produção de NO em células endoteliais

Juntamente com os experimentos de fosforilação do receptor de EGF, realizamos também, nestas mesmas células, a quantificação, do óxido nítrico liberado após estímulo com bradicinina, uma vez que um dos nossos objetivos é verificar a participação deste na ativação do receptor de EGF. Assim, as células foram estimuladas com bradicinina, as células lisadas para Western Blot (acima) e o meio de cultura foi coletado para quantificação do NO por quimiluminescência.

Quando células endoteliais foram tratadas com 1 μ M de bradicinina, observou-se um aumento nos níveis de NO. O estímulo de liberação do NO é transiente, decaindo ao logo de 30 minutos, porém, sem retornar aos níveis basais. Com estes experimentos podemos ainda notar que o aumento na produção de NO, independe da ativação de EGFR, uma vez que o clone KD4/C2, não apresenta diferença na produção de NO quando comparado à célula parental. Além disso, podemos observar que a BK aumenta a fosforilação em resíduos de tirosina de EGFR com uma cinética similar à produção de óxido nítrico, sugerindo que talvez exista uma correlação entre esses dois eventos (figura 9).

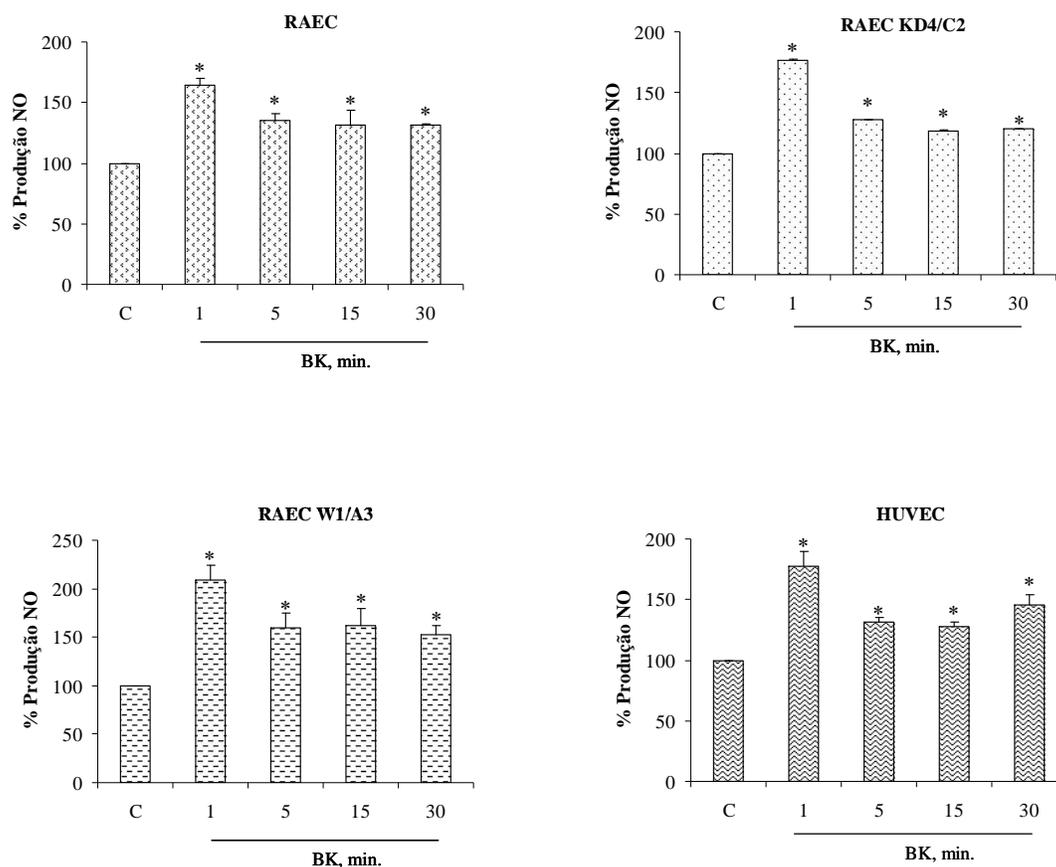


Figura 5: Curva de tempo da liberação de óxido nítrico estimulada por bradicinina em células endoteliais. Células RAEC e HUVEC foram estimuladas com 0,1 μ M de bradicinina durante o período de tempo indicado. O NO liberado foi determinado por quimiluminescência. Dados representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes, e o asterisco indica grupos significativamente diferentes para $p < 0,05$ pelo teste ANOVA/Newman-Keuls.

IV.4 - Atividade tirosina cinase do receptor de EGF induzida por Bk/NO na presença de inibidores da óxido nítrico sintase em células RAEC/HUVEC

Apesar dos dados apresentados até o momento sugerem uma relação de dependência

entre a ativação do receptor de EGF e a produção de óxido nítrico, estes achados não nos permitem afirmar que o aumento na produção do radical livre é capaz de interferir com a ativação de EGFR. Assim, utilizamos inibidores das isoformas da NOS para averiguarmos essa possibilidade.

Em nossos experimentos iniciais verificamos que células RAEC e HUVEC quando estimuladas com BK exibiam um aumento nos níveis de NO e também uma ativação do receptor de EGFR, verificado através do aumento de fosforilação em resíduos de tirosina. Então, cabia-nos averiguar se existia uma relação de dependência entre esses dois eventos. Para isso, resolvemos fazer uso de inibidores da enzima NO sintase, pois segundo nossa hipótese essa ativação estaria sendo estimulada pela produção de NO. Pré-tratamento de células RAEC com 2 mM de L-NAME (um seletivo inibidor de NOS), apesar de inibir a produção de NO em todos os tempos observados, não foi acompanhado por uma inibição semelhante na ativação do receptor de EGF, diminuindo a fosforilação do receptor de EGFR em resíduos de tirosina, e conseqüente ativação, somente em tempos maiores que 5 minutos (figura 10).

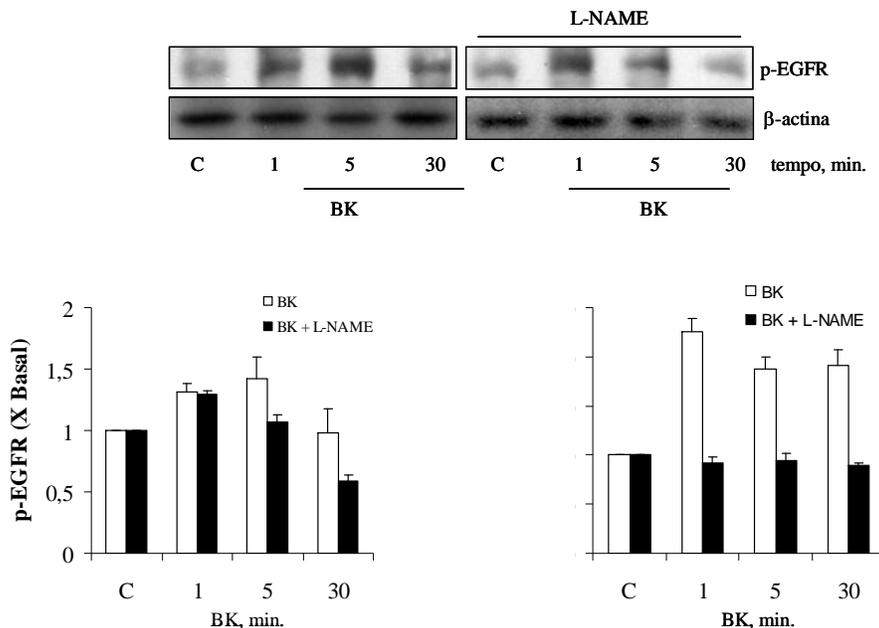


Figura 10: **Efeitos de L-NAME sobre o estímulo da atividade do receptor de EGF induzido por bradicinina em células RAEC.** Células RAEC foram estimuladas com $1\mu\text{M}$ de bradicinina durante o período de tempo indicado (1, 5 e 30 minutos) e onde indicado, 30 minutos antes do estímulo com BK adicionou-se 2 mM de L-NAME. As células foram lisadas e o receptor de EGF foi obtido por imunoprecipitação utilizando-se o anticorpo anti-EGFR. A imunoprecipitação dos lisados celulares foi seguida por immunoblotting com o anticorpo anti-fosfotirosina. C – células mantidas em meio de carenciamento sem qualquer estímulo - na presença ou não de L-NAME. Em cima, auto-radiografia Western Blot, acompanhado de densitometria; embaixo, gráfico de barras obtido a partir de medidas de NO são mostradas. As concentrações do NO liberado foram determinadas conforme descrito em Materiais e Métodos. Dados representam a média de três leituras para cada ponto.

Utilizando-se o tempo de 5 minutos realizamos, pré-tratamos células HUVEC e os clones RAEC WT1/A3 e RAEC KD4/C2 com L-NAME para verificarmos se resultados semelhantes seriam obtidos. Na figura 11, um western blot representativo utilizando-se o anticorpo para anti-fosfotirosina é mostrado. Torna-se evidente, assim como observado para RAEC, que em HUVEC e nos clones, óxido nítrico desempenha um papel na modulação da

atividade de EGFR, exibindo uma redução significativa na fosforilação de EGFR após tratamento com L-NAME.

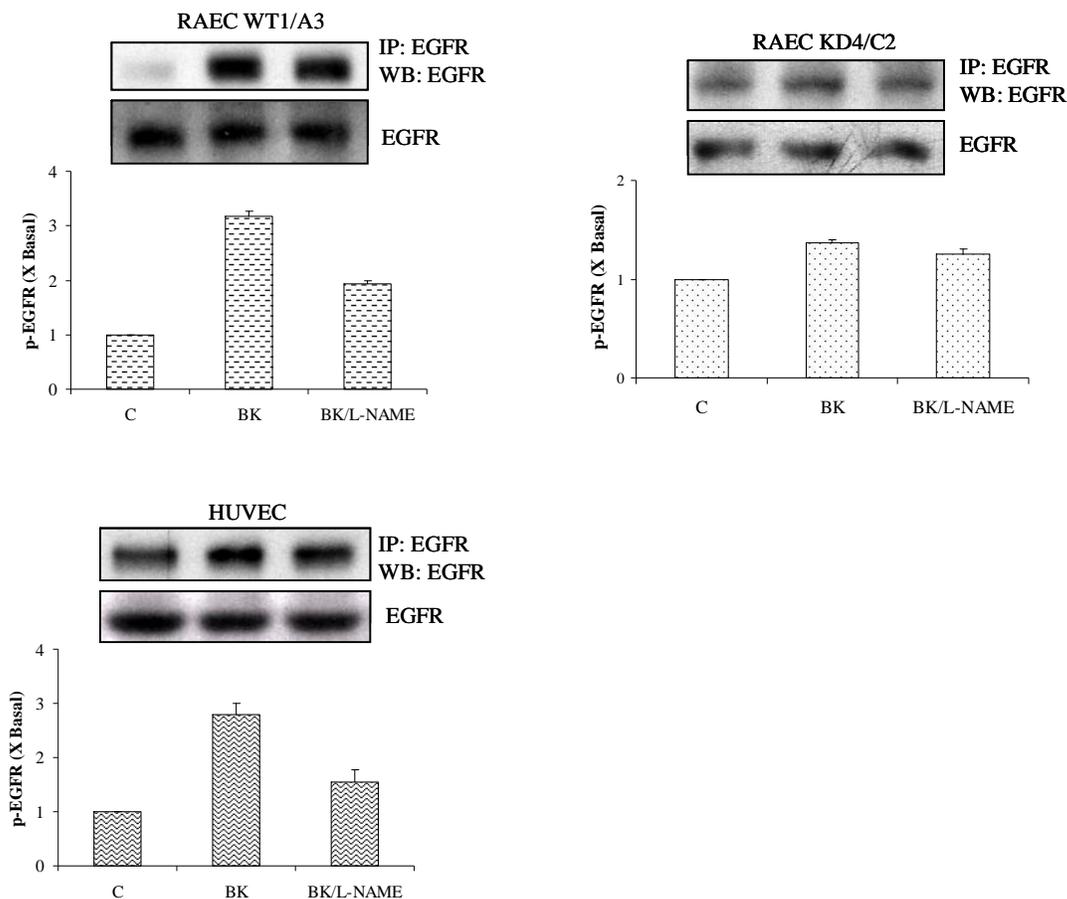


Figura 11: Efeitos da inibição da NO sintetase na fosforilação em resíduos de tirosina de EGFR. Células RAEC WT1/A3, KD4/C2 e células HUVEC foram estimuladas com $1\mu\text{M}$ de bradicinina por 5 minutos e onde indicado, 30 minutos antes do estímulo com BK adicionou-se 2 mM de L-NAME. As células foram lisadas e o receptor de EGF foi obtido por imunoprecipitação utilizando-se o anticorpo anti-EGFR. A imunoprecipitação dos lisados celulares foi seguida por immublotting com o anticorpo anti-fosfotirosina. C – células mantidas em meio de carenciamento; BK – bradicinina; BK/L-NAME – bradicina + L-NAME. Auto-radiografia Western Blot, acompanhado de densitometria; embaixo, gráfico de barras obtido a partir de medidas de NO são mostradas. Dados representam a média de dois experimentos.

Com estes experimentos verificamos que BK aumenta a ativação de EGFR e que este aumento é dependente de NO, uma vez que o pré-tratamento das células com L-NAME bloqueia o aumento da fosforilação em resíduos de tirosina desencadeado por BK.

Em trabalho recente de nosso grupo de pesquisa, ficou demonstrado que este aumento nos níveis de fosforilação de EGFR era dependente da via de Ras - ERK1/2 (Oliveira et al.,). Assim, o passo seguinte foi verificar como o aumento na produção de NO, promovido por BK interfere com a ativação de ERK 1 e ERK 2 e se a inibição destas, usando o inibidor de MEK, cinase responsável pela fosforilação e ativação de ERK e se a inibição destas cinases é capaz de modular a ativação de EGFR.

IV.5 - Ativação de ERK1/2 por Bradicinina

Já foi claramente demonstrado que o tratamento de diferentes tipos celulares com BK leva à ativação da cascata das ERK1/2 MAPK (Liebmann, 2001). O estímulo da via de MAPK por receptor pode envolver a ativação de Ras, Ras ativada então recruta Raf-1 para a membrana, levando a fosforilação desta e por último à fosforilação e ativação de MAPKs incluindo ERK. Uma via alternativa para a ativação de MAPK por GPCRs é independente de Ras e envolve a fosforilação de Raf-1 por PKC. Além disso, as respostas desencadeadas por MAPKs podem ser fortemente influenciadas por interações com outras proteínas, adicionando maior complexidade a esta via. A proximidade de eNOS e MAPK dentro dos cavéolos pode facilitar a interação entre estas proteínas e coordenar a regulação destas vias, as quais sabidamente são ativadas separadamente por bradicinina.

Assim, fomos averiguar se o aumento na produção de NO induzido por BK poderia estimular a atividade de ERK1/2, e a inibição da eNOS por L-NAME inibe a ativação de ERK1/2. Iniciamos esta etapa verificando o estado de ativação de ERK em RAEC e HUVEC

após estímulo com bradicinina. Tratamento de células RAEC e HUVEC com 1 μ M de BK resultou em um aumento, dependente de tempo, na fosforilação de ERK1/2 (figura 12).

Podemos observar que em células RAEC a ativação de ERK1/2 assemelha-se aquela observada no clone WT1//A3, apresentando um aumento a partir de um minuto, com um máximo em 5 minutos que se mantém por pelo menos 30 minutos. Células HUVEC comportam-se de modo semelhante à RAEC. Contudo, observamos que o clone KD4/C2 apresenta uma cinética de ativação de ERK diferente daquela observada na célula parental e também no clone WT1/A3. Neste clone podemos observar que a ativação de ERK1/2 é rápida e transiente, ao contrário do observado para o clone WT2/B4 onde a ativação é rápida, porém sustentada, fato semelhante foi observado no KD1/F3 (figura 13). Ao que tudo indica este pico de ativação independe do receptor de EGF, uma vez que, ao tratarmos estas mesmas células com EGF, não observamos um aumento na fosforilação de ERK1/2 (figura 13). Já é sabido que bradicinina é capaz de promover a ativação de ERK1/2 de maneira independente de Ras, por uma via envolvendo PKC. Assim, é possível que esta ativação rápida e transiente observada nos clones que expressam o receptor de EGF mutante, siga por esta via. Além disso, através dos resultados obtidos, pode-se sugerir que para que ocorra uma resposta mantida de ERK1/2 é necessário a ativação do receptor de EGF acima de certo limiar. A partir da figura 8 podemos observar que o clone KD4/C2, ainda apresenta uma pequena ativação de EGFR, a qual não parece suficiente para uma resposta sustentada de ERK1/2. Diversos artigos já demonstraram a importância na quantidade de receptores ativados para o tipo de cinética de ativação de ERK e conseqüente resposta celular gerada a partir desta (Dikic et al., 1994; Schelessing and Bar-Sagi, 1994; Murphy et al., 2004) .

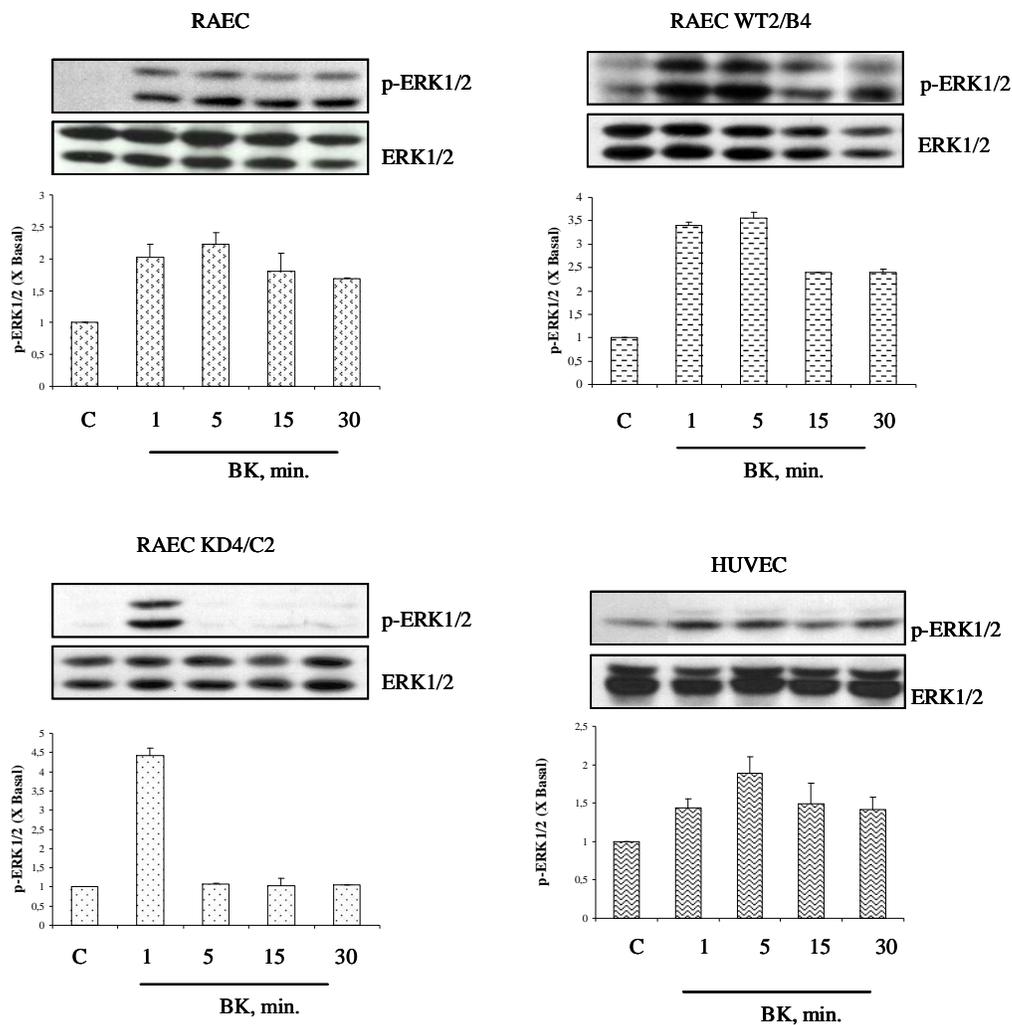


Figura 12: **Fosforilação de ERK1/2 em células RAEC e HUVEC induzida por Bradicinina.** Células RAEC: parental, que superexpressa o receptor selvagem de EGF (WT) e clone que superexpressa o receptor de EGF com atividade de tirosina cinase não funcional (KD) e HUVEC foram estimulados com $1\mu\text{M}$ de BK pelo período de tempo indicado. A fosforilação de ERK1/2 foi analisada por immunoblotting com um anticorpo anti-fosfo-ERK1/2 como descrito em Materiais e Métodos. Do mesmo blot fez-se “stripping” e colocou-se o anticorpo anti-ERK1/2 o qual reconhece ERK1/2 independentemente do estado de fosforilação para assegurar igual quantidade de proteína no gel (ERK total). A fosforilação foi quantificada densitometricamente como a proporção de ERK1/2 fosforilada e ERK1/2 total. Em cima, auto-radiografia de Western Blot; embaixo, gráfico de barras obtido a partir de análises densitométricas. Cada amostra refere-se a uma média entre dois experimentos. C – corresponde à célula mantida em meio de carenciamento. Dados representam a média de 2 - 3 experimentos \pm desvio padrão.

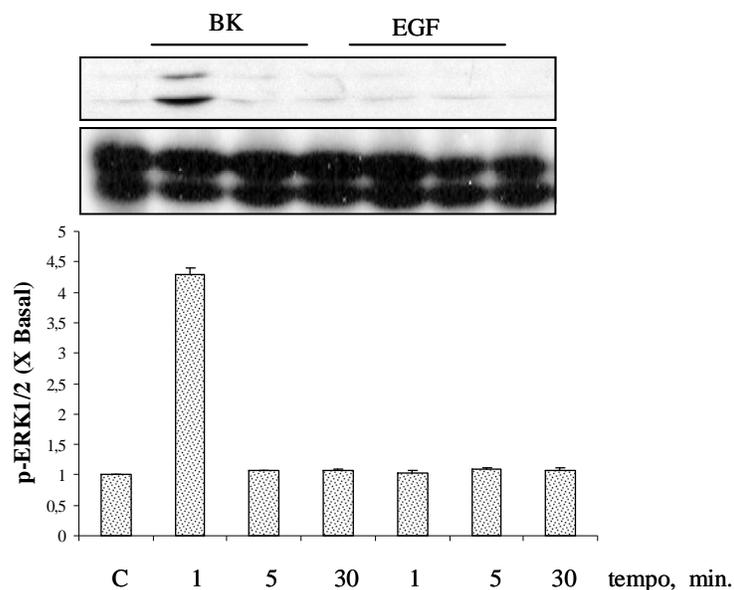


Figura 13: **Figura 8: Fosforilação de ERK1/2 em células RAEC KD1/F3.** Células RAEC que superexpressam de EGFR com atividade de tirosina cinase não funcional (KD1/F3) foram estimulados com $1\mu\text{M}$ de BK pelo período de tempo indicado. A fosforilação de ERK1/2 foi analisada por immunoblotting com um anticorpo anti-fosfo-ERK1/2 como descrito em Materiais e Métodos. Do mesmo blot fez-se “stripping” e colocou-se o anticorpo anti-ERK1/2 o qual reconhece ERK1/2 independentemente do estado de fosforilação para assegurar igual quantidade de proteína no gel (ERK total). A fosforilação foi quantificada densitometricamente como a proporção de ERK1/2 fosforilad e ERK1/2 total. Em cima, autoradiografia de Western Blot; embaixo, gráfico de barras obtido a partir de análises densitométricas. Cada amostra refere-se a uma média entre dois experimentos. C – corresponde à célula mantida em meio de carenciamento. Dados representam a média de 2 experimentos \pm desvio padrão.

Até aqui conseguimos estabelecer que BK promove a transativação de EGFR, através de um mecanismo que depende da atividade de tirosina cinase do receptor, uma vez que clones que superexpressam o receptor mutado exibem uma diminuição em sua ativação. Além disso, verificamos que BK também favorece a produção de NO, por uma via que independe da

ativação do receptor de EGF, uma vez que a ausência de ativação deste não interfere com o aumento na produção de NO. Contudo, o aumento na produção de NO é capaz de modular a ativação de EGFR, uma vez que, pré-tratamento das células com L-NAME, diminui a fosforilação do receptor de EGF em resíduos de tirosina.

Já foi demonstrado por diversos pesquisadores que ERK1/2 podem fosforilar EGFR e deste modo alterar sua ativação (Takishima et al. 1991; Morrison et al., 1993). Recente publicação de nosso grupo demonstrou que NO pode interferir com a ativação de ERK1/2 através da nitrosilação da cisteína 118 (Cys118) de Ras, favorecendo a troca de GDP por GTP. Nos passos seguintes verificamos a possibilidade de ERK1/2 fosforilarem EGFR por meio do estímulo de BK e se ocorre a participação de NO neste processo.

Para verificarmos se as ERK1/2 poderiam ser responsáveis pelo aumento da atividade cinase de EGFR promovida por BK/NO, nós determinamos o efeito de um inibidor de MEK, PD98059, sobre a regulação do EGFR por NO. Os resultados indicam que a via de ERK é um elemento chave em uma regulação do EGFR, que possa envolver NO e ERK.

Na figura 14 estimulamos células endoteliais com BK na presença ou não de L-NAME ou PD98059 e fomos verificar como esses agentes interferem com a ativação de ERK1/2 e também do EGFR. Como já verificado em experimentos acima (figuras 10 e 11), L-NAME induz a uma diminuição na fosforilação em resíduos de tirosina do EGFR. O mesmo pode ser verificado quando do uso do inibidor de MEK, PD98059, sugerindo que ERK1/2 desempenha algum papel na ativação de EGFR, contudo esta inibição parece independe da via de eNOS, uma vez que o pré-tratamento das células endoteliais não afeta a ativação de ERK1/2. Assim concluímos que estas duas vias estão atuando de modo independente na modulação da atividade do receptor de EGF.

Vale a pena salientar, que apesar do inibidor de MEK, PD98059, no clone KD4/C2 apresentar efeitos semelhantes aos observados no clone WT1/A3 e em HUVEC (ou seja, provocar uma diminuição na fosforilação de EGF próximo ao basal), o mesmo não é verdadeiro para o inibidor de NOS (L-NAME 2 mM), o qual, neste clone apresenta uma redução de apenas 10% ($\pm 0,22$).

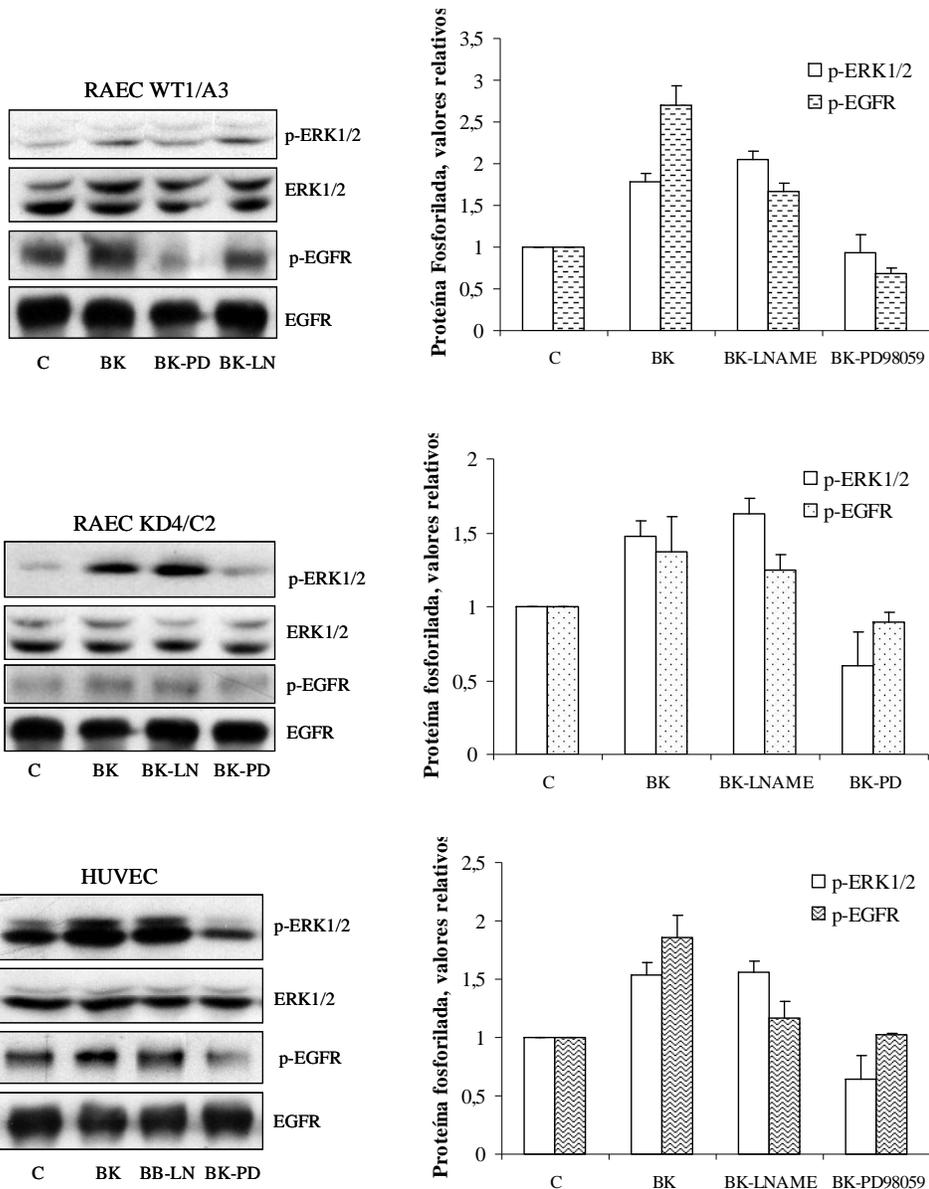


Figura 14: **Pré-tratamento de células HUVEC com inibidores, L-NAME ou PD98059, reverte a ativação do receptor de EGF induzida por bradicinina.** Células HUVEC carenciadas foram pré-incubadas com 50 μ M PD98059 (canaleta 3) ou 2 mM L-NAME (canaleta 4) por 30 minutos antes da adição de 1 μ M BK por 5 min. As células foram lisadas e depois de imunoprecipitação usando-se o anticorpo anti-EGFR as proteínas separadas por SDS-PAGE, transferidas para membrana de PVDF e reveladas com o anticorpo anti-fostotirosina (A). A quantidade de EGFR imunoprecipitado foi controlada através da utilização de um anticorpo anti-EGFR (B). 50 μ g de proteínas foram resolvidos por SDS-PAGE e revelado com anticorpo para anti-fosfo-ERK-1/2 (C). A fosforilação foi quantificada densitometricamente como a proporção da proteína fosforilada e a proteína total (fosforilada e não fosforilada). Em cima, auto-radiografia de Western Blot; embaixo, gráfico de barras obtido a partir de análises densitométricas. Cada amostra refere-se a uma média entre dois experimentos \pm desvio padrão.

Os resultados descritos até o momento nos permitem sugerir que NO interfere com a ativação do EGFR, e que ao contrário do que observado quando do uso de SNAP, NO não interfere com a ativação de ERK 1/2, e portanto a modulação da atividade desta por NO não é suficiente para explicar o modo pelo qual NO está alterando a ativação do receptor de EGF. Além disso, por meio destes experimentos podemos observar também que a via das ERK1/2 está envolvida na ativação do EGFR uma vez que, o uso do inibidor de MEK provoca uma diminuição na fosforilação de resíduos de tirosina deste receptor. Tendo esses resultados em mãos a seguir fomos verificar como NO e ERK, aparentemente de um modo independente, estão modulando a atividade do receptor de EGF.

IV.6 - Bradicinina promove a fosforilação do receptor de EGF em sítios de fosforilação de reconhecidos ERK

Através da figura 14 podemos verificar que BK promove a fosforilação do receptor de

EGF e que este aumento de fosforilação é dependente de NO. Contudo, quando observamos a mesma figura podemos constatar que a pré-adição de L-NAME em HUVEC e RAEC não é capaz de inibir a ativação de ERK1/2, sugerindo que ao contrário do que imaginávamos a ativação de ERK, no tempo observado, independe de NO. Sob as condições utilizadas, pode-se concluir que a ativação de ERK1/2 promovida por BK de algum modo interfere com a ativação do EGFR e que ou a ativação das ERK1/2 ocorre anteriormente a ativação de eNOS, ou temos duas vias independentes: uma que resulta na ativação de ERK1/2 e outra que resulta na ativação de eNOS.

Estudos anteriores têm implicado cinases de serina/treonina, por exemplo, PKC ERK1/2 como importantes na regulação da função de EGFR (Huang, 2003). A fosforilação de EGFR é um mecanismo primário para a regulação de sua atividade de cinase. A fosforilação pela proteína cinase C (PKC) leva, em alguns sistemas, a uma inibição da atividade de tirosina cinase do receptor induzida por ligante e a uma diminuição na afinidade do receptor por EGF (Friedman et al, 1984; Cochet et al, 1984). A partir dos resultados obtidos, resolvemos verificar se as ERK1/2 poderiam fosforilar EGFR. Para este fim utilizamos um anticorpo monoclonal estado-específico (PTP101) que detecta especificamente proteínas fosforiladas em uma sequência consenso para cinases dirigidas por prolina, tais como ERKs (Pearson and Kemp, 1991; Marinissen, et al., 2001; Hall, et al., 2001). No experimento mostrado na figura 15, nós examinamos os efeitos de BK sobre o estado de fosforilação de EGF em células RAEC e HUVEC. Células carenciadas foram expostas a BK ou EGF por cinco minutos antes da lise celular por detergente e imunoprecipitação com anti-EGFR. Extratos celulares foram resolvidos por SDS-PAGE e sequencialmente tratados com PTP101, anti-pTyr e anti-EGFR. Como previamente mostrado com estímulo de fibroblastos de camundongo 3T3-F4442A com hormônio de crescimento (Kim et al., 1999; Huang, et al.,

2003), BK promove a fosforilação da seqüência reconhecida pelo anticorpo PTP101 de EGFR em ambas as células. Notavelmente, podemos notar (painel superior figura 15) que tanto BK quanto EGF promove o surgimento de formas de EGFR que foram reconhecidas por PTP101, sugerindo a fosforilação na seqüência consenso reconhecida por ERK1/2 em EGFR. Ainda, western blot realizados com anticorpo anti-pERK1/2 a partir de extratos celulares que não foram imunoprecipitados, das mesmas células, confirma que ambos, BK e EGF, também ativaram ERK1/2. Interessantemente, enquanto BK promove menos fosforilação em resíduos de tirosina quando comparado à EGF, a comparação da fosforilação na seqüência reconhecida por PTP101 induzida por BK ou EGF, sugere que BK promove substancialmente uma maior fosforilação neste sítio que o próprio EGF.

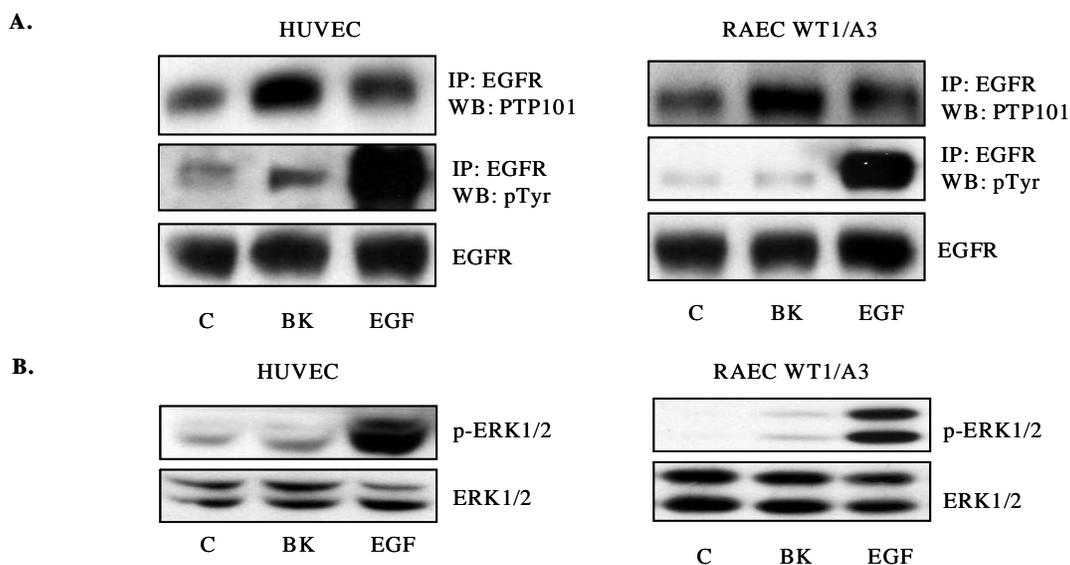


Figura 15: **Bradicinina induz a fosforilação em resíduos de treonina de EGFR, detectado pelo anticorpo PTP101.** A, Células RAEC WT1/A3 e HUVEC carenciadas foram estimuladas com bradicinina (1 μ M) ou EGF (20 ng/ml). Extratos celulares (1 mg) foram imunoprecipitados com anti EGFR. As proteínas foram analisadas utilizando os anticorpos PTP101, anti-pTyr, anti-EGFR. B, extratos celulares (50 μ g), como mostrado em A, foram resolvidos sem imunoprecipitação por SDS-PAGE e analisados com anti-pERK1/2 e anti-ERK1/2, sequencialmente. Os experimentos mostrados são representativos de dois experimentos.

Os dados na figura 15 indicam que BK e EGF levam a fosforilação de EGFR em uma seqüência fosforilada pelas ERK1/2, sugerindo a participação destas MAPKs neste processo. Para testar esta hipótese, nós empregamos o inibidor de MEK (ativadora de ERK1 e ERK2), PD98059. O pré-tratamento das células com PD98059 inibiu dramaticamente inibiu a reatividade à PTP101 tanto induzida por BK como aquela induzida por EGF.

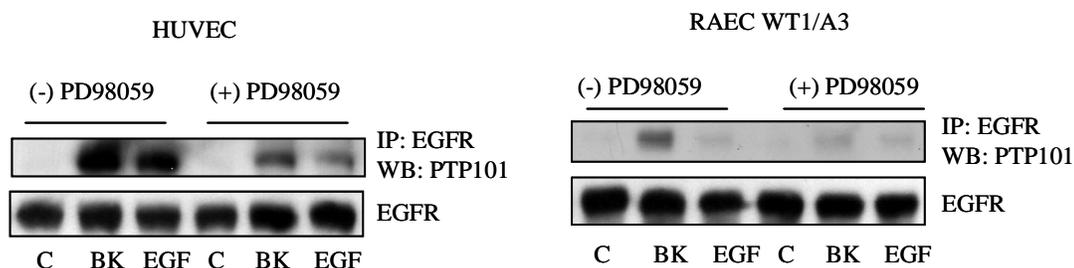


Figura 16: Pré-tratamento de células RAEC WT1/A3 e HUVEC com o inibidor de MEK1, PD98059, reverte a fosforilação em treonina detectada por PTP101 de EGFR. Células RAEC WT1/A3 e HUVEC foram pré-tratadas com PD98059 (50 μ M) por 30 minutos antes do estímulo com bradycinin ou EGF por 5 minutos. Extratos celulares (1 mg) foram imunoprecipitados com anti-EGFR. As proteínas foram analisadas por western blot com PTP101, anti-EGFR. Estes mesmo extratos (50 μ g), sem imunoprecipitação, foram analisados com anti-pERK1/2 e ant ERK1/2, respectivamente. Os experimentos mostrados são representativos de 3 experimentos.

Estes resultados sugerem que as ERK1/2 fosforilam o EGFR em resíduos de treonina e que este evento pode explicar a diminuição na fosforilação do receptor em resíduos de tirosina se pensarmos que a fosforilação do receptor de EGF em resíduos de serina/treonina está associado com a estabilidade do receptor e também com a afinidade com a qual este receptor liga-se ao seu ligante.

A ligação de EGF ao seu receptor ativa a atividade de tirosina cinase deste e dar início a cascatas de sinalização intracelular. Outra consequência da ligação de EGF é a rápida internalização do EGFR, o que pode levar a sua degradação (Mukherjee et al., 2006). Nós usamos imunoblot de lisado celular total para estimar a abundância de EGFR em células HUVEC e RAEC (clone WT1/A3), tratadas com EGF ou bradicinina por até duas horas (figura 17), como a quantidade de EGFR sofre variações dependentes do tempo quando as células são estimuladas com EGF, β -actina foi utilizada como controle interno da quantidade de proteína. Foi possível observar que EGF leva a uma progressiva diminuição na expressão de seu receptor a partir de 60 minutos de estímulo, o mesmo não sendo observado quando as células são estimuladas por BK. Podemos notar que o estímulo das células com bradicinina atenua a perda de EGFR quando comparado às células mantidas sob as mesmas condições só que estimuladas por EGF. Neste caso a expressão do EGFR praticamente se mantém. Este evento aparentemente está associado a uma maior fosforilação da sequencia consenso para serina-treonina cinases, fosforilação esta que é inibida pelo pré-tratamento das células com o inibidor de MEK.

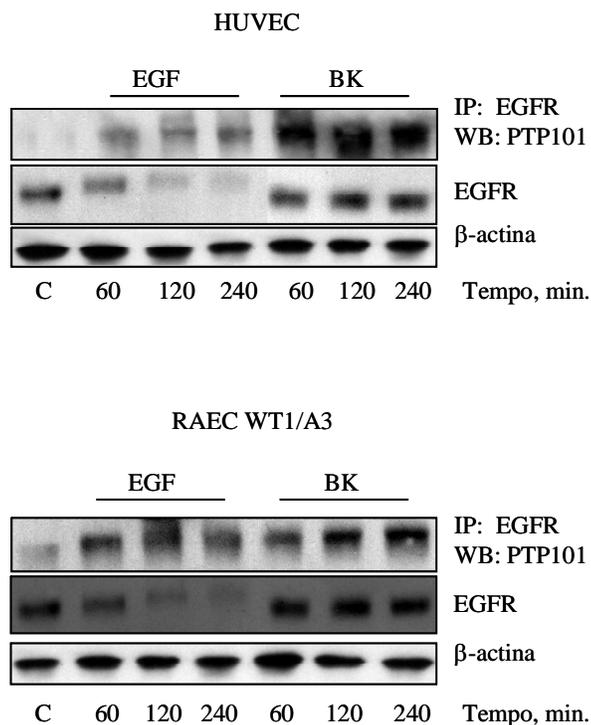


Figura 17: **Bradicinina apresenta menor taxa de degradação/distribuição de EGFR.** Células HUVEC e RAEC (WT1/A3) carenciadas foram tratadas com 20 ng/ml de EGF (canaletas 2 – 4), 1 μ M de BK (canaletas 6 – 7). Extratos celulares (1 mg) foram imunoprecipitados com anti-EGFR. As proteínas foram analisadas por western blot com PTP101, anti-EGFR. 50 μ g de lisado total foi resolvido por SDS-PAGE e revelado com o anticorpo anti- β -actina (blot inferior). C - refere-se à célula mantida em meio de carenciamento. O experimento mostrado é um exemplo de dois experimentos.

Os dados mostrados na figura 17 sugerem que ambos BK e EGF levam a fosforilação de EGFR em uma seqüência consenso de fosforilação de ERK, sugerindo que este evento é mediado pela ativação de ERK por estes estímulos. Resultados semelhantes foram obtidos quando da utilização de RAEC, clone WT1/A3 (superexpressa o receptor de EGF selvagem). Por outro lado, podemos notar uma quantidade maior de fosforilação nesta região quando da adição de BK, e esta fosforilação pode estar associada a maior estabilidade do receptor de

EGFR quando comparado às células tratadas com EGF, onde o nível de EGFR cai rapidamente após o estímulo.

Com estes experimentos ficou mostrado que, ao contrário do que observamos quando utilizamos uma fonte exógena de NO/espécies reativas do nitrogênio, o nitrosotiol SNA, o aumento na produção endógena de NO induzido por BK, não é responsável pela ativação de ERK. Assim, apesar de já termos mostrado que NO e as ERK1/2 estão envolvidos na transativação do EGFR, ainda fazia-se necessário estabelecer como esta transativação estava ocorrendo, e se outras proteínas sinalizadoras estariam participando neste processo.

IV.7 - Papel de Src cinase nas respostas desencadeadas por bradicinina.

Evidências acumuladas demonstram em alguns tipos celulares, que a ativação de Src pode contribuir para a transativação do receptor de EGF (Keely et al., 2000; Pierce et al., 2001; Buchanan et al., 2006). Além disso, trabalhos desenvolvidos pela aluna de doutorado Marli Curcio, em nosso laboratório evidenciaram que o óxido nítrico desempenha um papel importante na regulação de Src cinase. Src cinase pode ser S-nitrosilada por NO, o que aparentemente bloqueia o efeito inibitório da fosforilação da Tyr527 sobre a ativação da proteína (Curcio et al., 2006). Assim, como esta cinase pode ser regulada por NO e a sua ativação pode resultar na transativação do EGFR, fomos verificar se estes eventos estariam acontecendo em nosso modelo experimental.

Primeiro obtivemos informações sobre o estado de ativação de Src em células RAEC e HUVEC, para isso realizamos uma curva temporal e a partir dos extratos celulares obtidos analisamos o estado de ativação de Src utilizando anticorpo que reconhece Src fosforilada no resíduo de tirosina 416. Por meio da figura 18, podemos observar que BK promove a fosforilação de Src no resíduo de tirosina 416, com um pico em 5 minutos ($50\% \pm 11\%$) em

células HUVEC. No clone WT1/A3, sob as condições utilizadas não foi possível observar a fosforilação no resíduo de Tyr416, e conseqüente ativação, de Src. Resultados semelhantes foram observados na célula RAEC parental e no clone expressando a forma negativa do receptor de EGF (RAEC KD4/C2).

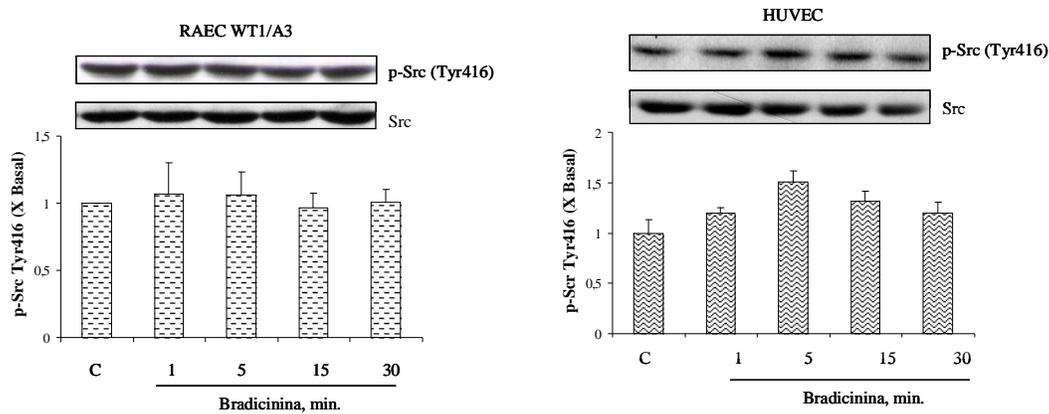


Figura 18: **Bradicinina estimula a fosforilação no resíduo de tirosina 416 de src.** Células RAEC WT1/A3 e HUVEC carenciadas foram estimuladas com $0,1\mu\text{M}$ de bradicinina nos tempos indicados. $50\mu\text{g}$ de lisado total foi resolvido por SDS-PAGE e revelado com os anticorpos anti-fosfo-src416 (blot superior) e anti-src total (blot inferior), cada re-blot era precedido de tratamento com β -mercaptoetanol/SDS para retirada do anticorpo anterior. C - refere-se à célula mantida em meio de carenciamento. Gráfico: quantificação por densitometria da fosforilação de src em tyr416 ($n = 3$, média \pm desvio padrão).

A seguir verificando se óxido nítrico poderia alterar o estado de ativação de Src, através do uso do inibidor de NOS, L-NAME em células HUVEC tratadas com BK. Células HUVEC foram pré-tratadas com 2 mM de L-NAME por 30 minutos e estimuladas com BK por cinco minutos. Podemos constatar que a presença de L-NAME não inibe a ativação de Src cinase induzida por BK. Este fato descarta a possibilidade de NO estar modulando a atividade de EGFR por esta via.

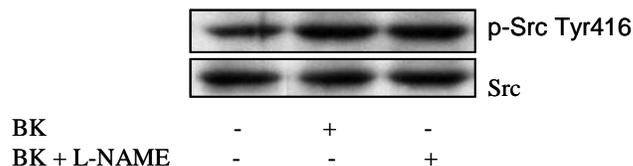


Figura 19: **Pré-tratamento de células HUVEC com inibidores, L-NAME, não tem efeito sobre a ativação de src cinase.** Células HUVEC carenciadas foram pré-incubadas 2 mM L-NAME por 30 minutos antes da adição de 0,1 μ M de bradicinina por 5 min. 50 μ g de lisado total foi resolvido por SDS-PAGE e revelado com os anticorpos anti-fosfo-src416 (blot superior) ou anti-src total (blot inferior), cada re-blot era precedido de tratamento com β -mercaptoetanol/SDS para retirada do anticorpo anterior. C - refere-se à célula mantida em meio de carenciamento.

Os resultados anteriormente descritos sugerem a participação de eNOS/NO e das ERK1/2 MAPK na transativação do EGFR, e descartam a participação de Src cinase no processo. Resolvemos então verificar se esta transativação poderia estar ocorrendo através da modulação redox de PTPs que podem modular a atividade do EGFR. Entre as várias PTPs, PTP SHP-1/ PTP 1C (Tomic, 1995), PTP 1B, a qual não contém um domínio de homologia a src ou domínios de ligação a fosfotirosina (Liu and Chernoff, 1997) e RPTP σ (Suárez-Pestana, 1999), podem modular negativamente EGFR. É sabido que NO pode oxidar resíduos de cisteínas de proteínas levando a formação de nitrosotióis. Desde que a formação de nitrosotióis é reversível, esta reação representa um importante mecanismo de sinalização pelo qual a modificação de proteínas mediada por NO pode iniciar sinalização celular (Hess et al., 2005)

Em nosso modelo experimental fomos verificar se a PTP 1C poderia ser regulada através de interação com NO. Inicialmente verificamos se o aumento na produção de NO derivada do estímulo de células endoteliais com BK poderia nitrosilar PTP 1C. Para

determinar se PTP 1C é nitrosilada por NO, nós estimulamos células HUVEC com 1 μ M de BK em diferentes tempos, na presença ou não de L-NAME. Após estímulo as células foram lisadas na presença de inibidores (menos inibidores de fosfatase). Neste ensaio, as células foram lisadas na presença de NEM para bloquear irreversivelmente todos os grupos tiol em cisteínas e prevenir posterior oxidação durante o processamento das amostras. PTP 1C foi imunoprecipitada utilizando um anticorpo monoclonal específico e após separação em gel de SDS-PAGE foi realizado western utilizando um anticorpo específico que reconhece proteínas nitrosiladas. Estes experimentos foram realizados somente com HUVEC.

Nossos resultados indicam que BK promove a nitrosilação de PTP 1C já a partir de cinco minutos, atingindo um valor máximo em trinta minutos (figura 20). Contudo a pré-incubação das células com L-NAME bloqueia completamente a nitrosilação de PTP 1C, sugerindo fortemente que NO está envolvido na modulação da atividade desta fosfatase e que este pode ser um dos mecanismos pelo qual NO favorece a fosforilação do EGFR.

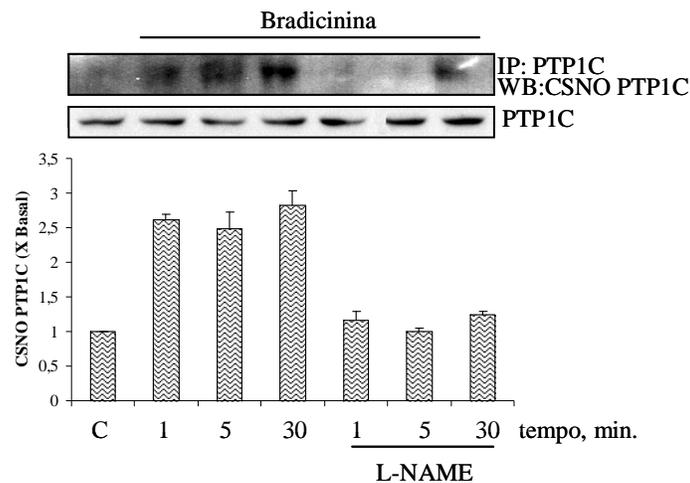


Figura 20: **Inibição de NOS por L-NAME bloqueia a nitrosilação de PTP 1C induzida por bradycinina.** Células HUVEC mantidas em carenciamento foram estimuladas com $1 \mu\text{M}$ BK nos tempos acima e onde indicado foram pré-incubadas com 2 mM de L-NAME. Depois das incubações os extratos celulares foram bloqueados com 20 mM de NEM. A partir de 1 mg de extrato total, PTP 1C foi imunoprecipitada usando um anticorpo monoclonal, separada em 10% SDS-PAGE e transferida a uma membrana de PVDF. PTP 1C nitrosilada foi reconhecida utilizando um anticorpo monoclonal que reconhece proteínas nitrosiladas (blot superior). A quantidade de PTP 1C imunoprecipitada foi controlada através da utilização de um anticorpo anti-PTP 1C (blot inferior).

IV.8 - Heparina bloqueia a transativação de EGFR por bradycinina

Foi demonstrado anteriormente que em SMCs, heparina bloqueia a ativação de ERK induzida por trombina e outros agonistas de GPCR (Hedin et al., 1998). Como BK se associa a um GPCR e promove a transativação de EGFR (figura 8), resolvemos verificar se heparina poderia modular negativamente este processo.

Entre a superfamília de fatores de crescimento EGF, anfiregulina e HB-EGF destacam-se por possuírem um domínio de ligação a heparina adjacente a unidade

semelhante ao EGF. Este domínio liga-se a cadeias laterais de heparan sulfato presentes em moléculas de proteoglicanos de heparan-sulfato (HSPGs) na superfície celular, os quais são requeridos por HB-EGF e anfiregulina como co-receptor para eficiente ativação de EGFR. Como HB-EGF requer os HSPGs associados à superfície celular como coreceptor para EGFR (Raab and Klagsbrun, 1997), resolvemos testar a possibilidade de que heparina adicionada exogenamente pudesse inibir HB-EGF por competir pela ligação a HSPGs na superfície celular. Se nossa hipótese estivesse correta, esperaríamos uma inibição da transativação de EGFR induzida por BK.

Usando heparina como ferramenta para dissecar o processo de transativação do EGFR em células endoteliais, nós encontramos que heparina interrompe a sinalização por BK no nível de transativação de EGFR (figura 21). Em adição, a ativação de ERK1/2 induzida por BK foi inibida por heparina. Contudo, estes mesmos elementos de sinalização não foram inibidos quando 20 ng/ml de EGF foram utilizados como estímulo.

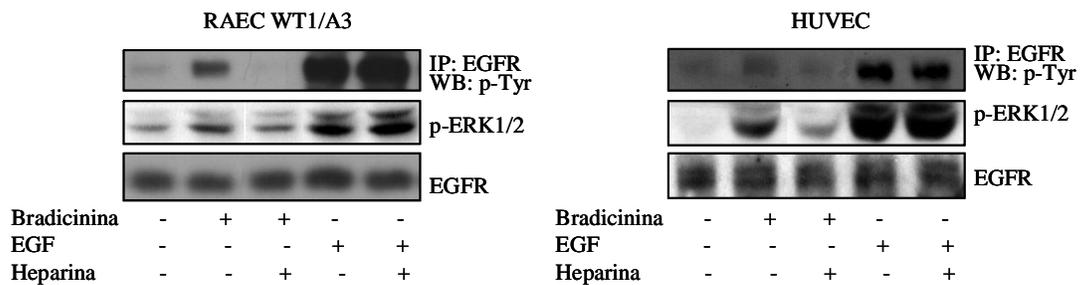


Figura 21: **A transativação de EGFR requer a atividade intrínseca de cinase de EGFR e é inibida por hepararina.** Células endoteliais mantidas em meio de carenciamento foram estimuladas com 0,1 μ M de bradicinina por 5 minutos na presença ou ausência de heparina (100 μ g/ml, pré-incubado 30 minutos antes). EGFR foi imunoprecipitado e Western Blot do material imunoprecipitado foi desafiado com anticorpo anti-fosfotirosina. Membranas foram reutilizadas usando-se o anticorpo anti-EGF. IP: imunoprecipitação. WB: Western Blot.

Estes resultados sugerem que um ligante de EGFR pode estar envolvido neste processo.

Assim, nesta etapa do trabalho conseguimos mostrar que bradicinina leva a ativação da via de eNOS e à transativação do EGFR por vias independentes, uma vez que a diminuição da atividade do EGFR não resulta em uma diminuição proporcional na produção de NO e que um dos possíveis mecanismos pelo qual NO está alterando a atividade do EGFR é por meio da inibição da atividade de PTPs. Além disso, observamos que EGFR é importante para uma ativação sustentada das ERK1/2 e que esta, provavelmente, por um mecanismo de retroalimentação positiva favorece a ativação do EGFR por meio da estabilização do receptor através da fosforilação deste em resíduos de Serina/Treonina.

In vivo, a resposta angiogênica requer proliferação para aumentar a população de células endoteliais, migração e organização das células endoteliais em estruturas semelhantes a tubo formando os futuros capilares. A última etapa pode ser resumida em termos de interações entre célula/célula e célula/matriz. Para determinar se EGFR induz angiogênese diretamente nós estudamos, em células HUVEC e RAEC, as diferentes etapas envolvidas neste processo.

IV.9 - Bradicininina estimula a proliferação de células endoteliais

As mudanças na cinética de migração e proliferação celular afetam a angiogênese. Portanto, nós examinamos os efeitos de BK, e a ativação das vias de eNOS e EGFR sobre a proliferação de RAEC e HUVEC. A habilidade de Bk induzir mitogênese em células endoteliais (RAEC e HUVEC) foi acessada usando-se incorporação de BrdU e proliferação celular. Os resultados apresentados na Figura 22 mostram que BK estimula a entrada na fase S do ciclo celular em todas as células analisadas. No entanto, o clone KD2/C4 (expressa o

receptor de EGF desprovido da atividade cinase), quando estimulado com BK observamos um aumento de 22% (\pm 8%) na proliferação celular enquanto que em células RAEC parental, RAEC WT1/A3 e HUVEC este índice é em torno de 70%. Estes resultados sugerem que a resposta mitogênica desencadeada por BK é dependente de um receptor de EGF funcional.

Com os resultados acumulados até este momento verificamos que aumento na produção de NO e ERK favorecem a ativação de EGFR, e que este é transativado por BK por meio de ligantes para EGFR. Então, usando inibidores destas vias, verificamos como estes controlam a proliferação celular induzida por BK. Como a inibição de NOS por L-NAME diminui a fosforilação de EGFR, e caso este esteja envolvido no aumento de proliferação observado pelo tratamento das células com 1 μ M de BK, esperaríamos observar uma conseqüente redução na proliferação celular. O tratamento com L-NAME diminui a entrada em S em torno de 30% para RAEC, RAEC WT1/A3 e HUVEC. O clone KD2/C4 apresentou uma redução de 14% \pm 5% quando comparado ao controle. Mas vale a pena salientar que este mesmo clone mostrou-se menos sensível à diminuição na produção de NO quando observamos a fosforilação de EGFR na presença de L-NAME. Ainda, o pré-tratamento das células com 100 μ g/ml de heparina ou 50 μ M de PD98059 bloquearam completamente a entrada em todas as células. Estes achados demonstram diretamente que BK estimula a proliferação de células RAEC e HUVEC e demonstra de forma mais inequívoca um papel para a transativação de EGFR e ERK1/2 na atividade mitogênica de BK.

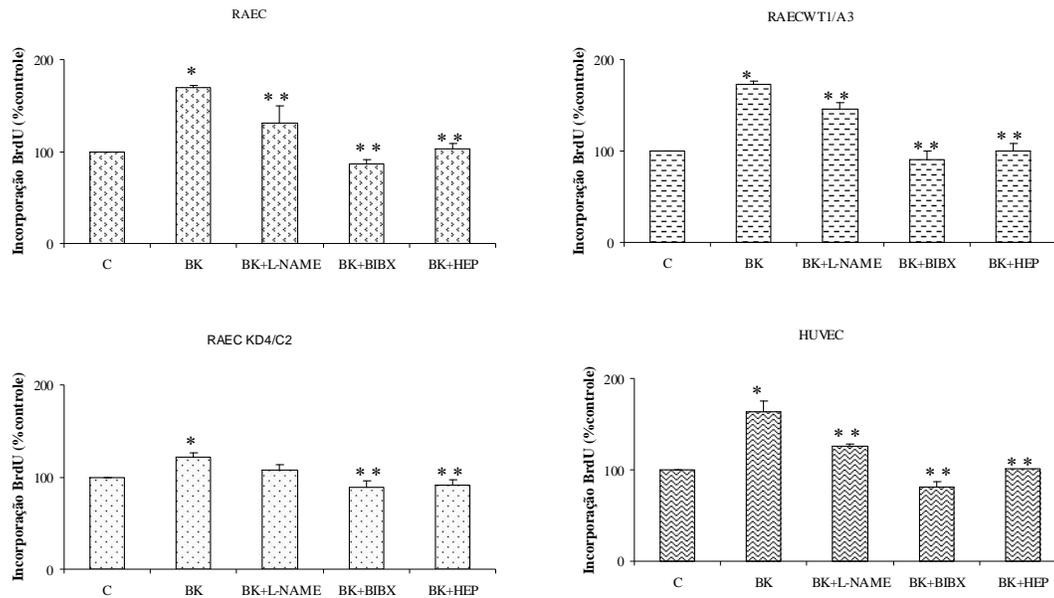


Figura 22: Entrada em S induzida por bradicinina depende da atividade de EGFR e ERK1/2. Células RAEC ou HUVEC foram carenciadas por 48 horas. Após carenciamento, adicionou-se 1 μ M de Bk na presença ou não de 2 mM de L-NAME, 50 μ M PD98059, 100 μ g/ml de heparina pré-adicionado meia hora antes. Doze horas após o estímulo, 100 μ M de BrdU foi adicionado. Após 24 horas as células foram processadas conforme descrito em métodos. A porcentagem de núcleos marcados foi obtida a partir da relação do número total de células (DAPI) e o número de células marcadas (BrdU/fluoresceína). C - refere-se às células mantidas em meio livre de soro. Experimentos foram realizados pelo menos 3 vezes em duplicata. Dados são mostrados como média \pm desvio padrão. $p < 0,05$ pelo teste ANOVA/Newman-Keuls. * diferente do controle; ** diferente do tratamento somente com BK. C – controle, BK – bradicinina, Hep – Heparina.

Para verificar se bradicinina era capaz de estimular a proliferação celular, após 24 horas de estímulo com bradicinina na presença ou não de inibidores, foi feita uma contagem das células RAEC WT1/A3 e HUVEC. Na presença de L-NAME, inibidor de NOS, a proliferação celular induzida por BK diminuiu, e foi completamente inibida por 50 μ M de PD98059 e 100 μ g/ml de heparina (figura 23). Estes resultados confirmam aqueles já obtidos para o ensaio de entrada em S.

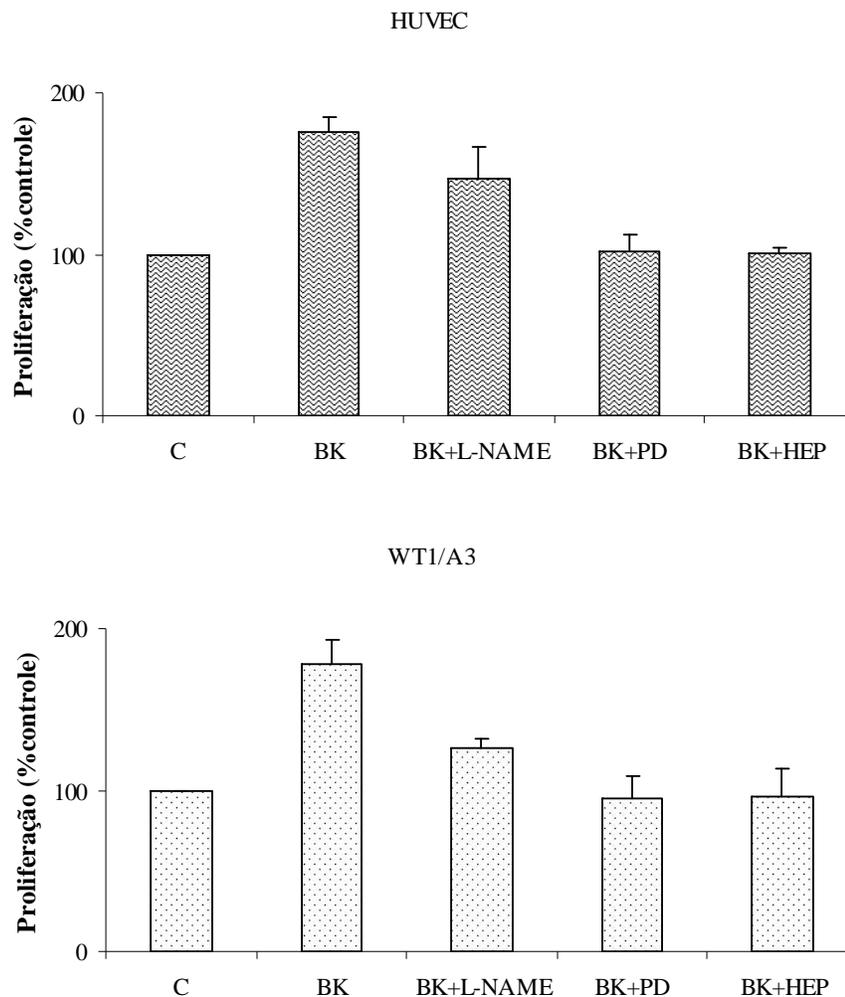


Figura 23: **Bradicinina estimula a proliferação celular em células RAEC e HUVEC.** Após carenciamento as células foram incubadas com 1 μ M de bradicinina. Onde indicado, 30 minutos antes do estímulo as células foram incubadas com 2 mM L-NAME, 50 μ M PD98059 ou 100 μ g/ml de heparina. Proliferação celular foi determinada por contar o número de células em câmara de Neubauer. Experimentos foram realizados pelo menos 3 vezes em triplicata. Dados são mostrados como média \pm desvio padrão. * $P \leq 0,05$ versus controle pelo teste ANOVA/Newman-Keuls. C – controle, BK – bradicinina, Hep – Heparina.

Tendo sido demonstrado que BK induz entrada em S (figura 22) e também aumenta o número de células endoteliais (figura 23), demos início aos experimentos para determinar o

papel de EGFR sobre o processo de angiogênese induzido por BK. Nós primeiro analisamos a habilidade de bradicinina estimular a formação das estruturas tubulares características de angiogênese em células RAEC e HUVEC sobre Matrigel. Sob estas condições, a adição de fatores angiogênicos, tais como bFGF e VEGF induz a formação de estruturas semelhantes a tubos que lembram finos capilares.

IV.10 - Efeitos de BK sobre o processo de angiogênese em células HUVEC

Demos início a estes experimentos tentando padronizar as condições em que ocorre a formação de tubos em células RAEC (parental e clones). Apesar de várias tentativas, seguindo diferentes protocolos, sob as diferentes condições utilizadas não foi possível observar a formação dessas estruturas em células RAEC, mesmo quando usamos VEGF, um típico fator angiogênico como controle positivo. Assim, realizamos esses experimentos somente com células HUVEC. Assim, plaqueamos 1×10^4 células HUVEC em Matrigel, na presença de $1 \mu\text{M}$ de BK e analisamos a formação das estruturas tubulares 24 horas após o plaqueamento (figura 24). Na presença de $1 \mu\text{M}$ de BK, estruturas que se assemelham a capilares foram prontamente observadas após 24 horas de incubação das células no gel. Estes dados indicam que BK é capaz de induzir angiogênese *in vitro*, fato este já observado para outros tipos de células endoteliais (Miura et al., 2002; Parenti et al., 2001).

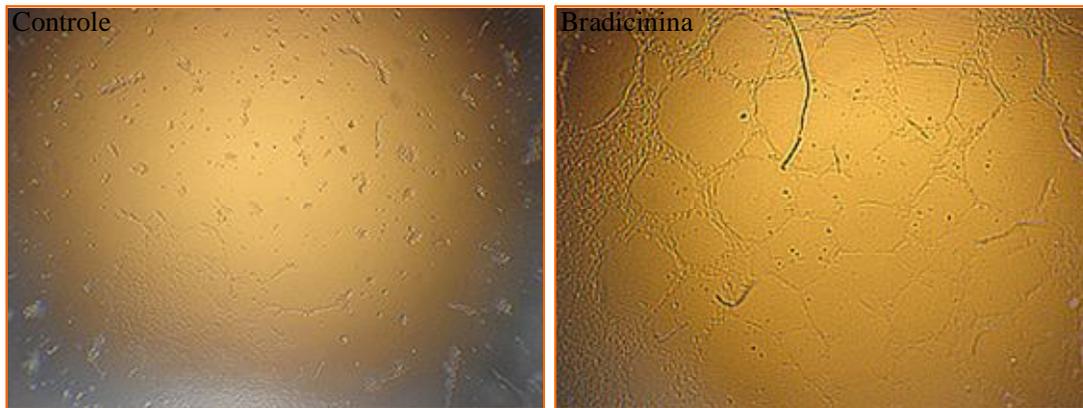


Figura 24: **Indução de estruturas semelhantes a tubo em Matrigel por bradicinina.** 1×10^4 células HUVEC foram semeadas sobre Matrigel na presença de $1 \mu\text{M}$ de Bradicinina. Onde indicado, 30 minutos antes do estímulo adicionou-se 2 mM L-NAME, 50 μM PD98059 ou 100 $\mu\text{g/ml}$ heparina (HEP). 24 horas depois, as células foram fotografadas. O gráfico mostra a porcentagem de formação de tubo comparada àquela presente na célula mantida sem nenhum estímulo – C. Note a organização de HUVEC em um modo que se assemelha a uma rede de capilares quando a cultura foi mantida em bradicinina.

Nossa intenção inicial era usarmos os clones de RAEC para determinarmos o papel do EGFR e sua modulação por NO no processo de angiogênese. Contudo, não conseguimos estabelecer as condições para que RAEC sofresse morfogênese tubular *in vitro*. Deste modo, usando HUVEC como modelo, traçamos duas estratégias para tentarmos alcançar esta meta. Fizemos uso do inibidor da atividade de tirosina cinase específico para o receptor de EGF, BIBX e também transfectamos células HUVEC, transientemente, com o EGFR mutado.

IV.11 - L-NAME e BIBX bloqueiam a formação de tubo induzida por bradicinina

É possível que a transativação do receptor de EGF por bradicinina induza a formação de tubo. Portanto, nós a seguir examinamos o efeito de BIBX, um específico inibidor do receptor de EGF (Toulany et al., 2006), sobre a formação de estruturas tubulares induzida por BK. Experimentos iniciais de natureza dose-resposta demonstraram que a concentração

efetiva mínima de BIBX foi de 1 μM (figura 25). Como mostrado na figura 25, o pré-tratamento de células HUVEC com BIBX inibiu a fosforilação em resíduos de tirosina induzida por BK.

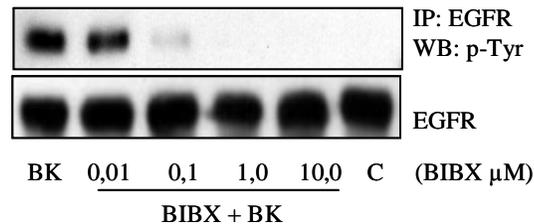


Figura 25: Figura 1: **Efeitos de bradicinina sobre a fosforilação de EGFR em resíduos de tirosina.** Células HUVEC carenciadas foram pré-incubadas por 30 minutos com diferentes concentrações de BIBX e estimuladas com 1 μM de bradicinina em por cinco minutos. Após isto, as células foram lisadas e depois de imunoprecipitação usando-se o anticorpo anti-EGFR as proteínas foram separadas por SDS-PAGE, transferidas para membrana de PVDF e reveladas com o anticorpo anti-fostotirosina (blot superior). A quantidade de EGFR imunoprecipitado foi controlada através da utilização de um anticorpo anti-EGFR (blot inferior). C – Controle (células mantidas em meio de carenciamento).

Baseamos nesta etapa do estudo determinar o envolvimento das vias de sinalização das quais participam eNOS e EGFR na resposta mitogênica a BK.

Células foram plaqueadas em Matrigel, e pré-tratadas com 2 mM de L-NAME, 50 μM de PD98059 ou 1 μM de BIBX. Após 30 minutos adicionou-se 1 μM de bradicinina por 24 horas. Observamos que BK provoca um aumento de 2,5 vezes acima do controle, resposta esta que é completamente inibida pelo tratamento com os inibidores. Devemos lembrar que a redução na produção de NO promovia apenas uma redução parcial na fosforilação do receptor de EGF (50 – 70%) e uma redução parcial na proliferação celular (em torno de 30%). Contudo podemos observar que no processo de formação de estruturas tubulares, a redução é completa.

Uma explicação para esta observação seria que NO está agindo sobre outros alvos além do EGFR.

Existem evidências substanciais que NO é um mediador crítico do processo de angiogênese, tendo muitos efeitos sobre este processo. Por exemplo, NO é um fator de sobrevivência endotelial, inibe apoptose (Dimmeler et al., 1999; Rossig et al., 1992), e aumenta proliferação (Morbidelli et al., 1996; Ziche et al., 1997). Além disso, NO aumenta a migração celular - dados obtidos pela aluna de mestrado, Roberta Borges, demonstraram que a inibição da via de eNOS bloqueia a migração de células RAEC e HUVEC induzida por BK. Em adição, NO aumenta a interação entre célula endotelial e matrix celular por induzir a expressão de $\alpha v\beta 3$ (Murohara et al., 1998). Finalmente, NO pode induzir a síntese e liberação de VEGF, um estímulo angiogênico, e esta indução pode ser mediada por ERK1/2, sendo que neste caso, por um aumento da atividade de ERK1/2 por NO (Dulak and Jozkowicz, 2003).

De acordo com as nossas expectativas o tratamento de células HUVEC com o inibidor do EGFR inibiu completamente a formação de estruturas tubulares induzida por BK. Observou-se o mesmo quadro quando do tratamento destas células com o inibidor de MEK. Isto corrobora nossas observações anteriores, onde a inibição da ativação das ERK1/2 bloqueava a proliferação celular. Por outro lado, sabe-se que ERK1/2 pode regular a expressão de VEGF, e também aumentar a atividade transcricional da proteína HIF-1 α , a qual aumenta a transcrição do fator do crescimento vascular endotelial (VEGF).

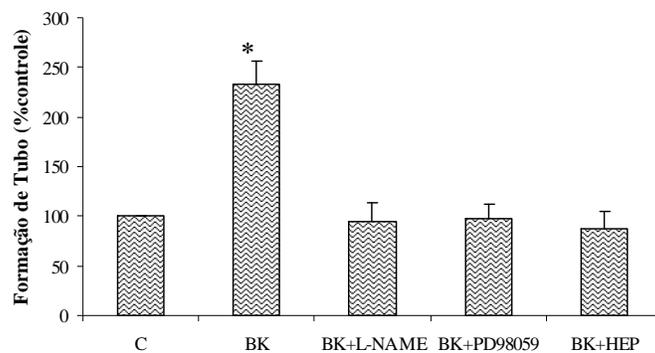
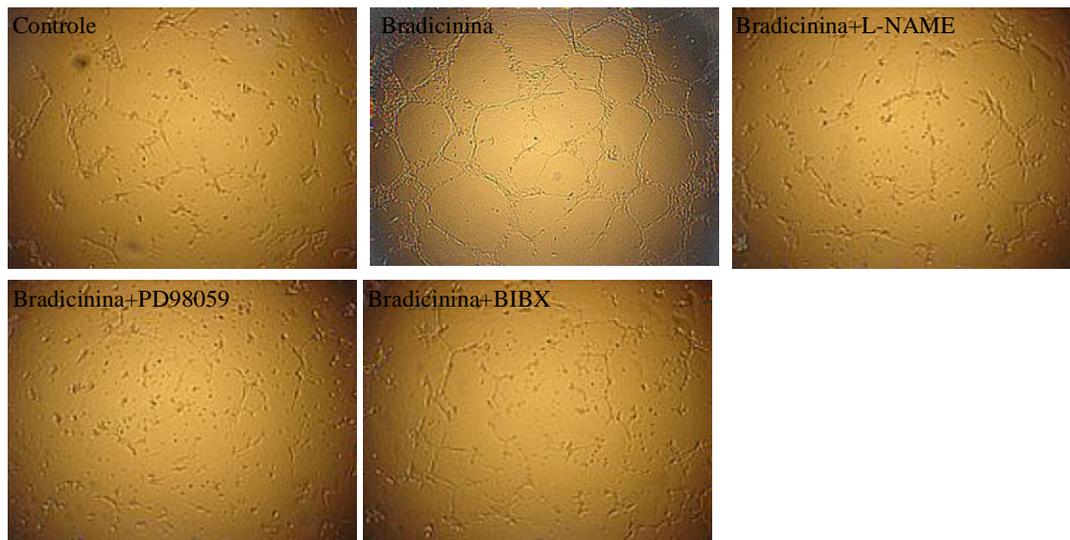


Figura 26: **Indução de estruturas semelhantes a tubo em Matrigel por bradicinina.** 1×10^4 células HUVEC foram semeadas sobre Matrigel na presença de $1 \mu\text{M}$ de Bradicinina. Onde indicado, 30 minutos antes do estímulo adicionou-se 2 mM L-NAME, 50 μM PD98059 ou 100 $\mu\text{g/ml}$ heparina (HEP). 24 horas depois, as células foram fotografadas. O gráfico mostra a porcentagem de formação de tubo comparada àquela presente na célula mantida sem nenhum estímulo – C. Cada amostra refere-se a uma triplicata e sua respectiva média \pm desvio padrão. * $P \leq 0,05$ versus controle pelo teste ANOVA/Newman-Keuls. Note a organização de HUVEC em um modo que se assemelha a uma rede de capilares quando a cultura foi mantida em bradicinina.

IV.12 - A transfecção de HUVEC com o receptor de EGF com o domínio cinase inativo (EGFR KD) reverte à formação de estruturas tubulares desencadeada por BK.

Para confirmarmos os resultados já obtidos com o uso do inibidor da atividade de tirosina cinase do EGFR, realizamos a transfecção transiente de HUVEC com o EGFR mutado (EGFR KD). Iniciamos os experimentos por verificar se estava ocorrendo ou não a ativação do EGFR nestas células. A partir da figura 27 podemos verificar que nem BK nem EGF foram capazes de promover a ativação do EGFR, resultados semelhantes já haviam sido observados com RAEC transfectadas estavelmente.

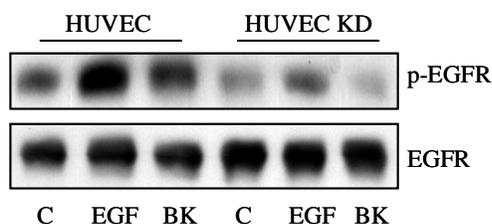


Figura 27: A transfecção de HUVEC com EGFR KD reverte a ativação de EGFR por bradicinina. Células HUVEC foram transfectadas com 10 μ g de plasmídeo contendo seqüência para EGFR KD ou vetor vazio, e 48 horas após a transfecção foram carenciadas por 24 e onde indicado foram estimuladas por 5 minutos, com 1 μ M de bradicinina ou 20ng/ml de EGF. As células foram lisadas e depois de imunoprecipitação a partir de 500 μ g proteína total, usando-se o anticorpo anti-EGFR as proteínas foram separadas por SDS-PAGE, transferidas para membrana de PVDF e reveladas com o anticorpo anti-fostotirosina (blot superior). A quantidade de EGFR imunoprecipitado foi controlada através da utilização de um anticorpo anti-EGFR (blot inferior). C - controle (células mantidas em meio de carenciamento), BK – bradicinina, EGF – fator de crescimento epidérmico.

Uma vez observado que o EGFR não estava sendo ativado fomos verificar como estas células se comportavam em relação a formação de estruturas tubulares quando estimuladas

por BK. A partir da figura 28 podemos verificar que estas células não apresentam a formação de estruturas semelhantes a tubos quando estimuladas por BK ou EGF, estas estruturas podendo ser ainda observadas somente em células tratadas com 10% de soro fetal bovino, demonstrando que a ausência de resposta à bradicinina e EGF não é devido a uma incapacidade da célula devido à transfecção.

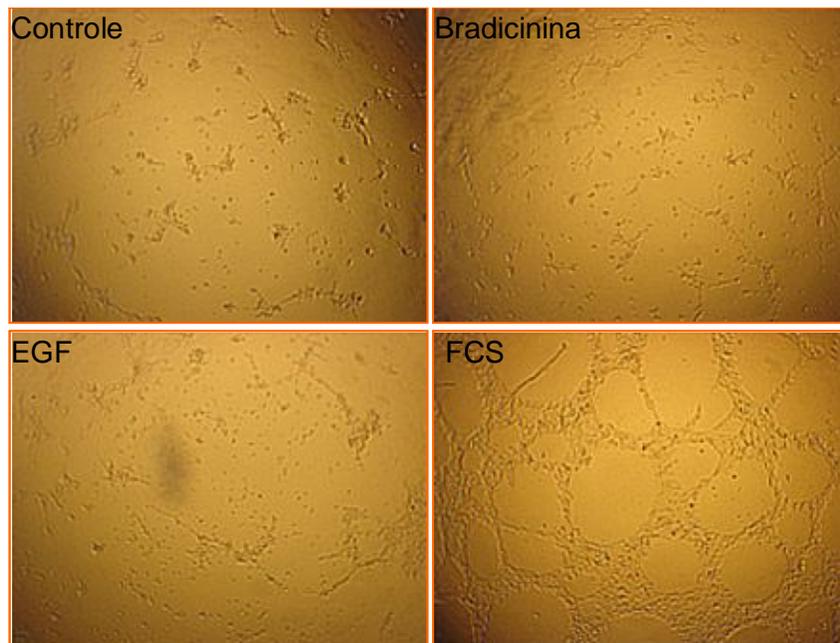


Figura 28: **O receptor de EGF é importante para que bradicinina induza a formação de tubos em HUVEC.** Células HUVEC foram transfectadas com 10 μ g de plasmídeo contendo seqüência para EGFR KD, e 48 horas após a transfecção foram plaqueadas sobre Matrigel e estimuladas por 1 μ M de bradicinina, 20ng/ml de EGF ou 10% de FCS (controle positivo). C - controle (células mantidas em meio de careciamento), BK – bradicinina, EGF – fator de crescimento epidérmico e FCS – soro fetal bovino.

Assim, utilizando o inibidor BIBX e transfectando células HUVEC com prK5KD, conseguimos estabelecer de maneira inequívoca que o receptor de EGF é importante no processo de angiogênese induzido por BK.

IV.13 - Expressão dos fatores de crescimento bFGF e VEGF-A (VEGF) em células endoteliais HUVEC

O fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) e o VEGF são potentes fatores angiogênicos. Tanto NO como ERK1/2 podem modular a expressão destes fatores, principalmente em relação à VEGF onde a importância de NO na indução do processo de angiogênese desencadeado por VEGF é amplamente demonstrado.

Nós então analisamos o papel de bFGF e VEGF em transduzir as propriedades angiogênicas de BK. Nós primeiro investigamos se BK poderia regular positivamente bFGF e VEGF endógeno em HUVEC. HUVEC foi exposta a 1 μ M BK e 6 horas depois foi realizado PCR em tempo real para verificarmos as expressões dos RNA mensageiros para os dois fatores.

Como mostrado na figura 29, 6 horas de exposição a BK leva a uma indução de 2 vezes na expressão do RNA mensageiro de VEGF, sem contudo levar a aumentos significativos estatisticamente na expressão de bFGF. Ao analisar esta figura verificamos também que a adição de BIBX, inibe a expressão de VEGF, sugerindo que este aumento deve-se à transativação do receptor de EGF.

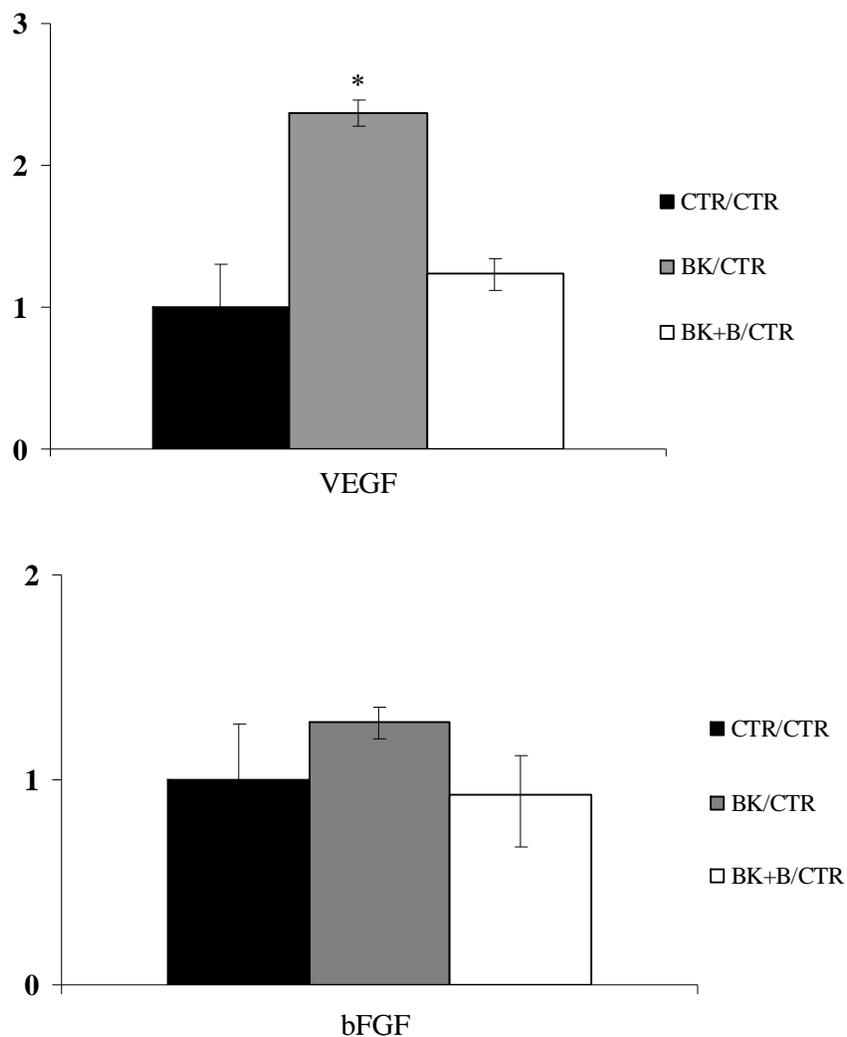


Figura 29: Análise da expressão de VEGF e bFGF após estímulo de HUVEC com BK. Células HUVEC plaqueadas em placas de 100 mm, foram carenciadas por 24 horas, estimuladas com 0,1 μ M de bradicinina por 6 horas, na presença ou não 1 μ M de BIBX, adicionado as células 30 minutos antes do estímulo. O RNA foi então obtido utilizando-se Trizol, e a partir deste preparou-se o cDNA, o qual foi utilizado na reação de Real Time PCR utilizando-se SYBR Green PCR Master Mix, com primers específicos. Foi utilizado como normalizador primers para RNA ribossomal. Estes experimentos foram realizados 3 vezes, cada um em triplicata. Dados são apresentados como média \pm desvio padrão, $P < 0,05$. * - estatisticamente significativo em relação ao controle. CTR – Controle (células mantidas em meio de carenciamento). BK – bradicinina. B – BIBX.

IV.14 - VEGF participa da indução de angiogênese promovida por bradicinina

Verificamos que BK aumenta a expressão de VEGF e que este aumento depende da transativação do EGFR. Para investigar um potencial papel de VEGF na angiogênese induzida por bradicinina nós utilizamos o inibidor SU5416, o qual é um inibidor específico da atividade de tirosina cinase do receptor de VEGF.

Para investigar a participação de VEGF na formação de tubo em células endoteliais, HUVECs foram plaqueadas sobre Matrigel e se quantificou as estruturas tubulares que se formaram. Tratamento de células HUVEC com BK estimulou a formação de estruturas tubulares (figura 30). Para determinar se VEGF é um mediador essencial para angiogênese induzida pela via BK/EGFR células HUVECs foram pré-incubadas com o inibidor SU5416. A adição de 1 μ M de Su5416 inibiu de 80 – 100% a formação das estruturas tubulares estimulada por BK.

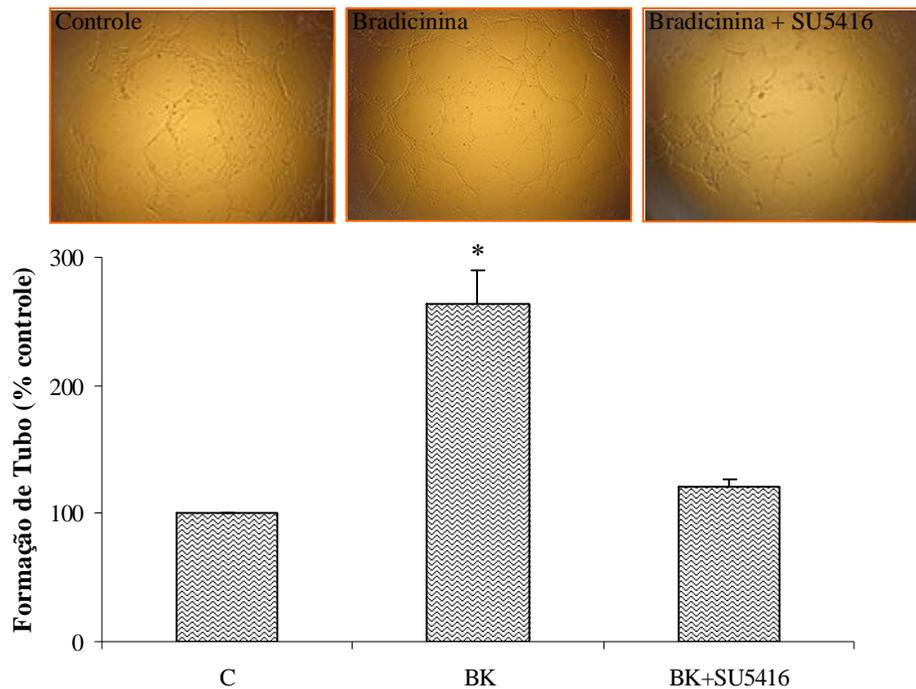


Figura 30: **VEGF inibe a indução de estruturas semelhantes a tubo em Matrigel por bradicinina.** 1×10^4 células HUVEC foram semeadas sobre Matrigel na presença de $1 \mu\text{M}$ de Bradicinina. Onde indicado, 30 minutos antes do estímulo adicionou-se $1 \mu\text{M}$ SU5416. 24 horas depois, as células foram fotografadas. O gráfico mostra a porcentagem de formação de tubo comparada àquela presente na célula mantida sem nenhum estímulo – C. Cada amostra refere-se a uma triplicata e sua respectiva média \pm desvio padrão. * $P \leq 0,05$ versus controle pelo teste ANOVA/Newman-Keuls.

Com estes experimentos demonstramos que o fator de crescimento VEGF é importante para o processo de angiogênese desencadeado por bradicinina via transativação do EGFR.

IV.15 - Modelo proposto para a angiogênese induzida por bradicinina

O estímulo de células endoteliais com BK leva à ativação de eNOS e concomitante aumento na produção de NO e também à transativação do EGFR. A transativação do EGFR

parece envolver o processamento de ligantes de EGFR, uma vez que o pré-tratamento das células com heparina bloqueia completamente a fosforilação do receptor em resíduos de tirosina. Em adição, uma vez ativado, o EGFR induz à ativação de ERK1/2, a qual por um mecanismo de feedback positivo fosforila o receptor de EGF em resíduos de tirosina, muito provavelmente diminuindo a sua degradação. O aumento na produção de NO também parece ser importante para a manutenção da resposta de EGFR, uma vez que o pré-tratamento das células com L-NAME reduz a ativação do receptor. Outro aspecto a ser salientado é o fato de que este aumento da atividade de EGFR por NO, parece envolver a inibição da atividade de PTP1C via a nitrosilação de uma cisteína essencial. Assim, poderíamos montar o esquema mostrado na figura 31 para melhor descrever os achados aqui relatados.

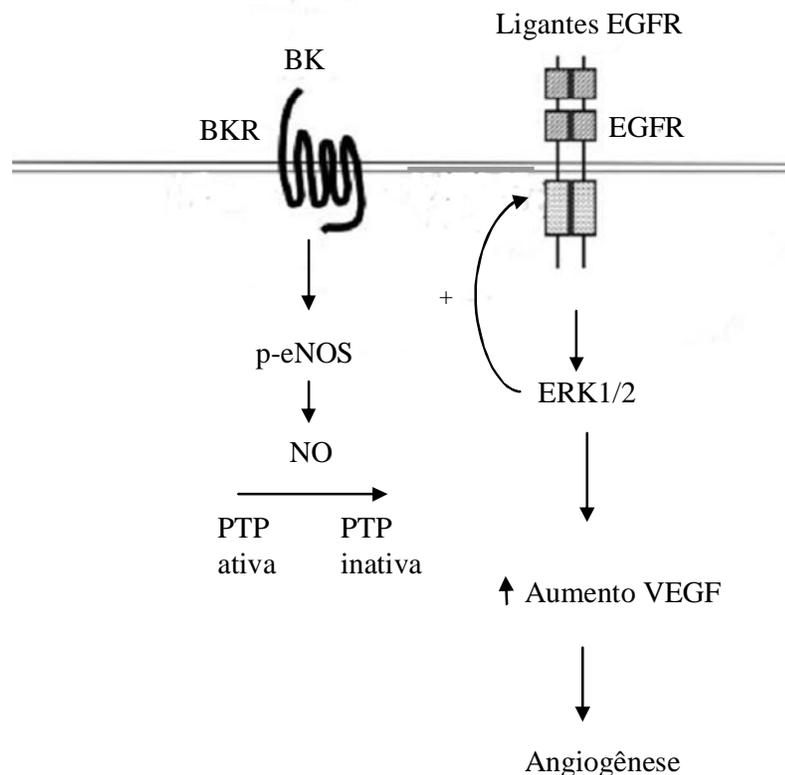


Figura 31: **Modelo proposto para a transativação do receptor de EGF e angiogênese.** Para maiores detalhes recorrer ao texto acima.

Além de bradicinina também utilizamos “shear stress” para promover aumentos na produção de NO endógeno, a fim de dar maior sustentabilidade a nossa hipótese e também evitar potenciais artefatos associados à utilização de um único sistema experimental. Assim, abaixo trazemos alguns experimentos semelhantes àqueles obtidos com BK, utilizando células HUVEC estimuladas por “shear stress”.

IV.16 - Indução na ativação do receptor de EGF em células endoteliais após estímulo por “shear stress”

Para avaliar os efeitos de shear stress sobre a ativação do EGFR células HUVEC foram expostas a um fluxo contínuo (“shear stress”) de 15 dinas/cm^2 em diferentes tempos e coletadas para análise dos níveis de fosforilação do EGFR (figura 32). Quando comparada à célula que foi mantida em repouso, podemos observar que a fosforilação do EGFR ocorreu dentro de 5 minutos, alcançando o máximo em 30 minutos ($3,7 \pm 0,4$ vezes de aumento) e decaindo a partir de 60 minutos. Aqui nós podemos notar que semelhante ao que ocorre com estímulo por BK, shear stress também promove a fosforilação de EGFR, porém com uma cinética diferente, sendo a resposta mais lenta.

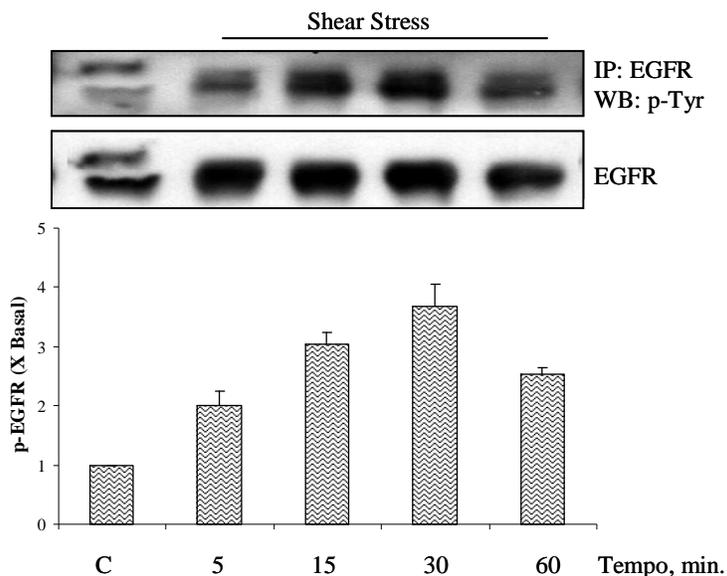


Figura 32: “Shear stress” estimula a rápida fosforilação de resíduos de tirosina de EGFR em células endotelial. Células HUVEC foram submetidas a fluxo contínuo de 15 dinas/cm² durante o tempo indicado (5, 15, 30 e 60 minutos). As células foram lisadas e o receptor de EGF foi obtido por imunoprecipitação utilizando-se o anticorpo anti-EGFr conforme descrito em métodos. A quantidade de EGFR imunoprecipitado foi controlada através da utilização de um anticorpo anti-EGFR. C – refere-se à condição em que as células foram mantidas estacionárias. A fosforilação foi quantificada densitometricamente como a proporção de EGFR fosforilado e EGFR total. Em cima, auto-radiografia de western blot. O gráfico de barras representa os resultados obtidos a partir da densitometria das bandas. Dados representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.

IV.17 - “Shear stress” aumenta a fosforilação da Ser1177 de eNOS com uma cinética semelhante a produção de NO

Utilizando as mesmas células descritas acima, recolhemos o meio de cultura destas células e analisamos a produção de NO. Podemos notar que a exposição das células ao “shear stress” estimula a liberação crescente de NO pelas células endoteliais com um máximo em 30

minutos ($2,0 \pm 15\%$) (figura 33). Nós também examinamos se o “shear stress” induz a fosforilação da eNOS no resíduo de serina 1177 (Ser1177), desde que este sítio é sabido ser o mais importante para a ativação de eNOS. Observamos que o “shear stress” estimula a fosforilação de eNOS já em 5 minutos, com um máximo em 30 minutos, sugerindo uma correlação direta entre os dois eventos.

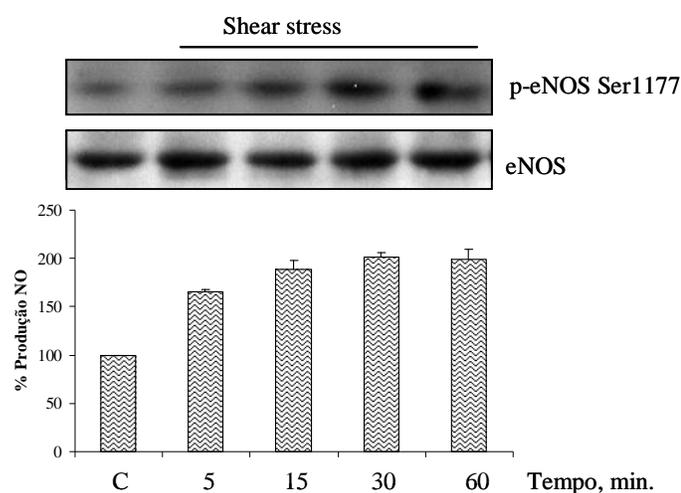


Figura 33: Curva de tempo da liberação de óxido nítrico e fosforilação de eNOS estimulada por shear stress em células endoteliais. Células HUVEC foram expostas a “shear stress” durante o período de tempo indicado. O sobrenadante foi recolhido e os lisados celulares foram preparados e então usados para western blot usando-se os anticorpos anti-P-eNOS-Ser1177 (blot superior) ou eNOS (blot inferior – proteína total). O NO liberado foi determinado por quimiluminescência. Dados representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.

IV.18 - “Shear stress” leva à ativação das ERK1/2

Como nosso modelo envolve a ativação de ERK1/2, também verificamos se esta era ativada após estímulo por “shear stress”. Estímulo de ERK1/2 por “shear” foi medido por “western blotting” com um anticorpo específico para ERK1/2 fosforiladas. Comparada à célula mantida em condição estática, “shear stress” promove a fosforilação das ERK1/2 com um pico em 5 minutos ($4 \pm 0,16$ vezes acima do controle), retornando ao nível basal em 60 minutos. Estes resultados demonstram que ERK1/2 é fosforilada em resposta a “shear stress” com uma cinética semelhante à já observada para BK.

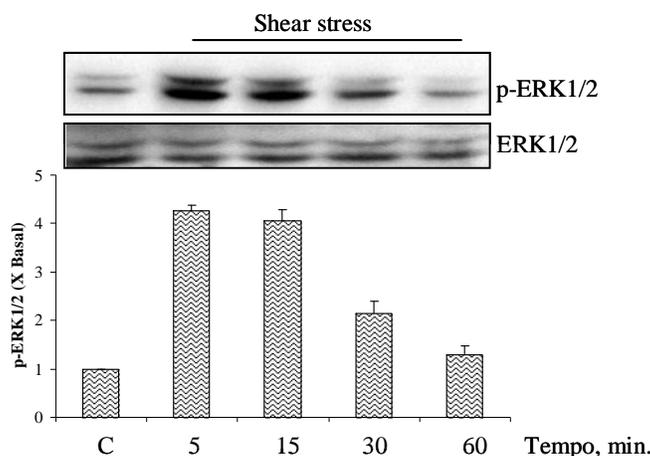


Figura 34: **Fosforilação de ERK1/2 em células HUVEC induzida por shear stress.** Células HUVEC foram expostas a 15 dinas/cm^2 de “shear” pelo período de tempo indicado. A fosforilação de ERK1/2 foi analisada por immunoblotting com um anticorpo anti-fosfo-ERK1/2 como descrito em Materiais e Métodos. Do mesmo blot fez-se “stripping” e colocou-se o anticorpo anti-ERK1/2 o qual reconhece ERK1/2 independentemente do estado de fosforilação para assegurar igual quantidade de proteína no gel (ERK total). A fosforilação foi quantificada densitometricamente como a proporção de ERK1/2 fosforilada e ERK1/2 total. Em cima, auto-radiografia de Western Blot; embaixo, gráfico de barras obtido a partir de análises densitométricas. C – corresponde à célula mantida em meio de carecimento e estática. Dados representam a média de 2 - 3 experimentos \pm desvio padrão.

Com estes resultados sabemos que shear stress estimula a fosforilação do receptor de EGF, aumenta a produção de óxido nítrico, provavelmente, via eNOS e ativa ERK1/2. Assim, tomando-se como base nossos resultados anteriores com SNAP e os resultados obtidos com bradicinina, utilizando inibidores destas proteínas, verificamos como estas interagem entre si.

IV.19 - Aumentos nos níveis de NO endógeno - “shear stress”-dependente - levam a um aumento na fosforilação em resíduos de tirosina do receptor de EGF

Assim, tendo-se estabelecido as condições experimentais para o estímulo de células endoteliais por “shear stress”, demos prosseguimento aos experimentos a fim de verificar a relevância do NO na ativação de EGFR uma vez que podemos observar um aumento concomitante na produção de NO e também na atividade do receptor. Assim, escolhemos o tempo de trinta minutos, onde podemos observar a máxima ativação de EGFR e os níveis de NO ainda encontram-se altos.

O estímulo de células endoteliais por “shear stress” leva a um aumento na fosforilação do receptor de EGF e parte desta ativação é devido aos aumentos nos níveis de NO, uma vez que o pré-tratamento de HUVEC com L-NAME provoca uma diminuição em torno de 60% nesta fosforilação. Porém, a adição de L-NAME, não tem qualquer efeito sobre a ativação de ERK1/2, apesar de já ter sido descrito por nós e outros autores (Monteiro, 2000; Bauer et al., 2001; Kibbe et al., 2002) que NO, produzido via fontes exógenas, pode ativar ERK1/2. No tempo de 30 minutos ERK1/2 ainda encontram-se ativadas e o pré-tratamento de HUVEC com o inibidor de MEK, PD98059, reverte esta ativação. Porém, a diminuição na ativação de ERK1/2, não diminui a fosforilação em resíduos de tirosina de EGFR, ao contrário do observado para BK.

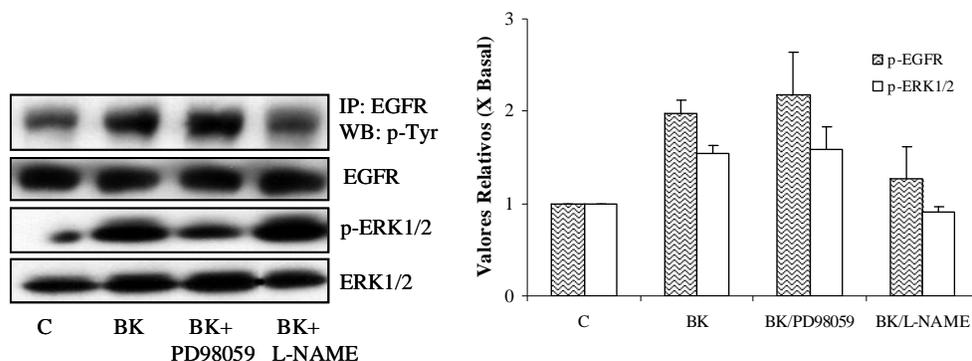


Figura 35: **Efeitos de “shear stress” sobre a ativação do EGFR em células endoteliais na presença de inibidores.** Células HUVEC foram submetidas a “shear stress” (15dinas/cm²) por trinta minutos. Onde indicado, trinta minutos antes do estímulo as células eram tratadas com 2 mM de L-NAME ou 50 µM de PD98059. As células foram lisadas e o receptor de EGF foi obtido por imunoprecipitação utilizando-se o anticorpo anti-EGFr conforme descrito em métodos. A quantidade de EGFR imunoprecipitado foi controlada através da utilização de um anticorpo anti-EGFr. Antes da imunoprecipitação, alíquotas dos lisados celulares eram sujeitas a SDS-PAGE, transferidas para membrana de PVDF e MAPK ativada era determinada usando-se um anti p-ERK policlonal. C – células mantidas em meio de carenciamento sem qualquer estímulo. A fosforilação foi quantificada densitometricamente como a proporção de EGFR fosforilado e EGFR total; cada amostra refere-se a uma média entre dois experimentos. À esquerda, auto-radiografia de Western Blot; à direita, gráfico de barras obtido a partir de análises densitométricas de pelo menos 3 experimentos, média ± desvio padrão .

IV.20 – L-NAME e BIBX bloqueiam a formação de estruturas tubulares induzida por “shear stress”

A seguir verificamos como o estímulo por “shear stress” estava regulando o processo de angiogênese. Células HUVEC foram plaqueadas em placas de 150 mm, e após 24 horas de

carenciamento foram submetidas a 24 horas de estímulo por shear stress. Após este período as células foram destacadas da superfície onde se encontravam usando-se PBS/EDTA 0,02%, contadas e 1×10^4 células foram plaqueadas sobre matrigel. Sob estas condições podemos observar que em células HUVEC estimuladas por shear por 24 horas ocorre um aumento em torno de $2,6 (\pm 0,35)$ vezes na formação de estruturas semelhantes a tubo quando comparada a célula mantida estática (figura 36).

É possível que a transativação do EGFR por “shear stress”, assim como observado para BK, induza a formação de tubo. Portanto, nós a seguir examinamos o efeito de BIBX, um específico inibidor do receptor de EGF (ref.), sobre a formação de estruturas tubulares induzida por “shear stress”. Como mostrado na figura 36, a inibição da atividade de EGFR pelo pré-tratamento de células HUVEC com $1 \mu\text{M}$ de BIBX inibiu completamente a formação de estruturas tubulares induzida por “shear stress”. Além disso, a adição de L-NAME também promoveu a redução na formação destas estruturas a níveis observados na célula controle, confirmando a importância do NO que atua como agente modulador positivo da ativação do EGFR e consequentemente do processo de angiogênese in vitro que estamos estudando em nosso modelo experimental.

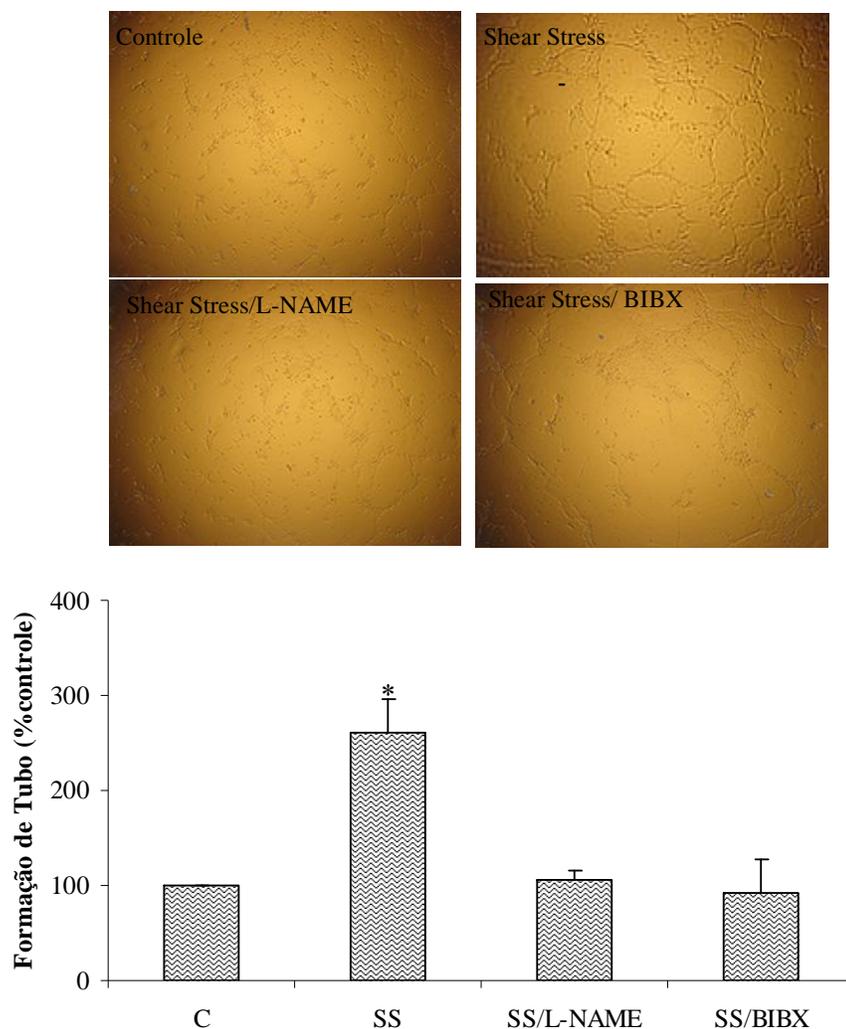


Figura 36: A formação de tubos em HUVEC promovida por “shear stress” é inibida L-NAME e BIBX. As células foram plaqueadas em placas de 150 mm e após careciamento foram submetidas a 24 horas de estímulo por shear stress (15 dinas/cm²) na presença ou não de inibidores. Onde indicado, 30 minutos antes do estímulo 2 mM de L-NAME ou 1 μM de BIBX foi adicionado. 24 horas depois, as células foram descoladas da placa e 1x10⁴ células semeadas sobre matrigel, no mesmo meio em que foram estimuladas e mantidas sob estas condições por mais 24 horas. Após este período as células foram fotografadas e a quantidade de estruturas tubulares foi analisada pelo programa Scion. Estes experimentos foram realizados em triplicata. * P ≤ 0,05 versus controle pelo teste ANOVA/Newman-Keuls. O gráfico mostra a porcentagem de formação de estruturas tubulares comparada àquela presente na célula mantida sem nenhum estímulo e estática (controle).

Assim, com os experimentos que realizamos conseguimos estabelecer que “shear stress” induz a ativação de EGFR, eNOS e ERK1/2, de uma maneira tempo dependente. O aumento na produção de NO, interfere com a ativação de EGFR uma vez que o pré-tratamento de células HUVEC com L-NAME reduz os níveis de fosforilação do EGFR em resíduos de tirosina. A ativação de EGFR e o aumento na produção de NO, interferem com o processo de angiogênese, aqui analisado por meio da formação de estruturas semelhantes a tubo formadas sobre Matrigel®.

V. Discussão

Angiogênese é um processo finamente regulado e essencial em condições fisiopatológicas. Neste estudo, nós procuramos demonstrar nossa hipótese de trabalho que afirmava que o aumento na produção de NO resultaria na transativação de EGFR e que este induziria o processo de angiogênese em células endoteliais. VEGF, “shear stress”, insulina, BK, são estímulos que irão promover a fosforilação da enzima eNOS e deste modo induz a produção de NO em células endoteliais. No trabalho que desenvolvemos fizemos uso de BK e “shear stress” para estimular a produção endógena de NO nas células endoteliais de origem humana e naquelas obtidas de aorta de coelho, linhagens HUVEC e RAEC respectivamente.

O estímulo de células endoteliais com BK ou “shear stress” provocou um aumento na fosforilação de eNOS e consequentemente aumento na produção de NO. Além de aumentar a produção de NO, estes estímulos também promoveram a fosforilação do EGFR em resíduos de tirosina. Esta fosforilação é dependente da atividade de tirosina cinase do EGFR, visto que a transfecção de células RAEC ou HUVEC com um vetor de expressão contendo o gene codificador para um EGFR que é nulo em sua atividade tirosina cinase, resultou em níveis de fosforilação do EGFR diminuídos nas células estimuladas com BK, sem afetar a produção de NO, sugerindo que estas vias estão sendo ativadas de forma independente. O passo seguinte foi verificar como estes dois eventos (aumento na produção de NO e ativação de EGFR) estavam se relacionando.

Com o uso do inibidor de NOS, L-NAME, que não distingue entre as diferentes isoformas de NOS, verificamos o bloqueio da produção de NO. Quando, nestas mesmas células observamos o estado de ativação de EGFR, verificamos que a adição de L-NAME antecedendo o estímulo das células por BK ou “shear stress” provoca uma diminuição (60 – 80%) nos níveis de fosforilação do EGFR. Contudo, o clone RAEC KD4/C2 (expressa o

receptor de EGFR sem atividade de tirosina cinase), que apresenta uma ativação residual do EGFR em torno de 20%, mostrou-se refratário à exposição ao inibidor da NOS, sugerindo que provavelmente, esta ativação residual de EGFR do clone KD4/C2, independe da via eNOS/NO.

Como já havíamos demonstrado que NO gerado a partir de fontes exógenas (nitrosotíóis e nitrovasodilatadores) aumenta a fosforilação de EGFR e que a via de Rho/MEK/ERK poderia estar envolvida neste processo (Oliveira et al., 2003), investigamos o envolvimento das ERK1/2 na ativação de EGFR sob condições de produção endógena de NO. Nestas condições, NO aparentemente não participa da ativação direta das ERK1/2, uma vez que o pré-tratamento de células endoteliais com L-NAME não inibe a fosforilação das ERK1/2 desencadeada por BK ou por “shear stress”. Ainda mais, a inibição das ERK1/2 pelo uso do inibidor PD98059 inibe o incremento de fosforilação do EGFR induzido por BK, mas não por “shear stress”. Com base nestes resultados e fazendo uso do anticorpo monoclonal PTP101, que reconhece seqüências passíveis de fosforilação pelas ERK1/2, verificamos um incremento substancial nos níveis de fosforilação destas seqüências no EGFR em células estimuladas com BK. O reconhecimento de PTP101 destes sítios em EGFR é bloqueado quando da adição de PD98059 às células endoteliais, implicando as ERK1/2 na fosforilação desta rodutio.

Estudos anteriores têm implicado cinases para serina/treonina como fundamentais na regulação de EGFR. Em particular, dois sítios de fosforilação em resíduos de treonina foram identificados, Thr-654 e Thr-669. PMA pode levar a fosforilação desses dois sítios, mas acredita-se que PKC é responsável pela fosforilação da Thr-654, enquanto acredita-se que a Thr-669 seja fosforilada pelas ERK1/2 (Takishima et al., 1991). Ainda, Thr-669 é consituente da única rodutio consenso para as ERK1/2 no domínio citoplasmático de EGF

e é um alvo conhecido de fosforilação de EGFR induzido por EGF. O exato papel destas fosforilações em EGFR ainda é incerto. Entretanto, De um modo geral a fosforilação em resíduos de treonina está associado à uma diminuição da expressão e atividade de EGFR. Em contraste aos efeitos inibitórios da ativação de PKC sobre a atividade cinase de EGFR relatado previamente (Morrison, 1996), o tratamento de células RAEC e HUVEC com BK em nossos experimentos não causa uma diminuição na fosforilação em tirosina de EGFR. Nossos resultados sugerem que o controle não é sobre atividade do receptor e sim sobre a quantidade de EGFR disponível, diminuindo a sua degradação. Porém, o mecanismo de transativação de EGFR pelas ERK1/2 em células estimuladas a produzir NO, ainda terá de ser mais bem investigado.

Observações anteriormente publicadas (Monteiro et al., 2000; Rocha Oliveira et al., 2003; Bauer et al., 2001; Kibbe et al., 2002), evidenciaram o papel do NO como estimulador das ERK1/2. Esta ativação de ERK1/2, por sua vez poderia estimular um processo de transativação do EGFR envolvendo a fosforilação em resíduos Ser/Thr do domínio citoplasmático do receptor. Com base nisso, investigamos a participação de ERK1/2 na fosforilação de EGFR nas células estimuladas com BK. Ao pré-tratarmos células endoteliais com o inibidor de MEK, PD98059, observamos, como esperado, inibição nos níveis de fosforilação das ERK1/2 e uma redução concomitante nos níveis de fosforilação do EGFR, após estímulo com BK. Concluimos com isso, que ERK1/2 é importante na modulação da atividade de EGFR, induzida por BK. Contudo, quando pré-tratamos as células com L-NAME e verificamos os níveis de fosforilação das ERK1/2 verificamos que uma diminuição na produção de NO, não provoca uma diminuição nos níveis de fosforilação destas cinases. Assim, a ativação das ERK1/2 e sua atuação como moduladoras do EGFR não são suficientes para explicar o modo pelo qual NO está modulando a ativação de EGFR.

Os efeitos reguladores do NO sobre as atividades de proteínas cinases e fosfatases têm sido bastante estudados sob o prisma da formação de nitrosotióis a partir da reação do NO com resíduos de cisteína específicos nestas proteínas (Croduct al., 2005). Desde que a formação de nitrosotióis é reversível, esta reação representa um importante mecanismo de sinalização pelo qual a modificação de proteínas mediada por NO por iniciar sinalização celular (Croduct al., 2005). Estudos anteriores demonstraram em alguns tipos celulares, que a ativação de Src pode contribuir para a transativação de EGFR (Keely et al., 2000; Pierce et al., 2001; Buchanan et al., 2006). Por outro lado, Src cinase pode ser S-nitrosilada por NO, o que supostamente contornaria o efeito inibitório da fosforilação da Tyr527 sobre a ativação desta proteína, tornando-a mais ativa (Akhand et al, 1999, Curcio et al., 2006). Ao sofrer nitrosilação Src aparentemente poderia estar mais ativa (Monteiro et al., 2000; Curcio et al., 2006) o que pode ser corroborado pela existência de mecanismos de regulação positiva da atividade desta cinase independentes daquele que envolve a participação da PTP α (Roskoski Jr, 2005).

Assim, nas nossas condições experimentais pudemos constatar que BK não promove um aumento nos níveis de fosforilação de Src cinase em células RAEC, no entanto nestas células os níveis basais de fosforilação de Src são mais elevados, o que poderia explicar a ausência de uma elevação nestes níveis de fosforilação após tratamento com BK. Por outro lado, ao estimularmos células HUVEC com BK observamos um incremento nos níveis de fosforilação de Src. Entretanto, apesar das evidências descritas sobre a regulação da atividade desta proteína cinase por NO, o pré-tratamento de células HUVEC com L-NAME seguido do estímulo com BK, não provocou alterações consideráveis nos níveis de fosforilação do EGFR.

Além de proteínas cinases como as ERK1/2 e Src, também investigamos a participação de PTPs nesta transativação do EGFR mediada por NO. Já se encontra bem

documentado o fato de PTPs terem sua atividade regulada por alterações no status redox intracelular (Monteiro et al., 1991). Além disso, NO e outras espécies reativas do nitrogênio são sabidamente capazes de modular a atividade de algumas PTPs (Li and Whornton, 2003; Xian et al., 2000; Takakura et al., 1999).

Entre as várias PTPs, PTP 1C (Tomic, 1995) pode modular negativamente os níveis de fosforilação do EGFR. Assim, através da imunoprecipitação de PTP1C a partir de células HUVECs estimuladas com BK, mostramos – por meio do uso de um anticorpo que reconhece resíduos de cisteína S-Nitrosilados – que a fosfatase se encontra S-nitrosilada, e que os níveis de nitrosilação foram máximos em 30 minutos. A adição de L-NAME antecedendo o estímulo por BK inibe a S-nitrosilação de PTP1C. Assim, uma possível regulação negativa diminuição na atividade da PTP1C, promovida por NO pode ser o mecanismo pelo qual NO esteja modulando a atividade do EGFR. Apesar destes resultados serem bastante promissores, não podemos afirmar que a S-nitrosilação de PTP1C observada não possa estar ocorrendo em outras PTPs.

Prova definitiva que a inativação de PTP1C induzida por NO é essencial para a sinalização do EGFR irá requerer o desenvolvimento de PTP1C mutante que não sejam inativada por oxidação. Se tais mutantes bloquearem o processo de sinalização observado, torna-se evidente que a inativação de PTPs em particular da PTP1C, é requerida para a sinalização mediada por EGFR.

Apesar do número de evidências experimentais acumuladas durante o desenvolvimento deste trabalho e que apontam principalmente para uma participação das ERK1/2 e da PTP1C como elementos fundamentais do mecanismo pelo qual NO e ERK1/2 possam estar modulando a atividade do EGFR, este fato ainda não nos permite apresentar um mecanismo definitivo através do qual a produção endógena de NO por células

endoteliais estimuladas com BK pode promover a transativação do EGFR.

Além da participação de cinases e fosfatases também buscamos estabelecer a participação dos ligantes para EGFR na resposta à BK. Como HB-EGF requer as proteoglicanas de heparan sulfato (HSPGs) associadas à superfície celular como coreceptor para EGFR (Raab and Klagsbrun, 1997), resolvemos testar a possibilidade de que heparina adicionada exogenamente poderia inibir HB-EGF por competir pela ligação a HSPGs na superfície celular e, portanto, inibir a transativação de EGFR induzida por BK. Usando heparina como ferramenta para dissecar o processo de transativação do receptor de EGF em células endoteliais, nós encontramos que heparina interrompe a sinalização por BK no nível de transativação de EGFR. Em adição, a ativação das ERK1/2 induzida por BK foi inibida por heparina. Contudo, estes mesmos elementos de sinalização não foram inibidos quando 20 ng/ml de EGF foram utilizados como estímulo. Embora tenhamos encontrado uma situação onde os estímulos de fosforilação nas ERK1/2 e no EGFR são igualmente inibidos, estes achados não nos permitiram estabelecer se os eventos estariam conectados a uma modulação da produção de NO pela célula na presença de heparina.

É sabido que a proliferação de células endoteliais afeta a angiogênese associada à expansão neovascular. De fato, a literatura apresenta considerável documentação acerca dos papéis do VEGF e bFGF no estímulo da proliferação celular e suas relações com o processo de angiogênese (Folkman and Shing, 1992; Thomas, 1996).

No nosso estudo, BK estimulou a proliferação celular de células RAEC e HUVEC, e em significativa menor extensão do clone KD4/C2, sugerindo de antemão que EGFR funcional é importante para uma adequada proliferação celular, nestas condições experimentais.

Quando analisamos a cinética de ativação de ERK1/2 no clone KD4/C2 e nas

demais células, observamos que nesta célula as ERK1/2 são ativadas de uma forma rápida e transiente. Já foi extensamente descrito que o tipo de resposta exibida por ERK1/2 (duração e intensidade) interfere na resposta exibida pela célula (Marshall, 1995). Deste modo, pode-se sugerir que uma ativação sustentada das ERK1/2 é necessária para que a célula prolifere de forma adequada. Esta afirmativa pode ser corroborada através das observações publicadas recentemente pelo nosso grupo de pesquisa. Neste trabalho descrevemos uma ativação sustentada das ERK1/2 em células RAEC expostas à baixas concentrações do nitrosotiol SNAP que resultou em progressão através do ciclo celular e proliferação destas células (Rocha Oliveira et al., 2008). Com a produção de NO estimulada por BK nestas células, observamos que a proliferação das mesmas é modulada por NO, pelo EGFR e pelas ERK1/2. O estímulo da proliferação celular pode ser um dos fatores pelos quais NO e EGFR induzem angiogênese. Além disso, migração das células endoteliais após degradação da matrix extracelular é uma dos principais eventos da etapa inicial de angiogênese (Carmeliet and Jain, 2000). Em projeto que vem sendo desenvolvido em nosso laboratório, o estímulo de BK promove a migração NO-dependente de células RAEC e HUVEC (Roberta Eller Borges, Projeto de Mestrado 2008).

Nos estudos que se sucederam procuramos demonstrar a importância do NO e EGFR na angiogênese em Matrigel®. Utilizamos nestes estudos, além do estímulo promovido por BK, o estímulo do “shear stress” para produção endógena de NO.

Quando células HUVEC foram plaqueadas em Matrigel®, observamos um aumento na formação de estruturas semelhantes a tubos após estímulo com BK ou “shear stress”. Em ambos os casos o pré-tratamento com inibidores para a via de eNOS e EGFR inibiu substancialmente a formação destas estruturas.

Além disso, por meio de experimentos de PCR em tempo real e uso do inibidor do receptor de VEGF, podemos afirmar que a expressão VEGF é estimulada por BK e que este aumento depende de EGFR, pois a inibição da atividade deste último bloqueia o aumento da expressão de VEGF. Além disso, a inibição do receptor de VEGF, por meio de um inibidor específico reverte o processo de angiogênese em Matrigel® desencadeado por BK. Nossos dados apontam para um papel essencial do EGFR neste processo. Além disso, outro elemento muito importante no processo é o NO, uma vez que a inibição da produção deste radical livre impede a formação de estruturas semelhantes a tubo indicadoras da ocorrência de angiogênese *in vitro*.

Os nossos achados demonstram que a regulação positiva de VEGF está envolvida no programa angiogênico de BK e está sob controle da via do EGFR, sendo que NO desempenha um papel importante neste processo ao modular a ativação do EGFR. De fato, a inibição da síntese de NO com L-NAME em nosso modelo experimental previne a ativação do EGFR e a proliferação de HUVEC.

O papel da via da NOS como mediadora positiva do processo de angiogênese foi consistentemente relatado (Ziche, et al, 1994; Ziche, et al, 1997; Leibovich, et al, 1994). Apesar do mecanismo pelo qual NO controla angiogênese ser ainda pouco compreendido, existem relatos consistentes sobre como NO controla a expressão de fatores angiogênicos (Dulak and Jozkowicz, 2003). Foi demonstrado que NO induz a proliferação e migração de células endoteliais via bFGF endógeno (Ziche, 1993; Ziche, 1997). Outros autores demonstraram, que a super-expressão de NOS resulta em uma regulação positiva de VEGF em linhagens celulares tumorais (Fukumura et al, 2006). Nossos dados corroboram outras observações já publicadas e que apontam para um papel central da via de sinalização da NOS no controle do processo de angiogênese induzido por BK em um modo autocrino-

paracrino.

Assim, o presente trabalho demonstrou que a transativação do EGFR receptor mediada por vários elementos, dentre eles as ERK1/2 MAP cinases, Src cinase e a PTP1C pode ser descrita como um processo de importância fundamental para o processo de angiogênese em Matrigel® desencadeado por BK e que se encontra sob o controle da via da NOS. Quando o estímulo pró-angiogênico foi o “shear stress”, notamos que tanto o EGFR quanto a NOS exerceram papéis fundamentais. Assim, apesar de algumas diferenças entre os dois sistemas pró-angiogênicos, nossos dados nos permitem concluir que ambos utilizam as vias do EGFR e da NOS para seu propósito.

VI. Conclusões

BK induz a transativação de EGFR, por um mecanismo que envolve ERK1/2 e a via de sinalização da eNOS/NO. Com base no que foi publicado até o momento podemos afirmar que este é um novo mecanismo através do qual a transativação de EGFR por um receptor acoplado a proteína G (receptor de BK), pode ser um potente sinal para o processo de angiogênese. Nossos resultados nos permitem inferir que as ERK1/2 podem estar alterando a atividade de EGFR por meio do controle de sua estabilidade; enquanto que o NO parece estar envolvido na inibição da atividade de fosfatases reguladoras dos níveis de fosforilação do EGFR tais como a PTP1C.

A transativação de EGFR estimulada por BK parece envolver a proteólise de ligantes para EGFR uma vez que, heparina bloqueia a esta ativação. Apesar de não termos verificado se mecanismo semelhante está envolvido na transativação do EGFR desencadeada por “shear stress” já foi descrito, em células HUVEC, que “shear stress” aumenta a expressão de HB-EGF, sugerindo que um mecanismo semelhante àquele observado para BK possa estar envolvido na resposta à este estímulo (Morita et al., 1993). A ativação de EGFR aumenta a expressão de VEGF, o qual modula a formação de estruturas semelhantes a tubo desencadeada por BK.

A partir dos resultados aqui apresentados fica evidenciada a participação do EGFR no processo de angiogênese desencadeado por BK e “shear stress”.

VII. Bibliografia

Akhand, A., Pu, M., Senga, T., Kato, M., Suzuki, H., Miyata, T. Hamaguchi, M., Nashima, I. 1999. “Nitric oxide controls src kinase activity through a sulfhydryl group modification-mediated Tyr-527-independent and Tyr-416-linked mechanism”. J. Biol. Chem. 274: 25821 – 25826.

Alroy, I. and Yarden, Y. 1997. “The ErbB productio network in embryogenesis and ontogêneses: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. FEBS Letter 410: 83 – 86.

Altenbach, C., Yang, K., Farrens, D. L., Farahbakhsh, Z. T., Khorana, H. G. and Hubbell, W. L. 1996. “Structural features and light-dependent changes in the cytoplasmic interhelical E-F Loop region of Rhodopsin: a site directed spin-labeling study”. Biochemistry 35: 12470 – 12478.

Amorino, G. P., Deeble, P. D., Parsons, S. J. 2007. “Neurotensin stimulates mitogenesis of prostate cancer cells through a novel c-Src//Start5b pathway”. Oncogene 26: 745 – 756.

Ankorina-Stark, I., Haxelmans, S., Schlatter, E. 1997. “Receptors for bradykinin and prostaglandin E2 coupled to Ca²⁺ signaling in rat cortical collecting duct”. Cell Calcium 22: 269 – 275.

Arai, R. J., Masutani, H., Yodoi, J., Debbas, V., Laurindo, F. R., Stern, A., Monteiro, H. P. 2006. “Nitric oxide induces thioredonin-1 nuclear translocation: possible association with the p21Ras survival pathway”. Biochem. Biophys. Res. Commun. 348: 1254 – 1260.

Arnelle, D. R. and Stamler, J. S. 1995. “NO⁺, NO and NO-donation by S-nitrosothiols: implications for regulation of physiological functions by S-nitrosylation and acceleration of disulfide formation. Arch. Biochem. Biophys. 318: 279 – 285.

Asakura, M., Kitakaze, M., Takashima, S., Liao, Y., Ishikura, F., Yoshinaka, T., Ohmoto, H., Node, K., Yoshino, K., Ishiguro, H., Asanuma, H., Sanada, S., Matsumura, Y., Takeda, H., Beppu, S., Tada, M., Hori, M., Higashiyama, S. 2002. “Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF: Metalloproteinases inhibitors as a new therapy”. Nat. Med. 8: 35 -40.

Babaei, S., Teichert-Kuliszewska, K., Monge, J. C., Mohamed., F., Bendeck, M. P. and Stewart, D. J. 1998. “Role of nitric oxide in the angiogenic response in vitro to basic fibroblasto growth factor”. Circ. Res. 82 (9): 1007 – 1015.

Bae, Y. S., Sung, J. Y., Kim, O. S., Kim, Y. J., Hur, K. C., Kazlauskas, A. and Rhee, S. G. 2000. J. Biol. Chem. 275: 10527 – 10531.

Barouch, L. A., Harrison, R. W., Skaf, M. W., Rosas, G. O., Cappola, T. P., Kobeissi, Z. A., Lemmon, C. A., Burnett, A. L., O'Rourke, B., Rodriguez, E. R., Huang, P. L., Lima, J. A., Berkowitz, D. E., Hare, J. M. 2002. “Nitric oxide regulates the heart by product confinement of nitric oxide synthase isoforms”. Nature 416: 337 – 339.

Baselga, J. 2002. “Why the epidermal growth factor receptor? The rationale for cancer therapy”. Oncologist 7: 2 – 8.

Bauer, P. M., Buga, G. M., Ignarro, L. J. 2001. “Role of p42/p44 mitogen-activated-protein kinase and p21waf1/cip1 in the regulation of vascular smooth muscle cell proliferation by nitric oxide”. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 12802 – 12807.

Bhoola, K. D., Figueroa, C. D., Worthy, K. 1992. “Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases”. Pharmacol. Rev. 44: 1 – 80.

Biscardi, J. S., Maa, M. C., Tice, D. A., Cox, M. E., Leu, T. H., and Parsons, S. J. 1999. “c-Src-mediated reduction tion of the epidermal growth factor receptor on Tyr845 and Tyr1101 is associated with modulation of receptor function”. J. Biol. Chem. 274: 8335 –

8343.

Boehning, D. and Snyder, S. H. 2003. “Novel neural modulators”. Annun. Rev. Neurosci. 26: 105 -131.

Bonni, A., Brunet, A., West, A. E., Datta, S. R., Takasu, M. A. and Greeberg, M. E. 1999. “Cell survival promoter by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and independent mechanisms”. Science 286: 1358 -1362.

Bourne, H. R. 1997. “G proteins. The reductio finger strikes agains”. Nature 389: 673 – 674.

Bredt, D. S. and Snyder, S. H. 1990. “Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin reductio enzyme”. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 682 – 685.

Bucci M., Gratton, J. P., Rudic, R. D., Acevedo, L., Roviezzo, F., Cirino, G., Sessa, W.C. 2000. “*In vivo* delivery of the caveolin-1 scaffolding domain inhibits nitric oxide synthesis and reduces inflammation”. Nat. Med. 6: 1362 – 1367.

Buchanan, F. G., Gorden, D. L., Matta, P., Shi, Q., Matrisian, L. M., DuBois, R. N. 2006. “Role of beta-arrestin 1 in the metastatic progression of colorectal cancer”. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 103: 1492 – 1497.

Buchanan, F. G., Wang, D., Bargiacchi, F., DuBois, R. N. 2003. “Prostaglandin E2 regulates cell migration via the intracellular activation of the epidermal growth factor receptor”. J. Biol. Chem. 278: 35451 – 35457.

Callsen, D., Sandau, K. B., Brüne, B. 1999. “Nitric oxide and superoxide inhibit platelet-derived growth factor receptor phosphotyrosine phosphatases”. Free Radic. Biol. Med. 26: 1544 – 1553.

Cao, S., Yao, J., McCabe, T. J., Yao, Q., Katusic, Z. S., Sessa, W. C. and Shah, V. 2001. “Direct interaction between endothelial nitric-oxide synthase and dynamin-2, Implications

for nitric-oxide synthase function". J. Biol. Chem. 276: 14249 – 14256.

Carmeliet, P. 2000. "Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis". Nat. Med. 6: 389 – 395.

Carpenter, G. 2000. "EGF receptor transactivation mediated by proteolytica production of EGF-like agonists". Science STKE 2000:E1.

Caselli, A., Chiarugi, P., Camici, G., Manao, G., Ramponi, G. 1995. "*In vivo* inactivation of phosphotyrosine protein phosphatases by nitric oxide". FEBS Lett. 374: 249 – 252.

Casanova, M. L., Larcher, F., Casanova, B., Murillas, R., Fernandez-Acenero, M. J., Villanueva, C., Martinez-Palacio, J., Ullrich, A., Conti, C. J., Jorcano, J. L. 2002. "A critical role for ras-mediated, epidermal growth factor receptor-dependent angiogenesis in mouse skin carcinogenesis". Cancer Res. 62: 3402 – 3407.

Chang, L. and Karin, M. 2001. "Mammalian MAP kinase productio cascades". Nature 410: 37 – 40.

Chi, J. T., Chang, H. Y., Haraldsen, G., Jahmsen, F., Troyanskaya, O. G., Chang, D. S., Wang, Z., Stanley, F. R., van de Rijn, M., Botstein, D., Brown, P. O. 2003. "Endothelial cell diversity revealed by global expression profiling". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 10623 – 10628.

Chiu, T., Santiskulvong, C., Rozengurt, E. 2005. "EGF receptor transactivation mediates ANG II-stimulated mitogenesis in intestinal epithelial cells through the PI3-kinase/Akt/mTOR/p70S6K I signaling pathway". Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 288: G182 – 194.

Choi, Y. B., Lipton, S. A. 2000. "Redox modulation of the NMDA receptor". Cell. Mol. Life Sci. 57: 1535 – 1541.

Cunnick, J.M., Dorsey, J. F., Standley, T., Turkson, J., Kraker, A. J., Fry, D. W., Jove,

- R., Wu, J.** 1998. "Role of tyrosine kinase activity of epidermal growth factor receptor in the lysophosphatidic acid-stimulated mitogen-activated protein kinase pathway. J. Biol. Chem. 273: 14468 – 14475.
- Curcio, M. F., Nascimento, F. D., Linares, E., Sap, J., Stern, A., Monteiro, H. P.** 2006. "Regulatory effects of nitric oxide on Src kinase, FAK, p130Cas, and RPTP alpha. Free Radic. Biol. Med. 41: (Supl. 1): S40.
- Davies, P. F.** 1995. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. Physiol. Rev. 75: 519 – 560.
- De Carvalho Frimm, C., Sun, Y., and Weber, K. T.** 1996. Wound healing following myocardial infarction in the rat: role for bradykinin and prostaglandins. J. Mol. Cell Cardiol. 28: 1279 – 1285.
- Dedio, J., König, P., Wohlfart, P., Schroeder, C., Kummer, W. and Müller-Esterl, W.** 2001. NOSIP, a novel modulator of endothelial nitric oxide synthase activity. FASEB J. 15: 79 – 89.
- De Jesús-Berríos, M., Liu, L., Nussbaum, J. C., Cox, G. M., Stamler, J. S., Heitman, J.** 2003. "Enzymes that counteract nitrosative stress promote fungal virulence". Curr. Biol. 13: 1963 – 1968.
- Dela Torre, A., Schroeder, R. A., Punzalan, C., Kuo, P. C.** 1999. "Endotoxin-mediated S-nitrosylation of p50 alters NF-kappa B-dependent gene transcription in ANA-1 murine macrophages". J. Immunol. 162: 4101 – 4108.
- Den Hertog, J., Groen, A., van der Wijk, T.** 2005. "Redox regulation of protein-tyrosine phosphatases". Arc. Bioc. Biop. 434: 11 – 15.
- Denu, J. M. and Dixon, J. E.** 1998. "Protein tyrosine phosphatases: mechanisms of catalysis and regulation". Curr. Opin. Chem. Biol. 2: 633 – 641.

- Dikic, I., Schlessinger, J., Lax, I.** 1994. "PC12 cells overexpressing the insuline receptor undergo insulin-dependent neuronal differentiation". Curr. Biol. 4: 702 – 708.
- Dimmeler, S., Hermann, C., Galle, J. and Zeiher, A. M.** 1999. "Upregulation of superoxide dismutase and nitric oxide synthase mediates the apoptosis-suppressive effects of shear stress on endothelial cells". Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 19 (3): 656 – 664.
- Dixon, B. S. and Dennis, M. J.** 1997. Regulation of. Metagêneses by kinins in arterial smooth muscle cells. Am. J. Physiol. 273: C7 – C20.
- Dohlman, H. G., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J.** 1987. "A family of receptors coupled to guanine cnuclotide regulatory proteins". Biochemistry 26 : 2657 – 2664.
- D'Orleans-Juste, P., De Nucci, F., e Vane, J. R.** 1989. Kinins act um B1 or B2 receptors to release conjointly endothelium derived relaxem factor and prostacyclin from bovine aortic endothelial cells. Br. J. Pharmacol. 96: 920 – 926.
- Dulak, J., Jozkowicz, A.** 2003. Regulation of vascular endothelial growth factor synthesis by nitric oxide: facts and controversies. Antioxidants & Redox Signaling 5: 123 -132.
- Dulak, J., Jozkowicz, A., Dembinska-Kiec, A., Guevara, I., Zdzienicka, A., Zmudzinska-Grochot, D., Florek, I., Wójtowicz, A., Szuba, A. and Cooke, J. P.** 2000. "Nitric oxide induces the synthesis of vascular endothelial growth factor by rat vascular smooth muscle cells". Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 20 (3): 659 – 666.
- Enomoto, K., Furuya, K., Yamagishi, S., Oka, T., Maeno, T.** 1995. Release of arachidonic acid via Ca²⁺ increase roduction by pyrophosponucleotides and bradykinin in roduct tumour cells". Cell Biochem. Funct. 13: 279 – 286.
- Farhy, R. D., Carretero, O. A., Ho, K. L., and Scicli, A. G.** 1993. "Role of kinins and nitric oxide in the eficaz of angiotensin converting enzyme inhibitors on neointima formatem". Circ. Res. 72: 1202 – 1210.

- Ferrara, N. and Kerbel, R. S.** 2005. "Angiogenesis as a therapeutic target". Nature 438: 967 – 974.
- Flavahan, N. A.** 1992. "Atherosclerosis or lipoprotein-induced endothelial dysfunction. Potential mechanisms underlying reduction in EDRF/nitric oxide activity". Circulation 85: 1927 – 1938.
- Fleming, I. and Busse, R.** 2003. "Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase". Am. J. Physiol. Regul. Integr. Com. Physiol. 284: R1 – R12.
- Folkman, J.** 1971. "Tumor angiogenesis: Therapeutic implications". N. Engl. J. Med. 285: 1182 – 1186.
- Foster, M. W., McMahon, T. J. and Stamler, J. S.** 2003. "S-nitrosylation in health and disease". Trends Mol. Med. 9: 160 – 163.
- Forstemann, U., Pollock, J. S., Schmidt, H. H., Heller, M., Murad, F.** 1991. "Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 1788 -1792.
- Friedman, B., Frackleton, A. R., Jr., Ross, A. H., Connors, J. M., Fujiki, H., Sugimura, T., and Rosner, M. R.** 1984. "Tumor promoters block tyrosine-specific reduction of the epidermal growth factor receptor". Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 81: 3034 – 3038.
- Fukumura, D., Kashiwagi, S., Jain, R. K.** 2006. "The role of nitric oxide in tumour progression". Nature 6: 521 -534.
- Furchgott, R. F. and Zawadzki, J. V.** 1980. "The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine". Nature 288 : 377 – 386.
- Gallo, O., Masini, E., Morbidelli, L., Franchi, A., Fini-Storchi, I., Vergari, W. A.,**

Ziche, M. 1998. "Role of nitric oxide in angiogenesis and tumor progression in head and neck cancer". J. Nat. Cancer Inst. 90 : 587 – 596.

Garcia-Cardena, G., Martasek, P., Masters, B. S., Skidd, P. M., Couet, J., Li, S., Lisanti, M. P., Sessa, W. C. 1997. "Dissecting the interactions between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the NOS caveolin binding domain in vivo". J. Biol. Chem. 272: 25437 – 25470.

Garcia-Cardena, G., Fan R., Shah, V., Sorrentino, R., Cirino, G., Papapetropoulos, A., Sessa, W. C. 1998. "Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by hsp90". Nature 392: 821 – 824.

Garg, U. C., Hassid, A. 1990. "Nitric oxide-generating vasodilators inhibit mitogenesis and proliferation of BALB/C 3T3 fibroblasts by a cyclic GMP-independent mechanism". Biochem. Biophys. Res. Commun. 171: 474 – 479.

Gille, H., Sharrocks, A. D., Shaw, P. E. 1992. "Phosphorylation of transcription factor p62TCF by MAP kinase reduction ternary complex formation at c-fos promoter. Nature 358: 414 – 417.

Gimbrone, M. A. Jr, Topper, J. N., Nagel, T., Anderson, K. R. and Garcia-Cardena G. 2000. "Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis". Ann. N. Y. Acade. Sci. 902: 230 – 239.

Gooch, K. J., Dangler, C. A., Frangos, J. A. 1997. "Exogenous, basal, and flow-induced nitric production and endothelial cell proliferation". J. Cell Physiol. 171: 252 – 8.

Gow, A. J., Chen, Q., Hess, D. T., Day, B. J., Ischiropoulos, H., Stamler, J. S. 2002. "Basal and stimulated S-nitrosylation in multiple cell types and tissues". J. Biol. Chem. 277: 9637 – 9640.

Gratton, J. P., Fontana, J., O'Connor D. S., Garcia-Cardena, G., McCabe, T. J., Sessa,

- W. C.** 2000. "Reconstitution of an endothelial nitric oxide synthase (eNOS), hsp90, and caveolin-1 complex *in vitro*. Evidence that hsp90 facilitates calmodulin-stimulated displacement of eNOS from caveolin-1". J. Biol. Chem. 275: 22268 – 22272.
- Gruetter, C. A., Barry, B. K., McNamara, D. B., Kadowitz, P. J., Ignarro, L. J.** 1980. "Coronary arterial relaxation and guanylate cyclase activation by cigarette smoke, N'-nitrosornicotine and nitric oxide". J. Pharmacol. Exp. Ther. 214: 9 – 15.
- Gschwind, A., Hart, S., Fischer, O. M., Ulrich, A.** 2003. "TACE cleavage of proamphiregulin regulates GPCR-induced proliferation and motility of cancer cells". Embo J. 22: 2411 – 2421.
- Gschwind, A., Hart, S., Fischer, O. M., Ulrich, A.** 2003. "TACE cleavage of proamphiregulin regulates GPCR-induced proliferation and motility of cancer cells". EMBO J. 22: 2411 – 2421.
- Gutkind, S. J.** 1998. "Cell growth control by G protein-coupled receptors: from signal transduction to signal integration". Oncogene 17: 1331 – 1342.
- Hall, J. M.** 1992. "Bradykinin receptors: pharmacological and biological roles". Pharmac. Ther. 56: 131 – 190.
- Haendeler, J., Hoffmann, J., Tichler, V., Berk, B. C., Zeiher, A. M., Dimmeler, S.** 2002. "Redox regulatory and anti-apoptotic functions of thioredoxin depend on S-nitrosylation at cysteine 69". Nature Cell. Biol. 4: 743 – 749.
- Hao, G., Xie, J., Gross, S. S.** 2004. "Argininosuccinate-synthase is production inactivated by S-nitrosylation *in vitro* and *in vivo*". J. Biol. Chem. 279: 35192 – 36200.
- Hausladen, A., Privalle, C. T., Keng, T., DeAngelo, J., Stamler, J. S.** 1996. "Nitrosative stress: activation of the transcription factor OxyR". Cell 86: 719 – 729.
- Hedin, U., Daum, G. and Clowes, A. W.** 1998. "Heparin inhibits thrombin-induced

mitogen-activated protein kinase signaling in arterial smooth muscle cells". J. Vasc. Surg. 27: 512 – 520.

Hess, D. T., Matsumoto, A., Kim, S. O., Marshall, H. E., Stamler, J. S. 2005. "Protein S-nitrosylation: purview and parameters". Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 6: 150 – 166.

Hirata, A., Ogawa, S., Kometani, T., Kuwano, T., Naito, S., Kuwano, M. and Ono, M. 2002. "ZD1839 (Iressa) induces antiangiogenic effects through inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase". Cancer Res. 62: 2554 – 2560.

Hoffmann J., Haendeler, J., Zeiher, A. M., Dimmeler, S. 2001. " THN alpha and oxLDL reduce protein S-nitrosylation in endothelial cells". J. Biol. Chem. 276: 41383 – 41387.

Hood, J. D., Mininger, C. J., Ziche, M. and Granger, H. J. 1998. "VEGF upregulates eNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells". Am. J. Physiol. 274 (3 Pt 2): H1054 – 1058.

Hornber, J. J., Brugeman, F. J., Binder, B., Geest, C. R., Marjolein Bij de Vaate, A. J., Lankelma, R. and Westerhoff, H. V. 2005. "Principles behind the multifarious control of signal transduction. ERK roduction tion and kinase/phosphatase control". FEBS J. 272 (1): 244 – 258.

Huang, C., Jacobson, K. and Schaller, M. D. 2004. "MAP kinase and cell migration". J. Cell Sci. 117: 4619 – 4628.

Hunter, T. 2000. "Signaling – 2000 and beyond". Cell 100: 113 – 127.

Hunyady, L., Catt, K. J. 2006. "Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II". Mol. Endocrinol. 20: 953 – 970.

Ignarro, L. J. 1990. "Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide". Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 30: 535 – 560.

Ignarro, L. J. 2002. "Nitric oxide in the regulation of vascular function: an historical

overview". J. Card. Surg. 17: 301 – 306.

Jackson, M. D., and Denu, J. M. 1991. "Molecular reactions of protein phosphatases – Insights from structure and chemistry". Chem. Rev. 101: 2313 – 2340.

Jaffrey, S. R., Erdjument-Bromage, H., Ferris, C. D., Tempst, P. and Snyder, S. H. 2001. "Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide". Nature Cell Biol. 3: 193 – 197.

Jaffrey, S. R., Fang, M., Snyder, S. H. 2002. Nitrosopeptide mapping: a novel methodology reveals s-nitrosylation of dexras1 on a single cysteine residue". Chem. Biol. 9: 1329 – 1335.

Jain, R. K. 2003. "Molecular regulation of. Vessel maturation". Nat. Med. 9 (6): 685 – 693.

Keely, S. J., Calandrella, S. O., Barret, K. E. 2000. "Carbachol-stimulated transactivation of epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinase in T84 Cells is mediated by intracellular Ca^{2+} , PYK2, and p60^{src}". J. Biol. Chem. 275: 12619 – 12625.

Kibbe, M. R., Li, J., Nie, S., Choi, B. M., Kovesdi, L., Lizonova, A., Billiar, T. R., Tzeng, E. 2002. "Potentiation of nitric oxide-induced apoptosis in p53^{-/-} vascular smooth muscle cells". Am. J. Physiol. Cell Physiol. 282: C625 – C634.

Kim, S. O., Houtman, J. C., Jiang, J., Ruppert, J. M., Bertics, P. J., Frank, S. J. 1999. "Growth hormone-induced alteration in ErbB-2 phosphorylation status in 3T3-F442A fibroblasts. J. Biol. Chem. 274: 36015 – 36024.

Kim, S. O., Merchant, K., Nudelman, R., Beyer, W. F. Jr., Keng, T., DeAngelo, J., Hausladen, A., Stamler, J. S. 2002. "OxyR: a molecular code for redox-related signaling. Cell 109: 383 – 396.

King, C. R., Borrello, L., Porter, L., Comoglio, P. and Schlessinger, J. 1989. Oncogene 4: 13- 18.

Knebel, A., Rahmsdorf, H. J., Ullrich, A. and Herrlich, P. 1996. EMBO J. 15: 5314 –

5325.

Kuchan, M. J. and Frangos, J. A. “Role of calcium and calmodulin in flow-induced nitric oxide production in endothelial cells”. Am. J. physiol. 266: C628 – C636.

Lander, H. M., Ogiste, J. S., Pearce, S. R., Levi, R., Novogrodsky, A. 1995. “Nitric oxide-stimulated guanine nucleotide exchange on p21ras”. J. Biol. Chem. 270: 7017 – 7020.

Lane, P., Hao, G., and Gross, S. S. 2001. “S-nitrosylation is emerging as a specific and fundamental posttranslational protein modification: head-to-head with O-phosphorylation”. Sci. STKE, 2001(86): RE1.

Lee, S. R., Kwon, K. S., Kim, S. R. and Rhee, S. G. 1998. “Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor”. J. Biol. Chem. 273: 15366 – 15372.

Le Gall, M., Chambard, J. C., Breitmayer, J. P., Grall, D., Pouyssegur, J. and Van Obberghen-Schilling, E. 2000. “The p42/p44 MAP kinase pathway prevents apoptosis induced by anchorage and serum removal”. Mol. Biol. Cell. 11: 1103 – 1112.

Leibovich, S. J., Polverini, P. J., Fong, T. W., Harlow, L. A. and Koch, A. E. 1994. Production of. “Angiogenic activity by human monocytes requires an L-arginine/nitric oxide-synthase-dependent effector mechanism”. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 4190 – 4194.

Leiper, J., Murray-Rust, J., McDonald, N., Vallance, P. 2002. “S-nitrosylation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates enzyme activity: further interactions between nitric oxide synthase and dimethylarginine dimethylaminohydrolase”. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 13527 -13532.

Li, S. and Whorton, A. R. 2003. “Regulation of protein tyrosine phosphatase 1B in intact cells by nitrosothiols”. Arch. Biochem. Biophys. 410: 269 – 279.

Liebmann, C. 2001. “Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor production

pathway: paradigm of multiplicity. Cell Signal. 13: 777 – 785.

Lipton, S. A., Choi, Y. B., Pan, Z. H., Lei, S. Z., Chen, H. S., Sucher, N. J., Loscalzo, J., Singel, D. J., Stamler, J. S. 1993. “A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds”. Nature 364: 626 – 632.

Liu, F., Chernoff, J. 1997. “Protein tyrosine phosphatase 1B interacts with and is tyrosine phosphorylated by the epidermal growth factor receptor”. Biochem. J. 327: 139 – 145.

Liu, L., Yan, Y., Zeng, M., Zhang, J., Hanes, M. A., Ahearn, G., MacMahon, T. J., Dickfeld, T., Marshall, H. E., Que, L. G., Stamler, J. S. 2004. “Essential roles of S-nitrosothiols in vascular homeostasis and endotoxic shock”. Cell 116: 617 – 628.

Luttrell, L. M., Ferguson, S. S., Daaka, Y., Miller, W. E., Maudsley, S., Della Rocca, G. J., Lin, F. T., Kawakatsu, H., Owada, K., Luttrell, D. K., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J. 1999. “Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes”. Science 283: 655 – 661.

MacMiching, J., Xie, Q. W. and Nathan, C. 1997. “Nitric oxide and macrophage function”. Annu Rev. Immunol. 15: 323 – 350.

Mahadev, K., Wu, X., Zilbering, A., Zhu, L., Lawrence, J. T. and Goldstein, B. J. 2001. J. Biol. Chem. 276: 21938 – 21942.

Mannick, J. B., Hausladen, A., Liu, L., Hess, D. T., Zeng, M., Miao, Q. X., Kane, L. S., Gow, A. J., Stamler, J. S. 1999. “Fas-induced caspase denitrosylation”. Science 284: 651 – 654.

Gu, Z., Kaul, M., Yan, B., Kridel, S. J., Cui, J., Strongin, A., Smith, J. W., Liddington, R. C., Lipton, S. A. 2002. “S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death”. Science 297: 1186 – 1190.

- Marinissen, M. J., Chiarello, M., and Gutkind, J. S.** 2001. "Regulation of gene expression by the small GTPase Rho through the ERK6 (p38 gamma) MAP kinase pathway". Genes Dev. 15: 535 – 553.
- Marshall, C. J.** 1995. "Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transiente versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation". Cell 80: 179 – 185.
- Marshall, H. E. and Stamler, J. S.** 2001. "Inhibition of NF-kappa B by S-nitrosylation". Biochemistry 40: 1688 – 1693.
- Matsushita, K., Morrell, C. N., Cambien, B., Yang, S. X., Yamakuchi, M., Bao, C., Hara, M. R., Quick, R. A., Cao, W., O'Rourke, B., Lowenstein, J. M., Pevsner, J., Wagner, D. D., Lowenstein, C. J.** 2003. "Nitric oxide regulates exocytosis by S-nitrosylation of N-ethylmaleimide-sensitive factor. Cell 115: 139 – 150.
- Menck, J. G., Borkowski, J. A., Bierilo, K. K., NacNeil, T., Drrick, A. W., Schneck, K. A., Rabsom, R. W., Strader, C. D., Linemeyer, D. L., Hess, J. F.** 1994. "Expresion cloning of a human B1 bradykinin receptor". J. Biol. Chem. 269: 21583 – 21586.
- Mikkelsen, R. B. and Wardman, P.** 2003. "Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms". Oncogene 22: 5734 – 5754.
- Miller, W. E and Lefkowitz, R. J.** 2001. "Arrestins as signaling molecules involved in apoptotic pathways: a real eye opener". Sci STKE 2001 (69): PE1.
- Miura, S., Matsuo, Y. and Saku, K.** 2003. "Transactivation of KDR/Flk-1 by the B2 receptor induces tube formatem in human coronary endothelial cell". Hypertension 41: 1118 – 1123.
- Moncada, S., Palmer, R. M. J., Higgs, E. A.** 1991. "Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology". Pharmacol. Rev. 43: 109 – 142.

- Moncada, S., Higgs, A.** 1993. "The L-arginine-nitric oxide pathway". N. Engl. J. Med. 329: 2002 – 2012.
- Monteiro, H. P. and Stern, A.** 1996. "Redox modulation of tyrosine reduction tion-dependent signal transduction pathways". Free Radic. Biol. Med. 21: 323 – 333.
- Monteiro, H. P., Rodu-Gray, J., Peranovich, T. M., de Oliveira, L. C., Stern, A.** 2000. "Nitric oxide stimulates tyrosine reduction tion of focal adhesion kinase, Src kinase, and mitogen-activated protein roduct in murine fibroblasts". Free Radic Biol. Med. 28: 174 - 182.
- Morbidelli, L., Chang, c. H., Douglas, J. G., Granger, H. J., Ledda, F. and Ziche, M.** 1996. "Nitric oxide mediates roductio effect of VEGF on coronary venular endothelium". Am. J. Physiol. 270 (1 Pt 2): H411- 415.
- Moroi, M., Zhang, L., Yasuda, T., Virmani, R., Gold, H. K., Fishman, M. C., Huang, P. L.** 1998. "Interaction of genetic deficiency of endothelial nitric oxide, gender, and pregnancy in vascular response to injury in mice". J. Clin. Invest. 101: 1225 – 1232.
- Morrison, P., Takashima, K., Rosner, M. S.** 1993. "Role of Threonine residues in regulation of the epidermal growth factor receptor by protein kinace C and mitogen-activated protein kinase. J. Biol. Chem. 268: 15536 – 15548.
- Morita, T., Yoshizumi, M., Kurihara, H., Maemura, K., Nagai, R., Yazaki, Y.** 1993. "Shear stress increases heparin-binding epidermal growth factor mRNA levels in Human Vascular Endothelial Cells". Biochem. Biophys. Res. Comm. 197: 256 – 262.
- Mukhin, Y. V., Gooz, M., Raymond, J. R., Garnovskaya, M.** 2006. "Collagenase-2 and -3 mediate epidermal growth factor receptor transactivation by bradykinin B₂ receptor kidney cells". J. Pharmacol. Exp. Ther. 318: 1033 – 1043.
- Mukherjee, S., Tessema, M., Wandinger-Ness.** 2006. "Vesicular trafficking of tyrosine

kinase receptors and associated proteins in the regulation of signaling and vascular function”. Circ. Res. 98: 743 – 756.

Murad, F. 1994. “Regulation of cytosolic guanylyl cyclase by nitric oxide: the No- cyclic GMP signal transduction system. Adv. Pharmacol. 26: 19 – 33.

Murphy, L. O., MacKeigan, J. P., Blenis, J. 2004. “A network of immediate early gene products propagates subtle differences in mitogen-activated protein kinase signal amplitude and duration. Mol. Cell. Biol. 24: 144 – 153.

Murohara, T., Asahara, T., Silver, M., Bauters, C., Masuda, H., Kalka, C., Kearney M., Chen, D., Symes, J. F., Fishman, M. C., Huang, P. L. and Isner, J. M. 1998. “Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia”. J. Clin. Invest. 101: 2567 – 2578.

Murohara, T., Witzenbichler, B., Spyridopoulos, I., Asahara, T., Ding, B., Sullivan, A., Losordo, W. and Isner, J. M. 1999. “Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cell migration”. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 19: 1156 – 1161.

Nathan, C. 1992. “ Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells”. FASEB J. 6: 3051 – 3064.

Neel, B. G. and Tonks, N. K. 1997. “Protein tyrosine phosphatases in signal transduction”. Curr. Opin. Cell Biol. 9: 193 – 204.

Oliveira, C. J., Schindler, F., Ventura, A. M., Moraes, M. S., Arai, R. J., Debbas, V., Stern, A., Monteiro, H. P. 2003. “Nitric oxide and cGMP activate the Ras-MAP kinase pathway-stimulating protein tyrosine phosphorylation in rabbit aortic endothelial cells. Free Radic. Biol. Med. 2003. 35: 381 – 396.

Oliveira, C. J. , Curcio, M. R., Moraes, M. S., Travassos, L. R., Stern, A., Monteiro, H. P. 2008. “The low molecular weight S-nitrosothiol, S-nitroso-N-acetylpenicillamine,

promotes cell cycle progression in rabbit aortic endothelial cells". *Nitric Oxide* (in press).

Ohtsu, H., Dempsey, P. J., Eguchi, S. 2006. "ADAMs as mediators of EGF receptor transactivation by G protein-coupled receptors". *Am. J. Physiol Cell Physiol.* 291: C1 – 10.

Palmer, R. M. J., Ferrige, A. S. and Moncada, S. 1987. "Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor". *Nature* 327: 524 – 526.

Papapetropoulos, A., Garcia-Cardena, G., Madri, J. A. and Sessa, W. C. "Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells". *J. Clin. Invest.* 100 (12) : 3131 – 3139.

Parenti, A., Morbidelli, L., Ledda, F., Granger, H., Ziche, M. 2001. "The bradykinin/B1 receptor promotes angiogenesis by up-regulation of endogenous FGF-2 in endothelium via the nitric oxide synthase pathway". *The FASEB J.*

Park, H. S., Huh, S. H., Kim, M. S., Lee, S. H., Choi, E. J. 2000. "Nitric oxide negatively regulates c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase by means of S-nitrosylation". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 14382 – 14387.

Pearson, R. B. and Kemp, B. E. 1991. "Protein kinase reduction site sequences and consensus specificity motifs: tabulations". *Methods Enzymol.* 200: 62 – 81.

Peranovich, T. M., da Silva, A. M., Fries, D. M., Stern, A., Monteiro, H. P. 1995. "Nitric oxide stimulates tyrosine reduction in murine fibroblasts in the absence and presence of epidermal growth factor". *Biochem. J.* 305: 613 – 619.

Perrotte, P., Matsumoto, T., Inoue K., Kuniyasu, H., Eve, B. Y., Hickin, D. J., Radinsky, R. and Dinney, C. P. 1999. "Anti-epidermal growth factor receptor antibody C225 inhibits angiogenesis in human transitional cell carcinoma growing orthotopically in nude mice". *Clin. Cancer Res.* 5: 257 -265.

Pierce, K. L., Tohgo, A., Ahn, S. Field, M. E., Luttrell, L. M., Lefkowitz, R. J. 2001.

“Epidermal growth factor (EGF) receptor-dependent ERK activation by G protein-coupled receptors. A co-culture system for identifying intermediates upstream and downstream of heparin-binding EGF shedding”. J. Biol. Chem. 276: 23155 – 23160.

Pouyssegur, J. and Lenormand, P. 2003. “Fidelity and ciátio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signaling”. Eur. J. Biochem. 270: 3291 – 3299.

Prast, H. and Philippu, A. 2001. “Nitric oxide as modulator of neuronal function”. Prog. Neurobiol. 64: 51 – 68.

Prenzel, N., Zwick, E., Daub, H., Leserer, M., Abraham, R., et al. 1999. “EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF”. Nature 402: 884 – 888.

Raab, G. and Klagsbrun, M. 1997. “Heparin-binding EGF-like growth factor”. Biochim. Biophys. Acta 1333: F179 – F199.

Regoli, D., Barabé, J. 1980. “Pharmacology of bradykinin and related peptides”. Pharmacol. Rev. 32: 1 – 46.

Riese, D. J. and Stern, D. F. 1998. “Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network”. BioEssays 20: 41 – 48.

Rodríguez-Fernández, J. L. and Rozengurt, E. 1996. “Bombesin, bradykinin, vasopressin, and phorbol esters rapidly and transiently activate Src family tyrosine kinase in Swiss 3T3 cells. Dissociation from tyrosine phosporilation of p125 focal adhesion kinase”. J. Biol. Chem. 271: 27895 – 27901.

Roskoski Jr., R. 2005. “Src kinase regulation by roduction tion and dephosphorylatio”. Biochem. Biophys. Res. Commun. 331: 1 – 14.

Rossig, L., Fichtlscherer, B., Breitschopf, K., Haendeler, J., Zeiher, A. M. and Mulsch, A. 1999. “Nitric oxide inhibits caspase-3 by S-nitrosation in vivo”. J. Biol. Chem. 274 (11):

6823 – 6826.

Rubanyi, G. M., Romero, J. C., Vanhoutte, P. M. 1986. “Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor”. Am. J. Physiol. 250: H1145 – H1149.

Russell, K. S., Haynes, M. P., Caulin-Glaser, T., Rosneck, J., Sessa, W. C., Bender, J. R. 2000. “Estrogen stimulates heat shock protein 90 binding to endothelial nitric oxide synthase in human vascular endothelial cells”. Effect on calcium sensitivity and NO release. J. Biol. Chem. 275: 5026 – 5030.

Salvemini, D. and Botting, R. 1993. “Modulation of platelet function by free radicals and free-radical scavengers. Trends Pharmacol. Sci. 14: 36 – 42.

Santiskulvong, C., Rozengurt, E. 2003. “Galardin (GM 6001), a broad-spectrum matrix metalloproteinase inhibitor, blocks bombesin- and LPA-induced EGF receptor transactivation and DNA synthesis in rat-1 cells”. Exp. Cell Res. 290: 437 – 446.

Santiskulvong, C., Sinnott-Smith, J., Rozengurt, E. 2001. “EGF receptor function is required in late G(I) for cell cycle progression induced by bombesin and bradykinin”. Amer. J. Physiol-Cell Physiol. 281: C886 – C898.

Schafer B., Gschwind, A., Ullrich, A. 2004a. “Multiple G-protein-coupled receptor signals converge on the epidermal growth factor receptor to promote migration and invasion”. Oncogene 23: 991 – 999.

Schafer B., Marg B., Gschwind A., Ullrich, A. 2004b. “Distinct ADAM metalloproteinases regulate G protein-coupled receptor-induced cell proliferation and survival”. J. Biol. Chem. 279: 47929 – 47938.

Schlessinger, J. and Bar-Sag, D. 1994. “Activation of Ras and other signaling pathways by receptor tyrosine roduct”. Col Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 59: 173 – 179.

Schlessinger, J. 2000. “Cell signaling by receptor tyrosine roduct”. Cell 103: 211 – 225.

- Schonhoff, C. M., Daou, M. C., Jones, S. N., Schiffer, C. A., Ross, A. H.** 2002. "Nitric oxide-mediated inhibition of Hdm2-p53 binding". Biochemistry 41: 13570 – 13574.
- Shaul, P. W., Anderson, R. G.** 1998. "Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction". Am. J. Physiol. 275: L843 – 851.
- Sogawa, K., Numayama-Tsuruta, K., Ema, M., Abe, M., Abe, H., Fujii-Kuriyama, Y.** 1998. "Inhibition of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide donors in hypoxia". Proc Natl. Acad. Sci. U S A 95: 7368 – 7373.
- Stamler, J. S., Osborne, J. A., Mullins, M. E., Jaraki, O., Michel, T., Singel, D. J., Loscalzo, J.** 1992. "S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 444 – 448.
- Stamler, J. S., Lamas, S. and Fang, F. C.** 2001. "Nitrosylation: the prototypic redox-based signaling mechanism". Cell 106: 675 – 683.
- Suarez Pestana E., Tenev, T., Gross, S., Stoyanov, B., Ogata, M., Bohmer, F. D.** 1999. "The transmembrane protein tyrosine phosphatase RPTPsigma modulates signaling of the epidermal growth factor receptor in A431 cells". Oncogene 18: 4069 – 4079.
- Sunnaborg, S. W., Hinkle, C. L., Stenvenson, M., Russel, W. E., Raska, C. S., Peschon, J. J., Castner, B. J., Gerhart, M. J., Paxton, R. J., Black, R. A., Lee, D. C.** 2002. "Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE) regulates epidermal growth factor receptor ligand availability". J. Biol. Chem. 277: 12838 – 12845.
- Takakura, K., Beckman, J. S., MacMillan-Crow, L.A., Crow, J. P.** 1999. "Rapid and irreversible inactivation of protein tyrosine phosphatases PTP1B, CD45, and LAR by peroxynitrite". Arch. Biochem. Biophys. 369: 197 – 207.
- Takishima, K., Griswold-Prenner, I., Ingebritsen, T., Rosner, M. R.** 1991. "Epidermal

growth factor (EGF) receptor T669 peptide kinase from 3T3-L1 cells is an EGF-stimulated MAP kinase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 2520 – 2524.

Tice, D.A., Biscardi, J. S., Nickles, A. L., Parsons, S. J. 1999. “Mechanism of biological synergy between cellular Src and epidermal growth factor receptor”. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 1415 – 1420.

Tomic, S., Greiser, U., Lammers, R., Kharitonov, A., Imyanitov, E., Ullrich, A., Bohmer, F. D. 1995. “Association of SH2 domain protein tyrosine phosphatases with the epidermal growth factor receptor in human tumor cells. Phosphatidic acid activates receptor by PTP1C”. J. Biol. Chem. 270: 21277 – 21284.

Tonks, N. K. and Neel, B. G. 2001. “Combinatorial control of the specificity of protein tyrosine phosphatases”. Curr. Opin. Cell Biol. 13: 182 – 195.

Tonks, N. K. 2006. “Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease”. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 7: 833 – 846.

Toulany, M., Kasten-Pisula, U., Brammer, I., Wang, S., Chen, J., Dittmann, K., Baumann, M., Dikomey, E., Rodemann, H. P. 2006. “Blockage of epidermal growth factor receptor-phosphatidylinositol 3-kinase-AKT signaling increases radiosensitivity of K-RAS mutated human tumor cells in vitro by affecting DNA repair”. Clin. Cancer Res. 12: 4119 – 4126.

Traverse, S., Seedorf, K., Paterson, H., Marsall, C., Cohen, P. and Ullrich, A. 1994. “EGF triggers neuronal differentiation of PC12 cells that over express the EGF receptor”. Curr. Biol. 4: 694 – 701.

Tunquist, B. J. and Maller, J. L. 2003. “Under arrest: cytosstatic factor (CFS)-mediated metaphase arrest in vertebrate eggs”. Genes Dev. 17: 683 – 710.

Tsurumi, Y., Murohara, T., Krasinski, K., Chen, D., Witzenbichler, B., Kearney, M.,

- Couffinhal, T., Isner, J. M.** 1997. Reciprocal relation between VEGF and NO in the regulation of endothelial integrity". Nat. Med. 3: 879 – 886.
- Ullrich, A. and Schelessinger, J.** 1990. "Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity". Cell 61: 203 – 212.
- Van Biesen, T., Hawes, B. E., Raymond, J. R., Luttrell, L. M., Koch, W. J., Lefkowitz, R. J.** 1996. "G9o)-protein alpha-subunits activate mitogen-activated protein kinase via a novel protein kinase C-dependet mechanism". J. Biol. Chem. 271: 1266 – 9.
- Van der Zee, R., Murohara, T., Luo, Z., Zollmann, F., Passeri, J. and Lekutat, C.** 1997. "Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor augments nitric oxide release from queixem rabbit and human vascular endothelium". Circulation 95 (4): 1030 – 1037.
- Weiss, F. U., Daub, H. and Ullrich, A.** 1997. "Novel mechanisms of RTK signal generation". Curr. Opin. Gen. Dev. 7: 80 – 86.
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B. and Johnson, G. L.** 1999. "Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human". Physiol. Rev. 79: 143 – 180.
- Wiernas, T. K., Davis, T. L., Griffin, B. W., Sharif, N. A.** 1998. "Effects of bnradykinin on signal transduction, cell proliferation, and cytokine, prostaglandin E2 and collagenase-1 release from human corneal epithelial cells". Br. J. Pharmacol. 123: 1127 – 1137.
- Xian, M., Wang, K., Chen, X., Hou, Y., McGill, A., Zhou, B., Zhang, Z. Y., Cheng, J. P., Wang, P. G.** 2000. "Inhibition of protein tyrosines phosphatases by low-molecular-weight S-nitrosothiols and S-nitrosylated human serum albumin". Biochem. Biophys. Res. Commun. 268: 310 – 314.
- Yaish, P., Gazit, A., Gilon, C. and Levitzki, A.** 1988. "Blocking of. EGF-dependent cell

proliferation by EGF receptor kinase inhibitors”. Science 242: 933 – 935.

Yan, Y., Shirakabe, K., Werb, Z. 2002. “ The metalloprotease Kuzbanian (ADAM10) mediates the reactivation of EGF receptor by G protein-coupled receptors”. J. Cell. Biol. 158: 221 – 226.

Yarden, Y., Escobedo, J. A., Kuang, W. J., Yang-Feng, T. L., Daniel, T. O., Tremble, P. M., Chen, E. Y., Ando, M. E., Harkins, R. N., Francke, U., et al. 1997. Nature 323: 226 – 232.

Yarden, Y. 2001. “The EGFR family and its ligands in human oncogenesis: Signalling mechanisms and therapeutic opportunities”. Eur. J. Cancer 37 (Suppl. 4): 53 – 58.

Yasinska, I. M., Sumbavev, V. V. 2003. “S-nitrosation of Cys-800 of HIF-1alpha protein activates its interaction with p300 and stimulates its transcriptional activity”. FEBS Lett. 549: 105 – 109.

Zhang, Z., Kolls, J. K., Oliver, P., Good, D., Schwarzenberger, P. O., Joshi, M. S., Ponthier, J. L., Lancaster, J. R. Jr. 2000. “Activation of tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme-mediated ectodomain shedding by nitric oxide”. J. Biol. Chem. 275: 15839 – 15844.

Ziche, M., Morbidelli, L., Masini, E., Amerin, I. S., Granger, H. J., Maggi, C. A., Geppetti, P., and Ledda, F. 1994. “Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P”. J. Clin. Invest. 94 (5): 2036 – 2044.

Ziche, M., Parenti, A., Ledda, F., Dell’Era, P., Granger, H. J., Maggi, C. A., and Presta, M. 1997. “Nitric oxide promotes proliferation and plasminogen activator production by coronary venular endothelium through endogenous bFGF”. Circ. Res. 80 (6): 845 – 852.

Zugasti, O., Rul, W., Roux, P., Peyssonnaud, C., Eyche, A., Franke, T. F., Fort, P.

and Hibner, U. 2001. "Raf-MEK-ERK cascade in anoikis is controlled by Rac1 and Cdc42 via Akt". Mol. Cell Biol. 21: 6706 – 6717.

VIII. Curriculum Vitae

Miriam Santos de Moraes

Acajutiba/ BA - 01 / 02 /1969

Formação:

- Universidade de São Paulo – Instituto de Biologia - Bacharel em Ciências Biológicas – 1996
- Universidade de São Paulo – Faculdade de Educação – Licenciatura Plena em Ciências Biológicas – 2008
- Mestrado em Bioquímica - 2002
- Doutorado em Bioquímica – a defender 05/2008

Cursos

- Modelos Pré-clínicos de Terapia Celular e Reparo Tecidual em Neurociências - Universidade Federal de São Paulo – Departamento de Neurociência.
- Sunrise Free Radical School – 29/06/05 – 02/07/05 – Satellite Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology – Águas de Lindóia – SP.
- Células-tronco e progenitores neurais, conceitos e aplicações - 30/08/04 – 01/09/04 - Universidade Federal de São Paulo - Departamento de Neurociência.
- Curso de Atualização em Aids – 03/12/96 – 12/12/96. Universidade Federal de São Paulo – Departamento de Medicina – Disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Comunicações em Congressos

- 2007 – XXXVI Reunião da SBBq – Nitric Oxide stimulates EGF-receptor signaling pathway promoting angiogenesis of endothelial cells. Moraes, M. S., Miyakawa, A., Curcio, M., Monteiro, H. P.

- 2005 - IV Meeting of the South American Group of the Society for Free Radical Biology and Medicine. Reciprocal Relationship between EGF and NO in the Regulation of Proliferation of Endothelial Cells. Moraes, M. S., Oliveira, R., Monteiro, H. P.
- 2001 – XXX Reunião da SBBq. ACTH Deactivates Akt/PKB Pathway in Y-1 Adrenocortical Cells. Forti, F. L., Moraes, M. S., Armelin, H. A.
- 2000 – XXXIX Reunião da SBBq. Role of c-Ki-Ras Protein Overexpression in Adrenocortical Y-1 Cells – A Study of Signal Transduction.
- 1999 – XXVIII Reunião da SBBq. ACTH Antagonizes c-Myc Induction by FGF-2 in Y-1 Adrenocortical Cells. Lepique, A. P., Hajji, G. N., Santos, M. O., Armelin, H. A.
- 1998 - Keystone Synposia on Molecular and Cellular Biology of Gene Therapy – Zerbine, L. F. C., Santos, M. O., Ventura, A. M. Insertion of the C4 domain of HIV envelope glycoprotein in to the Ad2 fiber gene. Meeting Abstracts, p. 56.
- 1996 – II Congresso do Instituto de Ciências Biomédicas – USP – Ventura, A. M., Zerbine, L. F. C., Santos, M. O. Insertion of the C4 domain of HIV1 envelope glycoprotein into the Ad2 fiber gene. Resumos da Reunião p. 96 -97.
- 1996 – VIII Encontro Nacional de Virologia. Zerbine, L. F. C., Santos, M. O., Ventura, A. M. Insertion of the domain of HIV1 envelope glycoprotein into the Ad2 Fiber Gene. Resumos da Reunião p. 123.
- 1996 – XXV Reunião da SBBq – Insertion of the C4 Domain of HIV1 envelope glycoprotein into the Ad2 fiber gene. Resumos da Reunião p. 60.
- 1996 – IV Simpósio de Iniciação Científica da USP – Santos, M. O., Zerbine, L. F. C., Ventura, A. M. Inserção do domínio C4 da glicoproteína de envelope do HIV1 no gene da fibra de Ad2. Ribeirão Preto. Resumos da Reunião, p. 16.11.
- 1995 – V Viroológica. Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Virologia – Zerbini, L. F. C., Santos, M. O., Ventura, A. M. Insertion of the C4 domain of HIV1 envelope glycoprotein in to the Ad2 fiber gene. Resumos da Reunião p. 80.
- 1995 – III Simpósio de Iniciação Científica da USP – Santos, M. O., Zerbine, L. F. C., Ventura, A. M. Inserção do domínio C4 da glicoproteína de envelope do HIV1 no gene da fibra de Ad2. Ribeirão Preto. Resumos da Reunião, p. 2.31.

Publicações

- 1. Oliveira, C. J. , Curcio, M. R., Moraes, M. S., Travassos, L. R., Stern, A., Monteiro, H. P.** 2008. "The low molecular weight S-nitrosothiol, S-nitroso-N-acetylpenicillamine, promotes cell cycle progression in rabbit aortic endothelial cells". Nitric Oxide (in press).
- 2. Forti, F. L., Costa, E. T., Rocha, K. M., Moraes, M. S., Armelin, H. A.** 2006. c-Ki-ras oncogene amplification and FGF2 signaling pathways in the mouse Y1 adrenocortical cell line. An Acad Bras Cienc. 78(2):231-9.
- 3. Monteiro, H. P., Rocha Oliveira, C. J., Curcio, M. F., Moraes, M. S., Arai, R.J.** 2005. Tyrosine phosphorylation in nitric oxide-mediated signaling events. Methods Enzymol. 396:350-8.
- 4. Costa, E. T., Forti, F. L., Rocha, K. M., Moraes, M. S., Armelin, H. A.** 2004. Molecular mechanisms of cell cycle control in the mouse Y1 adrenal cell line. Endocr Res. 30(4):503-9.
- 5. Lepique, A. P., Moraes, M. S., Rocha, K. M., Eichler, C. B., Hajj, G. N., Schwindt, T. T., Armelin, H. A.** 2004. c-Myc protein is stabilized by fibroblast growth factor 2 and destabilized by ACTH to control cell cycle in mouse Y1 adrenocortical cells. J Mol Endocrinol. 33(3):623-38.
- 6. Oliveira, C. J., Schindler, F., Ventura, A. M., Moraes, M. S., Arai, R. J., Debbas, V., Stern, A., Monteiro, H. P.** 2003. Nitric oxide and cGMP activate the Ras-MAP kinase pathway-stimulating protein tyrosine phosphorylation in rabbit aortic endothelial cells. Free Radic. Biol. Med. 15:35(4):381-96.
- 7. Forti, F. L., Schwindt, T. T., Moraes, M. S., Eichler, C. B., Armelin, H. A.** 2002. ACTH promotion of p27(Kip1) induction in mouse Y1 adrenocortical tumor cells is dependent on both PKA activation and Akt/PKB inactivation. Biochemistry. 6;41(31):10133-40.
- 8. Lepique, A. P., Forti, F. L., Moraes, M. S., Armelin, H. A.** 2000. Signal transduction in G0/G1-arrested mouse Y1 adrenocortical cells stimulated by ACTH and FGF2. Endocr Res. 26(4):825-32.
- 9. Lotfi, C. F., Lepique, A. P., Forti, F. L., Schwindt, T. T., Eichler, C. B., Santos, M. O., Rebustini, I. T., Hajj, G. N., Juliano, L., Armelin, H. A.** 2000. Proliferative signaling initiated in ACTH receptors. Braz. J. Med. Biol. Res. 33(10):1133-40.