

KENYA THIESEN

**MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS DO DESEQUILÍBRIO REDOX
EM CÉLULAS NEOINTIMAIS VASCULARES**

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

Área de Concentração: Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Francisco Rafael Martins Laurindo

**SÃO PAULO
2007**

ÍNDICE

Lista da Abreviaturas

Lista de Quadros

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

1. Introdução

- 1.1 Formação da camada neointima
- 1.2 Papel dos processos redox na resposta vascular a lesão
- 1.3 Isomerase de dissulfetos protéicos (PDI) e NADPH oxidase
- 1.4 Estresse do retículo endoplasmático (“reação de proteínas desenoveladas)

2. Objetivos

3. Material e Métodos

- 3.1 Reagentes
- 3.2 Angioplastia em artérias ilíacas de coelho
- 3.3 Análise Morfológica
- 3.4 Cultura e Isolamento de Células
 - 3.4.1 Estabelecimento do método para cultura de células neointimais(NeoC)
 - 3.4.2 Cultura de células da camada média de artérias após lesão por angioplastia (IVSMC)
 - 3.4.3 Cultura primária de células musculares lisas de artérias intactas (NVSMC)
- 3.5 Imunofluorescência em microscópio comum
- 3.6 Caracterização da origem neointimal das células
- 3.7 Análise da expressão de proteínas marcadoras do estresse do retículo por Western Blot
- 3.8 Análise de GSH intracelular por HPLC
 - 3.8.1 Obtenção das amostras
 - 3.8.2 Análise por HPLC
- 3.9 Análise da atividade da NADPH oxidase
 - 3.9.1 Obtenção das amostras
 - 3.9.2 Quimiluminescência mediada por lucigenina
- 3.10 Testes de viabilidade celular
 - 3.10.1 Incorporação de Trpan Blue
 - 3.10.2 Condições de análise no HPLC
- 3.11 Avaliação da produção de ROS em extratos celulares
 - 3.11.1 Extratos de células para análise por HPLC
 - 3.11.2 Condições de análise no HPLC
- 3.12 Análise Estatística

4. Resultados

- 4.1 Análise morfológica das artérias ilíacas de coelho intacta e 14 dias após angioplastia
- 4.2 Desenvolvimento de método para cultura de células da neointima
- 4.3 Desenvolvimento do método para cultura de células musculares lisas de artérias lesadas
- 4.4 Características morfo-funcionais de células neointimais
- 4.5 Características de células normais e da camada média da artéria lesada
- 4.6 Imunofluorescência para alfa-actina
- 4.7 Marcadores de NeoC
- 4.8 Expressão de proteínas marcadores do estresse do RE
- 4.9 Avaliação do estado redox pela GSH
- 4.10 Avaliação da produção de ROS em extratos totais de células
- 4.11 Avaliação da atividade da NADPH oxidase em fração de membrana
- 4.12 Avaliação da viabilidade celular em resposta a estressores

5. Discussão

- 5.1 Considerações metodológicas

5.2 Características morfo-funcionais de células neointimais cultivadas

5.3 Estresse do retículo endoplasmático e neointima

5.4 Estresse oxidativo e ativação da NADPH oxidase em células neointimais

5.5 Significância do modelo in vitro

5.6 Implicações

6. Conclusões

Referências Bibliográficas

Lista de Abreviaturas

All	angiotensina II
ATP	adenosinatrifosfato
BSA	soro de albumina bovina
BTEB 2	elemento de transcrição básico ligado a proteína 2
cBf α 1/RUNX2	um fator de transcrição requerido para diferenciação de osteoblastos e síntese óssea
DAPI	4',6-diamidino-2-fenil-indol
DHE	Dihidroetídio
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
DTT	Ditiotreitol
ECM	matriz extra-celular
eIF2 α	fator iniciador da tradução eucariótico
ET-1	endotelina 1
FBS	soro fetal bovino
FITC	isotiocianato de fluoresceína
GAPDH	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
grp	proteína regulada por glicose
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
i.m.	intramuscular
iNOS	óxido nítrico sintase induzida
i.v.	intravenosa
IVSMC	células musculares lisas vasculares da artéria lesada
MEM	meio essencial mínimo
NeoC	células neointimais
*NO, NO	óxido nítrico
NOC-18	2,2'-(hidroxinitrohidrazina)bis-etanamina (=DetaNONOato um doador de NO gás)
Nox	<u>NAD(P)H oxidase</u>
NVSMC	células musculares lisas vasculares da artéria normal
PBS	salina tampão fosfato
PDGF	fator de crescimento derivado de plaqueta
PDI	isomerase de dissulfeto proteicos
PGF2 α	prostaglandina F2 α
PMSF	fenilmetilsulfonilfluoreto
RE	reticulo endoplasmático
ROS	espécies reativas de oxigênio

SFB	soro fetal bovino
SM 22 α	um marcador de célula muscular lisa diferenciada
SM-MHCemb	muscular lisa miosina de cadeia pesada embrionária
SOD	superóxido dismutase
TBS	tampão tris salina
TCA	ácido tricloroacético
TGF- β	fator de crescimento transformador β
UPR	reação a proteínas desenoveladas
VSMC	células musculares lisas vasculares

Lista de Quadros

Quadro 1 – Diferenças entre os dois principais fenótipos das células musculares lisas

Quadro 2 – Evolução geral típica da resposta vascular a lesão em coelho

Quadro 3 – Expressão relativa do mRNA para diferentes isoformas de subunidades catalíticas da NAD(P)H oxidase em diferentes tipos celulares encontrados em vasos.

Quadro 4 – Subunidades catalíticas e reguladoras do complexo NAD(P)H oxidase em células musculares lisas vasculares.

Quadro 5 – Condições ideais para o crescimento das culturas primárias dos diferentes tipos celulares

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Lista dos primers para investigação de marcadores de células neointimais, com sua respectiva seqüência de nucleotídeos, tamanho do produto gerado, número de ciclos utilizados e temperatura de anelamento. Em todos os casos, a seqüência de DNA utilizada como base foi a descrita para coelho.

Tabela 2 – Quantificação do GSH em homogenatos totais de células musculares lisas de artérias intactas (NVSMC) ou da camada média da artéria lesada (IVSMC) e células neointimais(NeoC).

Tabela 3 – Média dos valores das concentrações de hidróxietídio (EOH) e etídio (E) nas células musculares lisas normais (NVSMC 20), nas células da camada média lesada (IVSMC 20) e nas células neointimais vasculares.

Tabela 4 – Percentual de células musculares lisas normais (NVSMC) não viáveis, determinada pela incorporação de Trypan Blue.

Lista de Figuras

Figura 1 – Cortes histológicos das artérias: intacta (A em 40X e B, C em 10X) e 14 dias após angioplastia (D em 40X e E, F em 10X), corados com hematoxilina-eosina (A, D); Verhoef-van-Gieson (B,E) e Masson (C, F).

Figura 2 – Fotomicrografias representativas da cultura de células musculares lisas da artéria lisada (IVSMC) e de células neointimais (NeoC) em diferentes tempos de incubação, mantidas em estufa a 37° C e 5% de CO₂. (A) - IVSMC após 24 horas em cultura; (B) - NeoC após 24 horas em cultura; (C) - IVSMC após 48 horas em cultura; (D) - NeoC após 48 horas em cultura; (E) - IVSMC após 72 horas em cultura; (F) - NeoC após 72 horas em cultura; (G) - IVSMC após 14 dias em cultura; (H) - NeoC após 14 dias em cultura (H);. Todas as imagens foram obtidas com aumento de 20X.

Figura 3 – Análise da expressão de alfa-actina em células musculares lisa (A e B), células da camada média lesada (C e D) e células neointimais (E e F). Todas as imagens foram obtidas em 20X.

Figura 4 – Análise da expressão do mRNA da RUNX2/Cbfa-1 através da reação em cadeia polimerase: O RNA total extraído de artérias normais (AN) e artérias lesadas (I) submetido à transcrição reversa utilizando primer OligodT. (A) Variação da expressão do mRNA da RUNX2 em artérias normais e lesadas extraídas 14 dias após lesão por cateter balão, após 25 ciclos; (B) Variação da expressão do mRNA da RUNX2 em artérias normais e lesadas extraídas 14 dias após lesão por cateter balão, após 30 ciclos. O controle negativo (CN) é a reação em cadeia polimerase sem cDNA.

Figura 5 – Análise da expressão do mRNA do Colageno α -1 e da osteopontina através da reação em cadeia polimerase: O RNA total extraído de artérias normais (AN) e artérias lesadas (I) submetido à transcrição reversa utilizando primer OligodT. (A) Variação da expressão do mRNA do Colageno α -1 em artérias normais e lesadas extraídas 14 dias após lesão por cateter balão; (B) Variação da expressão do mRNA da osteopontina em artérias normais e lesadas extraídas 14 dias após lesão por cateter balão. O controle negativo (CN) é a reação em cadeia polimerase sem cDNA.

Figura 6 – Análise da expressão do mRNA da osteopontina e da RUNX2/Cbfa-1, através da reação em cadeia polimerase: O RNA total extraído de artéria normal (AN), artéria contra lateral após 4 dias (CL4), artéria lesada após 4 dias (L4), artéria contra lateral após 8 dias (CL8), artéria lesada após 8 dias (L8), artéria contra lateral após 28 dias (CL28), artéria lesada após 28 dias (L28) submetido à transcrição reversa utilizando primer OligodT. (A) Variação da expressão do mRNA da osteopontina; (B) Variação da expressão do mRNA da RUNX2/Cbfa-1. O controle negativo (CN) é a reação em cadeia polimerase sem cDNA.

Figura 7 – Western blot mostrando expressão de proteínas marcadoras de estresse do retículo endoplasmático em homogenatos de artérias normais (NL) e artérias lesadas (I). O anticorpo primário detecta proteínas com a seqüência KDEL.

Figura 8 – Western blot mostrando expressão de proteínas marcadoras de estresse do retículo endoplasmático em homogenatos de células musculares lisas normais (NVSMC) ou da camada média lesada (IVSMC), células neointimais (NeoC). O anticorpo primário detecta proteínas com a seqüência KDEL.

Figura 9 – Produção de ROS em extrato total de células musculares lisas normais suplementadas com 20% de SFB (NVSMC 20) comparadas a produção basal após estímulo com angiotensina II (All) por 6 horas, tunicamicina (Tu) por 4 horas, NOC-18 (NO) por 18 horas. A atividade foi medida pelo método da DHE por HPLC. Em resposta a todos os estímulos houve diferença estatisticamente significativa com $p < 0,05$ comparado com o basal (sem estímulo).

Figura10 – Produção de ROS em extrato total de células da camada média de artérias lesadas suplementadas com 20% de SFB (IVSMC 20) comparadas a produção basal após estímulo com angiotensina II (All) por 6 horas, tunicamicina (Tu) por 4 horas, o doador de NO gás NOC-18 (NO) por 18 horas. A atividade foi medida pelo método da DHE por HPLC. Somente com óxido nítrico houve diferença estatisticamente significativa com $p < 0,05$ comparado com o basal (sem estímulo).

Figura 11 – Produção de ROS em extrato total de células neointimais (NeoC) comparadas à produção basal após estímulo com angiotensina II (All) por 6 horas, tunicamicina (Tu) por 4 horas, o doador de NO gás NOC-18 (NO) por 18 horas. A atividade foi medida pelo método da DHE por HPLC. Em resposta a todos os estímulos houve diferença estatisticamente significativa com $p < 0,05$ comparado com o basal (sem estímulo).

Figura 12 – Atividade da NADPH oxidase em frações de membrana de células musculares lisas normais (NVSMC); células da camada média lesadas (IVSMC) e células neointimais (NeoC) na condição basal e após tratamento com angiotensina II (All) por 6 horas. A atividade foi medida pelo método da lucigenina e expressa em cpm/mg/min, em escala logarítmica na ordenada. Condições experimentais: temperatura 37° C, e PBS/EDTA 10 μ M com pH rigorosamente controlado em 7,4. O resultado é a média mais ou menos o erro padrão de seis experimentos independentes. $p < 0,05$.

Figura 13 – Atividade da NADPH oxidase em frações de membrana de células musculares lisas normais (NVSMC); células da camada média lesadas (IVSMC) cultivadas com meio próprio suplementado com 10 ou 20% de soro fetal bovino por pelo menos 24 horas antes do preparo das amostras. A atividade foi medida pelo método da lucigenina. Condições experimentais: temperatura 37° C, e PBS/EDTA 10 μ M com pH 7,4.

Figura 14 – Atividade da NADPH oxidase em frações de membrana de células musculares lisas normais (NVSMC); células da camada média lesada (IVSMC) ambas cultivadas por 24 horas antes do estímulo com meio próprio suplementado com 20% de soro fetal bovino e células neointimais (NeoC) na condição basal e após tratamento com tunicamicina (Tu) por 4 horas. A atividade foi medida pelo método da lucigenina. Condições experimentais: temperatura 37° C, e PBS/EDTA 10 μ M com pH 7,4.

Figura 15 – Análise da suscetibilidade das células musculares lisas normais mantidas com 10 ou 20% de soro fetal bovino pela incorporação do Trypan blue. As células foram tratadas com (A) privação de soro por 1, 3 e 6 horas; (B) tunicamicina 5 μ g/mL por 4, 12 e 18 horas. (C) H₂O₂ 50 μ M por 1 hora. Os resultados foram dados comparando cada um dos tipos celulares com o controle de cada célula sem estímulo, sendo este considerado 100%.

Figura 16 – Análise da suscetibilidade das células musculares lisas normais e das células neointimais pelo método de redução do MTT. As células foram tratadas com (A) privação de soro por 1, 3 e 6 horas; (B) tunicamicina 2 μ g/mL por 4, 12 e 18 horas; (C) tunicamicina 5 μ g/mL por 4, 12 e 18 horas. (D) H₂O₂ 10 μ M por 1, 3 e 6 horas; (E) H₂O₂ 50 μ M por 1, 3 e 6; (F) H₂O₂ 100 μ M por 1, 3 e 6

horas; (G) doador de óxido nítrico 0,5 mM por 12 e 18 horas; (H) doador de óxido nítrico 0,5 mM por 12 e 18 horas e (I) doador de óxido nítrico 0,5 mM por 12 e 18 horas. Os resultados foram dados comparando cada um dos tipos celulares com o controle de cada célula sem estímulo, sendo este considerado 100%.

Figura 17 – Western blot representativo da expressão de proteínas contendo KDEL em homogenatos de células musculares lisas normais controle (1) e incubadas com NOC-18: 0,5 mM por 18 horas (2); 0,75 mM por 18 horas (3); 1,0 mM por 18 horas (4); 0,5 mM por 24 horas (5); 0,75 mM por 24 horas (6); 1,0 mM por 24 horas (7).

THIESEN, K. **Mecanismos fisiopatológicos do desequilíbrio redox em células neointimais vasculares**. São Paulo, 2007. 75p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

O crescimento de uma camada neointima é o marcador central do processo aterosclerótico, bem como do remodelamento vascular associado à reestenose após intervenções vasculares terapêuticas, tais como angioplastia ou colocação de *stents*. A célula neointimal é essencialmente uma célula com fenótipo muscular liso indiferenciado, cuja origem pode ser múltipla e com característica ação secretora de matriz extracelular. Dentre os fatores que coordenam a (des)diferenciação, proliferação e migração destas células, há evidências de que processos redox tenham papel preponderante, porém os mecanismos de tais processos não estão claros. A compreensão mais profunda de tais mecanismos redox tem sido dificultada pela falta de modelos de células neointimais cultivadas. Os objetivos específicos deste trabalho são: 1) Desenvolver um modelo de cultura de células neointimais de artéria ilíaca de coelho obtidas após lesão por catéter-balão. 2) Avaliar em tais células índices do estado redox e potenciais fontes enzimáticas de ERO, com ênfase no complexo NAD(P)H oxidase. 3) Avaliar marcadores de estresse do retículo endoplasmático e sua correlação com os índices do estado redox. 4) Estudar o efeito de estímulos proapoptóticos como deprivação de soro, estressores do RE e particularmente administração exógena de NO na viabilidade e estado redox de células neointimais. Os resultados obtidos demonstram que: é possível obter células neointimais em cultura de modo reproduzível e estável. Células provenientes da artéria lesada mantêm um estado persistente de aumento do estresse oxidativo. O estresse oxidativo nessas células decorre de produção aumentada de radical superóxido e ativação do complexo da NADPH oxidase vascular. Diferentemente do observado em vasos lesados, os marcadores do estresse do retículo endoplasmático não se apresentam alterados se comparados a células musculares lisas normais. Células neointimais têm resposta aumentada a agonistas da NADPH oxidase e estressores celulares. A exposição a óxido nítrico promove aumento da produção de superóxido, particularmente acentuado em células neointimais. As curvas de viabilidade celular indicam uma sensibilidade aumentada a estressores do RE, doadores de NO e particularmente a oxidantes exógenos. Em conjunto, estes resultados permitem concluir que o fenótipo neointimal é um fenótipo de estresse oxidativo acentuado e persistente, mesmo em condições de cultura celular, e que este estresse oxidativo decorre pelo menos em parte da ativação do complexo NADPH oxidase no contexto de uma adaptação à resposta celular integrada ao estresse. Estes dados indicam novas perspectivas no entendimento dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia redox da neointima, podendo suscitar o desenho de intervenções terapêuticas racionais.

Descritores: NAD(P)H oxidase, estresse oxidativo, restenose coronariana e coelhos.

THIESEN, K. **Pathophysiological mechanisms of redox imbalance in neointimal vascular cells**. São Paulo, 2007. 75p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Formation of a neointimal layer is the hallmark of most vascular diseases, such as atherosclerosis and restenosis after angioplasty. Neointimal cells display an undifferentiated noncontractile smooth muscle phenotype with marked extracellular matrix secretion. Their origin can be multiple. Among factors that govern the (de)differentiation, proliferation and migration of neointimal cells, there is evidence for a key role of redox processes, but the underlying mechanisms are unclear. Advancing the knowledge about such redox mechanisms has been difficulted by the absence of a reproducible method of neointimal cell culture. The objectives of this work are: 1) To develop a model of neointimal cell culture, in which cells are harvested from rabbit iliac arteries 14 days after overdilation balloon injury. 2) To assess the redox status in such neointimal cells and the possible enzymatic source of reactive oxygen, with emphasis in the NAD(P)H oxidase complex. 3) To investigate the expression of endoplasmic reticulum stress markers and their correlation with redox status. 4) To investigate the effects of proapoptotic stimuli such as serum deprivation, endoplasmic reticulum stressors and particularly the exogenous administration of nitric oxide in viability and redox status of neointimal cells. Our results show that it is possible to harvest and cultivate neointimal cells after balloon injury. The neointimal cells in culture, even after several passages, exhibit increased indexes of oxidative stress. Oxidative stress in such cells is associated with increased activation of the vascular NAD(P)H oxidase complex. Contrarily to what was observed in healing arteries harvested from in vivo rabbits, markers of ER stress did not show any change when compared with primary smooth muscle cells kept in similar conditions. Oxidative stress response was increased after NADPH oxidase agonists; in particular, exposure to exogenous nitric oxide markedly increased superoxide radical production in neointimal cells. Cell viability curves showed increased sensitivity to ER stressors, NO donors and, particularly, exogenous oxidants. Therefore, the neointimal phenotype is a phenotype of intrinsic sustained oxidative stress even after several passages in culture. Such oxidative stress is due at least in part to activation of the NAD(P)H oxidase complex in the context of adaptation to an integrated stress response. This data provide new perspectives to understand redox mechanisms associated with neointimal pathophysiology and can lead to development of rational therapeutic interventions.

Descriptors: NAD(P)H oxidase, oxidative stress, coronary restenosis and rabbits

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Artérias são compostas basicamente por três camadas estruturais. A camada de células mais interna que envolve o lúmen, delimitada pela camada elástica interna, é túnica íntima. É composta por um arranjo linear e longitudinal de células endoteliais e membrana basal contendo tecido conjuntivo, células sub-endoteliais (pericitos) e esporádicas células musculares lisas vasculares (VSMC). A túnica ou camada média é o tecido compreendido entre a lamina elástica interna e a externa. Composto de um arranjo de células musculares lisas dispostas em forma circunferencial embebidas em matriz extra-celular (ECM) rica em colágeno, elastina/fibrilina e proteoglicanos. A camada localizada externamente à lâmina elástica externa, ou túnica adventícia, é composta de fibroblastos arrumados longitudinalmente, inseridos em ECM rica em colágeno e elastina, pequenos vasos “*vasa vasorum*” e terminações nervosas (Gharios, *et al.*, 2004; Hillebrands, *et al.*, 2001).

Fisiologicamente, o endotélio atua como barreira semipermeável entre o sangue e a musculatura lisa vascular (ROSS, 1995). Particularmente, um grande volume de investigações nas últimas décadas evidenciou um papel crucial do endotélio no controle parácrino da estrutura e função vascular. Células endoteliais produzem substâncias vasoativas como endotelina-1 (ET-1) (YANAGISAWA, *et al.*, 1988) e angiotensina II (AII) (DZAU, *et al.*, 1987), além de fatores de relaxamento derivados do endotélio (FURCHGOTT, *et al.*, 1980), dentre eles prostaciclina e óxido nítrico (NO), que atuam nos tecidos adjacentes (VANE, *et al.*, 1990). Provavelmente o efeito mais significativo dos hormônios no controle vascular é a capacidade de muitos deles modularem a liberação de substâncias vasoativas como NO, prostaglandinas e ET-1 (POHL, *et al.*, 1994). A secreção tônica de NO induz um tônus basal vasodilatador, além de inibir a ativação plaquetária, a adesão de células inflamatórias e a proliferação de VSMC (Hermann, 2006).

VSMC têm sua origem, fenótipo e função variados. Grande parte delas é derivada de células mesenquimais (Hungerford, et al., 1999). Pelo menos em certos casos aparentemente se diferenciando de precursores monocíticos (Jabs, et al., 2005). Alguns estudos têm mostrado que algumas populações de VSMC têm sua origem em um processo de transdiferenciação de células endoteliais (DeRuiter, et al., 1997). VSMC apresentam, com gradações intermediárias, 2 fenótipos, sintético e contrátil (Quadro 1). O fenótipo sintético das VSMC aparece durante o estágio embrionário, se desenvolvendo para um mais filamentososo, que é o fenótipo contrátil mais maduro e presente em tecidos adultos. O fenótipo semelhante a fibroblasto se refere a um mais sintético, que é caracterizado por um aumento da síntese proteica (incluindo síntese de ECM), e ausência de organização do aparato contrátil no citoplasma. Já o fenótipo de VSMC maduras é caracterizado por uma capacidade reduzida de sintetizar proteínas da ECM, um aumento de miofilamentos contráteis e um aumento da expressão de alfa-actina (Gharios, et al., 2004).

Quadro 1 – Diferenças entre os dois principais fenótipos das células musculares lisas

	Fenótipo Sintético	Fenótipo Contrátil
Predomínio	Tecidos embrionários, reparo vascular (lesão vascular e aterosclerose)	Tecidos adultos
Função	Síntese de ECM e migração	Manutenção do tônus e resistência vascular
Organização do aparato contrátil	Ausente	Presente
Síntese de Proteínas da ECM	Aumentada	Reduzida

Baseado em Moiseeva EP, 2001.

A camada adventícia serve de arcabouço para a camada média e pode ter um papel ativo no remodelamento vascular em resposta à lesão vascular (Sartore, et al., 2001). Os fibroblastos podem ser estimulados por citocinas, fatores de crescimento como o fator de crescimento transformador β (TGF- β) levando a um fenótipo miofibroblástico ativo. Esse fenótipo é encontrado em vasos em processo de reparo e cura (Gabbiani, 2003). Miofibroblastos e VSMC são similares fenotipicamente, e a questão é se miofibroblastos e VSMC são realmente tipos de células distintas ou representam diferentes fases de diferenciação. Esta questão ainda não foi

plenamente esclarecida. Miofibroblastos estimulados com certos fatores de crescimento expressam alfa-actina, mas também podem expressar sob condições específicas outros marcadores de diferenciação de VSMC, tais como miosina da cadeia pesada e caldesmon (Serini, *et al.*, 1999). Recentemente foi observado que a esmotelina, um marcador de VSMC, não é expressa em miofibroblastos, o que permite a diferenciação entre os dois tipos celulares (Christen, *et al.*, 2001).

1.1 Formação da camada neoíntima.

Processos patológicos vasculares provocam uniformemente mudanças na estrutura da parede arterial (Gharios, *et al.*, 2004), em que há envolvimento de células inflamatórias e não-inflamatórias, gerando uma resposta vasculoproliferativa (Zhou, *et al.*, 2005). O crescimento e espessamento da camada íntima é denominado *camada neoíntima*, que é uma via final comum da resposta fisiopatológica vascular a condições como aterosclerose e no envelhecimento vascular, que é um processo eminentemente da camada íntima do vaso (Vazquez-Padron, *et al.*, 2004) e exacerbado na presença de diabetes (Winocour, *et al.*, 1993) e hipertensão arterial (Jandeleit-Dahm, *et al.*, 1997). Em especial, a formação da neoíntima é característica central da reparação vascular a lesões de diversas naturezas, seja imunoinflamatória, química ou física, representando essencialmente um fenômeno adaptativo (Khachigian, *et al.*, 2002). O exemplo mais típico e clinicamente relevante é a resposta a lesão mecânica vascular, após angioplastia por balão ou colocação de *stents* mecânicos, na qual ocorre progressivo espessamento, geralmente concêntrico, da íntima coincidindo com o avanço perivascular da inflamação (Hillebrands, *et al.*, 2001).

A angioplastia coronária percutânea foi um dos maiores avanços no tratamento de doenças arteriais coronarianas. A grande limitação dessa intervenção é o desenvolvimento de reestenose no local da intervenção (Roberts, *et al.*, 2005) que ocorre em 30 a 40% dos pacientes que sofreram angioplastia. O advento do *stent* coronariano tem resultado numa redução significativa dos casos de reestenose, porém a completa prevenção desta complicação não é ainda possível (Christen, *et al.*, 2001). A neoíntima é o ponto central do processo de reparação

vascular que freqüentemente culmina na síndrome clínica da reestenose pós-intervenção vascular (Chen, *et al.*, 2003). No caso da colocação de *stents*, a formação da neoíntima é o principal e, talvez, o único mecanismo de reestenose intra-*stent*. No caso de lesão por balão, o remodelamento vascular constrictivo é o principal determinante do grau de obstrução provocado pela neoíntima (Malik, *et al.*, 1998; Sartore, *et al.*, 2001). Em ambos os casos, assim como na aterosclerose nativa, a neoíntima é o essencial marcador do processo fisiopatológico vascular no âmbito celular, embora a neointima seja também exuberante após lesão mecânica de artérias normais (Moore, *et al.*, 1982).

A resposta vascular à lesão pode ser dividida em precoce e tardia. A primeira tem sido definida como uma fase inflamatória precoce, trombótica e baseada em mediadores inflamatórios, é também acompanhada por uma morte maciça de células vasculares, além da degradação da matriz. A fase tardia da estabilização da lesão é governada pela proliferação residual, migração celular, apoptose, remodelamento e secreção de ECM (Pollman, *et al.*, 1999; Schwartz, 1997; Straus, *et al.*, 1994). (Quadro 2).

A neoíntima é formada essencialmente por células com fenótipo muscular liso indiferenciado. A origem dessas células permanece controversa, com 3 possibilidades básicas (Hillebrands, *et al.*, 2001): 1) (des)diferenciação e migração de células musculares lisas contráteis da camada média (Ross, 1993); 2) migração e multiplicação de população(ões) celular(es) específica(s) oriunda(s) da camada média, adventícia ou da própria íntima (Roberts, *et al.*, 2005); 3) fixação, multiplicação e diferenciação de células pluripotentes oriundas do sangue periférico, p.ex., células progenitoras hematopoiéticas (Sata, *et al.*, 2002) ou progenitoras endoteliais (Roberts, *et al.*, 2005).

A célula neointimal é essencialmente uma célula secretora de ECM, uma ação que reflete a vasta mudança fenotípica a partir da célula muscular lisa contrátil desencadeada por estímulos parácrinos e autócrinos após uma lesão vascular. Portanto, além da proliferação e migração celular local, o acúmulo de ECM contribui fortemente para o espessamento da camada neointimal.

Estes processos são contrabalançados pela perda celular por apoptose e, possivelmente, pela contínua degradação de ECM (Lijnen, 2003/2004; Walsh, *et al.*, 2000). O balanço entre estes fenômenos determina o tamanho final da neoíntima.

Além da VSMC propriamente dita, a ativação dos fibroblastos da adventícia e sua migração e transformação em miofibroblastos pode contribuir para a formação da neointima e o remodelamento vascular.

Quadro 2 - Evolução geral típica da resposta vascular a lesão em coelho*

Tempo após lesão	Principais processos biológicos envolvidos
Imediato	Apoptose maciça precoce de células vasculares
24-48 horas	Infiltração de plaquetas e leucócitos Edema Início precoce da proliferação de camada média
4-7 dias	Migração celular para camada neointima incipiente Segunda onda de proliferação, principalmente na camada neointima Diminuição precoce do calibre e vasoconstrição
7-14 dias	Migração celular para camada neointima em expansão Máximo ritmo de diminuição do calibre do lúmen Secreção de matriz extracelular colágena Proliferação residual neointimal
14-28 dias	Segunda onda de apoptose da neointima > média Máxima secreção de matriz extracelular Diferenciação da célula muscular lisa neointimal Diminuição final do calibre vascular Tamanho quase-máximo da camada neointimal

* Laurindo, *et al.*, 2002.

O entendimento da biologia da célula neointimal representa uma etapa significativa para o avanço do conhecimento em inúmeras doenças vasculares, em particular no desenvolvimento e progressão da lesão aterosclerótica e na reestenose pós angioplastia (Bayes-Genis, *et al.*, 2000, Emanuelli, *et al.*, 2000). Conhecimentos sobre a prevenção de reestenose têm, em parte, sido limitados pela não existência de um modelo padronizado de células neointimais em cultura. Em protocolos *in vitro*, estas células podem ter vida média curta e são relativamente pouco uniformes entre as diversas fontes primárias da célula.

1.2 Papel de processos redox na resposta vascular à lesão

Dentre os inúmeros fatores envolvidos na resposta vascular à lesão mecânica, a participação de processos redox associados à sinalização e lesão celular nas diversas fases do processo de reparação têm um papel de destaque (Souza, *et al.*, 2000). Estes processos redox são basicamente relacionados à formação enzimática de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Hensley, *et al.*, 2000). A geração de radicais superóxido leva à redução da biodisponibilidade de NO e conseqüente disfunção vascular/endotelial. Neste contexto, as fontes enzimáticas de ROS fazem parte integrante de um sistema de transferência de elétrons que, em última análise, determina o ambiente redox celular. Além disso, variações redox em microambientes celulares e organelas contribuem para a modulação destes fenômenos.

Em vasos, em especial em VSMC há numerosas fontes de ROS, incluindo a NAD(P)H oxidase (semelhante à enzima de fagócitos), a cadeia respiratória mitocondrial, a xantina oxidase, a lipoxigenase e a óxido nítrico sintase; porém a NADPH oxidase e a mitocôndria são as principais fontes de ROS nessas células (Clempus, *et al.*, 2006).

A NADPH oxidase (Nox) é um complexo multiproteico de composição variável dependendo do tipo de célula, e não somente sua composição, mas a função das diferentes Noxs parecem ser distintas nos diferentes tipos de células (Griendling, 2004). A primeira oxidase descrita foi a dos fagócitos (=phagocytic oxidase – phox) é um complexo enzimático cuja ativação é estritamente controlada e envolve a interação física e montagem de várias subunidades proteicas: p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox}, rac 2 (em fagócitos), p22^{phox} e Nox 2. Nas células em repouso, os três primeiros componentes estão localizados no citosol, assim como a GTPase rac 2. Os componentes p22^{phox} e Nox 2 (a subunidade catalítica), localizados na membrana celular e em membranas de grânulos de secreção, se heterodimerizam para formar o citocromo b₅₅₈, a subunidade catalítica que contém heme, sítios flavina e o sítio de ligação do substrato redutor NADPH. Com estímulos apropriados, como citocinas e ativadores da proteína quinase C, o componente p47^{phox} é fosforilado pela proteína quinase C dentre outras possíveis quinases, e migra para a membrana juntamente com p67^{phox}, outra subunidade citosólica que é o local de ligação da rac que modula a atividade da enzima (Deleo, *et al.*, 1995; Deleo, *et al.*, 1998; Griendling, 2004). Este complexo interage com o citocromo b₅₅₈ e amplifica de modo exponencial a

transferência de elétrons do substrato NADPH para o oxigênio molecular, gerando de modo acelerado concentrações submicromolares de $O_2^{\bullet-}$, que é o produto primário da NADPH oxidase (Babior, 1999; 2000; 2002; Ohno, *et al.*, 1985).

Diferentemente da oxidase de fagócitos, a oxidase de células vasculares tem uma atividade basal constitutiva, sendo além disso ativada por estímulos de agonistas (Clempus, *et al.*, 2006), que induzem a produção de concentrações nanomolares de ROS com função de sinalização celular de processos como proliferação, migração, diferenciação, regulação da expressão e atividade de metaloproteinases de matriz, crescimento, secreção de citocinas inflamatórias, hipertrofia e morte (apoptose) (Clempus, *et al.*, 2006; Griendling, 2004) (Quador 3).

Quadro 3 - Expressão relativa do mRNA para diferentes isoformas de subunidades catalíticas da NAD(P)H oxidase em diferentes tipos celulares encontrados em vasos.

	Célula endotelial	Célula muscular lisa	Fibroblasto da adventícia	Monócito
Nox1	++	+++	-	-
Nox2	+++	-	++	+++++
Nox4	++	+	+	++

Obs.: os dados representam uma síntese de vários estudos (revisados por Lassegue *et al.*, 2005), utilizando diferentes metodologias (*i.e.* PCR quantitativa + não quantitativa), e portanto, são estimativas aproximadas. O sinal “-” representa expressão indetectável e os sinais “+” equivalem a semiquantificações relativas da expressão.

A Nox 1 é detectada em VSMC em baixos níveis, possui 56% de homologia com a Nox 2. Estudos mostraram que o aumento da expressão de Nox 1 está associado à proliferação celular, sendo a formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) um dos indutores dessa proliferação. Entre os agonistas conhecidos por ativar a Nox 1 estão: fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), AII e prostaglandina $F2\alpha$ ($PGF2\alpha$). A supressão da sua expressão inibe a produção de superóxido. As ROS produzidas pela Nox 1 estão associadas à hipertrofia e proliferação. A Nox 4 também é detectada em baixos níveis em VSMC, apresentando 39% de homologia com a Nox 2; é constitutivamente ativa. Nox 4 está relacionada à quiescência e diferenciação celular. Superexpressão da Nox 4 induz fenótipo senescente. Nox 4 parece ser inibida pelos agonistas da Nox 1 de modo que estímulos como PMA, ácido araquidônico ou cálcio não aumentam a sua atividade.

Todas as VSMC expressam p22^{phox}, e essa subunidade é requerida para atividade das seguintes subunidades catalíticas: Nox 1, Nox 2 (em níveis baixos porém funcionalmente importantes) e Nox 4 (Bayraktutan, *et al.*, 2000; Clempus, *et al.*, 2006; Geiszt, *et al.*, 2004; Griendling, 2004; Lassegue, *et al.*, 2001; Szocs, *et al.*, 2002) (Quadro 4). A Nox 1 e a Nox 2 são ativadas em resposta ao estímulo do PMA, via proteína quinase C, com o recrutamento do p47^{phox}. A expressão de p47^{phox} e rac1 (em não-fagócitos) é bem documentada, porém a do p67^{phox} ainda é controversa em VSMC. Novos homólogos das subunidades p47^{phox} e p67^{phox}, NoxO1 e NoxA1 foram recentemente descritos em outros tipos de células, mas sua presença ainda não foi confirmada em VSMC.

Quadro 4 – Subunidades catalíticas e reguladoras do complexo NAD(P)H oxidase em células musculares lisas vasculares.

Subunidades Catalíticas	Subunidades Reguladoras
Nox 1	p22 ^{phox}
Nox 2*	P47 ^{phox}
Nox 4	Rac 1
Nox 5	NoxA 1

Baseado em Kawahara, *et al.*, 2005.

* somente em VSMC de arteríolas (Touyz, *et al.*, 2002).

No vaso, a atividade da NAD(P)H oxidase gera concentrações nanomolares de superóxido (Souza, *et al.*, 2002) e está relacionada com a regulação da função vascular em condições fisiológicas (Irani, *et al.*, 2000) e em patologias como hipertensão (Cai, *et al.*, 2000; Fukui, *et al.*, 1997), diabetes (Du, *et al.*, 1998) e aterosclerose (Warnholtz, *et al.*, 1999; Miller, *et al.*, 1998).

Imediatamente após lesão vascular, ocorre maciça produção de superóxido por ativação da NAD(P)H oxidase vascular (Souza, *et al.*, 2000). Este processo leva à ativação precoce do fator de transcrição NF-κB, que está associada à transcrição de genes para mediadores da resposta inflamatória e cicatricial, geralmente associados à proteção celular contra apoptose (Souza, *et al.*, 2001). O estresse oxidativo após a lesão foi confirmado pela significativa redução dos níveis celulares de glutathiona reduzida e aumento da oxidada, de modo que a relação GSH/GSSG reduziu-se de 7,9±2,1 a 0,8±0,2 (p<0,005). Estudos subseqüentes com

quimiluminescência não detectaram aumento substancial da produção de radical superóxido (Azevedo, et al., 2000). Recentemente, foi mostrado por microtopografia fluorescente com hidroetidina o aumento da produção do radical superóxido, refletindo 2 processos simultâneos: a) aumento da expressão da NAD(P)H oxidase (Szocs, et al., 2002); b) redução sustentada da atividade da superóxido dismutase (Leite, et al., 2002). Nesse último estudo, demonstrou-se que depleção da SOD é um fator-chave para o remodelamento constrictivo do vaso após lesão e que esta depleção permite a ocorrência de estresse nitrativo/oxidativo envolvendo perda da bioatividade do NO derivado da iNOS.

Outra importante fonte de ROS é a mitocôndria. Essa organela gera por meio da respiração a energia necessária para a célula produzindo adenosinatrifosfato (ATP) pelo processo de fosforilação oxidativa (Coope, 2001; Czarnecka, *et al.*, 2006). O acceptor de elétrons dessa via é oxigênio molecular que é essencial à sobrevivência dos organismos aeróbicos e um acceptor final de elétrons em inúmeras outras vias metabólicas. Durante a cadeia respiratória mitocondrial, cerca de 0,1 % do oxigênio sofre uma redução incompleta para superóxido (Chang, *et al.*, 2004).

A produção de ROS na mitocôndria pode ocorrer em diversos locais, sob regulação de fatores como potencial de membrana, Ca^{2+} e NO. O complexo I pode produzir ROS sozinho ou combinado com o complexo II através de um processo conhecido como transporte reverso de elétrons (Zmijewski, *et al.*, 2005). O complexo III também pode produzir superóxido (Boveris & Chance, 1973; Turrens, 1997).

Além de ser uma geradora de ROS, a mitocôndria ao compartimentalizar a transferência de elétrons dos equivalentes redutores gerados pelo metabolismo intermediário na forma de NADH, age como verdadeiro “dreno” de elétrons na célula em condições normais aeróbicas. A resultante da atividade mitocondrial tem assim um efeito protetor antioxidante para outras estruturas extramitocondriais. Alguns estudos mostram que independente da Mn-SOD, a própria respiração mitocondrial pode consumir o superóxido gerado em sítios extramitocondriais (Guidot et al, 1995).

Cerca de 30% das enzimas envolvidas na cadeia transportadora de elétrons são sintetizadas pelo DNA genômico mitocondrial. Mutações ou lesões nesse DNA podem induzir a geração de ROS na mitocôndria (Chang, *et al.*, 2004).

1.3 Isomerase de dissulfetos proteicos (PDI) e NADPH oxidase

O mecanismo que governa a regulação da produção de ROS através da Nox é incerto. Recentemente, foi mostrado que a Nox vascular é fortemente regulada por reagentes específicos de grupos tiol via mecanismos não diretamente relacionados ao estado redox da glutatona intracelular (Janiszewski, *et al.*, 2000). Assim, estudos do nosso grupo avaliaram a hipótese que tiol oxidoreduases estão envolvidas na modulação da atividade da NAD(P)H oxidase.

A PDI é uma proteína da super família da tioredoxina, com multi-domínios, abundante na célula, múltiplas funções, comportamento redox versátil e conhecida interação com outras proteínas. A PDI é localizada principalmente no lumen do retículo endoplasmático (RE) onde é assiste o enovelamento redox das proteínas, via reações tiol dissulfeto como oxidação, redução e isomerização. Essa proteína é composta por dois domínios catalíticos tioredoxina, *a* e *a'*, que são separados por dois domínios não catalíticos, *b* e *b'* e por um domínio C-terminal ligado a uma sequência KDEL, que é um tetrapeptídeo (Lys-Asp-Glu-Leu) presente em células de mamíferos e que sinaliza retenção ou recuperação da proteína no RE. O domínio *a* é composto pelo motivo redox-ativo WCGHCK. Já o domínio *b* confere à PDI, conformação estrutural que facilita a apresentação da sequência redox-ativa. Em particular, a PDI é um eficiente catalizador de reações de trans-nitrosação mediando a internalização do óxido nítrico por S-nitrosotiois extracelulares (Ellgaard, *et al.*, 2005; Janiszewski, *et al.*, 2005).

Janiszewski e colaboradores (2005) mostraram uma associação física e funcional entre a PDI e a NADPH oxidase, em células musculares lisas. Nesse estudo um oligodeoxinucleotídeo antisenso contra PDI promovendo redução de sua atividade, acarretou substancial redução da atividade da NAD(P)H oxidase. Além disso, a ativação da oxidase com o seu agonista clássico AII induziu ca. 5-6 vezes aumento da atividade da PDI na fração particulada de homogenatos celulares. Assim, tem-se elementos para propor que a PDI seja uma nova proteína reguladora da NAD(P)H oxidase vascular. Por outro lado, a própria atividade da oxidase leva a uma ativação da PDI, caracterizando uma interação estreita entre essas moléculas.

1.4 Estresse do retículo endoplasmático (“reação a proteínas desenoveladas”)

O enovelamento correto de proteínas assistido por chaperonas, é uma das principais funções do RE. Um caso paradigmático de alteração da função do RE é uma resposta coordenada celular conhecida como “reação a proteínas desenoveladas” (UPR, do inglês - *unfolded protein reaction*), que é um dos principais componentes do estresse do retículo endoplasmático (RE) (Frand, *et al.*, 2000). Esta resposta evolutivamente conservada ocorre como reação a um acúmulo de proteínas incorreta ou incompletamente enoveladas no retículo, decorrente de qualquer alteração da função secretora. As alterações celulares desta resposta envolvem elementos de sinalização transmembrana do retículo para o núcleo e citoplasma, dirigidos virtualmente contra todos os passos do processo secretor (para revisão ver, Patil & Walter, 2001; Hampton, 2000).

O componente funcional principal caracterizado da UPR consiste na atenuação significativa da transcrição de certas proteínas (ex: ciclina D1) com o fim de reduzir a carga sintetizada de proteínas e suspender a divisão celular. Esta inibição da síntese proteica é promovida pela fosforilação do *Fator Iniciador da Tradução eucariótico* (eIF2 α).

A UPR ocorre no contexto do estresse do RE, que se caracteriza por:

- 1) Super-regulação de genes para chaperonas (p.ex., Bip/GRP78, GRP94, PDI, etc).
- 2) Secreção de proteínas do retículo endoplasmático (ex: PDI, através de uma via dependente de [Ca²⁺]).
- 3) Apoptose, mediada por vias que incluem o envolvimento de:
 - a) fator de transcrição CHOP/GADD153 (cuja função parece estar ligada à checagem do DNA traduzido por via distinta do p53 (Oyadomari, *et al.*, 2001; Ghribi, *et al.*, 2001; Igase, *et al.*, 2001).
 - b) caspase 12, uma caspase associada ao retículo endoplasmático recentemente caracterizada como uma nova via efetora de apoptose (Nakagawa, *et al.*, 2000; Yoneda, *et al.*, 2001; Oubrahim, *et al.*, 2002; Rao, *et al.*, 2002).

A sinalização da UPR depende de um mecanismo sensor, constituído por quinases transmembrana do retículo (Ex: Ire1 α , Ire 1 β , PERK), e de mecanismos

efetores que envolvem fatores de transcrição solúveis citoplasmáticos e nucleares, em particular alguns membros da família ATF/CREB de proteínas “leucine-zipper” (Patil & Walter, 2001). A superexpressão de CHOP/GADD153 sensibiliza células ao estresse do retículo endoplasmático via redução da proteína antiapoptótica *bcl-2*; esta redução leva a depleção de glutatona e aumento da produção de ROS (McCullough, *et al.*, 2001).

Dois fatores são essenciais para a função chaperona do retículo. O primeiro é a manutenção de um ambiente oxidativo intra-reticular, o qual depende dos níveis de GSH/GSSG e da atividade de tiol oxidoredutases, p.ex., PDI. Em segundo lugar, a manutenção de altas concentrações de cálcio intra-reticular é essencial a todas as etapas do processo secretor (Oyadomari, *et al.*, 2001). Deve-se considerar que a homeostase do cálcio no retículo depende primariamente de Ca-ATPases que mantêm a captação de cálcio a partir do citosol, de proteínas ligantes de cálcio no lúmen do retículo, cujo exemplo mais relevante é a calreticulina, e de canais para a liberação de cálcio, cujos tipos principais são o canal sensível a IP3 e o receptor de rianodina. Desta forma, não é surpreendente que os principais estímulos que induzem estresse do retículo endoplasmático consistam em substâncias fortemente redutoras ou que alterem os níveis de cálcio. Tais compostos são utilizados como ferramentas experimentais indutoras de estresse do RE (p.ex., v. Zhang, *et al.*, 2001). Alguns exemplos incluem:

- a) Ditioneitol (DTT) – agente redutor.
- b) Tapsigargina, ácido ciclopiazônico, tert-butil hidroquinona – são inibidores da Ca^{2+} -ATPase que depletam o cálcio intrareticular.
- c) Tunicamicina, um antibiótico que inibe a glicosilação de proteínas e sua exportação do retículo.

Vários estudos têm-se concentrado recentemente no entendimento das possíveis conseqüências fisiológicas celulares do estresse do retículo endoplasmático. Tem sido proposto que este mecanismo pode ser responsável pela indução de apoptose em algumas circunstâncias. Em especial, foi proposto que a apoptose induzida pelo óxido nítrico (NO) em células beta pancreáticas ocorra através desta via, em oposição à via habitualmente proposta, que é a indução de p53 (Oyadomari, *et al.*, 2001). É possível que células secretoras sejam

particularmente sensíveis à apoptose induzida pelo \bullet NO através da via da UPR. No caso da lesão vascular, deve-se considerar que células musculares lisas neointimais não diferenciadas apresentam intensa secreção de proteínas da matriz extracelular e portanto, na presença de NO ou espécies relacionadas, poderiam ser induzidas à apoptose pela via da UPR.

Estudos do nosso laboratório (Santos, *et al.*, 2005-06) têm sugerido por diversos experimentos que a interação entre a PDI e a NADPH oxidase é uma via de convergência entre esse estresse do RE e estresse oxidativo. Estes estudos mostraram ainda que a camada neointimal é um tecido sob estresse do retículo endoplasmático e que a apoptose associada ao remodelamento vascular envolve uma via relacionada ao estresse do retículo endoplasmático, p.ex., caspase 12. Os resultados parciais indicam que a imuno-reatividade da PDI sofre importantes alterações na neointima do vaso lesado, com mudança da intensidade do sinal, bem como do padrão de marcação, citoplasmático difuso na porção intacta do vaso e perinuclear/membrana plasmática na neointima.

Entretanto os mecanismos fisiopatológicos de estresse oxidativo nas células neointimais permanece ainda incompletamente elucidados. Em particular, as possíveis vias mediadoras da convergência entre os diferentes tipos de estresse nestas células não foram ainda estudados. Em parte, a falta de uma elucidação melhor da biologia da célula neointimal decorre da dificuldade e da inadequação de modelos de isolamento e crescimento destas células em cultura.

1.5 Hipótese e justificativa

O objetivo amplo desse estudo é o entendimento de mecanismos do desequilíbrio redox em células neointimais. Neste sentido, são possíveis dois cenários distintos. Primeiro, o estresse oxidativo poderia resultar de uma exposição local *in vivo* a mediadores inflamatórios, como citocinas, fatores de crescimento ou indutores locais de diferenciação, todos estes no contexto de um ciclo de lesão/reparação que caracteriza a resposta à lesão vascular. Este cenário seria essencialmente reversível uma vez que a célula é retirada do local afetado pela lesão. Segundo, o estresse oxidativo da neointima poderia resultar de adaptações

irreversíveis a um diferente histórico de desenvolvimento ou estresse celular. Estas adaptações são típicas, por exemplo, de células tumorais e talvez de células submetidas a estresse mecânico continuado (Valko, *et al.*, 2006). Este último cenário poderia ser mais relevante no caso de uma lesão arterial profunda como a que ocorre após angioplastia, considerando a maior população e complexidade das adaptações celulares. É conhecido que pelo menos as células neointimais oriundas de lesões mais superficiais arteriais sustentam em cultura, por várias passagens, várias características fenotípicas distintas das células musculares lisas da camada média. Para investigar se o estresse oxidativo pode fazer parte deste fenótipo neointimal em células oriundas de lesões profundas da parede arterial, nós desenvolvemos procedimentos para manter células neointimais em cultura por várias passagens e analisamos índices de estresse oxidativo, produção de espécies reativas de oxigênio, estresse do retículo endoplasmático e viabilidade celular em resposta a estressores celulares.

Objetivos

2. OBJETIVOS

O objetivo geral da presente investigação é esclarecer a ocorrência e possíveis mecanismos de estresse oxidativo em células neointimais e a interação entre tais mecanismos e estresse do retículo endoplasmático.

Os **objetivos específicos** deste projeto são:

- (i) Desenvolver um modelo de cultura de células neointimais de artéria ilíaca de coelho obtidas após lesão por cateter-balão.
- (ii) Avaliar em tais células índices do estado redox e potenciais fontes enzimáticas de ERO, com ênfase no complexo NAD(P)H oxidase.
- (iii) Avaliar marcadores de estresse do retículo endoplasmático e sua correlação com os índices do estado redox.
- (iv) Estudar o efeito de fatores de crescimento, estressores do RE e particularmente da administração exógena de NO no estado redox e na viabilidade de células neointimais.

Material
e
Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Reagentes

A água utilizada em todos os experimentos foi tratada com o sistema “Nanopure” da Barnstead e eventualmente com Chelex-100. O DETA-NONOato (NOC-18), o coquetel de inibidores de protease (aprotinina, leupeptina e fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF), a NADPH, o fosfato de sódio utilizados foram adquiridos da Calbiochem/Merck (Darmstadt, Germany); o Dihidoretídio (DHE), a lucigenina e o kit de viabilidade celular - Vybrant® MTT Cell Proliferation assay Kit (V-1254), da Molecular Probes Inc. (Eugene, OR, USA); a colagenase I, a colagenase IV e a elastase, da Worthington-Biochemical Corporation (Lakewood, NJ, USA), os demais reagentes utilizados nos experimentos foram adquiridos da Sigma Chemical (St Louis, MO, USA), e foram diluídos e estocados conforme as instruções do fabricante.

Os meios de cultura: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Minimum Essential Medium (MEM), o soro fetal bovino (FBS), a solução de penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) e a tripsina foram obtidos da Gibco BRL-Life Technologies Grand Island, NY, USA).

Os anticorpos foram mantidos de acordo com as instruções dos fabricantes e diluídos para uso, quando não especificado, de acordo com as sugestões dos fabricantes. O anticorpo primário monoclonal anti-alfa-actina (IgG de camundongo, clone 1A4) foi adquirido da Alexis Biochemicals, São Diego, USA. O anticorpo secundário anti-IgG conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) foi adquirido da Calbiochem Corporation, San Diego, USA. O anticorpo primário monoclonal anti-KDEL (IgG de camundongo, clone 10C3) e o anticorpo primário monoclonal anti-PDI (IgG de camundongo, clone 1D3) foram adquiridos da Stressgen, Victoria, Canada.

O anticorpo anti-calreticulina (IgG de galinha, imunizadas com peptídeos correspondentes ao resíduo de aminoácidos 399-414) foi adquirido da Affinity BioReagents, USA. O anticorpo monoclonal anti-caspase 12 desenvolvido em rato, foi gentilmente fornecido pela Profa. Junying Yuan, da U. de Harvard, EUA, e utilizado na diluição inicial 1:50. O anticorpo anti-fosfo-elf-2 α (IgG de coelho, reconhece p-elf-2 α , fosforilada na Serina 51) foi adquirido da Upstate, Lake Placid, NY, USA. O anticorpo primário monoclonal anti- β -actina (IgG de camundongo, clone AC-15) utilizado foi da Sigma, Saint Louis, Missouri, USA. O anticorpo secundário anti-IgG conjugado com peroxidase foi da Amersham Pharmacia Biotech, USA.

3.2 Angioplastia em artéria ilíaca de coelho

O modelo do estudo foi o de lesão arterial por angioplastia em artéria ilíaca de coelhos (Janiszewski et al., 1998; Laurindo, et al., 2002). Foram utilizados coelhos machos albinos da raça New Zealand pesando entre 2,5 a 3,5 Kg, comprados de criadores independentes e mantidos no biotério do Serviço de Fisiologia Aplicada do Instituto do Coração da FMUSP, sob ciclos claro/escuro de 12h em temperatura controlada em 25°C com água e dieta comercial para cunicultura ad libitum.

Os coelhos foram submetidos à sedação intramuscular (cloridrato de S(+)-ketamina 35-50 mg/kg e 3,5 mg/kg de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina) para realização dos preparativos para o procedimento. Posteriormente os coelhos foram anestesiados com pentobarbital sódico, 25 mg/Kg via intravenosa (i.v.) e colocados em decúbito dorsal. Foi injetada i.v. uma dose de gentamicina e posteriormente a artéria ilíaca direita foi isolada e exposta 4-5 cm distalmente ao ligamento inguinal. Foi administrada heparina não fracionada como único bolus i.v. 250 UI/Kg, 10 minutos antes da introdução de um catéter-balão para angioplastia coronária.

As dimensões do balão foram 20,0 mm de comprimento e 3,0 mm de diâmetro, quando insuflado. Em alguns casos coelhos no limite inferior do peso e artérias finas, <2 mm de diâmetro externo, o diâmetro do foi 25 mm. O catéter foi introduzido retrogradamente por 8,0-9,0 cm até a origem da artéria ilíaca direita. A lesão arterial foi provocada pela insuflação do balão (com séries de três insuflações de 8,0 atmosferas durante 30 segundos, com 15 segundos de intervalo entre cada

insuflação); após cada série de insuflações, o balão foi posicionado 20 mm distalmente ao local da série anterior e todo o procedimento repetido até completar um total de três séries de insuflações. Após a lesão, a artéria ilíaca direita foi ligada. Após receberem penicilina-benzatina e gentamicina intramuscular, os coelhos retornavam ao biotério para um período de sobrevivência de 14 dias. Após esse período, os coelhos foram sacrificados com excesso de pentobarbital e a artéria ilíaca direita lesada foi retirada imediatamente.

Como controles negativos foram utilizadas artérias ilíacas retiradas de coelhos não submetidos previamente a qualquer lesão. Este protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética e Científica da Instituição (Protocolo SDC nº 2333/03/127 da sessão 439/03/18 de 06/11/2003).

3.3 Análise Morfológica

Para a análise morfológica das artérias ilíacas, lesada e normal, foram utilizados segmentos das mesmas artérias utilizadas para a cultura, com o objetivo de avaliar a lesão provocada, e a possível precisão da dissecação das artérias lesadas pós-digestão enzimática. Por essa razão, a coleta das artérias seguiu os mesmos procedimentos utilizados para a realização da cultura, de onde foram retirados segmentos de 0,5 cm que foram fixados por imersão em formalina 4% em tampão fosfato, pH 7,4.

Os segmentos foram embebidos em parafina e corados pelos métodos de coloração: (i) hematoxilina e eosina que destaca os núcleos celulares; (ii) Verhoeff-van-Gieson que evidencia as fibras elásticas, e (iii) Masson que cora em azul o colágeno; e posteriormente analisadas em microscópio comum.

3.4 Cultura e isolamento de células

No presente trabalho, foram estudados 3 tipos celulares em cultura:

- a) *células neointimais de artéria ilíaca de coelho 14 dias após angioplastia (NeoC);*

- b) *células da camada média de artéria ilíaca de coelho 14 dias após angioplastia (IVSMC);*
- c) *células da camada média de artérias intactas (NVSMC).*

3.4.1 Estabelecimento do método para cultura de células neointimais (NeoC)

Este método foi desenvolvido como parte do presente trabalho. O protocolo de cultura de células neointimais para o modelo de coelho foi adaptado a partir de procedimentos estabelecidos com sucesso pela “Cell Culture Core Facility” da Universidade de Iowa/US para cultura de neointima da aorta de camundongo. Estes procedimentos foram gentilmente cedidos pelo Prof. Francis Miller, Jr. O protocolo consistia de cultura de células extraídas de artérias aortas com lesões ateroscleróticas cultivadas com DMEM com alta concentração de glicose, sem piruvato, complementado com penicilina, estreptomicina, MEM (Solução de aminoácidos não essenciais) e SFB 10% (v/v).

Os fragmentos da neointima foram colocados em meio de cultura regular e submetidos à digestão por colagenase I a 37° por 20 minutos, seguido de lavagem com PBS. A seguir, os fragmentos foram cortados em pedaços pequenos com o bisturi e submetidos à nova digestão enzimática com colagenase IV (380 U/mL) e elastase (0.9 mg/mL) a 37° por 50 minutos, respeitando-se o tempo limite de incubação de 1 hora. As células foram, então separadas por centrifugação em meio de cultura e colocadas em placa com gelatina a 0,1%, com semeaduras secundárias a cada 7 dias.

Este protocolo inicial sofreu modificações para se adequar ao modelo de lesão utilizado no presente estudo. O protocolo final será descrito no item resultados.

3.4.2 Cultura de células da camada média de artérias após lesão por angioplastia (IVSMC)

As IVSMC foram obtidas conforme protocolo para obtenção de células neointimais, sendo utilizados aqui os fragmentos remanescentes da separação da neointima. O protocolo completo está descrito no item resultados.

3.4.3 Cultura primária de células musculares lisas de artérias intactas (NVSMC)

As artérias ilíacas, direita e esquerda, de coelhos intactos foram dissecadas e a fração visível da camada adventícia retirada. As artérias foram fragmentadas em segmentos de aproximadamente 0,5 cm, e então seccionadas no sentido longitudinal. A camada endotelial foi retirada com o auxílio de um bisturi e os fragmentos submetidos a digestão enzimática com solução contendo: colagenase IV (1 mg/mL), elastase (0,125 mg/mL) e inibidor de tripsina (0,375 mg/mL) diluída em DMEM (contendo penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 µg/mL) a 37° C por 4 horas. A seguir, os fragmentos foram lavados com PBS (contendo penicilina e estreptomicina) e colocados em placa com DMEM, complementado com penicilina, estreptomicina e FBS 10 % (v/v). Os fragmentos de tecido que foram semeados, foram retirados da placa após 4 dias. O meio de cultura a partir daí foi trocado a cada dois ou três dias. As NVSMC foram mantidas com esse meio de cultura em estufa 37° C com 5 % CO₂, com semeaduras secundárias a cada 7 dias. As células foram utilizadas entre a 4^a e a 6^a passagem. A partir da 4^a passagem as células foram divididas em dois grupos, sendo um grupo mantido com meio descrito acima, e o outro mantido com DMEM, complementado com penicilina, estreptomicina e FBS 20 % (v/v).

3.5 Imunofluorescência em microscópio comum

Os diferentes tipos celulares foram fixados com paraformaldeído 4% overnight a 4° C, posteriormente foram lavadas com PBS (três vezes por 10 minutos) e bloqueadas por 40 minutos, a temperatura ambiente com PBS contendo BSA 3 % e saponina 0,1 %. As lamínulas foram incubadas com o anticorpo monoclonal anti-alfa-actina por 1 hora à temperatura ambiente, lavadas com PBS contendo BSA 1 % e saponina 0,1 %, solução esta utilizada em todas as lavagens posteriores (três vezes

de 10 minutos) e reveladas com anti-IgG de camundongo conjugado com FITC por 50 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Após nova lavagem (três vezes de 10 minutos), a amostra foi marcada com DAPI por 20 minutos e posteriormente nova lavagem (três vezes de 10 minutos). As lâminas foram montadas e examinadas em um microscópio Zeiss Axiovert 200 acoplado a um sistema de fluorescência EBQ 100.

3.6 Caracterização da origem neointimal das células cultivadas

Para a caracterização da origem neointimal das células cultivadas houve a necessidade do uso de vários marcadores simultaneamente, uma vez que não existe uma proteína que caracterize estas células de forma não ambígua. Assim, a partir de dados da literatura, foi construído um painel de marcadores celulares e desenhados *primers* para avaliação dos mesmos por RT-PCR (Tabela 1).

Antes de realizar qualquer procedimento, todo o material foi tratado com solução de DEPC para excluir qualquer vestígio de RNA contaminante presente no material.

As artérias foram extraídas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, pulverizadas com pulverizador de tecido e posteriormente transferidas para um tubo livre de RNase. Os diversos tipos celulares estudados foram semeados em placas de cultura até atingirem uma confluência de 80 a 90 %. As placas foram então lavadas três vezes com PBS gelado e o RNA foi extraído com fenol e clorofórmio.

As amostras foram incubadas e homogeneizadas por 5 minutos a temperatura ambiente com 1 mL de Trizol® (para completa dissociação dos complexos de nucleoproteínas). Foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio para cada mL de Trizol. Os tubos foram vortexados por 15 segundos, incubados por 2 a 3 minutos a temperatura ambiente e centrifugados por 12.000 g por 15 minutos, entre 2 e 8° C. A fase aquosa, que é a fração que contém o RNA (a fase orgânica contém o DNA e proteína), foi transferida para um eppendorf. O RNA foi precipitado com 1 mL de álcool isopropílico para cada mL de Trizol®, incubado à temperatura ambiente por

mais 10 minutos e posteriormente centrifugado a 12.000 g por 10 minutos de 2 a 8° C. O sobrenadante foi removido por inversão.

Tabela 1 – Lista dos primers para investigação de marcadores de células neointimais, com sua respectiva seqüência de nucleotídeos, tamanho do produto gerado, número de ciclos utilizados e temperatura de anelamento. Em todos os casos, a seqüência de DNA utilizada como base foi a descrita para coelho.

PROTEÍNA	SEQUÊNCIA DOS PRIMERS	TAMANHO DO PRODUTO	NÚMERO DE CICLOS	TEMPERATURA DE ANELAMENTO
GAPDH ^a	TCACCATCTTCCAGGAGCG A CACAATGCCGAAGTGGTCTG T	293 pb	30	57° C
OSTEOPON -TINA ^b	CTCCCGGTTAAACACGCTG ATTC AGGATACTGGGCATTAGAG ACG	498 pb	35	63° C
SM – MHCemb ^c	CCAATTAGCTTCTCTTCCAG C CGGCGGAGTTCCTCTGTGT	214 pb	35	56° C
α 2 COLAGENO ^d	GACACAAGGGAGAACGTG GT GTGTCCCTTTATGCCAGGA A	298 pb	35	56° C
SM 22 ALFA ^e	AGTTCCTGAAGGCAGCTGA G CGGTAGTGCCCATCATTCT T	151 pb	35	56° C
RUNX 2 ^f	TCTGGCCTTCCA CTCTCAGT GACTGGCGGGGTGTAAGTA A	161 pb	30	57° C
BTEB 2 ^g	CCCTTGACATACACAATG C TTGGATGTTTTGCGAATTGA	220 pb	35	52° C

Números de classificação do Genbank: ^a L23961, ^b D16544; ^c D10280, ^d D49399, ^e AY336996, ^f AY598934, ^g AF131882. **Abreviatura:** GAPDH – gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase; SM-MHCemb – miosina de cadeia pesada isoforma de musculares lisas embrionárias; SM 22 α - um marcador de célula muscular lisa diferenciada; RUNX 2 – (ou OSF2 ou CBFA 1) um fator de transcrição requerido para diferenciação de osteoblastos e síntese óssea; BTEB 2 – elemento de transcrição básico ligado a proteína 2.

Ao pellet foi então adicionado 1 mL de etanol 75 % para cada mL de Trizol®. O conjunto foi então centrifugado a 7.500 g por 5 minutos de 2 a 8° C. O sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspensionado com água estéril.

A integridade da amostra foi então testada através de uma corrida de eletroforese em gel de agarose 0,8 %, sendo visualizado em um transluminador (Eagle Eyell da Alpha Innotech) em presença de brometo de etídio. A concentração de RNA total foi determinada por espectrofotometria UV. Todas as preparações de RNA tinham razão OD₂₆₀/OD₂₈₀ de 1,6 a 1,8. O RNA total (2 µg) de cada uma das amostras foi convertido em fita simples de cDNA usando Superscript II com oligo (deoxitimidina) primer (500 µg/mL). A amplificação dos cDNAs codificadores dos marcadores específicos foi feita por primers específicos descritos na tabela II.

A gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi usada para semiquantificação dos RT-PCR. A reação de PCR foi realizada em um volume final de 25 µL contendo 1/10 reação RT, 3 U de DNA Taq polimerase, tampão de PCR, 1,50 mM MgCl₂, 0,4 mM dNTP e 20 pM de cada primer. As condições para cada reação de PCR estão descritas na tabela II, as reações foram feitas em um termociclador (PTC-200 MJ REsearch). O produto da PCR foi separado por eletroforese em um gel de agarose de 2 % e visualizado por um transluminador em presença de brometo de etídio.

3.7 Análise da expressão das proteínas marcadoras do estresse do retículo por Western Blot

Foram utilizadas amostras de cultura de NVSMC, IVSMC e NeoC ou homogenato das artérias ilíacas de coelhos, tanto intactas como lesadas; as amostras foram lisadas com tampão de lise (20mM Hepes; 150mM NaCl; 10% glicerol; 1% Triton; 1mM EGTA e 1,5mM MgCl₂) contendo inibidores de protease (1 µg/mL de aprotinina; 1 µg/mL de leupeptina e 1 mmol/L de PMSF). A concentração das proteínas totais foi determinada pelo método de Bradford. As amostras (30 µg de proteína por canaleta) foram diluídas em tampão de amostra contendo azul de bromofenol 0,02 %, mercaptoetanol 10 mM e dodecil sulfato de sódio (SDS) 10 %. Essas amostras foram aquecidas por 5 minutos a 100° C para desnaturação das

proteínas e quebra de pontes dissulfeto. As amostras foram aplicadas em gel de eletroforese de poliacrilamida com SDS 12% em condições redutoras e submetidas à corrente elétrica contínua de 50 mA por 80 minutos para separação eletroforética das proteínas. Foi também aplicado ao gel um padrão de pesos moleculares conhecidos (Kaleidoscope®. Bio-Rad, USA). Após a separação realizou-se a transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose, através de um sistema semi-seco (Semiphor, Hoefer-Pharmacia, Suécia) com corrente elétrica contínua de 0,8 mA/cm² por 60 minutos.

A membrana de nitrocelulose foi então corada com solução de Ponceau para visualização da correta transferência de proteínas das amostras e do padrão de pesos moleculares. Após lavagem em tampão tris salina (TBS) 0,1% de Tween 20, foi realizado o bloqueio dos sítios inespecíficos com 5% de leite em TBS-T 0,1 % pH 7,6 por 2 horas em temperatura ambiente, com o objetivo de minimizar a ligação inespecífica dos anticorpos. As membranas foram incubadas com os anticorpos primários apropriados diluídos em TBS-T 0,1% com 0,1% de leite desnatado e incubados overnight a 4° C sob agitação. Após lavagem com TBS-T 0,1 % (três vezes de 5 minutos), foi realizada a incubação com o respectivo anticorpo secundário conjugado com peroxidase por 1 hora a temperatura ambiente. Após novas lavagens, foi procedida à revelação da membrana por método quimiluminescente (peroxidase - H₂O₂ – luminol), utilizando kit ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Grã-Bretonha). Após 2 minutos de reação, a membrana foi exposta a filme radiográfico por períodos de tempo variados e revelada em equipamento automatizado.

3.8 Análise de GSH intracelular por HPLC

3.8.1 Obtenção das amostras

As NVSMC, IVSMC e NeoC foram mantidas em estufa de 5% CO₂ por diferentes tempos de incubação e posteriormente lisadas por congelamento-descongelamento e sonicadas (3 vezes de 10 segundos cada), e posteriormente centrifugadas a 12.000 RPM por 10 minutos. Foi retirada uma alíquota para dosar

proteína total da amostra a fim de ajustar os resultados de GSH/GSSG pela quantidade de proteínas.

As amostras foram separadas em dois tubos com igual volume (50 μ L) em um dos tubos foi adicionado 10 μ L PBS/EDTA 0,1 μ M; no outro tubo acrescentou-se a 10 μ L de uma solução redutora contendo glutathiona redutase (0,6 U/mL) e NADPH (0,2 mg/mL). Ambos os tubos foram deixados à temperatura ambiente por uma hora. As amostras foram então desproteinizadas pela adição de igual volume de 10% de ácido tricloroacético (TCA) e centrifugadas a 10.000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi congelado a -80°C por no máximo uma semana. As amostras foram analisadas por sistema HPLC com detecção eletroquímica.

3.8.2 Análise por HPLC

A análise de GSH nos lisados dos diferentes tipos celulares foi realizada em um sistema de HPLC da Waters Corp. Milford, MA (constituído por 2 bombas 515, acopladas ao detector eletroquímico 247 e equipado com eletrodo de Ag/AgCl). As amostras foram submetidas à separação cromatográfica usando uma coluna X-Terra (4,5 x 250 mm; 5 μ m). Como fase móvel foi utilizada solução de 100 mM KH_2PO_4 (pH 2,5), 200 mg/l heptanossulfonato de sódio, 5 mg/l EDTA em 1% metanol (v/v), em fluxo de 0,7 ml/min. A eluição do GSH foi monitorada com detecção eletroquímica (potencial de oxidação GSH, 600 mV) (Hiraku, *et al.*, 2002). O composto foi identificado e quantificado pela comparação de seu tempo de retenção com padrão autêntico submetido às mesmas condições cromatográficas.

3.9 Análise da atividade da NADPH oxidase

3.9.1 Obtenção da fração particulada de membrana

Todo o procedimento foi realizado sobre gelo ou com soluções resfriadas a 4°C . Utilizamos células ainda aderentes aos frascos de cultura em torno de 90% de confluência, que foram lavadas duas vezes com tampão fosfato (50 mM PBS com 10 μ M EDTA), pH 7,4 e então raspadas das placas para tubos de centrifugação contendo tampão 50 mM Tris, pH 7,4 com 1 mM PMSF, 2 μ M pepstatina A e 2 μ M

leupeptina, sonicadas (3 vezes por 10 segundos com 4W). O material foi centrifugado a 200 g por 5 minutos para remoção de células intactas e grandes aglomerados. Uma segunda centrifugação do material sobrenadante a 18.000 g por 15 minutos permitiu a precipitação de núcleos celulares, mitocôndrias e grandes organelas. Por fim, o sobrenadante da centrifugação anterior foi submetido a uma última centrifugação a 100.000 g por 60 minutos. O material precipitado desse último procedimento contendo principalmente microssomas e vesículas de membrana plasmática foi ressuspendido em 50µl de tampão 50 mM Tris contendo inibidores de protease, e congelados a -80°C até a análise (Laurindo, *et al.*, 2002). A concentração de proteína nas soluções foi medida pelo método de Bradford.

3.9.2 Quimiluminescência mediada por lucigenina

A quimiluminescência amplificada por lucigenina foi analisada nas frações particuladas dos diversos tipos celulares estudados. Resumidamente, 20 µl de fração de membrana (ca. 20µg proteína) foram adicionados em 1 mL de solução de PBS/10 µM EDTA e então 5 µM de lucigenina a 37°C. Após termostatização e contagem basal, adicionou-se ao tubo de cintilação 300 µM de NADPH e as contagens de luminescência foram registradas continuamente por 10 min. Em um luminômetro Berthold 9505 (EG& Instruments GmbH, Munique, Alemanha). Os sinais da linha de base foram subtraídos daqueles obtidos após a adição de NADPH e os resultados normalizados pela quantidade de proteína e descritos como cpm/mg/min.

3.10 Curvas de viabilidade celular

Para investigar a sensibilidade dos diferentes tipos celulares a condições de estresse, células foram incubadas nas condições acima descritas com diversos estímulos em concentrações e tempos especificados. Os estímulos utilizados foram: *i*) privação de soro, avaliada por 1, 3 e 6 horas; *ii*) tunicamicina 2 e 5 µg/mL, incubada por 4, 12 e 18 horas; *iii*) peróxido de hidrogênio 10, 50 e 300 µM, incubado por 1, 3 e 6 horas; *iv*) doador de NO, NOC-18, 0,5, 0,75 e 1,0 mM por 18 e 24 horas. Em todos os estímulos, as células foram avaliadas tanto pelo método de

incorporação de Trypan blue, como pelo método espectrofotométrico do MTT e comparadas com o controle, sem estímulo.

3.10.1 Incorporação de Trypan Blue

O método de viabilidade celular por incorporação de Trypan blue é um método de exclusão por incorporação do corante. O método consiste na não incorporação do corante por células vivas, ligando-se este apenas aos fragmentos de células mortas (Freshney, 1994). Células foram semeadas ca $1,4 \times 10^5$ células por poço, em placa de 24 poços e mantidas em cultura por 24 horas. Após esse período, o meio foi trocado e incubado com o respectivo estímulo. Após cada tempo de incubação, o meio foi lavado com PBS para retirada das células em suspensão. A seguir foi adicionado à placa solução de Trypan blue (1:3) diluído em PBS, durante 1 minuto, sendo a solução posteriormente retirada. Foram contadas 100 células aleatoriamente de três campos distintos na placa e o resultado expresso como média de células viáveis dessas três contagens.

3.10.2 Ensaio de viabilidade por redução de MTT

O ensaio de viabilidade celular por MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 dipheniltetrazolium bromide) consiste na conversão de um composto solúvel em água, o MTT, em um composto insolúvel colorido, o formazan por células viáveis. Est conversão é indicativa de integridade mitocondrial e, por inferência, da integridade celular (Rossa, et al., 2003; Mosmann, 1983). O protocolo utilizado foi o protocolo rápido descrito pelo fabricante do kit - Vybrant® MTT Cell Proliferation Assay Kit (V13154). Foram semeadas ca $1,4 \times 10^5$ células em placa de 24 poços mantidas em cultura por 24 horas. Após esse período, o meio foi trocado e incubado com o respectivo estímulo. Após cada tempo de incubação, o meio foi trocado. Foi então adicionada uma solução de 5 mg/mL de MTT, com concentração final de 0,45 mg/mL, e as placas foram incubadas a 37° C por 2 horas para conversão do MTT. Após esse período, o produto de cor púrpura formado (formazan) foi solubilizado com dimetilsulfóxido (DMSO) por 10 minutos a 37° C. A seguir, as amostras foram lidas em espectrofotômetro de placa, SPECTRA MAX 340® (Molecular Devices), a 540 nm. Os resultados foram analisados em relação ao controle, sem tratamento.

3.11 Avaliação da produção de ROS em extrato total de células.

3.11.1 Extrato de células para análise por HPLC

Os diferentes tipos celulares estudados foram semeados em placa de 6 poços, na ausência e presença dos estímulos: All (100 nM, 6 horas), Tunicamicina (5 µg/mL, 4 horas) e NOC-18 (0,75 mM, 18 horas) em condições idênticas. Após, as placas foram lavadas duas vezes com PBS/DTPA 0,1 mM.

A partir desse ponto todo o procedimento foi realizado ao abrigo de luz, o DHE (50 µM) foi adicionado por 30 minutos em PBS/DTPA 0,1 mM. As células foram então lavadas cuidadosamente por duas vezes com PBS/DTPA 0,1 mM gelado e extraídas posteriormente com acetonitrila (0,5 mL/poço, não sendo extraídas mais de duas amostras por vez), sonicadas (10 segundos, 1 ciclo a 8 W) e centrifugadas (12.000 g por 10 minutos a 4° C). O sobrenadante foi seco sob vácuo (Speed Vac®Plus SC-110 A, Thermo Savant) e o pellet mantido a -20°C no escuro até a análise. As amostras foram ressuspensas em 120 µL de PBS/DTPA 0,1mM e injetadas (100 µL) no sistema de HPLC.

Simultâneas detecções de DHE e produtos derivados de sua oxidação (2-hidroxi-etidio e o etidio) foram realizadas usando, respectivamente, a detecção por ultravioleta e fluorescência sobre condições ideais e usando DHE como um controle interno durante a extração orgânica de cada amostra. Esses produtos derivados da DHE foram expressos na razão de 2-hidroxi-etidio ou etidio gerado por DHE consumida (concentração inicial de DHE - DHE remanescente) (EOH/DHE e E/DHE). As células foram normalizadas com 80 % de confluência.

3.11.2 Condições de análise no HPLC

A separação de DHE, 2-hidroxi-etidio e etidio foi realizada por método recentemente validado em nosso laboratório (Fernandes, *et al.*, 2007) baseado nos métodos descritos previamente por Fink (2004) e Zhao (2003). O sistema HPLC (Waters) equipado com um injetor "rheodyne" e photodiode array (W2996) e detector de fluorescência (W2475). Cromatografia de separação foi carregada usando uma

coluna NovaPak C18 (3,9 x 150 mm, com partículas de 5 μm de tamanho), usando solução A (acetonitrila pura) e solução B (água/ 10% de acetonitrila/ 0,1% ácido tricloroacético) como fase móvel num fluxo de de 0,4mL min⁻¹. As corridas foram iniciadas com 0% de A, aumentando linearmente para 40% de A durante os 10 minutos iniciais, mantendo essa proporção pelos 10 minutos adicionais, mudando para 100% de a pelos 5 minutos seguintes e 0% de A pelos 10 minutos finais.

O DHE foi monitorado pela absorção de UV a 245 nm. EOH e E foram monitorados por detecção de fluorescência com excitação de 510 nm e emissão em 595nm. A quantificação foi feita por comparação entre a integral das áreas dos picos obtidas e as soluções padrões sobre condições cromatográficas idênticas.

3.12 Análise Estatística

Os resultados representam a média \pm 1 erro padrão da média (EPM). A análise estatística utilizada para comparação entre os grupos foi a análise de variância variada (ANOVA) “one-way”, seguido do pós-teste de Student-Newman-Keuls, através do programa GraphPad Prism (versão 3.01 Prism, GraphPad, USA).

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Análise morfológica das artérias ilíacas de coelho intacta e 14 dias após angioplastia

A análise histológica de artérias normais e lesadas, exemplificada à Figura 1, mostra o desenvolvimento de uma camada neoíntima não homogênea. A lâmina elástica interna, evidenciada pela coloração Verhoef-van-Gieson, define a separação da camada neoíntima da camada média. Esta lâmina é o principal alvo da digestão enzimática utilizada para possibilitar a dissecação dessas camadas. O acúmulo de matriz colagênica nas camadas neoíntima e média é evidenciado pelo Tricrômico de Masson, que cora em azul as proteoglicanas.

4.2 Desenvolvimento de método para cultura de células da neointima (NeoC).

Com os procedimentos iniciais descritos em “ Métodos” , não conseguimos reprodutivelmente obter células aderidas viáveis em cultura, necessitando então de vários ajustes realizados em diversas etapas, com respeito ao procedimento de dissecação da camada neoíntima, meio de cultura ideal, concentração de soro e matriz utilizada para cultura celular.

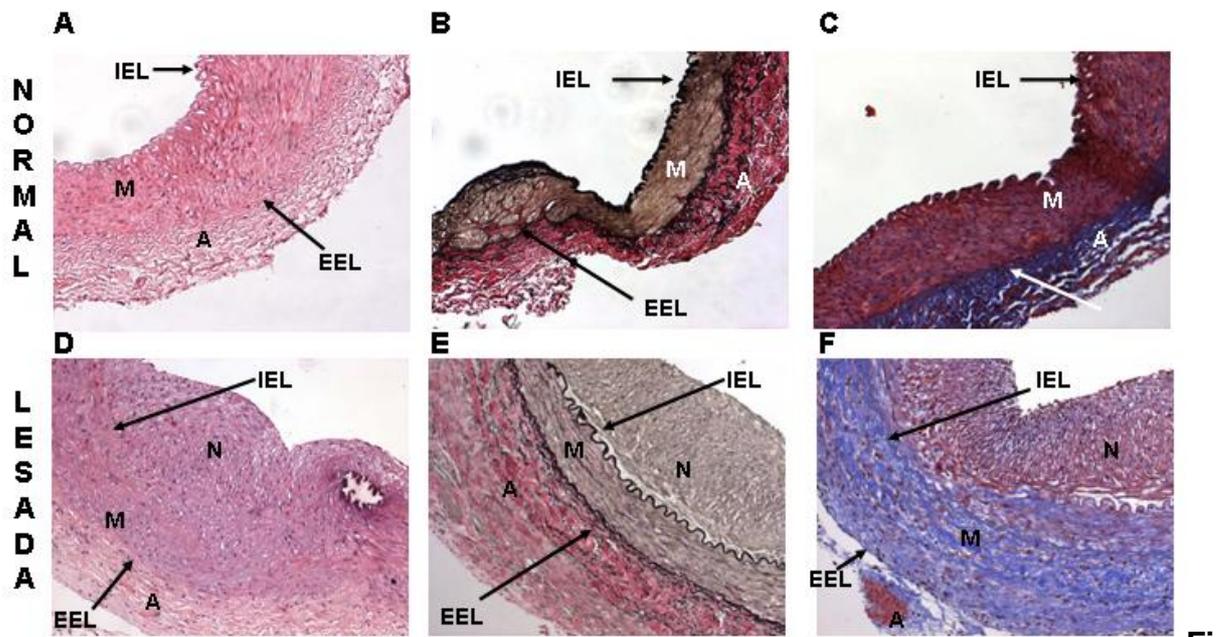


Figura 1 – Cortes histológicas das artérias: intacta (40X) e 14 dias após angioplastia (40X), corados com hematoxilina-eosina (A, D); Verhoef-van-Gieson (B,E) e Masson (C, F). **Abreviaturas:** IEL – Lâmina Elástica Interna; EEL – Lâmina Elástica Externa; M – Camada Média; A – Camada Adventícia; N – Camada Neointimal.

Para a dissecação da camada neointima, a artéria ilíaca direita lesada por balão foi retirada 14 dias após a lesão e a fração visível da camada adventícia retirada. As artérias foram seccionadas em segmentos de ~ 0,5 cm, submetidas à digestão por colagenase I (2 mg/mL) em estufa a 37°C por 20 minutos, seguida de lavagem com tampão salina fosfato (PBS). A seguir, cada fragmento sofreu microdissecção para separar a camada neointimal da camada média e em seguida ambas as camadas foram submetidas a nova digestão enzimática com solução contendo: colagenase IV (380 U/mL), elastase (0.9 mg/mL) e albumina bovina (BSA) (1 mg/mL), mantida a 37° C por 50-60 minutos. A seguir, os fragmentos de tecido juntamente com as células isoladas geradas após digestão enzimática foram lavados com PBS (contendo penicilina 100.000 U/L e estreptomicina 100 mg/L) e semeados em placa sem gelatina. As NeoC foram cultivadas utilizando o meio de cultura MEM, complementado com penicilina 100.000 U/L, estreptomicina 100 mg/L e FBS 20 % (v/v). A cultura foi mantida em estufa a 37° C com 5 % de pressão de CO₂, com semeaduras secundárias a cada 7 dias. Os fragmentos de tecido semeados juntamente com a suspensão de células foram retirados da placa após 4 dias. O

meio de cultura a partir daí foi trocado a cada 2-3 dias. As células foram utilizadas entre a 4^a e 6^a passagem para os experimentos subseqüentes.

O Quadro 5 mostra as principais diferenças entre as condições ideais, observadas por nós, para cultura dos diferentes tipos de células utilizados nesse estudo. É importante ressaltar, entretanto, que para melhor uniformização das condições de cultura e comparações entre os diferentes tipos de células, todos estes tipos celulares foram cultivados na ausência de matriz para a finalidade de executar os experimentos subseqüentes. Experimentos específicos foram também realizados variando-se o tipo de meio e a concentração de soro nas NVSMC e IVSMC, de modo a controlar possíveis influências que podem estar ligadas a essas variáveis. Em particular, vários experimentos foram realizados com concentrações de soro de 20% nas NVSMC e IVSMC, conforme indicado. Entretanto, como verificamos que as NVSMC não sustentam o crescimento em cultura com 20% de soro além da 2^a passagem ou mesmo após 48 horas na primeira passagem, estas alterações da concentração de soro foram feitas apenas durante 24 horas.

Quadro 5 – Condições ideais para o crescimento das culturas primárias dos diferentes tipos celulares.

Tipo Celular	Meio	Concentração de Soro (%)	Matriz
NVSMC	DMEM	10	Gelatina
IVSMC	DMEM	10	Gelatina
NeoC	MEM	20	Nenhuma

Abreviações: NVSMC – Células musculares lisas normais; IVSMC – Células musculares lisas de artérias lesadas; NeoC – Células neointimais; DMEM - Meio Eagle modificado por Dulbecco; MEM – Meio Essencial Mínimo.

4.3 Desenvolvimento do método para cultura de células musculares lisas de artérias lesadas (IVSMC)

Os procedimentos utilizados para cultura de IVSMC foram os mesmos descritos acima para cultura de NeoC. As IVSMC, porém, foram semeadas em meio de cultura DMEM, complementado com penicilina 100.000 U/L, estreptomicina 100

mg/L e FBS 10 % (v/v). Os fragmentos de tecido que foram semeados, eram retirados da placa após 4 dias. O meio de cultura a partir daí foi trocado a cada dois ou três dias. As IVSMC foram mantidas com esse meio de cultura em estufa 37° C com 5 % CO₂, com sementeiras secundárias a cada 7 dias. As células foram utilizadas entre a 4^a e a 6^a passagem para os experimentos subsequentes. Conforme já explicado acima, a partir da 4^a passagem, em alguns experimentos específicos, a concentração de soro fetal (FBS) foi ajustada para 20%, mantendo-se as demais variáveis constantes.

4.4 Características morfo-funcionais de células neointimais

As células neointimais presentes em cultura apresentaram basicamente 3 fenótipos: a) esférico e refringente; b) um fenótipo intermediário fusiformes refringente; c) fusiformes. Cada um dos fenótipos citados acima predomina em fases distintas da cultura celular.

As células com fenótipo esférico refringente são as primeiras células a aparecerem na placa de cultura, já no segundo dia, principalmente em volta dos fragmentos de tecido (Figura 2 B). Essas células apresentam uma adesão fraca à placa de cultura, podendo ser facilmente desprendidas. Esse fenótipo permanece parcialmente após o primeiro repique, mas praticamente desaparece após o segundo repique .

O fenótipo fusiforme refringente apareceu geralmente antes do primeiro repique (Figura 2D). Essas células apresentam-se já aderidas à placa. Este fenótipo desaparece após ca de 14 dias em cultura, dando lugar a células com fenótipo fusiforme, semelhante ao fenótipo mostrado por células musculares lisas (Figura 2F). A partir daí, a cultura apresenta os modelos clássicos de confluência das células musculares lisas, do tipo "*hill-and-valley*". Esse fenótipo fusiforme permanece por inúmeros repiques (verificados até 11 repiques). NeoC, IVSMC e NVSMC após apresentarem as características clássicas de células musculares lisas não podem mais ser diferenciadas visualmente, mostrando todas tamanho e forma semelhantes.

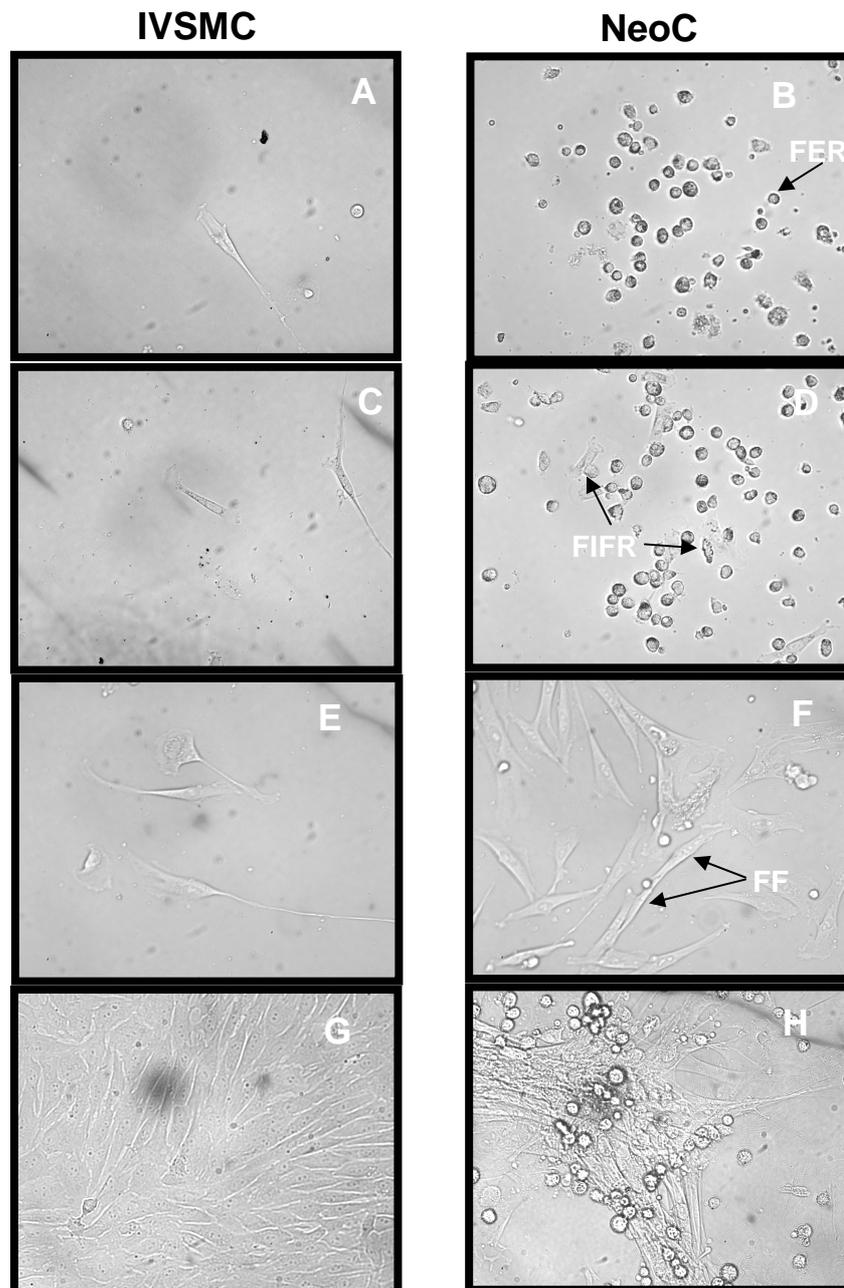


Figura 2 – Fotomicrografias representativas da cultura de células musculares lisas da artéria lesada (IVSMC) e de células neointimais (NeoC) em diferentes tempos de incubação, mantidas em estufa a 37° C e 5% de CO₂. (A) - IVSMC após 24 horas em cultura; (B) - NeoC após 24 horas em cultura; (C) - IVSMC após 48 horas em cultura; (D) - NeoC após 48 horas em cultura; (E) - IVSMC após 72 horas em cultura; (F) - NeoC após 72 horas em cultura; (G) - IVSMC após 14 dias em cultura; (H) - NeoC após 14 dias em cultura (H);. Todas as imagens foram obtidas com aumento de 20X. **Abreviaturas:** FER – Fenótipo esférico refringente; FIFR – Fenótipo Intermediário Fusiforme Refringente e FF – Fenótipo Fusiforme

4.5 Características de células normais e da camada média da artéria lesada

As células oriundas da cultura de células da camada média da artéria lesada (IVSMC) apresentaram dois fenótipos: a) fusiforme, correspondendo a células aderidas (Figura 2A, C, E e G) e b) esférico, com células predominantemente em suspensão. Essas células em suspensão, quando repicadas, adquirem o fenótipo fusiforme, sem mostrar fenótipo intermediário como no caso da cultura de neointima. As IVSMC tendem a apresentar um crescimento cerca de duas vezes mais rápido que as células musculares lisas da artéria intacta. As células musculares lisas normais (NVSMC) requerem de três a quatro semanas para se evidenciar em quantidades significativas, enquanto que as IVSMC requerem somente duas semanas.

4.6 Imunofluorescência para alfa-actina

As NeoC fusiformes, as IVSMC e as NVSMC apresentaram imunomarcagem para alfa-actina (Figura 3A, C e E). As células intactas, mais diferenciadas, apresentaram maior intensidade de fluorescência. As células neointimais com fenótipo esférico refringente não foram avaliadas por dificuldades de se isolar esse fenótipo. Para confirmar que as marcações correspondem a células, foi utilizado o corante nuclear DAPI (Figura 3B, D e F).

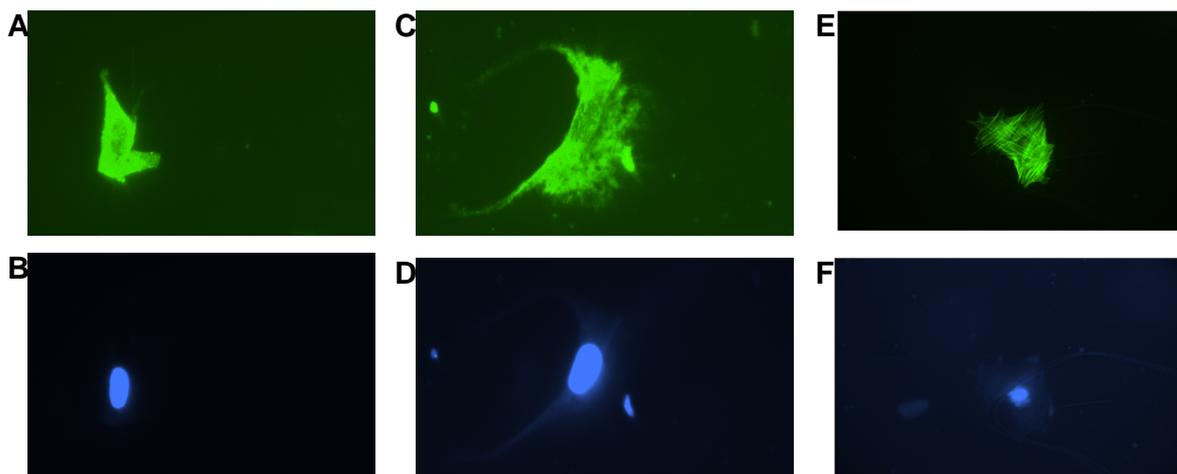


Figura 3 – Análise da expressão de alfa-actina em células musculares lisas (A e B), células da camada média lesada (C e D) e células neointimais (E e F). Todas as imagens foram obtidas em 20X.

4.7 Marcadores de NeoC

Estudos na literatura têm descrito inúmeras proteínas que distinguem células neointimais de células musculares lisas diferenciadas (Popolo, *et al.*, 2005; Bar, *et al.*, 2002; Aikawa, *et al.*, 1997; Pauli, *et al.*, 1994). Entretanto, tais estudos não identificaram até o momento marcador(es) específico(s) de células neointimais vasculares. Além disso, tais proteínas definem marcadores potenciais que tendem a ser expressos, p.ex., na neointima após lesão vascular, mas a vasta maioria destas proteínas não foi testada em condições de cultura celular. Desta forma, com o intuito de caracterizar o fenótipo neointimal das células cultivadas nas condições de nosso estudo, procedemos a uma extensa busca destas proteínas, atendendo simultaneamente aos seguintes critérios: a) maior expressão descrita em neointima e/ou em artérias lesadas em relação a células primárias e/ou artérias intactas; b) seqüência da proteína descrita para o coelho.

Identificamos, assim, potenciais marcadores relacionados a componentes de matriz extracelular (colágeno α -1) (Farb, *et al.*, 2004), marcadores de calcificação (osteopontina (Li, *et al.*, 2002) e cBf α 1/RUNX2 (Geary, *et al.*, 2002), fatores de transcrição (BTEB 2) (Nagai, *et al.*, 2001), além de marcadores de células musculares lisas indiferenciadas (SM 22 α (You, *et al.*, 2003). A enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GADPH) foi utilizada como controle de carregamento (*loading*).

A expressão do mRNA de todos estes marcadores foi primeiramente testada por RT-PCR em artérias normais e lesadas para confirmar a adequação dos mesmos às condições do modelo utilizado no presente trabalho. Os marcadores selecionados mostraram uma expressão significativa na artéria intacta não lesada, de modo que, à PCR não quantitativa, não se detectou diferença aparente em relação à artéria lesada (estudada 14 dias após a angioplastia) (Figura 5). Como exceção, notamos pequeno aumento de expressão da proteína cBf α 1/RUNX2 na artéria lesada em relação à intacta (Figura 4).

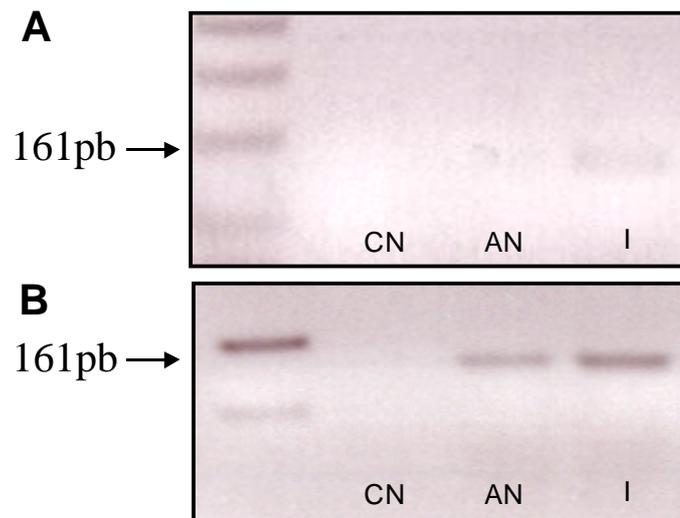


Figura 4 - Análise da expressão do mRNA da RUNX2/Cbfa-1 por da reação em cadeia polimerase: O RNA total extraído de artérias normais (AN) e artérias lesadas (I) submetido à transcrição reversa utilizando primer OligodT. (A) Variação da expressão do mRNA da RUNX2 em artérias normais e lesadas extraídas 14 dias após lesão por cateter balão, após 25 ciclos; (B) Variação da expressão do mRNA da RUNX2 em artérias normais e lesadas extraídas 14 dias após lesão por cateter balão, após 30 ciclos. O controle negativo (CN) é a reação em cadeia polimerase sem cDNA.

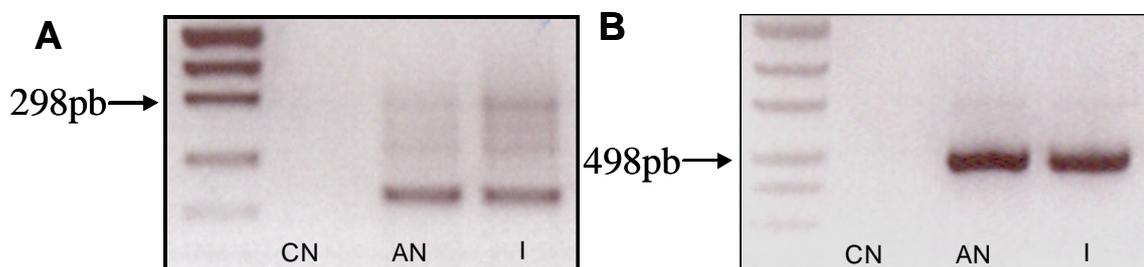


Figura 5 - Análise da expressão do mRNA do Colageno α -1 e da osteopontina por da reação em cadeia polimerase: O RNA total extraído de artérias normais (AN) e artérias lesadas (I) submetido à transcrição reversa utilizando primer OligodT. (A) Expressão do mRNA do Colageno α -1 em artérias normais e lesadas extraídas 14 dias após lesão por cateter balão; (B) Expressão do mRNA da osteopontina em artérias normais e lesadas extraídas 14 dias após lesão por cateter balão. O controle negativo (CN) é a reação em cadeia polimerase sem cDNA.

Para investigar o melhor momento do desenvolvimento da lesão para o aparecimento dos marcadores em questão, testamos alguns desses marcadores selecionados em artérias lesadas e artérias contra-laterais com tempos distintos do desenvolvimento da lesão. Os tempos escolhidos foram 4, 8 e 28 dias, o período de 14 dias já havia sido testado previamente como mostram os resultados anteriores.

Como o descrito por Giachelli e colaboradores (1993) o aumento da expressão da osteopontina na lesão é transitório e mais evidente na fase mais

proliferativa e com maior migração, nossos dados mostram que o aumento da expressão ocorre por volta do 4^o. dia pós lesão, voltando aos valores basais cerca de 8 dias pós lesão (Figura 6). RUNX2 aparece com 4, 8 e 28 dias apenas nas artérias lesadas (Figura 6), conforme descrito por Geary e colaboradores (2002), que mostraram aumento da expressão dos genes que codificam RUNX2 até 4 semanas pós lesão.

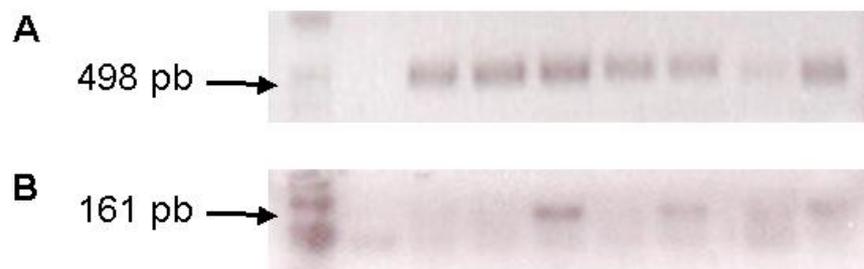


Figura 6 - Análise da expressão do mRNA da osteopontina e da RUNX2/Cbfa-1, através da reação em cadeia polimerase: O RNA total extraído de artéria normal (AN), artéria contra lateral após 4 dias (CL4), artéria lesada após 4 dias (L4), artéria contra lateral após 8 dias (CL8), artéria lesada após 8 dias (L8), artéria contra lateral após 28 dias (CL28), artéria lesada após 28 dias (L28) submetido à transcrição reversa utilizando primer OligodT. (A) Variação da expressão do mRNA da osteopontina; (B) Variação da expressão do mRNA da RUNX2/Cbfa-1. O controle negativo (CN) é a reação em cadeia polimerase sem cDNA.

4.8 Expressão de proteínas marcadoras do estresse do RE

Estudos em andamento em nosso laboratório (Santos, *et al.*, 2006) têm mostrado que a resposta de reparação vascular *in vivo* a uma lesão por catÉter-balão é acompanhada de um importante estresse do RE, conforme evidenciado pelo marcante aumento de expressão das chaperonas BiP/GRP78 (de *glucose regulated protein*) e GRP94 (que se comportam como indicadores de estresse do RE) e das proteínas de RE PDI e calreticulina (Figura 6). Para investigar a ocorrência de estresse do RE nas células cultivadas NVSMC, IVSMC e NeoC, foi estudada a expressão de proteínas marcadoras de estresse do RE.

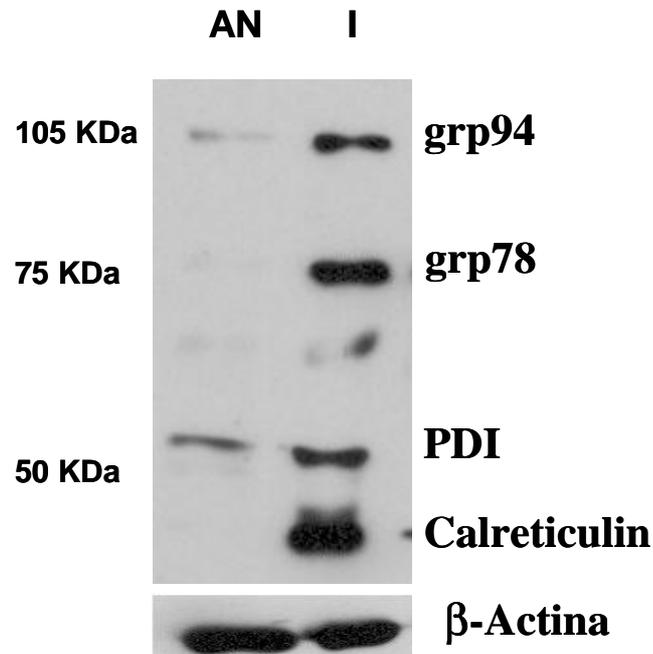


Figura 7 - Western blot mostrando expressão de proteínas marcadoras de estresse do retículo endoplasmático em homogenatos de artérias normais (NL) e artérias lesadas (I). O anticorpo primário detecta proteínas com a seqüência KDEL.

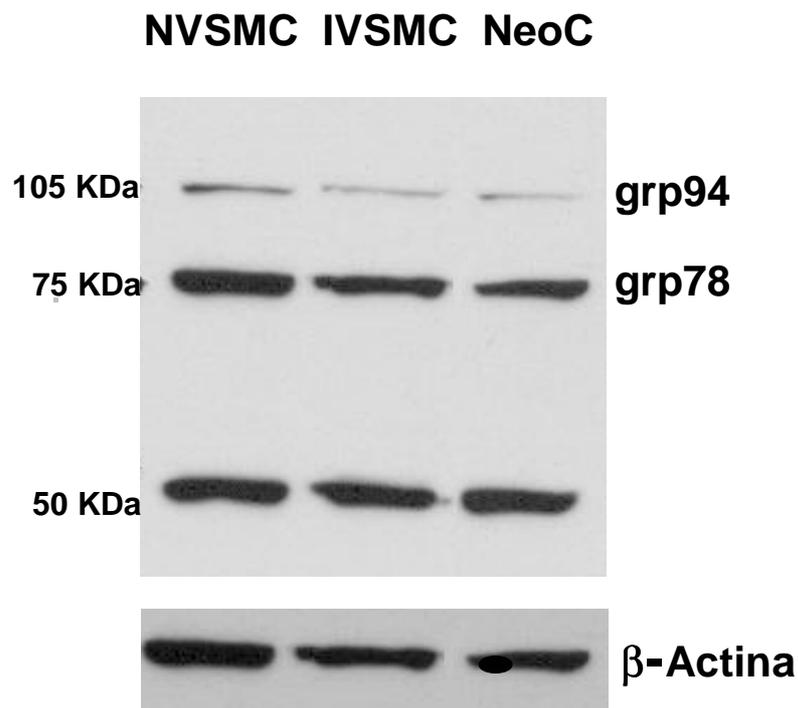


Figura 8 - Western blot mostrando expressão de proteínas marcadoras de estresse do retículo endoplasmático em homogenatos de células musculares lisas normais (NVSMC) ou da camada média lesada (IVSMC), células neointimais (NeoC). O anticorpo primário detecta proteínas com a seqüência KDEL.

4.9 Avaliação do estado redox pela GSH

A avaliação do estado redox celular por meio da análise das concentrações de GSH nas NVSMC, IVSMC e NeoC indicou a ocorrência de um importante estresse oxidativo nas IVSMC e NeoC, com respectivos valores médios de GSH; 19,9 e 6,2 nmol/mg, vs. 158,2 nmol/mg em células NVSMC ($p < 0,0001$, Tabela 2). Os valores encontrados em NVSMC (que é uma cultura primária) são ca. 2 vezes mais elevados que os valores usuais encontrados nas células de linhagem RASM, muito utilizadas em nosso laboratório.

Tabela 2 – Quantificação do GSH^a em homogenatos totais de células musculares lisas de artérias intactas (NVSMC) ou da camada média da artéria lesada (IVSMC) e células neointimais(NeoC).

Amostra	nanomol GSH/mg proteína ^b
NVSMC	158,20 ± 7,55
IVSMC*	19,93 ± 3,53
NeoC*	6,20 ± 2,42

^a A quantificação foi determinada por HPLC com detecção eletroquímica (potencial de oxidação 600mV) como descrito em Materiais e Métodos.

^b Os dados representam a média ± erro padrão de três experimentos independentes.

* $p < 0,0001$

4.10 Avaliação da produção de ROS em extratos totais de células.

A análise dos produtos de oxidação da hidroetidina assistida por HPLC é capaz de evidenciar um indicador preferencial da produção de superóxido (EOH) e E, que é um indicador menos específico da produção de superóxido e provavelmente relacionado a outras espécies, como H₂O₂/peroxidases ou heme – Fernandes, *et al.*, 2006). Esta análise foi realizada nos diferentes grupos celulares na ausência ou presença de diferentes agonistas da NADPH oxidase vascular e/ou

estressores celulares (AII – 100nM por 6 horas, Tu – 5 µg/mL 4 horas, NOC-18 – 0,75mM 18 horas).

Comparando NVSMC cultivado com DMEM suplementado com 20% de soro fetal, sem e com estímulos, o EOH mostrou diferença estatisticamente significativa com todos os estímulos utilizados, o E somente apresentou diferença estatística entre o basal e as células estimuladas com AII ($p < 0,001$), nos demais estímulos não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Tabela 3).

Tabela 3 – Média dos valores das concentrações de hidróxietídio (EOH) e etídio (E) nas células musculares lisas normais (NVSMC 20), nas células da camada média lesada (IVSMC 20) e nas células neointimais vasculares.

Estímulos	NVSMC 20		IVSMC 20		NeoC	
	[EOH]	[E]	[EOH]	[E]	[EOH]	[E]
Basal	43,1 ± 1,0	5,4 ± 0,5	29,1 ± 4,3	9,3 ± 3,4	24,2 ± 13,9	12,7 ± 5,2
AII	69,1 ± 16,9	23,5 ± 4,0	39,0 ± 7,9	10,2 ± 3,8	97,5 ± 5,0	21,7 ± 2,0
Tu	23,8 ± 3,0	5,7 ± 0,3	36,6 ± 3,6	11,8 ± 0,6	74,4 ± 16,6	24,1 ± 4,9
NOC-18	23,2 ± 3,2	8,7 ± 0,8	89,7 ± 10,8	20,0 ± 5,2	90,4 ± 2,2	37,4 ± 10,0

Abreviaturas: EOH – Hidróxietídio; E – Etídio; AII – Angiotensina II; Tu – Tunicamicina; NO° - óxido nítrico gás liberado pelo NOC-18.

As IVSMC cultivadas com DMEM suplementado com 20% de SFB sem e com os mesmos estímulos, somente mostrou diferença estatisticamente significativa a comparação das células sem estímulo com as estimuladas por NOC-18 os demais estímulos não mostraram diferenças estatisticamente significativas se comparados ao basal tanto para o EOH como para o E ($p < 0,001$ e $p < 0,05$ respectivamente) (Tabela 3).

Nas NeoC, as diferenças entre os valores basais e após todos os estímulos apresentaram diferença estatisticamente significativa para o EOH ($p < 0,01$), assim como para o E (Tabela 3).

Conforme demonstrado na Figura 9 a produção de ROS foi estatisticamente significativa para todos os grupos, quando comparado ao controle (sem estímulo).

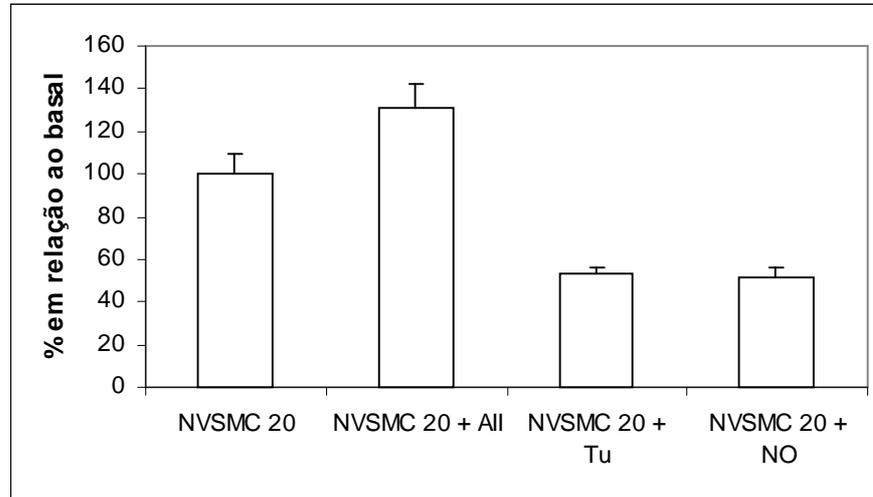


Figura 9 Produção de ROS em extrato total de células musculares lisas normais suplementadas com 20% de SFB (NVSMC 20) comparadas a produção basal após estímulo com angiotensina II (All) por 6 horas, tunicamicina (Tu) por 4 horas, NOC-18 (NO) por 18 horas. A atividade foi medida pelo método da DHE por HPLC. Em resposta a todos os estímulos houve diferença estatisticamente significativa com $p < 0,05$ comparado com o basal (sem estímulo).

A Figura 10 mostra que a produção de ROS foi estatisticamente significativa somente para o grupo tratado com NO, quando comparado ao controle (sem estímulo).

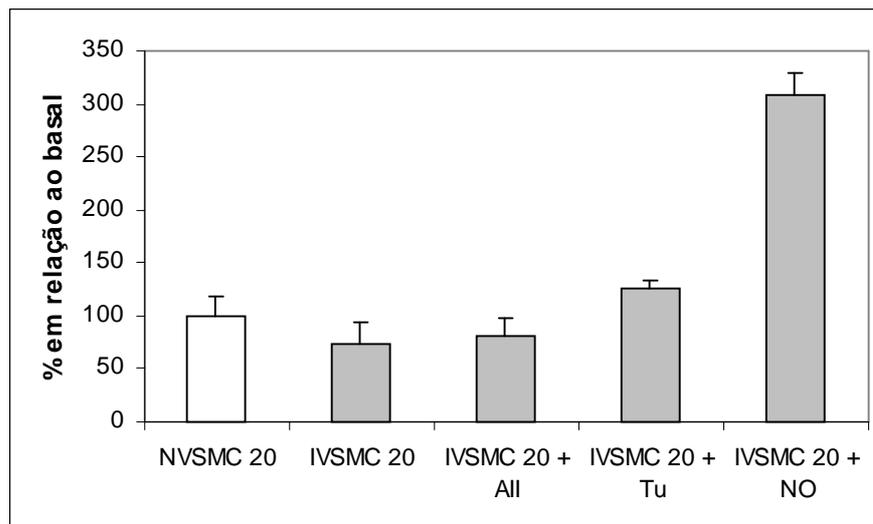


Figura 10– Produção de ROS em extrato total de células da camada média de artérias lesadas suplementadas com 20% de SFB (IVSMC 20) comparadas a produção basal após estímulo com angiotensina II (All) por 6 horas, tunicamicina (Tu) por 4 horas, NOC-18 (NO) por 18 horas. A atividade foi medida pelo método da DHE por HPLC. Somente com óxido nítrico houve diferença estatisticamente significativa com $p < 0,05$ comparado com o basal (sem estímulo).

A produção de ROS aumentou Conforme demonstrado na Figura 11 a foi estatisticamente significativa para todos os grupos, quando comparado ao controle (sem estímulo).

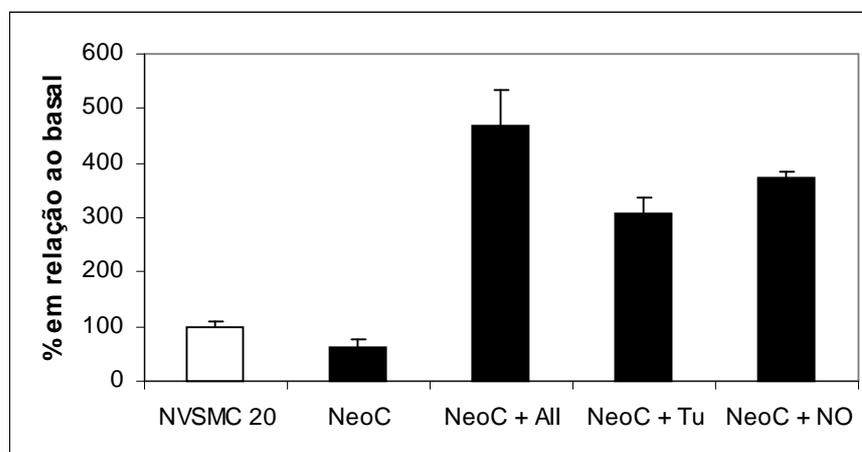


Figura 11 – Produção de ROS em extrato total de células neointimais (NeoC) comparadas À produção basal após estímulo com angiotensina II (All) por 6 horas, tunicamicina (Tu) por 4 horas, NOC-18 (NO) por 18 horas. A atividade foi medida pelo método da DHE por HPLC. Em resposta a todos os estímulos houve diferença estatisticamente significativa com $p < 0,05$ comparado com o basal (sem estímulo).

4.11 Avaliação da atividade da NADPH oxidase em fração de membrana

A atividade do complexo NADPH oxidase vascular foi estudada nos diferentes tipos celulares por quimiluminescência, tanto no estado basal como em homogenatos obtidos após estimulação com All (100nM por 6 horas). Os resultados mostraram significativo aumento tanto na atividade basal como na resposta à angiotensina II nas células neointimais e nas IVSMC, quando comparadas às células normais (NVSMC) (Figura 12).

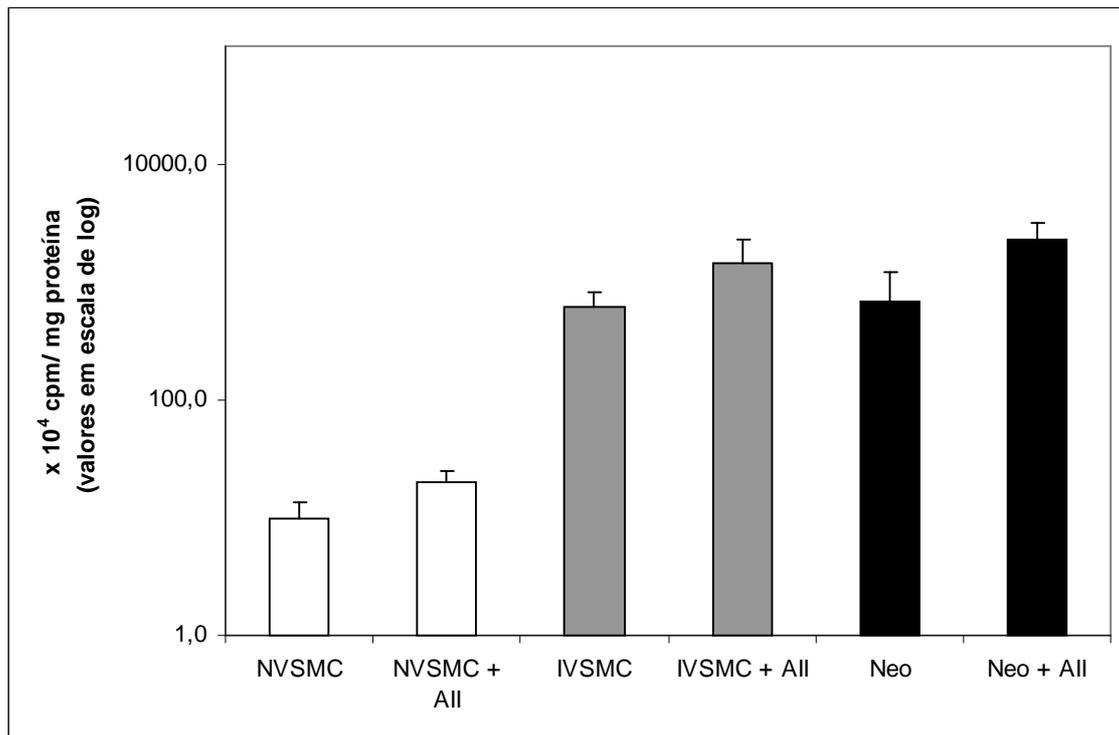


Figura 12 - Atividade da NADPH oxidase em frações de membrana de células musculares lisas normais (NVSMC); células da camada média lesadas (IVSMC) e células neointimais (NeoC) na condição basal e após tratamento com angiotensina II (AII) por 6 horas. A atividade foi medida pelo método da lucigenina e expressa em cpm/mg/min, em escala logarítmica na ordenada. Condições experimentais: temperatura 37° C, e PBS/EDTA 10 μ M com pH rigorosamente controlado em 7,4. O resultado é a média mais ou menos o erro padrão de seis experimentos independentes. $p < 0,05$

É importante notar que todas as células aumentam a atividade da NADPH oxidase mediante estímulo prévio com AII, como esperado pelo fato de a AII um agonista da NADPH oxidase (particularmente a Nox1 em células musculares lisas) (Lassègue, *et al.*, 2001), porém as células neointimais e da artéria lesada mostram aparentemente um maior grau de resposta, com os seguintes valores médios de aumento em relação ao basal sem estímulo: NVSMC = 2,1 vezes; IVSMC = 2,4 vezes e NeoC = 3,4 vezes (Figura 12) com diferença estatisticamente significativa.

Sabe-se que alterações na concentração de soro no meio de cultura podem modular o estresse oxidativo (Takahashi, *et al.*, 2006). Avaliou-se então o papel do soro nas NVSMC e nas IVSMC. A incubação com soro por 24 horas aumenta a atividade da NAD(P)H oxidase, particularmente nas células NVSMC (Figura 13).

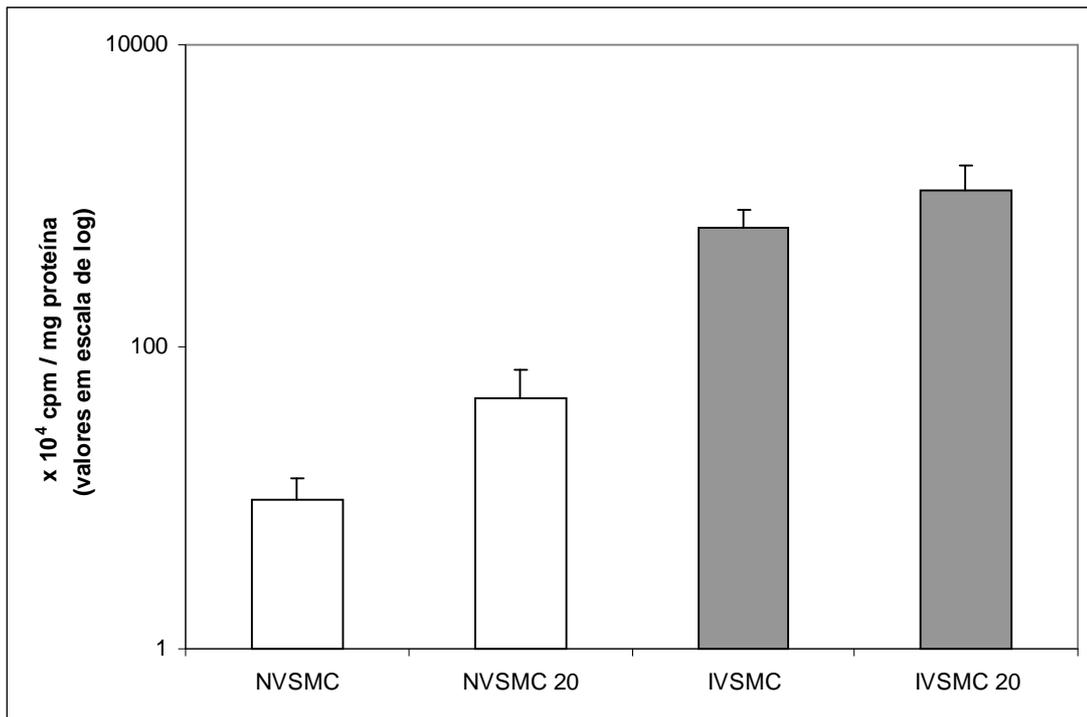


Figura 13 - Atividade da NADPH oxidase em frações de membrana de células musculares lisas normais (NVSMC); células da camada média lesada (IVSMC) cultivadas com meio próprio suplementado com 10 ou 20% de soro fetal bovino por pelo menos 24 horas antes do preparo das amostras. A atividade foi medida pelo método da lucigenina. Condições experimentais: temperatura 37° C, e PBS/EDTA 10 μ M com pH 7,4.

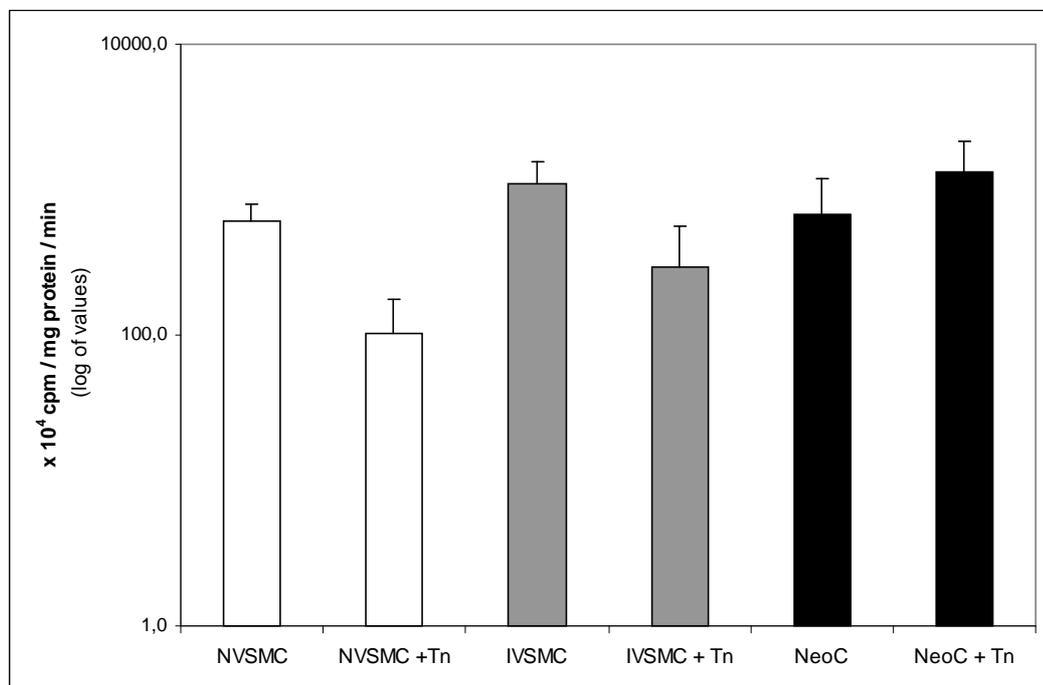


Figura 14 - Atividade da NADPH oxidase em frações de membrana de células musculares lisas normais (NVSMC); células da camada média lesada (IVSMC) ambas cultivadas por 24 horas antes do estímulo com meio próprio suplementado com 20% de soro fetal bovino e células neointimais (NeoC) na condição basal e após tratamento com tunicamicina (Tu) por 4 horas. A atividade foi medida pelo método da lucigenina. Condições experimentais: temperatura 37° C, e PBS/EDTA 10 μ M com pH 7,4.

Foi testada também atividade da NAD(P)H oxidase nos diferentes tipos celulares após tratamento com Tu 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 4 horas. Observamos que somente as NeoC mostram um aumento da atividade da NAD(P)H após o tratamento comparado com os valores basais de cada um dos tipos celulares, sendo que as NVSMC e IVSMC foram mantidas em cultura com 20% de SFB por pelo menos 24 horas antes do tratamento com Tu ou do preparo das amostras basais (Figura 14).

4.12 Avaliação da viabilidade celular em resposta a estressores.

A viabilidade celular das NeoC em resposta a estressores celulares foi analisada tanto pelo método de incorporação do Trypan blue como pelo método de redução do MTT. As NeoC mostraram-se mais sensíveis a Tu, um estressor do RE, a um oxidante exógeno, o peróxido de hidrogênio, e a NOC-18, um doador de NO (Figuras 16). Por outro lado, NeoC foram igualmente sensíveis (se não ligeiramente mais sensíveis), ao estímulo clássico da privação de soro, indicando que a maior sensibilidade aos estímulos anteriores não representa uma tendência geral inespecífica resultante de um possível maior dano celular.

Nas NVSMC, a redução da concentração de soro para 10% resultou em sensibilidade ligeiramente aumentada (10 - 15% de perda adicional de viabilidade) frente a H_2O_2 e tunicamicina, embora não à privação de soro (Figura 15).

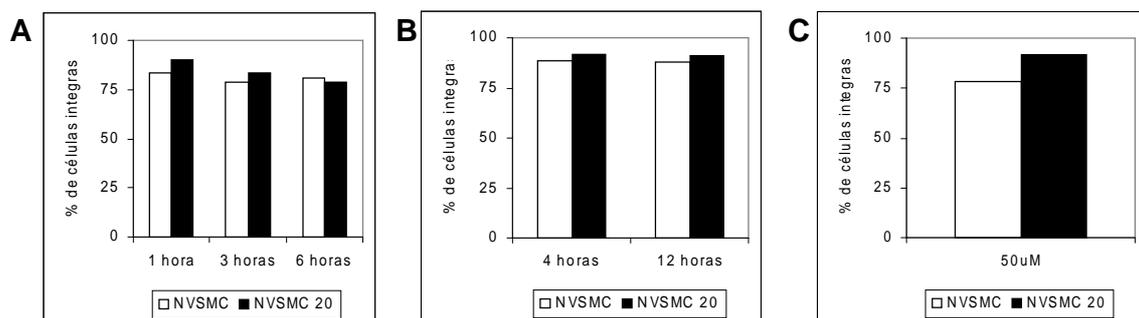


Figura 15 - Análise da suscetibilidade das células musculares lisas normais mantidas com 10 ou 20% de soro fetal bovino pela incorporação do Trypan blue. As células foram tratadas com (A) privação de soro por 1, 3 e 6 horas; (B) tunicamicina 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 4, 12 e 18 horas. (C) H_2O_2 50 μM por 1 hora. Os resultados foram dados comparando cada um dos tipos celulares com o controle de cada célula sem estímulo, sendo este considerado 100%.

É conhecido que em determinados tipos celulares, p.ex., células beta de ilhota pancreática (Cnop, *et al.*, 2005), a exposição a doadores de NO induz uma resposta

de estresse do RE, que pode, se sustentada em níveis elevados, levar à apoptose e perda celular. Além disso, estudos recentes têm confirmado amplamente o efeito do NO como indutor de disfunção mitocondrial (Xu, *et al.*, 2005; Borutaite, *et al.*, 2006) como resultado da inibição da citocromo oxidase, com maior geração de ROS de origem mitocondrial e indução da assim chamada hipóxia metabólica (Shiva, *et al.*, 2005). Para avaliar a hipótese de que células da parede arterial lesada sejam mais sensíveis a um indutor destas vias de estresse celular, foi realizada uma curva de viabilidade celular após exposição a um doador de NO, o NOC-18. Este é um composto da família dos deta-NONOatos, capaz de promover a liberação de NO^o gasoso (em oposição a nitrosotióis, que são doadores de NO⁺ em reações de transnitrosação), com meia-vida em meio aquoso de 54 horas. Em experimentos preliminares, foram detalhados os efeitos de várias concentrações de NOC-18 sobre a viabilidade celular nas NVSMC. Com base nestes resultados, para os experimentos subseqüentes escolhemos concentrações de NOC18 variando entre 0,5 e 1,0 mM (Tabela 4), considerando como base arbitrária nas NVSMC uma perda celular de 15-20% após 18 horas de exposição ao NO. Resultados da análise western com diferentes concentrações e tempos de exposição ao NO mostraram, nas NVSMC, aumento da expressão de GRP78 com a concentração de 0,5 e 1,0 mM, máxima na concentração 0,75 mM de NOC-18, todas após 18 horas de incubação (Figura 17). Com 24 horas de exposição, entretanto, a expressão do indicador de estresse do RE retornou aos níveis basais controle. (Figura 17).

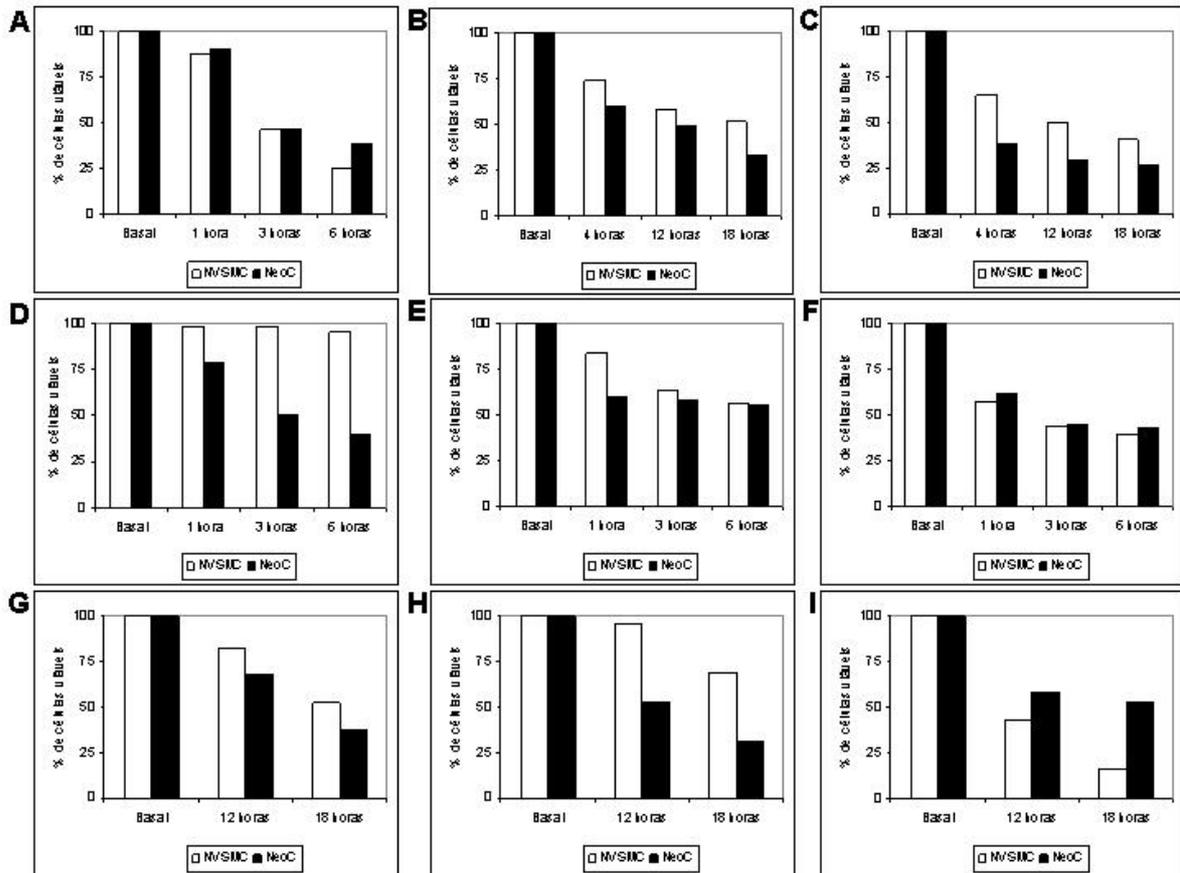


Figura 16 - Análise da suscetibilidade das células musculares lisas normais e das células neointimais pelo método de redução do MTT. As células foram tratadas com (A) privação de soro por 1, 3 e 6 horas; (B) tunicamicina 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 4, 12 e 18 horas; (C) tunicamicina 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 4, 12 e 18 horas. (D) H_2O_2 10 μM por 1, 3 e 6 horas; (E) H_2O_2 50 μM por 1, 3 e 6; (F) H_2O_2 100 μM por 1, 3 e 6 horas; (G) NOC-18 0,5 mM por 12 e 18 horas; (H) NOC-18 0,5 mM por 12 e 18 horas e (I) NOC-18 0,5 mM por 12 e 18 horas. Os resultados foram dados comparando cada um dos tipos celulares com o controle de cada célula sem estímulo, sendo este considerado 100%.

Tabela 4 - Percentual de células NVSMC não viáveis, determinada pela incorporação de Trypan Blue.

[Doador de NO] (mM de NOC18*)	% de células não viáveis
0	7,0
0,2	11,3
0,5	14,3
1,0 ^a	18,6
1,5	29,0
2,0	23,3

*Tempo de incubação de 18 horas

^a A partir da concentração de 1mM existe uma inibição (não quantificada no momento) da proliferação celular induzida pelo NO.

^b Foram semeadas aproximadamente 1×10^6 células por well.

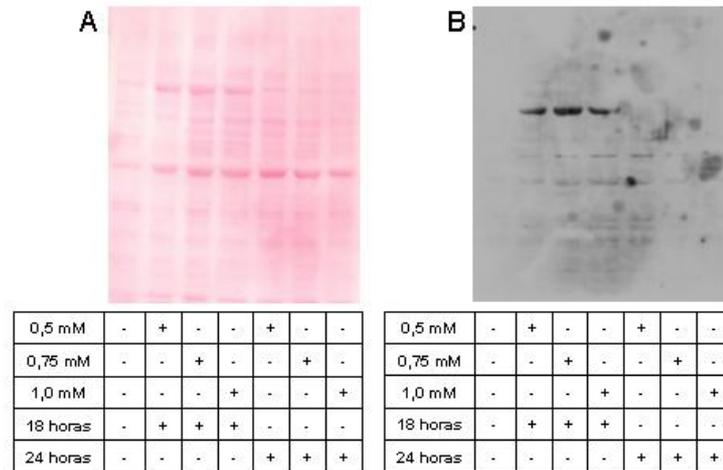


Figura 17 – Western blot representativo da expressão de proteínas contendo KDEL em homogenatos de células musculares lisas normais controle (1) e incubadas com NOC-18: 0,5 mM por 18 horas (2); 0,75 mM por 18 horas (3); 1,0 mM por 18 horas (4); 0,5 mM por 24 horas (5); 0,75 mM por 24 horas (6); 1,0 mM por 24 horas (7).

Discussão

5. DISCUSSÃO

Este estudo mostrou que células neointimais que se desenvolvem na fase de reparação após superdistensão de catéter-balão em artéria ilíaca de coelho podem ser transplantadas para meio de cultura e mantêm-se como uma população homogênea estável a longo prazo. Nas condições de cultura, células neointimais mostram repressão de vias de sinalização do estresse do RE, que estão importantemente ativadas em vivo na fase de reparação tardia à lesão. Por outro lado, células neointimais mantêm nas condições de cultura um importante estresse oxidativo, maior ativação basal da NADPH oxidase vascular e maior resposta desse complexo enzimático a agonistas e/ou estressores celulares. Células da camada média lesada mantidas em cultura exibem comportamento análogo, com menor intensidade de alterações. Células neointimais têm viabilidade reduzida após exposição a oxidantes, estressores do RE ou doadores de óxido nítrico. Estes dados confirmam o fenótipo neointimal como um fenótipo de estresse oxidativo em um contexto de uma resposta de estresse celular integrado, e abrem perspectivas para o entendimento mais aprofundado dos mecanismos envolvidos nestes processos.

5.1 Considerações metodológicas

O período de 14 dias após lesão por balão foi escolhido como o momento propício para obtenção de células neointimais após lesão a partir de estudos prévios realizados em nosso laboratório, que indicaram ser esse o período com o maior conteúdo celular na camada neointima e com algum potencial proliferativo nas células (Leite, *et al.*, 2003). Neste período, observa-se uma perda no calibre vascular por remodelamento constritivo (Leite, *et al.*, 2003), em consonância com a

observação de menores calibres nas artérias lesadas. Estudos prévios mostraram relação de áreas íntima /média ~0.60 (Laurindo et al, 2002). A neoíntima se desenvolve não apenas como resultado de proliferação celular, mas também pelo acúmulo de matriz extracelular. Esses dados, verificados em nosso modelo, são análogos aos achados observados em vasos lesados de pacientes submetidos a angioplastia. A composição relativa da matriz extracelular da íntima no homem mostra predominância de colágeno e glicosaminoglicanas que podem se associar formando proteoglicanas. No homem, também ocorre tendência a diminuição do material fibrocelular e aumento de colágeno com o aumento da espessura da camada íntima (Gentile, et al., 1999).

Apesar destas observações, notamos que as células neointimais não evoluíram em matrizes colagênicas de gelatina ou fibronectina, sendo que ambas se baseiam na interação via receptores de integrinas (Wilson, *et al.*, 1995). Após a retirada da matriz, obteve-se um pequeno número de células arredondadas e refringentes, que cresciam aderidas às placas em contato com outras células fibroblastóides fusiformes, porém com pouca proliferação celular, entrando em quiescência e vacuolização, com cessação total do crescimento, resistência à tripsinização, e posterior morte celular após alguns dias. Foi testado então o crescimento com o dobro da concentração de SFB. Houve com essa condição um crescimento inicial mais acelerado, porém a evolução foi semelhante à descrita anteriormente. Alterou-se então o meio de cultura, de DMEM para MEM, que é composto apenas com nutrientes essenciais para o crescimento celular, sem a adição de nutrientes complementares, acrescido de 20% de SFB e esse se apresentou como meio de escolha por gerar células viáveis e que mantém crescimento consistente sem alterar a morfologia. As razões para a preferência por um meio menos rico não estão claras, mas o fenômeno é observado em outros tipos de células, como células mesenquimais da medula (Covas, *et al.*, 2005). É interessante notar que células neointimais, particularmente aquelas formadas após lesão mecânica do vaso, têm uma predominância de origem a partir de células pluripotentes do sangue periférico (Sata, *et al.*, 2002). É possível, ainda, que o cultivo em meio mais rico acelere o processo de senescência celular (Takahashi, *et al.*, 2006).

5.2 Características morfo-funcionais de células neointimais cultivadas

As características morfológicas encontradas em nossas culturas foram semelhantes às encontradas por Bochaton-Piallat e colaboradores (1996) em modelos com ratos. Os fenótipos por eles descritos em células cultivadas foram agrupados nas seguintes categorias: a) forma alongada, correspondente à aparência “*hill-and-valley*”; b) epitelióides, c) alongado fraco; e d) senescentes, caracterizadas por células com inúmeros vacúolos que podem não alcançar confluência. Já Bauriedel e colaboradores (1992), estudando modelos *in vitro* de migração celular, relataram vários tipos de fenótipos nas células neointimais, p.ex. a) algumas podem migrar com velocidades variadas; b) outras podem começar se movendo, depois tornar-se refringente e praticamente imóvel e c) outros ainda podem ser imóveis e refringentes e depois começar a se dividir. Esses dados condizem com os descritos por Péronneau e colaboradores (1995), que também constataram aumento na velocidade de crescimento entre as células da artéria lesada comparada à artéria intacta *in vitro*.

Várias evidências da literatura (Sartore, *et al.*, 1999; Christen, *et al.*, 2001) indicam que células da camada neointima formada após angioplastia ou colocação de stent, em diferentes modelos animais, primeiro se (des)diferenciam, e adquirem gradualmente, em tempos subsequentes, marcação positiva para marcadores de diferenciação de células musculares lisas. Em alguns casos, a marcação para estes indicadores pode se estender para células da camada adventícia. Assim, a expressão dos marcadores de diferenciação de células musculares lisas “*in vivo*” aumenta com o passar do tempo (Christen, *et al.*, 2001). Dentre os inúmeros marcadores selecionados não há um marcador totalmente específico para diferenciar células neointimais de outras células com fenótipo muscular liso ou miofibroblástico. É possível que estudos de larga escala com um grande número de marcadores simultâneos possam indicar tal diferença, porém tais estudos não foram até o momento reportados. Em nosso modelo, a ausência de distinção destes marcadores entre as células da artéria lesada e normal mesmo no tecido *in vivo* é intrigante. Realizando então um seguimento temporal da lesão observamos, conforme descrito na literatura (Giachelli, *et al.*, 1993), que a osteopontina é um marcador que surge em um estágio mais precoce de proliferação. A expressão da

osteopontina na lesão é transitória e mais evidente fase mais proliferativa e com maior migração. Além disso, notamos índices de expressão relativamente altos mesmo nas artérias intactas, por razões que não estão claras no presente. RUNX2, um fator de transcrição envolvido com a calcificação celular, tem sua expressão aumentada (Geary, *et al.*, 2002) até 4 semanas pós lesão.

5.3 Estresse do retículo endoplasmático e neoíntima

Um dos aspectos mais peculiares da neoíntima é o importante nível de estresse do RE verificado em estudos com artérias in vivo mostrando marcante aumento na expressão de proteínas contendo a sequência KDEL em relação à artéria não lesada. A via do retículo endoplasmático, além disso, parece ser um relevante mecanismo de apoptose associada ao remodelamento vascular, envolvendo a ativação da caspase 12 (Santos, *et al.*, 2006, dados não publicados de nosso laboratório). Além disso, evidências da literatura sugerem em vários tipos celulares uma convergência entre o estresse do RE e estresse oxidativo, por meio de mecanismos envolvendo consumo de glutathione (Harding *et al.*, 2003), maior atividade da oxidase do RE Ero1-p (Kettner, *et al.*, 2004), disfunção mitocondrial (Hori, *et al.*, 2002) e talvez disfunções da via Keap/Nrf-2 (Qiang, *et al.*, 2004). Esta multiplicidade de mecanismos sugere que a convergência entre estes 2 tipos de estresse tenha um importante papel homeostático. De fato, estudos de nosso laboratório indicam um importante mecanismo adicional desta integração de estresses, que é a associação entre a PDI e a NADPH oxidase (Janiszewski, *et al.*, 2005). Neste contexto, compostos indutores de estresse do RE desencadeiam ativação da NADPH oxidase e estresse oxidativo em VSMC (Santos, *et al.*, 2006 dados não publicados de nosso laboratório). Devido ao importante estresse do RE documentado nas artérias durante o período de reparação vascular à lesão, postulamos que este estresse do RE poderia ser um fator mantenedor dos altos níveis de estresse oxidativo e atividade da NADPH oxidase documentados previamente nesta situação (Souza, *et al.*, 2000). Embora nossos resultados não excluam este papel do estresse do RE, eles indicam entretanto, a presença de outras vias independentes do estresse do RE capazes de promover estresse oxidativo na célula neointimal. Esta conclusão é sugerida pela ausência de

diferenças no estado basal entre os marcadores do estresse do RE nas células provenientes da artéria lesada (tanto neointimais como da camada média) vs. células normais. Esta ausência de diferença deve, entretanto, ser encarada com cautela, pois a expressão de marcadores de estresse do RE pode em geral variar conforme as condições de incubação e confluência celular (dados não publicados do nosso laboratório e Wang, *et al.*, 1996). De fato, os níveis de expressão destas proteínas foram relativamente elevados já em células normais, o que poderia minimizar eventuais diferenças. Sob qualquer ângulo, entretanto, a menor diferença entre a situação *in vivo* e *in vitro* sugere fortemente que as células neointimais e médias lesadas tenham suprimido as vias de estresse do RE nas condições de cultura, possivelmente como processo adaptativo para capacitar a proliferação celular, já que o estresse do RE induz suspensão da transcrição gênica e é, pelo menos em altos níveis, incompatível com a sobrevivência celular em condições de cultura. Assim, uma interpretação alternativa é que o estresse oxidativo da neointima faça parte de processos resultantes da adaptação de células a um estresse do RE sustentado. Um destes processos pode ser o da senescência celular, que resulta da exposição de células submetidas a estresse a fatores de crescimento e proliferação celular. A senescência está associada a níveis bastante aumentados de produção de espécies reativas de oxigênio (Ramsey, *et al.*, 2006; Takahashi, *et al.*, 2006).

5.4 Estresse oxidativo e ativação da NADPH oxidase em células neointimais

A concentração de GSH em células de mamíferos pode variar de 1 a 10 μM (Molteni *et al.*, 2004). Estudos não publicados do nosso laboratório (Santos, *et al.*, 2005 e 2006) mostraram que o conteúdo de GSH em células musculares lisas de linhagem (RASM) foi *ca* 40 nmolGSH/mg proteína e o estímulo por 4 horas com AII, um agonista da NADPH oxidase, reduz o conteúdo de GSH em 50%, condizente com a ocorrência de estresse oxidativo celular. Resultados semelhantes foram descritos para células musculares lisas de humanos (Bhunja e col., 1997), embora o método utilizado para dosagem de GSH tenha sido fluorimétrico (menos sensível); em musculares lisas de ratos os valores descritos foram *ca* de metade do valor encontrado em RASM (Zhuoxiao e Li, 2002). Desta forma, os baixos níveis de glutathiona verificados em células obtidas da parede arterial lesada refletem estresse oxidativo, e não uma peculiaridade técnica do ensaio. A redução dos níveis de

glutationa nas células neointimais e da camada média lesada está de acordo com os achados previamente verificados em artérias durante a resposta de reparação vascular (Azevedo, *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2006). A ocorrência de estresse oxidativo é provavelmente um reflexo da maior expressão da NAD(P)H oxidase exibida pelas artérias lesadas (Azumi, *et al.*, 1999; Paravicini, *et al.*, 2002; Szocs, *et al.*, 2002). Dados da literatura mostram também ainda aumento da expressão e atividade da glutationa peroxidase 14 dias após lesão por catéter balão (Gong, *et al.*, 1996).

Os resultados da análise dos produtos de oxidação de DHE nos homogenatos celulares e nos ensaios com fração de membrana mostraram, em consonância com o maior estresse oxidativo, uma produção de superóxido aumentada, relacionada pelo menos em parte a um aumento da atividade da NADPH oxidase. Estes achados mostram coerência com observações prévias *in vivo* de nosso grupo (Souza, *et al.*, 2000; Azevedo, *et al.*, 2000; Leite, *et al.*, 2003 e 2004) e de outros laboratórios (Szocs, *et al.*, 2002). Devido às diferenças nas condições ótimas de cultivo celular para as diferentes células utilizadas nesse trabalho e com o objetivo de minimizar os possíveis vieses na avaliação da atividade da NADPH oxidase trabalhou-se com duas diferentes concentrações de soro fetal. Estudos anteriores mostraram que a expressão das diferentes Nox encontradas em VSMC pode ser alterada pela concentração do soro (Wingler, *et al.*, 2001). Essa diferença pode explicar o aumento da atividade basal da IVSMC cultivada com 20 vs. 10% SFB. Por outro lado, as marcantes diferenças observadas nas células neointimais e mesmo nas IVSMC em relação às normais são claramente atribuíveis ao tipo celular e não apenas às condições de cultura.

Estudos mostraram que a apoptose induzida pelo NO em células beta pancreáticas (que são células secretoras) ocorre através da via do estresse do RE que envolve a depleção de Ca^{2+} (Oliver, *et al.*, 2005), em oposição à via habitualmente proposta, que é a indução de p53 (Oyadomari, *et al.*, 2001). É possível que células secretoras, como é o caso das NeoC por sua intensa secreção de matriz extracelular, sejam particularmente sensíveis à apoptose induzida pelo NO através do via de sinalização ligada ao estresse do RE. Defato, nossos dados indicam expressão de Grp78 após exposição ao doador de NO NOC-18. Além disso, a maior produção de superóxido em resposta à incubação com doador de NO nas

células neointimais pode ser indicativa de disfunção mitocondrial, considerando que um mecanismo possível deste efeito do NO é a inibição da cadeia de transporte de elétrons na altura da citocromo oxidase, gerando vazamento de elétrons pelo complexo III (Moncada, *et al.*, 2005).

5.5 Significância do modelo *in vitro*

Uma das principais questões de nosso estudo é a relevância do modelo *in vitro* de cultura de células neointimais em relação à biologia dessas células *in vivo*. É bem aceito que praticamente todos os tipos celulares sofrem reprogramação gênica quando colocados em condições de cultura celular, devido à manipulação, exposição a soro, diferentes nutrientes, etc. Certamente, este fato deve ter ocorrido em nossas células, conforme inclusive sugerido pela supressão de marcadores de estresse do RE nas células cultivadas. Assim, resultados de certos ensaios *in vitro*, particularmente aqueles dependentes de programas gênicos transitórios, devem ser encarados com certa cautela quanto à possível relevância *in vivo*. Neste contexto, é notável o achado de uma manutenção persistente do estresse oxidativo e da atividade da NADPH oxidase nas condições de cultura. Conforme discutido acima, vários estudos fornecem evidência de que este fenômeno é relevante *in vivo* (Szocs, *et al.*, 2002; Leite, *et al.*, 2004). Assim, os dados de maior estresse oxidativo em condições de cultura são consistentes com a noção de que o desequilíbrio redox da célula neointimal é provavelmente constitutivo e não apenas um fenômeno transitório. Esta noção reforça a idéia de que o estresse oxidativo esteja no contexto de complexa adaptação celular a uma resposta integrativa de vários tipos de estresse, p.ex., estresse do RE, deprivações metabólicas (Harding, *et al.*, 2003), disfunção mitocondrial (Moncada, *et al.*, 2005). É possível que mutações de DNA nuclear ou mitocondrial, bem como mecanismos epigenéticos, possam ocorrer no sentido de sustentar o estresse oxidativo *in vivo* e serem sustentadas no contexto do crescimento *in vitro*. Além disso, deve-se ressaltar que várias alterações ligadas ao processo de senescência celular (um possível processo da célula neointimal, conforme discutido acima) são irreversíveis (Ramsey, *et al.*, 2006; Takahashi, *et al.*, 2006).

5.6 Implicações

A caracterização da célula neointimal como um fenótipo de estresse oxidativo celular pode ter várias implicações no melhor conhecimento dos mecanismos que governam os processo redox destas células. A disponibilidade de um modelo de célula neointimal persistentemente cultivada permitirá entender porque estas células desenvolvem estresse oxidativo. A visão corrente é de que o estresse oxidativo funciona como um segundo mensageiro de processos celulares como proliferação, diferenciação, etc., governando essencialmente a fosforilação celular (ativação de quinases e inibição de fosfatases), oxidação ou S-nitrosação (Forman, *et al.*, 2004). Nossos dados, em conjunto com outras observações do laboratório, sugerem uma ampliação destes conceitos no sentido de englobar estas cascatas de sinalização em um perfil de adaptação coerente das células a uma resposta integrada de estresse. Em última análise, estes avanços poderão determinar o aperfeiçoamento do desenho de intervenções racionais para restabelecer o equilíbrio redox celular e controlar a formação e as conseqüências da neointima em doenças vasculares.

Conclusões

6. Sumário de resultados e Conclusões

- 1) É possível obter células neointimais em cultura de modo reproduzível e estável.
- 2) Tanto células neointimais como células da camada média da artéria lesada mantêm um estado persistente de aumento do estresse oxidativo.
- 3) O estresse oxidativo de células neointimais decorre de produção aumentada de radical superóxido e ativação da NADPH oxidase vascular.
- 4) Diferentemente do observado em vasos lesados, os marcadores do estresse do retículo endoplasmático não se apresentam alterados se comparados a células musculares lisas normais.
- 5) Células neointimais têm resposta aumentada a agonistas da NADPH oxidase e estressores celulares.
- 6) A exposição a óxido nítrico promove aumento da produção de superóxido, particularmente acentuado em células neointimais.
- 7) Células neointimais têm sensibilidade aumentada a oxidantes exógenos e doadores de NO, porém não à privação de soro.

Em conjunto, estes resultados permitem concluir que o fenótipo neointimal é um fenótipo de estresse oxidativo acentuado e persistente, mesmo após várias passagens em cultura celular, e que este estresse oxidativo decorre pelo menos em parte da ativação do complexo NADPH oxidase no contexto de uma adaptação à resposta celular integrada ao estresse. Estes dados indicam novas perspectivas no entendimento dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia redox da neointima, podendo suscitar o desenho de intervenções terapêuticas racionais.

Referências
Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIKAWA, M; SAKOMURA, Y; UEDA, M; KIMURA, K; MANABE, I; ISHIWATA, S; KOMIYAMA, N; YAMAGUCHI, H; YAZAKI, Y; NAGAI, R (1997). Redifferentiation of smooth muscle cells after coronary angioplasty determined via myosin heavy chain expression. **Circulation** 96(1):82-90.
- AZEVEDO, LCP; PEDRO, MA; SOUZA, LC; SOUZA, HP; JANISZEWSKI, M; LUZ, PL; LAURINDO, FRM (2000). Oxidative stress as a signaling mechanism of the vascular response to injury: The redox hypothesis of restenosis. **Cardiovasc Res** 47: 436-445
- AZUMI, H; INOUE, N; TAKESHITA, S; RIKITAKE, Y; KAWASHIMA, S; HAYASHI, Y; ITOH, H; YOKOYAMA, M (1999). Expression of NADH/NADPH oxidase p22phox in human coronary arteries. **Circulation** 100(14):1494-8
- BABIOR BM (2002) The Activity of Leukocyte NADPH Oxidase: Regulation by p47PHOX Cysteine and Serine Residues. **Antioxid Redox Signal** 4: 35-8.
- BABIOR BM (2000). The NADPH oxidase of endothelial cells. **IUBMB Life** 50: 267-9.
- BABIOR BM (1999). NADPH oxidase: an update. **Blood** 9: 1464-76.
- BAR, H; WENDE, P; WATSON, L; DINGER, S; VAN EYS, G; KREUZER, J; JAHN, L (2002). Smoothelin is an indicator of reversible phenotype modulation of smooth muscle cells in balloon-injured rat carotid arteries. **Basic Res Cardiol** 97(1):9-16.
- BAYES-GENIS, A; CONOVER, CA; SCHWARTZ, RS (2000). The insulin-like growth factor axis. A review of atherosclerosis and restenosis. **Circ Res** 86: 125-30.
- BAYRAKTUTAN, U; BLAYNEY, L; SHAH, AM (2000). Molecular characterization and localization of the NAD(P)H oxidase components gp91-phox and p22-phox in endothelial cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 20: 1903-11.
- BHARGAVA, B; KARTHIKEYAN, G; ABIZAID, AS; MEHRAN, R (2003). New approaches to preventing restenosis. **Brit Med J** 327: 274-9.
- BORUTAITE, V; BROWN, GC (2006). S-nitrosothiol inhibition of mitochondrial complex I causes a reversible increase in mitochondrial hydrogen peroxide production. **Biochim Biophys Acta** 2006 Mar 23; [Epub ahead of print]
- BOVERIS, A; CHANCE, B (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochem J**, 134: 707-16.
- CAI, HE; HARRISON, DG (2000). Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. **Circ Res** 87: 840-4.
- CHANG, L; XU, JX; ZHAO, J; PANG, YZ; TANG, CS; QI, YZ (2004). Taurine antagonized oxidative stress injury induced by homocysteine in rat vascular smooth muscle cells. **Acta Pharmacol Sin**, 25 (3): 341-6.

- CHEN, K; THOMAS, SR; KEANEY JR, JF (2003). Beyond LDL oxidation: ROS in vascular signal transduction. **Free Radic Biol Med** 35 (2): 117-32.
- CHOMCZYNSKI, P; SACCHI, N (1987). Single Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. **Anal Biochem**, 162(1), 156-9.
- CHRISTEN, T; VERIN, V; BOCHATON-PIALLAT, M-L; POPOWSKI, Y; RAMAEKERS, F; DEBRUYNE, P; CAMENZIND, E; EYS, GV; GABBIANI, G (2001). Mechanisms of neointima formation and remodeling in the porcine coronary artery. **Circulation** 103(6): 882-8.
- CLEMPUS, RE; GRIENGLING, KK (2006). Reactive oxygen species signaling in vascular smooth muscle cells. **Cardiovasc Res**,
- COOPER GM. **A célula: uma abordagem molecular**. 2ª Edição. Artmed Editora. Porto Alegre, 2001.
- CZARNECKA,AM; GOLIK, P; BARTINIK, E (2006). Mitochondrial DNA mutations in human neoplasia. **J Appl Genet**, 47(1): 67-78.
- DEBARBIEUX, L; BECKWITH, J (1999). Electron avenue: pathways of disulfide bond formation and isomerization. **Cell** 99: 117-9.
- DELEO, FR; RENEE, J; MCCORMICK, S; NAKAMURA, M; APICELLA, M; WEISS, JP; NAUSEEF, WM (1998). Neutrophils exposed to bacterial lipopolysaccharide upregulate NAD(P)H oxidase assembly. **J Clin Invest** 101: 455-63.
- DELEO, FR; NAUSEEF, WM; JESAITIS, AJ; BURRITT, JB; CLARK, RA; QUINN, MT (1995). A domain of p47phox that interacts with human neutrophil flavocytochrome b558. **J Biol Chem** 270: 26246-51.
- DERUITER, MC; POELMANN, RE; VANMUNSTEREN, JC; MIRONOV, V; MARKWALD, RR; GITTENBURGER, DE; GROOT, AC; (1997). Embryonic endothelial cells transdifferentiate into mesenchymal cells expressing smooth muscle actins *in vivo* and *in vitro*. **Circ Res** 80(4): 444-51.
- DU, XL; SUI, GZ; STOCKKLAUSER-FARBER, K; WEISS, J; ZINK, S; SCHWIPPERT, B; WU, QX; TSCHOPE, D; ROSEN, P (1998). Introduction of apoptosis by high proinsulin and glucose in cultured human umbilical vein endothelial cells is mediated by reactive oxygen species. **Diabetologia** 41: 249-56.
- DYKXHOORN, DM; NOVINA, CD; SHARP, PA (2003). Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. **Nat Rev Mol Cell Biol** 6: 457-67.
- DZAU, VJ; RE, RN (1987). Evidence for the existence of renin in the heart. **Circulation**, 75: 1134-36.
- ELLGAARD, L; RUDDOCK, LW (2005). The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties. **EMBO reports**, 6(1): 28-32.
- EMANUELI, C; SALIS, MB; CHAO, J; CHAO, L; AGATA, J; LIN, K-F; MUNAO, A; STRAINO, S; MINASI, A; CAPOGROSSI, MC; P MADEDDU (2000). Adenovirus-mediated human tissue kallikrein gene delivery inhibits neointima formation induced by interruption of blood flow in mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 20: 1459-66.

- FARB, A; KOLODZIE, FD; HWANG, JY; BURKE, AP; TEFERA, K; WEBER, DK; WIGHT, TN; VIRMANI, R (2004). Extracellular matrix changes in stented human coronary arteries. **Circulation** 110(8):940-7.
- FINK, B; LAUDE, K; MCCANN, L; DOUGHAN, A; HARRISON, DG; DIKALOV, S (2004). Detection of intracellular superoxide formation in endothelial cells and inact tissues using dihydroethidium and HPLC-based assay. **Am J Physiol Cell Physiol**, 287: C895-902.
- FRAND, AR; CUOZZO, JW; KAISER, CA (2000). Pathways for protein disulphide bond formation. **Trends Cell Biol** 10: 203-210.
- FRESHNEY, RI. Measurement of viability and cytotoxicity. *In: Culture of animal cells*. 3ed. New York: WILEY-LISS, 1994. p. 287-307.
- FUKUI, T; ISHIZAKA, N; RAJAGOPALAN, S; LAURSEN, JB; CAPERS, Q 4TH; TAYLOR, WR; HARRISON, DG; DE LEON, H; WILCOX, JN; GRIENGLING, KK (1997). p22phox mRNA expression and NAD(P)H oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats. **Circ Res** 80: 45-51.
- FURCHGOTT, RF; ZAWADZKI, JV (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, 288: 373-76.
- GABBIANI G (2003). The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. **J Pathol**, 200(4): 500-3.
- GEARY, RL; WONG, JM; ROSSINI, A; SCHWARTZ, SM; ADAMS, LD (2002). Expression profiling identifies 147 genes contributing to a unique primate neointimal smooth muscle cell phenotype. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 22(12):2010-6.
- GEISZT, M; LETO, TL (2004). The Nox Family of NAD(P)H Oxidases: Host Defense and Beyond. **J Biol Chem**, 279(50): 51715-8.
- GHARIOS, GB; PONTICOS, M; RAJKUMAR, V; ABRAHAM, D (2004). Extra-cellular matrix in vascular networks. **Cell Prolif**, 37: 207-20.
- GHRIBI, O; HERMAN, MM; DEWITT, DA; FORBES, MS; SAVORY, J (2001). Abeta(1-42) and aluminum induce stress in the endoplasmic reticulum in rabbit hippocampus, involving nuclear translocation of gadd 153 and NF-kappaB. **Brain Res Mol Brain Res** 96(1-2): 30-8.
- GIACHELLI, CM; BAE, N; ALMEIDA, M; DENHARDT, DT; ALPERS, CE; SCHWARTZ, SM (1993). Osteopontin Is Elevated during Neointima Formation in Rat Arteries and Is a Novel Component of Human Atherosclerotic Plaques. **J Clin Invest** 92:1686-1696.
- GRIENGLING, KK (2004). Novel NAD(P)H oxidases in the cardiovascular system. **Heart**, 90: 491-3.
- GUIDOT, DM; REPINE, JE; KITLOWSKI, AD; FLORES, SC; NELSON, SK; WRIGHT, RM; MCCORD, JM (1995). Mitochondrial respiration scavenges extramitochondrial superoxide anion via a nonenzymatic mechanism. **J Clin. Invest**, 96: 1131-6.
- HAMPTON, RY (2000). ER stress response: getting the UPR hand on misfolded proteins. **Curr Biol** 10(14): R518-21.
- HARDING, HP; ZHANG, Y; ZENG, H; NOVOA, I; LU, PD; CALFON, M; SADRI, N; YUN, C; POPKO, B; PAULES, R; STOJDL, DF; BELL, JC; HETTMANN, T;

- LEIDEN, JM; RON, D (2003). An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. **Mol Cell** 11(3): 619-33.
- HENSLEY, K; ROBINSON, KA; GABBITA, SP; SALSMAN, S; FLOYD, RA (2000). Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. **Free Radic Biol Med** 28(10): 1456-62.
- HERMANN, M (2006). Cyclooxygenase-2 and nitric oxide. **J Cardiovasc Pharmacol** 47(Supple 1): S21-5.
- HILLEBRANDS, J-L; KLATTER, FA; VAN DEN HURK, BMH; POPA, ER; NIEUWENHUIS, P; ROZING, J (2001). Origin of neointimal endothelium and α -actin-positive smooth muscle cells in transplant arteriosclerosis. **J Clin Invest** 107(11): 1411-22.
- HORI, O; ICHINODA, F; TAMATANI, T; YAMAGUCHI, A; SATO, N; OZAWA, K; KITAO, Y; MIYAZAKI, M; HARDING, HP; RON, D; TOHYAMA, M; M STERN, D; OGAWA, S (2002). Transmission of cell stress from endoplasmic reticulum to mitochondria: enhanced expression of Lon protease. **J Cell Biol** 157(7):1151-60.
- HUNGERFORD, JE; LITTLE, CD (1999). Developmental biology of the vascular smooth muscle cell: building a multilayered vessel wall. **J Vas Res**, 36(1): 2-27
- IGASE, M; OKURA, T; NAKAMURA, M; TAKATA, Y; KITAMI, Y; HIWADA, K (2001). Role of GADD153 (growth arrest- and DNA damage-inducible gene 153) in vascular smooth muscle cell apoptosis. **Clin Sci (Lond)** 100(3): 275-81.
- IRANI, K (2000). Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival: a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. **Circ Res** 87: 179-83.
- JABS, A; MONCADA, GA; NICHOLS, CE; WALLER, EK; WILCOX, JN (2005). Peripheral blood mononuclear cells acquire myofibroblast characteristics in granulation tissue. **J Vasc Res** 42(2):174-80.
- JANDELEIT-DAHM, K; BURRELL, LM; JOHNSTON, CI; KOCH, KM (1997). Elevated vascular angiotensin converting enzyme mediates increased neointima formation after balloon injury in spontaneously hypertensive rats. **J Hypertens** 15(6):643-50.
- JANISZEWSKI, M; LOPES, LR; CARMO, AO; PEDRO, MA; BRANDES, RP; SANTOS, CXC; LAURINDO, FRM (2005). Regulation of NAD(P)H oxidase by associated protein disulfide isomerase in vascular smooth muscle cells. **J Biol Chem**, 280(49): 40813-9.
- JANISZEWSKI, M; PEDRO, MA; SOUZA, HP; LAURINDO, FR (2003). Interaction between NAD(P)H oxidase and protein disulfide isomerase in vascular smooth muscle cells. Evidence for a novel mechanism modulating cellular redox processes. **Circulation**. Abstract. In press.
- JANISZEWSKI, M; CARMO, A; PEDRO, MA; LAURINDO, FRM (2002). Platelet-derived microparticles contain the phagocyte oxidase subunits and are related to apoptosis of vascular cells. **Free Radic Biol Med** 33: S 320.
- JANISZEWSKI, M. **Interação entre a NAD(P)H oxidase e a isomerase de dissulfetos proteicos (PDI) em células musculares lisas vasculares: evidências de um novo mecanismo molecular de processos redox celulares.** 2002. 100f.. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo.

- JANISZEWSKI, M; PEDRO, MA; SCHEFFER, RC; VAN ASSELDONK, JH; SOUZA, LC; DA LUZ, PL; AUGUSTO, O; LAURINDO, FR (2000). Inhibition of vascular NADH/NAD(P)H oxidase activity by thiol reagents: lack of correlation with cellular glutathione redox status. **Free Radic Biol Med** 29: 889-899.
- KETTNER, K; BLOMBERG, A; RODEL, G (2004). Schizosaccharomyces pombe ER oxidoreductin-like proteins SpEro1a p and SpEro1b p. **Yeast** 21(12):1035-44.
- KHACHIGIAN, LM; FAHMY, RG; ZHANG, G; BOBRY SHEV, YV; KANIAROS, A (2002). c-Jun regulates vascular smooth muscle cell growth and neointima formation after arterial injury. Inhibition by a novel DNA enzyme targeting c-Jun. **J Biol Chem**, 277 (25): 22985-91.
- LAURINDO, FRM; SOUZA, HP; PEDRO, MP; JANISZEWSKI, M (2002). Redox aspects of vascular response to injury. **Methods Enzymol** 352: 432-454.
- LASSÈGUE, B; SORESCU, D; SZOCS, K; YIN, Q; AKERS, M; ZHANG, Y; GRANT, SL; LAMBETH, JD; GRIENDLING, KK (2001). Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells : nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. **Circ Res** 88: 888-894.
- LEITE, PF; DANILOVIC, A; MORIEL, P; DANTAS, K; DANTAS, APV; LAURINDO, FRM (2002). Sustained superoxide dismutase down-regulation contributes to constrictive remodeling after balloon injury in rabbits. **Circulation** 106:II-50.
- LI, G; OPARIL, S; KELPKE, SS; CHEN, YF; THOMPSON, JA (2002). Fibroblast growth factor receptor-1 signaling induces osteopontin expression and vascular smooth muscle cell-dependent adventitial fibroblast migration in vitro. **Circulation** 13;106(7):854-9.
- LIJNEN, HR (2003/2004). Metalloproteinases in development and progression of vascular disease. **Pathophysiol Haemost Thromb**, 33: 275-81.
- MAHONEY, WM; SCHWARTZ, SM (2005). Defining smooth muscle cells and smooth muscle injury. **J Clin Invest** 115(2): 221-4.
- MALIAK, N; FRANCIS, SE; HOLT, CM; GUNN, J; THOMAS, GL; SHEPHERD, L; CHAMBERLAIN, J; NEWMAN, CMH (1998). Apoptosis and cell proliferation after porcine coronary angioplasty. **Circulation** 98: 1657-65.
- MCCULLOUGH, KD; MARTINDALE, JL; KLOTZ, LO; AW, TY; HOLBROOK, NJ (2001). Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. **Mol Cell Biol** 21(4): 1249-59.
- MILLER, FJ JR; GUTTERMAN, DD; RIOS, CD; HEISTAD, DD; DAVIDSON, BL (1998). Superoxide production in vascular smooth muscle contributes to oxidative stress and impaired relaxation in atherosclerosis. **Circ Res** 82: 1298-1305
- MOISEEVA, EP (2001). Adhesion receptors of vascular smooth muscle cells and their functions. **Cardiovas Res** 52: 372-86.
- MOORE, S; BELBECK, LW; RICHARDSON, M; TAYLOR, W (1982). Lipid accumulation in the neointima formed in normally fed rabbits in response to one or six removals of the aortic endothelium. **Lab Invest** 47(1):37-42.
- MOSMANN, T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, 65: 55-63.

- NAGAI R, SHINDO T, MANABE I, SUZUKI T, KURABAYASHI M (2003). KLF5/BTEB2, a Kruppel-like zinc-finger type transcription factor, mediates both smooth muscle cell activation and cardiac hypertrophy. **Adv Exp Med Biol** 538:57-65; discussion 66.
- NAKAGAWA, T; ZHU, H; MORISHIMA, N; LI, E; XU, J; YANKNER, BA; YUAN, J (2000). Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. **Nature** 403(6765): 98-103.
- OHNO, Y; SELIGMANN, BE; GALLIN, JI (1985). Cytochrome b translocation to human neutrophil plasma membranes and superoxide release. Differential effects of N-formylmethionylleucylphenylalanine, phorbol myristate acetate, and A23187. **J Biol Chem** 260: 2409-2414.
- OUBRAHIM, H; CHOCK, PB; STADTMAN, ER (2002). Manganese(II) induces apoptotic cell death in NIH3T3 cells via a caspase-12-dependent pathway. **J Biol Chem** 277(23): 20135-8.
- OYADOMARI, S; TAKEDA, K; TAKIGUCHI, M; GOTOH, T; MATSUMOTO, M; WADA, I; AKIRA, S; ARAKI, E; MORI, M (2001). Nitric oxide-induced apoptosis in pancreatic beta cells is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway. **Proc Natl Acad Sci U S A** 98(19): 10845-50.
- PARAVICINI, TM; GULLUYAN, LM; DUSTING, GJ; DRUMMOND, GR (2002). Increased NADPH oxidase activity, gp91phox expression, and endothelium-dependent vasorelaxation during neointima formation in rabbits. **Circ Res** 91(1): 54-61.
- PATIL, C; WALTER, P (2001). Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. **Curr Opin Cell Biol** 13(3): 349-55.
- PATTERSON, C; RUEF, J; MADAMANCHI, NR; BARRY-LANE, P; HU, Z; HORAIST, C; BALLINGER, CA; BRASIER, AR; BODE, C; RUNGE, MS (1999). Stimulation of a vascular smooth muscle cell NAD(P)H oxidase by thrombin. Evidence that p47(phox) may participate in forming this oxidase in vitro and in vivo. **JBC** 274(28): 19814-22.
- POHL, U; KAAS, J (1994). Interaction of hormones with the vascular endothelium. **Drug Res**, 44: 459-61.
- POLLMAN, MJ; HALL, JL; GIBBONS, GH (1999). Determinants of vascular smooth muscle cell apoptosis after balloon angioplasty injury. Influence of redox state and cell phenotype. **Circ Res** 84(1):113-21.
- POPOLO, A; MARZOCCO, S; NASTI, C; LIPPOLIS, L; DI VILLA BIANCA, R; SORRENTINO, R; AUTORE, G; PINTO, A (2005). Phenotypic modifications of vascular smooth muscle cells could be responsible for vascular hyporeactivity to contracting agent in mechanically injured rat carotid artery. **Atherosclerosis** 183(2):213-21.
- QIANG, W; CAHILL, JM; LIU, J; KUANG, X; LIU, N; SCOFIELD, VL; VOORHEES, JR; REID, AJ; YAN, M; LYNN, WS; WONG, PK (2004). Activation of transcription factor Nrf-2 and its downstream targets in response to moloney murine leukemia virus ts1-induced thiol depletion and oxidative stress in astrocytes. **J Virol** 78(21):11926-38.

- RAMSEY, MR; SHARPLESS, NE (2006). ROS as a tumour suppressor? **Nature Cell Biology**, 8(11): 1213-5.
- RAO, RV; CASTRO-OBREGON, S; FRANKOWSKI, H; SCHULER, M; STOKA, V; DEL RIO, G; BREDESEN DE; ELLERBY, HM (2002). Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. An Apaf-1-independent intrinsic pathway. **J Biol Chem** 277(24): 21836-42.
- ROBERTS, N; JAHANGIRI, M; XU, Q (2005). Progenitor cells in vascular disease. **J Cell Mol Med**, 9(3): 583-91.
- ROBINSON, J; COOPE, JM (1970). Method of determining oxygen concentrations in biological media, suitable for calibration of the oxygen electrode. **Anal Biochem**, 33: 390-9.
- ROOS, R (1995). Cell biology of atherosclerosis. **Ann Rev Physiol**, 57: 791-804.
- ROSS, R (1993). The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990's. **Nature**, 362: 801-9.
- ROSSA, MM; ROCHA-E-SILVA, TAA; TERRUGGI, CHB; TEDESCO, AC; SELISTRE-DE-ARAUJO, HS; BORISSEVICH, E; DEGTEREV, IA (2003). Comparasion of the citotoxicity of two nitroheterocyclic grugs (NHCD) towards transformed and non-transformed cells. **Pharmacol Res**, 48: 369-375.
- SARTORE, S; CHIAVEGATO, A; FAGGIN, E; FRANCH, R; PUATO, M; AUSONI, S; PAULETTO, P (2001). Contribution of adventitial fibroblasts to neointima formation and vascular remodeling. From innocent bystander to active participant. **Circ Res** 89: 1111-21.
- SARTORE, S; SCATENA, M; CHIAVEGATO, A; FAGGIN, E; GIURIATO, L; PAULETTO, P (1994). Myosin isoform expression in smooth muscle cells during physiological and pathological vascular remodeling. **J Vasc Res** 31(2):61-81.
- SATA, M; SAIURA, A; KUNISATO, A; TOJO, A; OKADA, S; TOLUHISA, T; HIRAI, H; MAKUUCHI, M; HIRATA, Y; NAGAI, R (2002). Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. **Nat Med** 8: 403-9.
- SCHAFER, FQ; BUETTNER, GR (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radic Biol Med** 30: 1191-212.
- SCHWARTZ, SM (1997). Smooth muscle migration in vascular development and pathogenesis. **Transpl Immunol** 5(4):255-60.
- SERINI, G; GABBIANI, G (1999). Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation. **Exp Cell Res**, 250(2): 273-83.
- SHIVA, S; OH, JY; LANDAR, AL; ULASOVA, E; VENKATRAMAN, A; BAILEY, SM; DARLEY-USMAR, VM (2005). Nitroxia: the pathological consequence of dysfunction in the nitric oxide-cytochrome c oxidase signaling pathway. **Free Radic Biol Med** 38(3):297-306.
- SOLDANI, C; BOTTONE, MG; PELLICCIARI, C; SCOVASSI, AI (2001). Two-color fluorescence detection of Poly (ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP-1) cleavage and DNA strand breaks in etoposide-induced apoptotic cells. **Eur J Histochem** 45(4): 389-92.

- SOUZA, HP; LIU, X; SAMOUILOV, A; KUPPUSAMY, P; LAURINDO, FR; ZWEIER, JL (2002). Quantitation of superoxide generation and substrate utilization by vascular NAD(P)H oxidase. **Am J Physiol (Heart Circ Physiol)** 282: H466-474.
- SOUZA, HP; LAURINDO, FR; ZIEGELSTEIN, RC; BERLOWITZ, CO; ZWEIER, JL (2001). Vascular NAD(P)H oxidase is distinct from the phagocytic enzyme and modulates vascular reactivity control. **Am J Physiol (Heart Circ Physiol)** 280: H658-667.
- SOUZA, HP; SOUZA, LC; ANASTACIO, VM; PEREIRA, AC; JUNQUEIRA, ML; KRIEGER, JE; LUZ, PL; AUGUSTO, O; LAURINDO, FR (2000). Vascular oxidant stress early after balloon injury: evidence for increase NAD(P)H oxidoreductase activity. **Free Radic Biol Med** 28(8): 1232-42.
- STRAUSS, BH; CHISHOLM, RJ; KEELEY, FW; GOTLIEB, AI; LOGAN, RA; ARMSTRONG, PW (1994). Extracellular matrix remodeling after balloon angioplasty injury in a rabbit model of restenosis. **Circ Res** 75(4):650-8.
- SZOCS, K; LASSEGUE, B; SORESCU, D; HILENSKI, LL; VALPPU, L; COUSE, TL; WILCOX, JN; QUINN, MT; LAMBETH, JD; GRIENDLING, KK (2002). Upregulation of Nox-based NAD(P)H oxidases in restenosis after carotid injury. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 22: 21-7.
- TAKAHASHI, A; N; YAMAKOSHI, K; IIDA, SI; TAHARA, H; NAKAYAMA, K; NAKAYAMA, KI; IDE, T; SAYA, H; HARA, E (2006). Mitogenic signalling and the p16INK4a-Rb pathway cooperate to enforce irreversible cellular senescence. **Nature Cell Biology**, 8(11): 1291-7.
- TOUYZ, RM; CHEN, X; TABET, F; YAO, G; HE, G; QUINN, MT; PAGANO, PJ; SCHIFFRIN, EL (2002). Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II. **Cir Res** 90(11):1205-13.
- VALKO, M; RHODES, CJ; MONCOL, J; IZAKOVIC, M; MANZUR, M (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem Biol Interact**, 160(1): 1-40.
- VAZQUEZ-PADRON, RI; LASKO, D; LI, S; LOUIS, L; PESTANA, IA; PANG, M; LIOTTA, C; FORNONI, A; AITOUCHE, A; PHAM, SM (2004). Aging exacerbates neointimal formation, and increases proliferation and reduces susceptibility to apoptosis of vascular smooth muscle cells in mice. **J Vasc Surg** 40(6):1199-207.
- WARNHOLTZ, A; NICKENIG, G; SCHULZ, E; MACHARZINA, R; BRASEN, JH; SKATCHKOV, M; HEITZER, T; STASCH, JP; GRIENDLING, KK; HARRISON, DG; BOHM, M; MEINERTZ, T; MUNZEL, T (1999). Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin-angiotensin system. **Circulation** 99: 2027-33.
- WALSH, K; SMITH, RC; KIM, HS (2000). Vascular cell apoptosis in remodeling, restenosis and plaque rupture. **Circ Res** 87: 184-8.
- WILSON, E; SUDHIR, K; IVES, HE (1995). Mechanical strain of rat vascular smooth muscle cells is sensed by specific extracellular matrix/integrin interactions. **J Clin Invest** 96: 2364-72.
- WINGLER, K; WUNSCH, S; KREUTZ, R; ROTHERMUND, L; PAUL, M; SCHIMIDT, HHHW (2001). Upregulation of the vascular NAD(P)H-oxidase isoforms Nox1 and

- Nox4 by the renin-angiotensin system in vitro and in vivo. **Free Radic Biol Med** 31(11): 1456-64.
- WINOCOUR, PD; RICHARDSON, M; KINLOUGH-RATHBONE, RL (1993). Continued platelet interaction with de-endothelialized aortae associated with slower re-endothelialization and more extensive intimal hyperplasia in spontaneously diabetic BB Wistar rats. **Int J Exp Pathol** 74(6):603-13.
- XU, W; CHARLES, IG; MONCADA, S (2005). Nitric oxide: orchestrating hypoxia regulation through mitochondrial respiration and the endoplasmic reticulum stress response. **Cell Res** 15(1):63-5.
- YANAGISAWA, M; KURIHARA, H; KIMURA, S; TOMOBE, T.Y; KOBAYASHI, M; MITSUI, Y; YAZAKI, Y; GOTO, K; MASAKI, T (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. **Nature**, 332: 411-15, .
- YONEDA, T; IMAIZUMI, K; OONO, K; YUI, D; GOMI, F; KATAYAMA, T; TOHYAMA, M (2001). Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. **J Biol Chem** 276(17): 13935-40.
- YOU, XM; MUNGRUE, IN; KALAIR, W; AFROZE, T; RAVI, B; SADI, AM; GROS, R; HUSAIN, M (2003). Conditional expression of a dominant-negative c-Myb in vascular smooth muscle cells inhibits arterial remodeling after injury. **Circ Res** 92(3):314-21.
- ZHANG, C; CAI, Y; ADACHI, MT; OSHIRO, S; ASO, T; KAUFMAN, RJ; KITAJIMA, S (2001). Homocysteine induces programmed cell death in human vascular endothelial cells through activation of the unfolded protein response. **J Biol Chem** 276(38): 35867-74.
- ZHAO, H; KALIVENDI, S; ZHANG, H; JOSEPH, J; NITHIPATIKOM, K; VASQUEZ-VIVAR, J; KALYANARAMAN, B (2003). Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. **Free Radic Biol Med**, 34: 1359-68.
- ZHOU, X; BECK, C; BOREN, J; AKYUREK, LM (2005). Diverse origin of vascular smooth muscle cells in the neointima-Review. **Anadolu Kardiyol Derg**, 5: 216-21.
- ZMIJEWSKI, JW; LANDAR, A; WATAABE, N; DICKINSON, DA; NOGUCI, N; DARLEY-USMAR, VM (2005). Cell signalling by oxidized lipids and the role of reactive oxygen species in the endothelium. **NIH-PA Biochem Soc Trans**, 33(Pt 6): 1385-9.