

Valerio Garrone Barauna

**ECA e Receptor AT1 participam da
mecanotransdução de sinais hemodinâmicos
independentemente da angiotensina II**

**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. José Eduardo Krieger

São Paulo

2009

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular (LBGCM) do Instituto do Coração (InCor) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora Nacional de Estudos e Projetos (FINEP) e Fundação Zerbini.

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

Referências: adaptado de *International Commitee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

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

Dedico esta tese a duas pessoas:

Em primeiro lugar a minha mãe que, apesar de ter falecido precocemente, enquanto pôde estar presente sempre me incentivou, me apoiou e esteve do meu lado mesmo quando o caminho escolhido era o errado ou o mais difícil;

Em segundo lugar a Luciene Cristina Gastalho Campos Luiz ("Lucisneide) por tudo que passamos nestes tres anos de Incor, por todas as experiencias trocadas, pelas risadas dadas, pelo favores oferecidos, pela orientação dada, pela dedicação ensinada e acima de tudo pelo companheirismo fosse a hora que fosse, o dia que fosse ou o experimento que fosse. Essa tese de doutorado teria parado MUITO antes dos 72,3% se não fosse pela sua incansável e irritante busca pelo perfeccionismo. Mais uma vez meu muitíssimo obrigado.

Ao meu orientador, José Eduardo Krieger, pela oportunidade oferecida para realizar essa tese, pela sempre disponibilidade para discutir os dados, pela paciência em saber contornar, as vezes, minha teimosia e por sempre estar encorajando seus alunos a sempre crescerem;

À Dra Ayumi Myiakawa ("Ayumis") por ter me aceitado de paracadistas no seu grupo, por ter sempre discutido comigo idéias malucas, inviáveis e absurdas, e por ter tentado me colocar no rumo desta tese;

A os integrantes do grupo de biologia vascular: Vinicius Bassanezi ("Vinicastro") pelas intermináveis discussões filosóficas sobre ciência e pelas aulas sobre economia; Thais Girão ("Thaizera"), companheira de churrasco, botecos e reuniões à segundas-feiras; Chester Bittencourt ("Blessor") pelas viagens, em todos os sentidos; Thais Borin, por me acolher na cidade quando eu não tinha para onde correr;

Aos companheiros de república, em especial ao Marcel pelas intermináveis discussões sobre ciência, Foucault e pós graduação, ao

Flávio pela ajuda em 50% de todos os experimentos envolvendo o receptor A71, pelos contos verídicos de Divinópolis e pelas inúmeras vezes que veio me buscar no incor e ao Rodrigo pelo companheirismo;

Aos amigos do 9º andar por me permitirem utilizar o espaço físico, por colaborarem em tudo que eu precisei e por sempre estarem disponíveis para ajudar a resolver qualquer problema, Joao Wosniak, Denise de Castro, Victor Debbas, Léozinho, Marcos, Luciana e Célio;

À Profa Dra Edilamar Menezes de Oliveira, mais que uma orientadora de mestrado, uma orientadora de vida;

Ao único remanescente irmão de laboratório desde a iniciação científica, Julio e a agora sua esposa Vanessa pelos conselhos e pela oportunidade de visita-lo em Stanford;

Ao meu pai e irmã por toda a ajuda que deram apesar de continuarem achando que estou no caminho errado;

Ao Gustavo e sua esposa Natalie que estiveram ao meu lado antes mesmo de eu chegar ao Incor para o Doutorado;

À amiga Juliana Nakamuta, maior incentivadora de bancada;

Aos amigos de todas as horas, aqueles que de dia ou de noite, com chuva ou sol estavam no incor ou no boteco, Fafá, Alessandro, Débora Sobreira e Hozana;

Ao Wilson Barros Luiz e a "dona" Rita pela compreensão nos momentos que a Luciene, esposa e filha, respectivamente, veio me socorrer;

Ao Prof. Dr Cláudio Costa-Neto pela colaboração nos experimentos com o receptor AN de maneira a tornar o segunda capítulo desta tese possível, e a sua orientanda Rosana por colaborar no experimentos de binding e transiente de cálcio pelo confocal;

À Laura pelo auxílio nas dosagens de nitirto nos meios de cultura;

Aos staffs do laboratório Maíde, Isabel Cristina, Silvana, Arrudão, Dona Antônia, Genilton, Marcos, Samatha, Daniela Jardim e ao "Pedro" Newton;

Ao Senhor Abraúvel pela contribuição de maneira a pagar um dívida com um "amigo" que financiou meus estudos quando não tinha verba para arcar com os gastos e por financiar "algumas festinhas";

À Priscila Chinarro pelos momentos divertidos e desconfiados;

À Carol Lauigni pela ajuda nos experimento de transiente de cálcio no citometro de fluxo;

À Renata Carmona pelos protocolos discutidos;

Ao Prof Francisco Laurindo por abrir as portas de seu laboratório e estar sempre disposto a discutir meus resultados;

Ao Prof Dr Laurence Pinkus, do NIF, por toda a preocupação em nos acolher tão bem quando em visita aos EUA.

Ao Prof Dr José Xavier Neto, pelas oportunidades de sempre estar discutindo meus dados nas reuniões semestrais do laboratório desde quando meus resultados eram ainda apenas a ponta do iceberg e pelas magnificas conferencias proferidas que sempre pude acompanhar com muito entusiasmo;

Ao Prof Dr Paulo de Oliveira por sempre questionar meus dados e me ensinar desde os fundamentos mais básicos da bioquímica;

Ao Tiago Pereira por, mesmo sempre derrotado em suas tentativas, nunca ter deixado de lutar pelo o que achava correto e nunca ter deixado de lado suas opiniões e assim ter me mostrado que devemos insistir até o fim nas nossas idéias;

Ao Tiago Sobreira pelas inúmeras vezes que me permitiu vir ao laboratório aos finais de semana;

E a todos os amigos, que se fosse citar nominalmente ocupariam mais umas 1 paginas dessa tese, e que de uma forma direta ou indireta

contribuíram por tornar essa tese possível nesses 3 nos de convivência no laboratório, o meu muito obrigado;

A Fapesp pelo apoio financeiro.

.... Improving.

Making progress.

Always....

Sumário

SUMÁRIO	I
ÍNDICE DE FIGURAS	V
ÍNDICE DE TABELAS	VII
LISTA DE ABREVIATURAS	VIII
RESUMO	XII
ABSTRACT	XIV
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	16
3. MÉTODOS	18
3.1. CULTURA DE CÉLULAS	18
3.1.1. CHINESE HAMSTER OVARY (CHO).....	18
3.1.2. CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS ENDOTELIAIS DE VEIA SAFENA (SVEC) HUMANA.....	18
3.1.3. CULTURA PRIMÁRIA DE FIBROBLASTOS CARDÍACOS.....	19
3.2. CONSTRUÇÃO DOS VETORES	20
3.3. TRANSFEÇÃO PERMANENTE	21
3.4. ENSAIO DE GENE REPORTER – ATIVIDADE DA LUCIFERASE	21
3.5. ESTIMULOS FÍSICOS <i>IN VITRO</i>	22
3.5.1. PRODUÇÃO DE <i>SHEAR STRESS</i>	22
3.5.2. PRODUÇÃO DE ESTIRAMENTO.....	24

3.6. ATIVIDADE DA ECA.....	25
3.7. EXTRAÇÃO DE RNA.....	26
3.8. SÍNTESE DE CDNA	26
3.9. RT-PCR	27
3.9.1. RT-PCR EM TEMPO REAL	27
3.10. WESTERN BLOT	28
3.11. TRANSIENTE DE CALCIO	29
3.12. BINDING.....	30
3.13. DOSAGEM DE NITRITO	31
3.14. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
4. RESULTADOS – CAPÍTULO I.....	34
4.1. CONSTRUÇÃO DOS VETORES	34
4.2. CONTRUÇÃO DAS LINHAGENS CELULARES	38
4.2.1. EXPRESSÃO GÊNICA	39
4.2.2. EXPRESSÃO PROTEICA.....	40
4.2.3. ATIVIDADE DA ECA NO LISADO CELULAR	41
4.2.4. ATIVIDADE DA ECA NO MEIO DE CULTURA	44
4.3. ECA COMO MECANOTRANSDUTOR	46
4.3.1. ESTIRAMENTO CELULAR	46
4.3.2. SHEAR STRESS.....	50
4.4. REGULAÇÃO DA ECA PELAS FORÇAS HEMODINÂMICAS	56

4.5. PARTICIPAÇÃO DA C-JUN N-TERMINAL KINASE.....	59
5. RESULTADOS – CAPÍTULO II.....	61
5.1. CONFIRMAÇÃO DA EXPRESSÃO DO RECEPTOR AT1 NAS CÉLULAS CHO.....	61
5.1.1. EXPRESSÃO GÊNICA DO RECEPTOR AT1A	61
5.1.2. ENSAIO DE BINDING.....	62
5.1.3. TRANSIENTE DE CÁLCIO.....	63
5.1.4. SINALIZAÇÃO INTRACELULAR.....	65
5.2. ATIVAÇÃO DO RECEPTOR AT1 PELO <i>SHEAR STRESS</i>	67
5.3. CAPACIDADE DOS BLOQUEADORES DO RECEPTOR AT1 EM IMPEDIR A ATIVAÇÃO DO RECEPTOR PELO <i>SHEAR STRESS</i> E POTENCIALIZAR A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO	68
5.4. INTERAÇÃO <i>SHEAR STRESS</i> E ANGIOTENSINA II SOBRE O RECEPTOR AT1	80
5.5. VIA INTRACELULAR ATIVADA PELO AT1A EM RESPOSTA AO <i>SHEAR STRESS</i>	84
5.6. MODIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DO RECEPTOR AT1 PELO <i>SHEAR STRESS</i> PROLONGADO.....	90
6. DISCUSSÃO	94
7. CONCLUSÕES.....	111
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
ANEXO I.....	133

ANEXO II	136
ANEXO III	138

Índice de Figuras

Figura 1	03
Figura 2:	05
Figura 3:	05
Figura 4:	07
Figura 5:	11
Figura 6:	23
Figura 7:	24
Figura 8:	35
Figura 9:	37
Figura 10:	38
Figura 11:	39
Figura 12:	41
Figura 13	43
Figura 14:	45
Figura 15:	48
Figura 16	50
Figura 17:	52
Figura 18:	54
Figura 19:	56
Figura 20:	58
Figura 21:	60
Figura 22:	62
Figura 23:	63
Figura 24:	64
Figura 25:	66

Figura 26:	67
Figura 27:	69
Figura 28:	71
Figura 29:	73
Figura 30:	74
Figura 31:	76
Figura 32:	78
Figura 33:	80
Figura 34:	83
Figura 35:	85
Figura 36:	86
Figura 37:	88
Figura 38:	89
Figura 39:	91
Figura 40:	92

Índice de Tabelas

Tabela 1.....	27
---------------	----

Lista de Abreviaturas

Lista de Abreviaturas

- APS** – perssulfato de amônio
- AT1** – receptor de angiotensina II subtipo 1
- AT2** – receptor de angiotensina II subtipo 2
- Arg** - aminoácido arginina
- BRAs** – Bloqueadores do receptor AT1
- BSA** – albumina sérica bovina
- CAPPesq** – Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
- CK2** – caseína quinase 2
- Cap** – Captopril
- Cand** - Candesartan
- cDNA** – ácido desoxirribonucléico complementar
- CHO** – células de ovário de hamster chins
- COX-2** – ciclooxigenase 2
- Da** – Dalton
- DAB** – diaminobenzidina tetrahydroclorida
- DMEM** – meio de cultura de células modificado da Dulbecco
- DNA** – ácido desoxirribonucléico
- dNTPs** – desoxinucleotídeos trifosfato
- DTT** – 1,4-Dithioerythritol
- ECA** – Enzima Conversora de Angiotensina I
- ECs** – células endoteliais
- EDTA** – ácido etilenodiaminotetracético
- eNOS** – óxido nítrico sintase endotelial
- ERK** – *Extracelular regulated kinase*
- FBS** – soro fetal bovino
- GPCR** – receptor acoplado a proteína-G
- H₂O₂** – peróxido de hidrogênio
- HCl** – ácido clorídrico
- HRP** – Horseradish Peroxidase (planta horseradish da família *Amoracia rusticana*)
- ICAM-1** – molécula de adesão intracelular-1

JAK-2 – *Janus-activated kinase*

JNK – *c-Jun N-terminal Kinase*

KCl – cloreto de potássio

kDa – QuiloDalton

MAP quinase – proteína quinase ativada por mitógeno

MKK-7 – *mitoses kinase kinase 7*

Los - Losartan

µg - microgramas

MgCl₂ – cloreto de magnésio

MMP – metaloproteinase matricial

NaCl – cloreto de sódio

Na₂HPO₄ – fosfato de sódio dibásico

NH₄HCO₃ – bicarbonato de amônio

PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida

pb – pares de bases

PBS – solução de bicarbonato de sódio e fosfato

PBST – solução de bicarbonato de sódio e fosfato e Tween

PCR – Reação em cadeia da polimerase

pH – Potencial hidrogeniônico

PM – peso molecular

PMSF – Fluoreto de fenilmetanosulfonil

RNA – ácido ribonucléico

rpm – Rotações por minuto

RT-PCR – transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase

Ser – aminoácido serina

SRA – Sistema Renina Angiotensina

SDS –Dodecil sulfato de sódio

SVEC – célula endotelial de veia safena

Telm - Temisartan

TEMED – N,N-Tetrametiletlenodiamina

UF – Unidade de Fluorescencia

VCAM-1 – molécula de adesão das células vasculares

Resumo

Resumo

Barauna V. G. **ECA e Receptor AT1 participam da mecanotransdução de sinais hemodinâmicos independentemente da angiotensina II** [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 143p.

No sistema cardiovascular, modificações de pressão e *shear stress* devido ao fluxo sanguíneo influenciam a morfologia e a patofisiologia dos vasos sanguíneos e do coração. Neste trabalho, estudamos o papel de duas moléculas transmembrânicas do Sistema Renina-Angiotensina: a Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) e o Receptor de Angiotensina do tipo I (AT1) como mecanosensoras e mecanotransdutoras dessas forças físicas.

A ECA foi por muito tempo conhecida somente por sua ação em converter Angiotensina I em Angiotensina II e por inativar a Bradicidina. Recentemente foi demonstrado que a ECA, além dos efeitos enzimáticos já conhecidos, pode ter sua cauda citoplasmática fosforilada e desencadear vias de sinalização intracelular. Observamos que o *shear stress*, mas não o estiramento, induziu a diminuição da fosforilação da porção citoplasmática da ECA após 5 minutos de estímulo e se mantém até 18 horas. Demonstramos também que a porção extracelular da ECA tem papel fundamental como mecanosensora e que a via intracelular da JNK participa da mecanotransdução em resposta ao *shear stress*. Além disto, demonstramos que a diminuição da fosforilação da ECA está associada na diminuição da sua expressão pelo *shear stress*.

O receptor AT1 é a principal molécula efetora das ações da angiotensina II. Recentemente foi demonstrado que esse receptor pode também ser ativado por forças físicas, estiramento celular, independentemente da presença da angiotensina II. No presente estudo, observamos que o receptor AT1 é ativado pelo *shear stress* e que o Candesartan, mas não o Losartan, é capaz de impedir esta resposta. A via intracelular ativada é dependente de proteína-G e da entrada de cálcio do meio extracelular. Interessantemente, a pré-exposição dos receptores ao *shear stress* diminuem a responsividade dos receptores ao peptídeo Angiotensina II porém a Angiotensina II não é capaz de inibir a ativação pelo *shear stress*.

Em conjunto, demonstramos novos mecanismos de ação da ECA e do AT1 que são duas importantes moléculas do sistema renina angiotensina. A modulação destes componentes por estímulos mecânicos traz novas possibilidades de intervenções farmacológicas sobre esse sistema bem como o melhor entendimento da participação dessas moléculas na fisiopatologia cardiovascular.

Descritores: 1. Mecanotransdução celular 2. Sistema renina-angiotensina 3. *Shear stress* 4. Peptidil dipeptidase A

Abstract

Abstract

Barauna V. G. **ACE and AT1 receptor are involved in mechanotransduction by hemodynamica forces independently of angiotensin II** [thesis]. São Paulo: Medical School, University of São Paulo; 2009. 143p.

Hemodynamic forces such as pressure and *shear stress* modulate the patophysiology of the cardiovascular system. In this study, we investigated two transmembranic key molecules of the renin-angiotensin system (RAS) as mechanosensors and mechanotransducers of physical forces: Angiotensin Converting Enzyme (ACE) and Angiotensin II type 1 Receptor (AT1).

ACE is an enzyme that converts angiotensin I in angiotensin II. Recently, it was demonstrated that ACE cytoplasmic tail can be phosphorylated by ACE inhibitors and elicited intracellular cell signaling. Here, we observed that *shear stress*, but not stretch, decreased ACE cytoplasmic phosphorylation after 5 minutes and maintained up to 18 hours. ACE extracellular portion act as mechanosensor and JNK pathway participate in the mechanotransduction activation. In addition, we also demonstrate that decrease in ACE phosphorylation is involved in ACE expression downregulation by *shear stress*.

AT1 receptor is the main effector molecule of angiotensin II cellular responses. It has recently been shown that AT1 receptor can directly be activated by mechanical stretch stress through an angiotensin-II-independent mechanism. In the present study, we observed that *shear stress* also activates AT1 receptor which is blocked by Candesartan, but not by Losartan. The intracellular pathway activated by *shear stress* involves both G-protein and extracellular calcium. Interestingly, preconditioning of AT1 receptor by *shear stress* impairs its responsiveness to angiotensin II while the pretreatment with angiotensin II still allow AT1 responsiveness to *shear stress*.

Altogether, we demonstrated that ACE and AT1 receptor activates intracellular signal in response to mechanical force. This new concept for the RAS, the modulation of these molecules by mechanical forces gives new insigh into the discovery for pharmacological interventions to the RAS

Descriptors: 1. cellular mechanotransduction 2. renin-angiotensin system 3. *Shear stress* 4. dipeptidyl-carboxypeptidase

Introdução

1. Introdução

A conversão de forças físicas em informações bioquímicas é essencial para o desenvolvimento biológico. Esse é o estímulo mais simples pelo qual células e organismos adquirem sua conformação estrutural e formam estruturas tridimensionais. A capacidade de mecanotransdução já foi evidenciada nos diversos filos biológicos desde bactérias até mamíferos (45).

Exemplos da importância das forças físicas no nosso organismo podem ser encontrados nos diversos sistemas. No sistema cardiovascular, por exemplo, a pressão e o *shear stress* oriundos do bombeamento sanguíneo influenciam a morfologia e patofisiologia do coração e vasos. As forças da gravidade e da contração muscular modelam o formato dos ossos. A audição e o tato são transmitidos por meio de respostas neuronais baseadas na pressão. O enchimento e esvaziamento pulmonar, através do estiramento das paredes do pulmão regulam seu ciclo. O crescimento coordenado de tecidos é regulado pelas forças físicas geradas pelo contato celular entre si, e a ausência desse mecanismo contribui para o crescimento desregulado celular e conseqüentemente para o surgimento de tumores.

Essa imensa gama de eventos mecanosensitivos torna improvável o seu controle por um ou poucos sistemas de mecanotransdução. Essa percepção não surpreende se considerarmos o grande número de componentes celulares expostos a essas forças físicas. O estímulo físico, assim como o hormonal, representado por fatores de crescimento, peptídeos vasoativos e neurotransmissores, necessita de moléculas receptoras de

maneira a iniciar e transmitir uma série de eventos intracelulares até o núcleo. Geralmente esta resposta inicia-se pela alteração conformacional de uma molécula que transmite a informação adiante para dentro da célula. Assim como processos de fosforilação ou outras modificações pós-traducionais são processos de transdução de sinais por alterar a conformação de proteínas, efeitos conformacionais induzidos por forças físicas podem representar um mecanismo geral pela qual as moléculas mecanosensoras iniciam o processo de mecanotransdução.

O sistema vascular recebe importante influência do *shear stress*, força de cisalhamento entre o sangue e a camada endotelial dos vasos, para a manutenção de sua homeostasia (20). Rápidas alterações do fluxo causam o relaxamento do músculo liso pela liberação de óxido nítrico (NO) pelo endotélio. A persistência do fluxo alterado induz o remodelamento do vaso. Por exemplo, a exposição de uma veia ao padrão de fluxo arterial induz à expressão de genes que contribuem para o remodelamento da parede venosa para suportar a nova condição hemodinâmica (11). Outra influência do *shear stress* pode ser observada em regiões de maior predisposição a formação de lesão aterosclerótica. A aterosclerose geralmente ocorre de maneira seletiva em regiões de curvatura ou bifurcação vascular, onde o padrão de fluxo sanguíneo que é laminar ou unidirecional torna-se turbilhonado ou oscilatório, com diminuição do *shear stress* figura 1 (21, 69, 112).

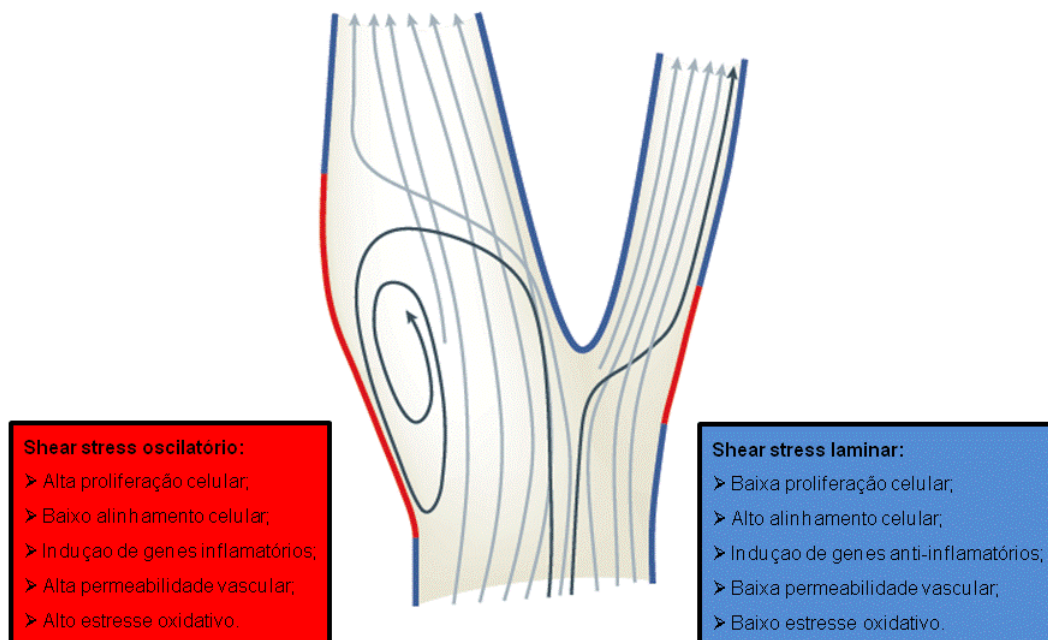


Figura 1: Bifurcação vascular com diferentes padrões de fluxo: A cor azul representa regiões de *shear stress* laminar. São regiões com menor incidência de desenvolvimento de processos inflamatórios. A cor vermelha representa regiões de *shear stress* oscilatório nas regiões de bifurcação dos vasos. São regiões de maior incidência de desenvolvimento de processos inflamatórios. Os quadros ao lado informam características determinadas pelo padrão de *shear stress* de cada uma das regiões (41).

No coração, a força tensional sobre as paredes das câmaras cardíacas (*mechanical stretch* ou estiramento celular) devido ao maior trabalho cardíaco é o principal determinante da fisiologia e patologia cardíaca (58, 64). Alterações súbitas na sobrecarga cardíaca, em indivíduos normais, estão associadas ao aumento do débito cardíaco pela ativação de sistemas neuro-humorais ou pelo mecanismo de Frank-Starling. A necessidade de trabalho cardíaco aumentado por períodos prolongados induz ao remodelamento cardíaco para compensar a força tensional da

sobrecarga hemodinâmica. O aumento da massa cardíaca exacerbado na hipertensão arterial é um dos principais preditores do aumento do risco de morte cardiovascular (36). A regressão do remodelamento cardíaco pode ser obtida, por exemplo, em situações onde somente os valores de pressão arterial são normalizados. Mesmo o aumento local de quase 100x na concentração de fatores hipertróficos, não necessariamente induz o remodelamento cardíaco que só é observado quando a pressão arterial e consequentemente a sobrecarga cardíaca estão aumentados (120). Em um modelo de coartação da aorta em gatos, foi demonstrado que músculo papilar cujo tendão foi retirado de maneira a não receber tensão não aumentou a síntese protéica, enquanto áreas adjacentes cujo tendão foi mantido desenvolveram hipertrofia. Ainda nesse modelo, foi demonstrado também que a hipertrofia cardíaca também é observada mesmo após a desnervação ventricular dos receptores adrenérgicos (19, 57).

Para que todos esses eventos dependentes do *shear stress* e do estiramento sejam percebidos pela célula, um grande número de moléculas mecanosensoras tem sido propostas tanto para o *shear stress* (figura 2) como para o estiramento (figura 3). Trata-se de proteínas transmembrânicas que sejam capazes de perceber o estímulo físico extracelular e transformá-lo em sinal bioquímico intracelular.

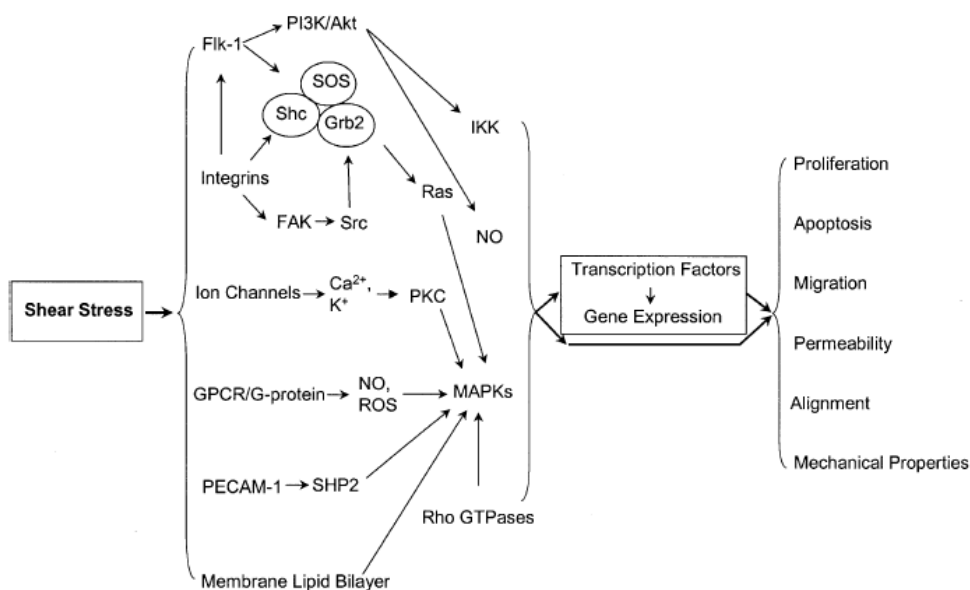


Figura 2: Esquema dos principais mecanosensores descritos ao *shear stress*, com a via intracelular ativada e a modulação na expressão gênica e funcional celular (67).

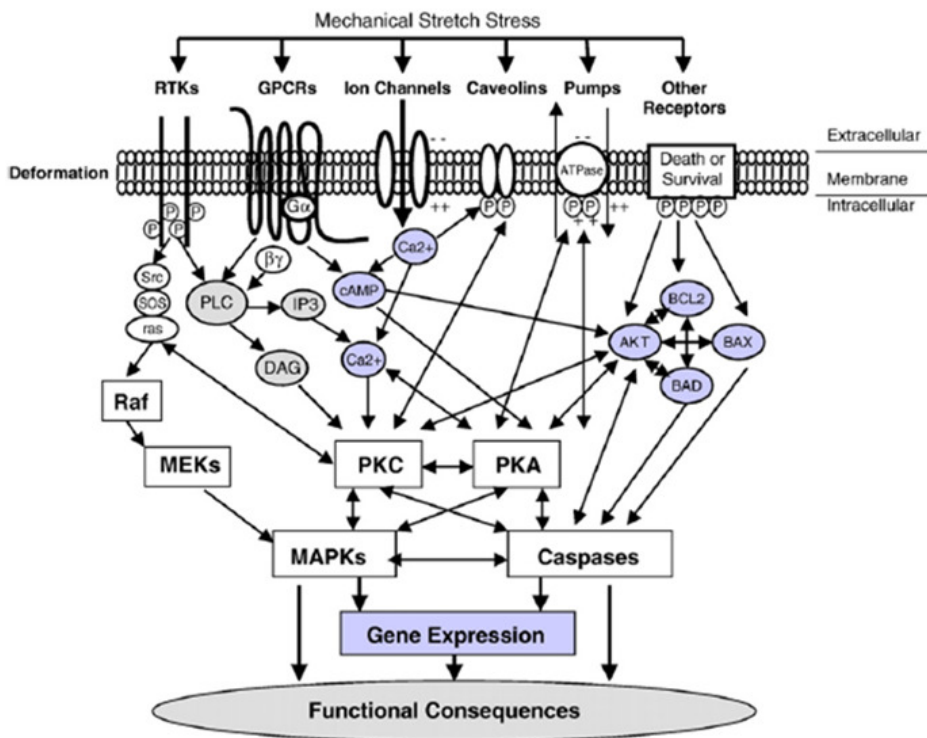


Figura 3: Esquema dos principais candidatos a mecanosensores ao estiramento celular (66).

No presente trabalho, investigamos se 2 importantes moléculas transmembrânicas do sistema renina angiotensina (SRA), a enzima conversora de angiotensina I (ECA) e o receptor de angiotensina II do tipo I (AT1), podem também participar como mecanosensores a forças hemodinâmicas. O interesse por esse sistema hormonal em específico deve-se a sua importância como modulador da estrutura e função do sistema cardiovascular.

O SRA é um, cada vez mais, complexo sistema hormonal associado com o controle da pressão arterial tanto a longo quanto a curto prazo, além da manutenção da homeostasia hidroeletrolítica do organismo. A visão clássica deste sistema, que perdurou por mais de 50 anos, resumia o sistema como uma cascata de eventos que se iniciava com a quebra do angiotensinogênio hepático pela renina renal de maneira a formar o decapeptídeo angiotensina I. Uma vez na circulação, a angiotensina I era clivada pela ECA presente quase que exclusivamente nas células endoteliais pulmonares formando o até então único peptídeo ativo do sistema, a angiotensina II. Esse peptídeo, por sua vez atuaria sobre receptores específicos (AT1 e AT2) induzindo os efeitos biológicos descritos (78).

Entretanto nas últimas 2 décadas principalmente, novos conhecimentos foram adicionados ao sistema de tal forma que hoje seu entendimento e controle se ampliou muito. Do ponto de vista funcional, o conceito de “SRA locais” tem sido proposto em diferentes tecidos cuja regulação e função independem do SRA clássico ou sistêmico (94). Mais

impactante ainda e intrigante tem sido o número de novos componentes que vem sendo descobertos para esse sistema: novos receptores (AT₃, AT₄ (118), Mas (105) e Receptores para a Renina (51)), novas ECAs (ECA-2 (105) e ECA-3 (99)), peptídeos biologicamente ativos (Ang 1-7, entre outros (121)) e vias alternativas de produção dos peptídeos (Catepsina G, Tonina, Quimase, Elastase-2, entre outras (65)). A figura 4 mostra esquematicamente o SRA clássico e uma versão mais recente e atualizada.

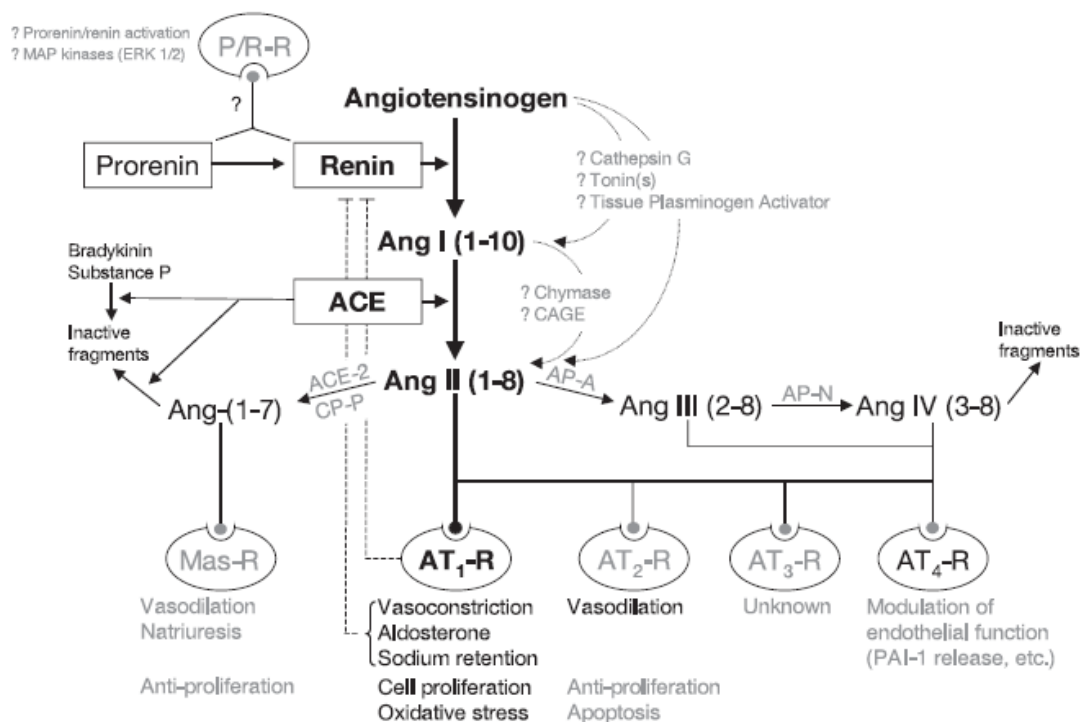


Figura 4: Esquema atualizado do sistema renina angiotensina (SRA). O SRA clássico está destacado em negrito adicionado dos novos componentes representados em cinza. ACE = Enzima Conversora de Angiotensina, Ang = Angiotensina, AP-A/AP-N = Aminopeptidase A e Aminopeptidase N, AT_xR = Subtipos dos receptores de angiotensina, CP-P = Carboxipeptidase M, P/R-R = Receptor de Renina/Pro-renina, PAI-1 = Inibidor do ativador de plasminogênio (5).

O estudo da ECA e do receptor AT1 em específico como moléculas candidatas para a mecanotransdução deve-se a algumas características que os tornam candidatos a participarem da mecanotransdução do sistema cardiovascular:

Estrutura e Localização: Tanto a ECA quanto o receptor AT1 são proteínas transmembrânicas capazes de ativar vias de sinalização intracelular (figura 5 a e b):

1) A ECA é uma glicoproteína transmembrânica com 1256 aminoácidos na sua porção extracelular, 20 na porção transmembrânica e 30 na sua porção intracelular (18).

- Na sua porção extracelular localizam-se 2 sítios catalíticos ativos (N-terminal e C-terminal) responsáveis pelas suas principais funções como enzima - a quebra da angiotensina I para angiotensina II e a degradação da bradicinina (por essa segunda função ela também é conhecida como cininase II e faz parte do sistema Calicreína-Cinina)(30).

- Sua pequena porção intracelular de 30 aminoácidos apresenta 3 sítios de serina passíveis de fosforilação (sequência humana). Entretanto, 13 aminoácidos altamente conservados entre diversas espécies chamam a atenção. Dentre eles, recentemente foi descrito que o resíduo de Ser¹²⁷⁰ pode ser fosforilado pela CK2 (caseína kinase-2) em resposta aos inibidores da ECA (iECAs) (ref). Uma vez fosforilada, ocorre o recrutamento e ativação da MKK7, seguida de fosforilação da c-jun N-terminal quinase (JNK), fosforilação de fatores de transcrição c-jun, translocação desses fatores para

o núcleo, formação de dímeros e ligação ao DNA de maneira a regular a expressão gênica celular. Essa via de sinalização desencadeada pela fosforilação da ECA é responsável pelo aumento da expressão da própria ECA e da ciclo-oxigenase-2 (COX-2) (29). O descobrimento desta alça de retroalimentação positiva da ECA explica, pelo menos em parte, porque pacientes tratados cronicamente com iECAs, necessitam regularmente aumentar a dosagem do fármaco utilizada de maneira a impedir a formação da angiotensina II (102). Além disso, lança-se a idéia de que benefícios observados com a utilização dos inibidores da ECA podem estar ocorrendo não somente pela ocupação do sítio catalítico da ECA, mas também pela ativação de vias de sinalização intracelular.

2) O Receptor AT1 é uma proteína integral de membrana com 359 aminoácidos, pertencente a família dos receptores com 7 domínios transmembrânicos acoplados a proteína G. Apesar dos principais efeitos da ativação pelo agonista Ang II ser atribuída a ativação da proteína heterotrimérica $G_{\alpha_{q/11}}$, formação de IP_3 e liberação de cálcio intracelular (24), o receptor é também capaz de ativar vias intracelulares independentes a proteína G. Entre elas, realizar *cross-talking* com diversas moléculas com atividade tirosina kinase, incluindo receptores tirosina kinase (EGFR, PDGF e IR) e não receptores tirosina kinase (Src, Pyk2, FAK e Jak-2) (87). Além disso, alguns efeitos patológicos vasculares da Ang II têm sido atribuídos a capacidade do receptor em ativar NAD(P)H oxidases e conseqüentemente estimular a produção de espécies reativas de oxigênio (115). Mais

recentemente foi descrito que a β -arrestina, uma proteína inicialmente identificada como componente do complexo protéico responsável pela desensibilização e internalização de receptores acoplados a proteína G, também pode funcionar como uma proteína ancoradora para diversas moléculas de sinalização intracelular em resposta a ativação do receptor AT1 (122). Curiosamente, apesar de existirem diversas vias de ativação intracelular, todas elas em um momento ou outro podem levar a ativação da mesma proteína intracelular, a ERK1/2. Com a possibilidade de ativação de tantas vias intracelulares, dúvidas como de que maneira a células “decide” pela ativação de uma via em detrimento da outra ainda aguardam uma resposta. Especula-se que a localização intracelular e o tempo de ativação das diferentes vias determinem cada resposta em particular (47). Estudos já tem demonstrado que o pico de ativação das diferentes vias ativadas pela Ang II ocorrem em tempos distintos (50, 87, 114). Além disso, diferenças na afinidade do receptor pelo ligante, alterações na conformação do receptor, o tipo celular envolvido e todo o micro ambiente em questão podem exercer papel fundamental na sinalização ativada (47, 49).

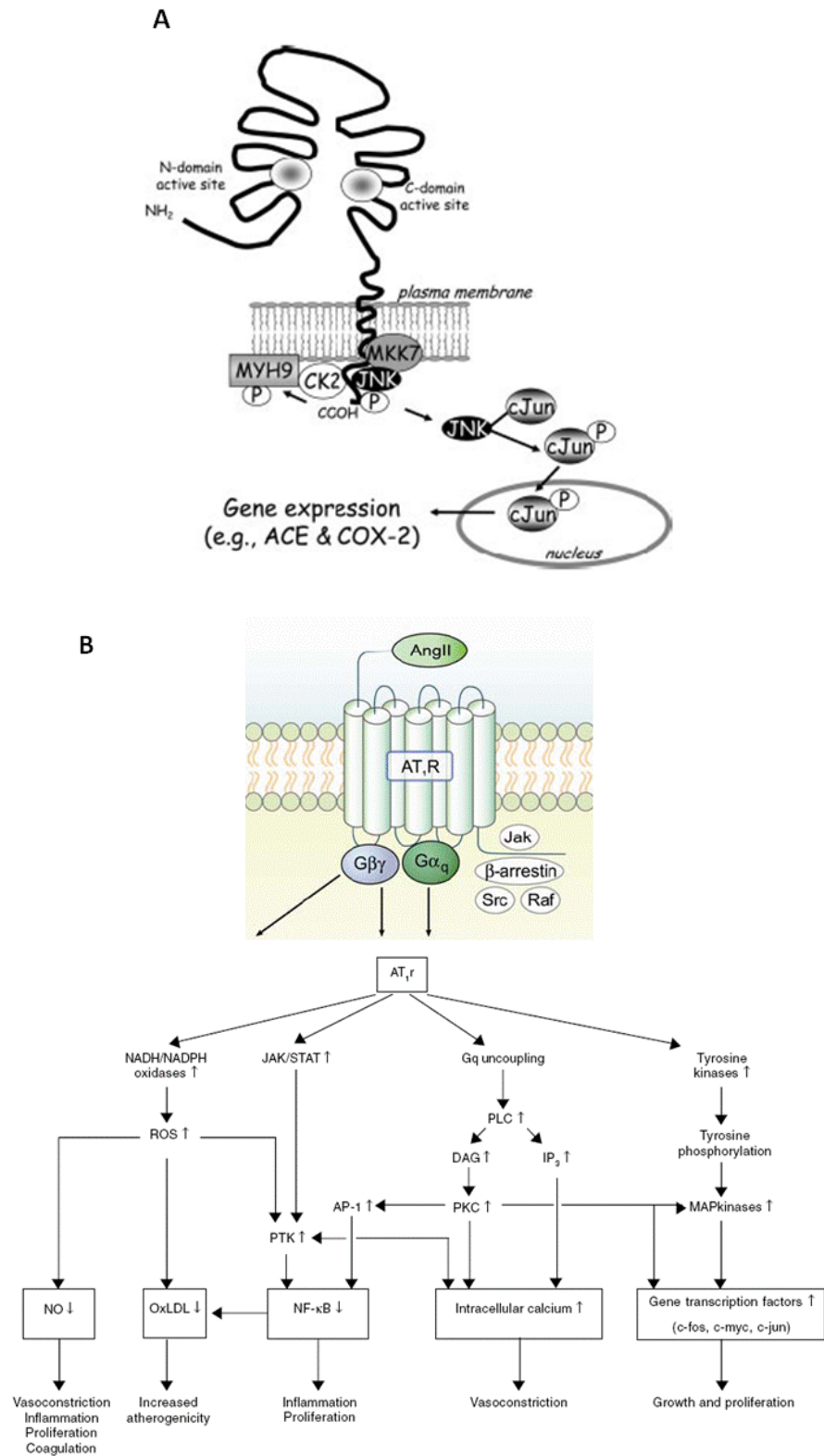


Figura 5: Estrutura e sinalização da A) ECA (29) e B) receptor AT1 (15).

Expressão: Tanto a ECA quando o receptor AT1 são expressos nos tipos celulares expostos a forças físicas. Além disto, a regulação da expressão destes genes exerce papel importante na fisiopatologia cardiovascular.

1) O aumento da expressão da ECA na artéria carótida de rato resulta no desenvolvimento de hipertrofia vascular de maneira independente de fatores sistêmicos e hemodinâmicos (81), além disso, o bloqueio da produção da ECA inibe a formação da neoíntima induzida pela angioplastia por balão, mesmo na ausência da ativação do SRA (82), e previne o remodelamento cardíaco, morbidade e mortalidade pós-infarto agudo do miocárdio (2, 97).

2) Dados experimentais sugerem que a ativação aumentada dos receptores AT1 promove formação aterosclerose por indução de disfunção endotelial e aumento da produção vascular de espécies reativas de oxigênio (86). Animais KO para o receptor AT1 (AT1a e AT1b) tem pressão arterial e peso cardíaco menores que os animais selvagens (31).

Farmacologia: Elevada pressão arterial é considerada como o maior fator de risco para doenças cardiovasculares (14). Fármacos que regulam a ativação dessas duas moléculas (iECAS, inibidores da Enzima Conversora de Angionsina I; e BRAs, Bloqueadores do Receptor de Angiotensina) são rotineiramente escolhidas como primeira abordagem no tratamento da hipertensão (130). Aproximadamente 600 milhões de indivíduos pelo mundo são hipertensos e aproximadamente 7,14 milhões de mortes ocorrem por

ano devido a hipertensão. Com isso, o mercado para agentes anti-hipertensivos é enorme e conta com considerável participação de fármacos que atuam no SRA. Em 2006, a venda mundial dos iECAs atingiram 10 bilhões de dólares e dos BRAs 16,7 bilhões de dólares. Esses valores são 3,9% e 15,3% maiores que os valores obtidos em 2005 para iECAs e BRAs, respectivamente (1). Assim, o completo entendimento das mais variadas formas de ativação desses dois alvos, ECA e AT1, bem como o melhor conhecimento do modo de atuação desses fármacos pode contribuir para o desenvolvimento de novos fármacos, ou melhora dos atuais, de maneira a proporcionar bloqueio do SRA mais eficiente.

Evidências de função distinta às funções classicamente descritas:

1) A regulação da ECA pelo *shear stress* já vem sendo estudada no laboratório de Genética e Cardiologia Molecular. Já foi demonstrado que o *shear stress* laminar diminui a expressão e a atividade da ECA em células endoteliais, evidenciando mais um efeito anti-aterogênico para o *shear stress* (101). Pesquisou-se então se esta adaptação seria mais um dos efeitos benéficos da produção de NO pelo *shear stress*. Entretanto, apesar da expressão da ECA em condições normais poder ser regulada por moléculas doadoras de NO, o NO produzido pelo *shear stress* não modula a expressão da ECA (96). Mais recentemente foi identificado que esta resposta é mediada por 2 novos elementos regulatórios: Barbie-box e GAGA-box (80). Foi demonstrado também que o iECAs previnem o processo de remodelamento cardíaco devido a disfunção ventricular após infarto do

miocárdio mesmo em camundongos KO para o receptor AT1, sugerindo um possível efeito benéfico da inibição da enzima além da diminuição da ação da Ang II via AT1 (128).

2) Em 2004, Zou e colaboradores realizaram um estudo bastante sofisticado demonstrando que o estiramento celular é capaz de ativar o receptor AT1 sem a participação da Ang II (133). Neste estudo, os autores depreendem que a ativação da ERK pelo estiramento via AT1 é dependente tanto da fosforilação de JAK-2 como de vias intracelulares dependentes da proteína-G. Em modelo experimental *in vivo*, hipertrofia cardíaca por coartação da aorta foi induzida em animais sem a capacidade de formar angiotensina II (animais KO para o angiotensinogenio). Mesmo na ausência da angiotensina II, o tratamento desses animais com Candesartan, um bloqueador do receptor AT1, foi capaz em diminuir a hipertrofia cardíaca desenvolvida, sugerindo ativação direta dos receptores pela sobrecarga pressórica induzida (133).

Apesar da atividade enzimática da ECA e os efeitos fisiológicos do agonista natural Ang II sobre AT1 já estarem bastante descritos na literatura, pouco ainda se sabe sobre a capacidade dessas moléculas serem ativadas por outros estímulos, como forças físicas, e atuarem como mecanotransdutoras de no sistema cardiovascular. Desta forma, neste trabalho será estudado se a ECA e o AT1, *per se* podem ser moléculas mecanosensoras capazes de detectar alterações mecânicas sobre a célula e desencadear vias de sinalização intracelular independentes da presença das angiotensinas.

Objetivo

2. Objetivo

Estudar a participação da ECA e do receptor AT1 como mecanotransdutores e mecanosensores de estímulos físicos (*shear stress* e estiramento) sobre a membrana celular.

Métodos

3. Métodos

3.1. CULTURA DE CÉLULAS

3.1.1. Chinese Hamster Ovary (CHO)

Foram utilizadas células de ovário de hamster (CHO) cultivadas em meio RPMI 1640 (Gibco®) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/ml de penicilina e 100 µl/ml de estreptomicina. A cultura foi mantida em estufa umidificada a 37°C, 5% de CO₂. Estas células foram mantidas em garrafas de 150cm² até a confluência de aproximadamente 100% para serem colocadas em placas e submetidas ao *shear stress* ou ao estiramento. Os repiques foram realizados por exposição à solução de tripsina/EDTA (250mg- 1:250) por 5 minutos.

3.1.2. Cultura primária de células endoteliais de veia safena (SVEC) humana

Veias safenas foram obtidas de pacientes submetidos a cirurgia de revascularização cardíaca por ponte de safena no Instituto do Coração, HC-FMUSP. Após o procedimento cirúrgico, os segmentos não utilizados foram levados ao Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do InCor para realização do cultivo de células endoteliais. Este protocolo de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq 638/04) (Anexo II, item 1) (Termo de consentimento livre e esclarecido – Anexo III).

As culturas primárias de células endoteliais de veia safena foram mantidas em meio Human Endothelial – SFM suplementado com 20% de soro de bezerro recém-nascido, 100 U/ml de penicilina, 100 µl/ml de estreptomicina, 20ng/ml de b-FGF humano (fator básico de crescimento de fibroblasto), 10ng/ml de EGF (fator de crescimento epidermal) e em estufa umidificada a 37°C, 5% de CO₂.

Estas células foram mantidas em garrafas de 150cm² até a confluência de aproximadamente 100% para serem colocadas em placas e submetidas ao *shear stress*. Os repiques foram realizados por exposição à solução de tripsina/EDTA (250mg - 1:250) por 5 minutos, e a manutenção da cultura foi mantida até a oitava passagem. 3,0 x 10⁶ células foram cultivadas em placas de cultura de 150x25 mm e após 2 dias submetidas ao *shear stress*. A cultura apresenta marcadores específicos de células endoteliais como, por exemplo, fator de Von willebrand e VE-caderina.

3.1.3. Cultura Primária de Fibroblastos Cardíacos

Para a extração de fibroblastos cardíacos foram utilizados 20-25 ratos Wistar neonatos submetidos a decaptação. O coração foi retirado e transferido para um tubo plástico contendo solução gelada de PBS. Os corações foram transferidos para placa de petri em fluxo laminar e seccionados. O tecido seccionado foi transferido para tubo plástico contendo solução de colagenase tipo 2 (200 U/ml, Sigma Chemical Co., Milwaukee, WI, USA) e mantido sob agitação a 37 °C por períodos de 30 minutos ou até completa dissociação do tecido cardíaco. Após cada período de incubação o

sobrenadante foi recuperado e acrescido de 1 ml de FBS. Esta suspensão de células foi submetida à centrifugação a 150 g por 5 minutos em temperatura ambiente. O precipitado obtido de cada etapa foi ressuspenso em DMEM acrescido de 15 % de FBS (vol./vol.) e 1 % (vol./vol.) de penicilina/estreptomicina (100 UI/ml–100 µg/ml; GIBCO BRL, Gaithersburg). Posteriormente foi transferido para garrafa de 75 cm² mantida em estufa umidificada contendo 5 % de CO₂ a 37 °C. Após 24 horas, o meio de cultura foi substituído por DMEM suplementado com 20 % de FBS. Os fibroblastos foram utilizados entre a terceira e quarta passagens para os experimentos de estiramento celular.

3.2. CONSTRUÇÃO DOS VETORES

Para a realização do primeiro capítulo desta tese, 2 vetores foram construídos (ECA-wt e ECA-cito-del) e 1 vetor foi cedido pelo Dr Nigel Hooper (ECA-extra-del) (91): pcDNA3-ECA-wt, vetor de expressão da ECA selvagem; pcDNA3-ECA-cito-del, vetor de expressão da ECA mutada sem a sua porção intracelular; pcDNA3-ECA-extra-del, expressão da ECA mutada sem a sua porção extracelular. Detalhes dessas construções estão apresentados na sessão de resultados.

Para a realização do segundo capítulo desta tese, utilizamos uma linhagem celular gentilmente fornecida pelo Prof. Dr Cláudio Miguel Costa-Neto da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Células CHO foram transfectadas com o plasmídeo de expressão do receptor AT1a de rato e selecionadas com o antibiótico G418. A expressão e função desses

receptores nessa linhagem celular foram confirmadas também pelo nosso laboratório através de PCR, *binding*, e transiente de cálcio.

3.3. TRANSFECCÃO PERMANENTE

Células CHO foram transfectadas pelo método de fosfato de cálcio (37, 123). Os vetores transfectados nas células, além de induzirem a expressão da proteína de interesse, conferem ainda às células resistência ao antibiótico geneticina, o qual foi utilizado para a seleção de clones. Após a transfecção, foi adicionado ao meio de cultura o antibiótico Geneticina (1000 µg/ml) para a seleção das células onde a transfecção foi eficiente. Clones foram separados a partir de uma única célula, totalizando 7 clones de cada transfecção, e mantidos em meio de cultura suplementado com Geneticina (250 µg/ml). A confirmação da transfecção após a seleção dos clones foi feita pela atividade da ECA e por PCR como descrito a seguir. Os dados dessa análise estão mostrados na sessão de resultados.

3.4. ENSAIO DE GENE REPORTER – ATIVIDADE DA LUCIFERASE

Para avaliar o padrão de resposta de ativação do promotor da ECA pelos fatores mecânicos, os clones celulares construídos foram transfectados com gene repórter da luciferase controlado por uma região de ~1300 pb do promotor da ECA de rato (WLuc)(80).

Para avaliar o padrão de resposta de ativação do promotor do receptor AT1 pelos fatores mecânicos, o clone celular utilizado foi transfectado com gene repórter da luciferase controlado por uma região de

~1015 pb do promotor do AT1a de rato cedido gentilmente pelo Prof. Terry Elton, da Universidade Estadual de Ohio, EUA (27).

O objetivo deste ensaio é poder estudar de maneira rápida e de baixo custo fatores que modulam a expressão de uma proteína de interesse, no nosso caso a ECA ou o AT1 pelo *shear stress*. Dessa maneira, estímulos que modulam a expressão da ECA ou do AT1 (atividade do seu promotor) são expressos pelas células na forma de atividade da luciferase. A atividade da luciferase foi determinada pelo método de quimioluminescência utilizando-se o kit Promega's Luciferase Assay System, conforme instruções do fabricante. Uma alíquota do lisado celular é misturada com o reagente que contém luciferina e ATP, e a reação monitorada em luminômetro por 10 segundos. A intensidade de luz da reação é constante por aproximadamente 20 segundos e decai lentamente, com uma meia-vida de 5 minutos. Os resultados foram normalizados pela proteína total e pela atividade da *Renila*, um controle da eficiência da transfecção presente no kit.

3.5. ESTIMULOS FÍSICOS *IN VITRO*

3.5.1. Produção de *shear stress*

Para a produção de *shear stress* foi utilizado o sistema de *cone plate* (figura 6), que é um método já bem estabelecido de produzir *shear stress in vitro* (74). Este sistema consiste de um cone, de ângulo superficial de 0,5°, girando sobre a cultura de células. A velocidade angular (ω) do cone é controlada e o *shear stress* é calculado através da fórmula abaixo:

$$\tau = \eta\omega/\alpha$$

onde: τ é o *shear stress* (dinas/cm²), η a viscosidade do meio de cultura (dinas.s/cm²), ω a velocidade angular do cone (rad./s) e α o ângulo superficial do cone (rad.).

As células foram submetidas ao *shear stress* de 15 dinas/cm² por período de 5 minutos, 10 minutos (experimentos com o receptor AT1), 30 minutos, 18 horas ou 24 horas (experimentos para expressão do receptor AT1 em células endoteliais humanas) no sistema de *cone plate*. Antes da realização do estímulo mecânico, as células foram carenciadas em meio sem soro por 24h e o estímulo também foi realizado na ausência de soro. Em seguida, estas células foram processadas para a subsequente análise.

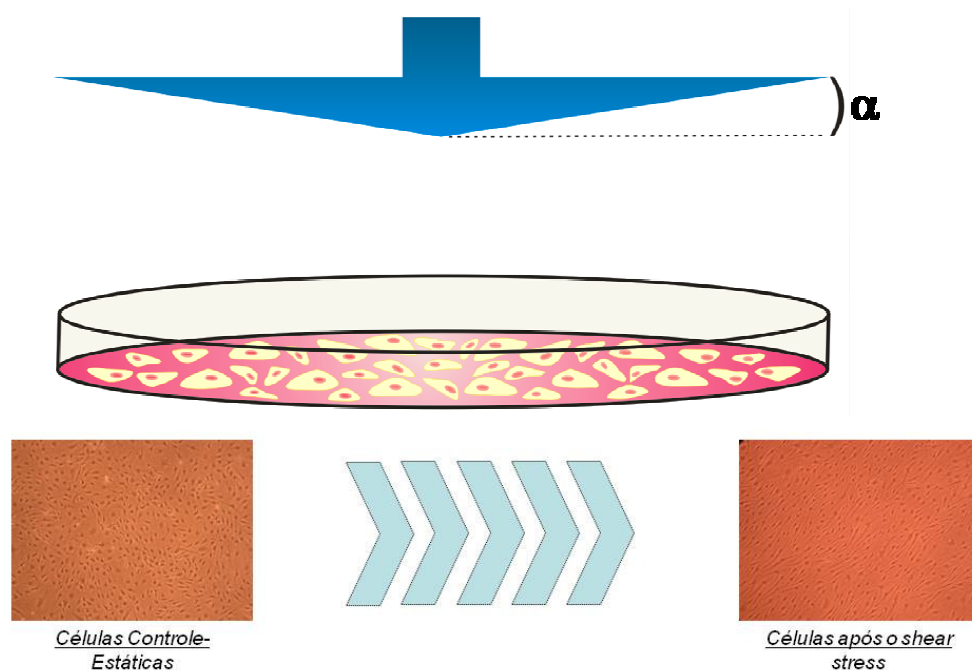


Figura 6: Sistema de *cone plate* utilizado para produção de *shear stress* nas células endoteliais. O cone gira sobre as células endoteliais e o *shear stress* pode ser variado através de alterações na velocidade angular ou da viscosidade do meio de cultura. Abaixo, alinhamento das células endoteliais humanas submetidas ao *shear stress*.

3.5.2. Produção de estiramento

Para a produção de estiramento foi utilizado o sistema *FX-4000™ Flexercell® Tension Plus™* (figura 7).

Os experimentos foram realizados em placas de cultura de 6 poços de 3,5 cm de diâmetro tratadas com colágeno tipo I. Após atingirem 100% de confluência, as células foram carenciadas por 24h em meio sem soro e em seguida submetidas ao estímulo mecânico de 10% de estiramento (*stretch*) com frequência de 1Hz, por um período de 5 minutos, 30 minutos ou 18 horas também na ausência de soro.

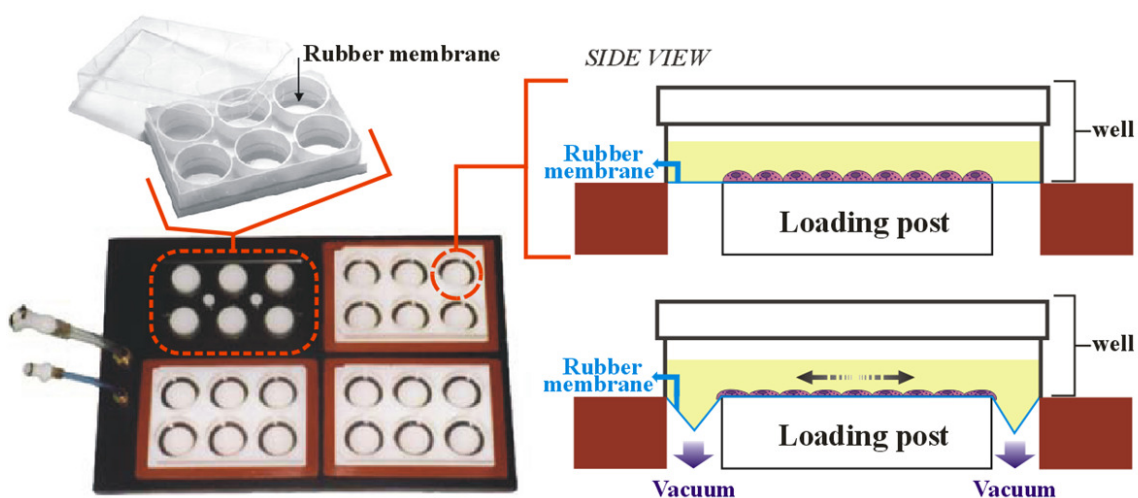


Figura 7: Sistema *Flexercell* utilizado para produção de estiramento nas células. A membrana inferior da placa é estirada juntamente com as células que estão aderidas em sua superfície, provocando o estiramento das mesmas.

3.6. ATIVIDADE DA ECA

Para a análise da atividade da ECA, foram utilizadas placas de 6 poços na confluência entre 90-100%. As células foram lisadas em tampão apropriado (Tris-HCl 0,1M e NaCl 50mM). O lisado foi armazenado a -70°C até o dia da dosagem enzimática.

Para o ensaio foram utilizados 20 µl do lisado, mantidos sob incubação a 37°C em solução de Abz-FRK(Dnp)P-OH (Abz = ácido ortho-aminobenzóico; Dnp = dinitrophenil) 15 µM em tampão (Tris-HCl 1 mM, NaCl 50 mM e ZnCl₂ 10 µM) num volume final de 200 µl. A seguir, a atividade enzimática foi determinada de forma contínua em fluorímetro ($\lambda_{em} = 420\text{nm}$ e $\lambda_{ex} = 320\text{ nm}$), medindo-se a fluorescência por 60-120 minutos (uma leitura a cada 30-60 segundos). Este método se baseia na utilização de um substrato fluorescente (Abz-FRK(Dnp)P-OH) que é clivado com alta afinidade pela ECA ($K_{cat}/K_m = 45,4 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$) (4). Como controle negativo, a hidrólise do Abz-FRK(Dnp)P-OH foi abolida no lisado celular por 0,5 µM de captopril.

A partir da leitura das amostras foi obtida uma curva de fluorescência por unidade de tempo e a inclinação desta curva resultou na atividade da ECA, que foi convertida em µmol de substrato hidrolisado por minuto por miligrama de proteína. A atividade enzimática foi normalizada através do conteúdo de proteína de cada amostra, determinada através do método de Bradford (9). A atividade da ECA está expressa em $\text{uF} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína.

3.7. EXTRAÇÃO DE RNA

As células foram lisadas em 1mL de Trizol (Invitrogen). O protocolo foi realizado de acordo com instruções do fabricante. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos, à 12000 g à 4°C. Os sobrenadantes foram coletados e adicionado 200 µl de clorofórmio (Merck). Os tubos foram homogeneizados e incubados por 3 minutos à temperatura ambiente. Após centrifugação de 15 minutos, 12000 g à 4°C, a fase superior foi transferida para um novo tubo onde foi adicionado 500 µl de isopropanol (Merck). Em seguida, as amostras foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugadas por 10 minutos, 12000 g à 4°C. O sobrenadante foi descartado e 1ml de etanol 75% (Merck) foi adicionado ao precipitado de RNA. Após centrifugação de 5 minutos, 7500 g à 4°C, o precipitado de RNA foi diluído em água milliQ. Para se certificar da integridade das moléculas de RNA, ou seja, verificar se não houve nenhuma degradação durante o processo de extração, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1% (Invitrogen) (agarose 1%, Tris acetato 40mM e EDTA 2mM).

3.8. SÍNTESE DE cDNA

1000 ng de RNA total das culturas celulares foram utilizados para a síntese de cDNA. A reação de transcriptase reversa foi realizada através da utilização da *Superscript III*, seguindo instruções do fabricante. (Invitrogen).

3.9. RT-PCR

Após a síntese de cDNA a partir de RNA total, o RT-PCR foi realizado utilizando 50ng de cDNA. Os oligonucleotídeo desenhados especificamente para cada gene em estudo estão descritos na tabela 1.

Tabela 1: Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados para estudo de RT-PCR e RT-PCR em tempo real, e o tamanho do amplificado gerado.

Gene	Senso (5' – 3')	Anti-senso (5' – 3')
ECA (humana) (porção intracelular)	Senso: 5' - TAC-Tgg-ACg-CCg-AAC-TCC-gCT - 3'	Anti-senso: 5' - AgT-gTC-TCA-gCT-CCA-CCT-Cgg - 3'
ECA (humana) (porção extracelular)	Senso: 5' - AgC-Cgg-TAC-AAC-TCg-ATg-AAg - 3'	Anti-senso: 5' - Aag-ggT-ACg-TCg-AgC-AAg - 3'
AT1a (rato)	Senso: 5' - ggA-AAC-AgC-TTg-gTg-gTg-AT - 3'	Anti-senso: 5' - ACA-TAg-gTg-ATT-gCC-gAA-gg - 3'
AT1 (humano)	Senso: 5' - CCT-AgC-CTg-CTT-TTg-TCC-Tg - 3'	Anti-senso: 5' - TAC-TgC-CCT-TTg-gAA-ACT-gg - 3'

3.9.1. RT-PCR em tempo real

Após a síntese de cDNA a partir de RNA total, o RT-PCR em tempo real foi realizado utilizando o kit SYBR® Green PCR Master Mix de acordo com instruções do fabricante. A reação de RT-PCR em tempo real foi realizada no ABI PRISM 7700 *Sequence Detector* utilizando

oligonucleotídeos iniciadores específicos (AT1 (humano) tabela 1) para o gene de interesse e detecção por *SYBR Green*.

Nesta metodologia, o PCR foi combinado a um intercalante fluorescente de DNA dupla fita, o SYBR Green I. Desta forma, um sinal fluorescente gerado é diretamente proporcional à quantidade de produto de PCR na reação. A intensidade de fluorescência é monitorada após cada ciclo do PCR, o que possibilita a análise durante a fase exponencial da reação. Para obter resultados reprodutíveis e com exatidão, a eficiência da reação deve ser próxima de 100%, ou seja, a quantidade de DNA deve duplicar após cada ciclo da fase exponencial.

3.10. WESTERN BLOT

As células foram lisadas em tampão contendo EDTA (1 mM), EGTA (1 mM), MgCl₂ (2 mM), KCl (5 mM), HEPES (25 mM), PMSF (1 mM), DTT (2 mM), Triton X-100 (0,1%) e coquetel de inibidores de fosfatases I e II (Sigma). PMSF, DTT, Triton e o coquetel de inibidores foram adicionados ao tampão no dia do experimento. A quantificação da concentração total de proteína foi realizada de acordo com o método de (9) utilizando o reagente *Bio-Rad assay dye Reagent Concentrad* (Bio-Rad Laboratories).

O extrato de proteína foi separado em gel de poliacrilamida/SDS utilizando cuba de eletroforese vertical Ettan Daltsix (géis de 25,5 x 20,5 cm) (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) e em seguida transferido para uma membrana de PVDF. Esta membrana foi incubada com anticorpo específico

para JNK ou p-JNK (1:1000, Cell Signaling), ECA p-Ser1270 (gentilmente cedido por Ingrid Fleming, Universidade Johan Wolfgang Goethe, Alemanha) ou ECA (obtido com o pesquisador Sergei Danilov, Universidade de Illinois em Chicago, E.U.A.) (1:1000), ERK ou p-ERK (1:1000, Cell Signaling), p-Jak-2 (1:1000, Cell Signaling), p-Src (1:1000 Cell Signaling) e p-eNOS (1:1000, Millipore) seguida de incubação com anticorpo secundário conjugado com horseradish peroxidase, e revelada utilizando kit ECL Western Blotting Analysis System (GE Healthcare) conforme instruções do fabricante.

Em cada gel foi aplicado como padrão um marcador de peso molecular com valores estabelecidos (Kaleidoscope Prestained Standards, Bio-rad Laboratories).

3.11. TRANSIENTE DE CALCIO

Fluo-3/AM, assim como o FURA-2/AM, também é um indicador de cálcio. O comprimento de onda de excitação do Fluo-3/AM é de 488nm. Porém, quando esta sonda está ligada ao íon Ca^{2+} , emite fluorescência em um comprimento de onda de 526nm. O Fluo-3/AM pode ser excitado com um laser de argônio em 488nm, onde sua fluorescência aumenta com o aumento da concentração de cálcio.

Para a realização do experimento, as células foram soltas das placas e ressuspensas, 3×10^5 células em 500 μl de solução tampão (NaCl 135mM, KCl 5mM, HEPES 10mM, MgCl_2 1mM, glicose 2mM, CaCl_2 2mM,

pH 7.2). As células foram então carregadas com Fluo-3/AM (1 μ M) durante 30 minutos, a 37°C. Posteriormente, as células foram estimuladas e a leitura da intensidade de fluorescência observada no citômetro de fluxo (BD FACSCalibur) através do software CellQuest Pro. Foram adquiridos 10.000 eventos na região selecionada por tamanho e granulosidade celular. Desta forma, o aumento da intensidade de fluorescência nos indicou aumento na concentração citoplasmática de Ca⁺², enquanto que a redução desta fluorescência nos indicou diminuição da concentração citoplasmática de Ca⁺².

3.12. **BINDING**

As células foram plaqueadas em placas de 24 poços. As placas foram previamente tratadas com uma solução de poli-lisina (0,1mg/mL em PBS), e enxaguadas com PBS, antes de receberem as células. Após receberem as células, as placas foram incubadas na estufa até o dia seguinte, e imediatamente antes de ser iniciado o ensaio de *binding* foram enxaguadas brevemente com tampão de lavagem (Tris-HCl 25 mM, pH 7,4, NaCl 140 mM, MgCl₂ 5 mM, albumina de soro bovino 0,1%).

Os experimentos de *binding* foram realizados a 4°C, e iniciados com a adição do ligante marcado (50.000 cpm/well) (³H-AngII, GE-Healthcare) na presença de diferentes concentrações de ligante frio (AngII) (10⁻¹¹ a 10⁻⁶ M) em um volume final de reação de 525 μ L. O tampão usado para os ensaios foi Tris-HCl 25mM, pH 7,4, contendo MgCl₂ 5mM, albumina de soro bovino 0,1% (p/v), e bacitracina (Sigma) numa concentração final de 100 μ g/mL.

Após a adição do ligante marcado (dissolvido no tampão), as placas foram deixadas por 24 horas a 4°C. Após 24 horas os poços foram lavados duas vezes com o mesmo tampão, mas sem bacitracina, e adicionou-se a cada um, 1ml de tampão de lise (uréia 48%, detergente NONIDET P-40 2%, preparados em ácido acético 3M), para subsequente contagem radioativa. Após 15 minutos de incubação com o tampão de lise, 950 µl desta solução foram transferidos para tubos plásticos de cintilação e após a adição de 5ml de líquido de cintilação e agitação vigorosa dos mesmos, procedeu-se à contagem da radiação em contador β.

3.13. DOSAGEM DE NITRITO

A quantificação de nitrito reflete a indiretamente a produção de NO e nesta tese foi medida no meio de cultura das células por 2 métodos diferentes:

Reação de Griess: Em 100 µL de meio de cultura adicionouse 50 µL de cloreto de N-(1-naftil)etilenodiamina (0,1 %) e 50µL de sulfanilamida (1 % em H₃PO₄ 2,5 %). Após 10 minutos de incubação mediu-se a absorbância a 540nm em leitor de elisa e calculou-se a concentração de nitrito pela curva de calibração feita em paralelo (1-40 µM) (106).

Analizador de Oxido Nitrico: Pelo analisador de •NO (NOATM 280, Sievers) foram medidas as concentrações de nitrito. A solução na cela de reação era composta por KI/HAc (temperatura ambiente). Após injeção de 20µl de meio de cultura, a concentração de nitrito foi baseada na curva de calibração feita no mesmo dia com solução padrão de NaNO₂ (0,1 - 7,5 µM).

3.14. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados estão representados como média \pm erro padrão da média. De maneira geral, para as análises estatísticas foram utilizados teste *t* e análise de variância (ANOVA) de um ou dois caminhos, quando necessários. Teste de *bonferroni* foi utilizado como pós-teste. As análises foram realizadas utilizando o programa *GraphPad Prism 5*. A estatística utilizada em cada gráfico está descrita na legenda das figuras. Os dados foram considerados significativamente diferentes para valores de $p < 0.05$.

Resultados

4. Resultados – Capítulo I

A construção de linhagens celulares utilizadas neste projeto envolveu a utilização de três plasmídeos de expressão da ECA selvagem e mutada (sem a porção extracelular ou sem a porção intracelular). A descrição das construções ou obtenção desses plasmídeos encontra-se a seguir. Os resultados descritos de fosforilação da cauda citoplasmática da ECA foram confirmados em mais de um clone celular construído.

4.1. CONSTRUÇÃO DOS VETORES

4.1.1. pcDNA3-ECAwt (Vetor para a expressão da ECA *wild type*):

Para a retirada e purificação do cDNA da ECA do vetor pEACE (fornecido gentilmente por P. Corvol; Collège de France; Paris; França), realizamos a digestão do pEACE com EcoRI, seguida de separação do fragmento do cDNA da ECA do vetor em gel de agarose 0,8% e purificação da banda de 4026 pb com o kit PerfectPrec Clean Up (Eppendorf). Em seguida, o cDNA da ECA foi ligado ao vetor pcDNA3 previamente digerido com EcoRI. A confirmação de que o cDNA da ECA foi inserido no sentido correto, foi feita por digestões sobre o pcDNA3-ECAwt e análise em gel de agarose dos fragmentos produzidos (figura 8).

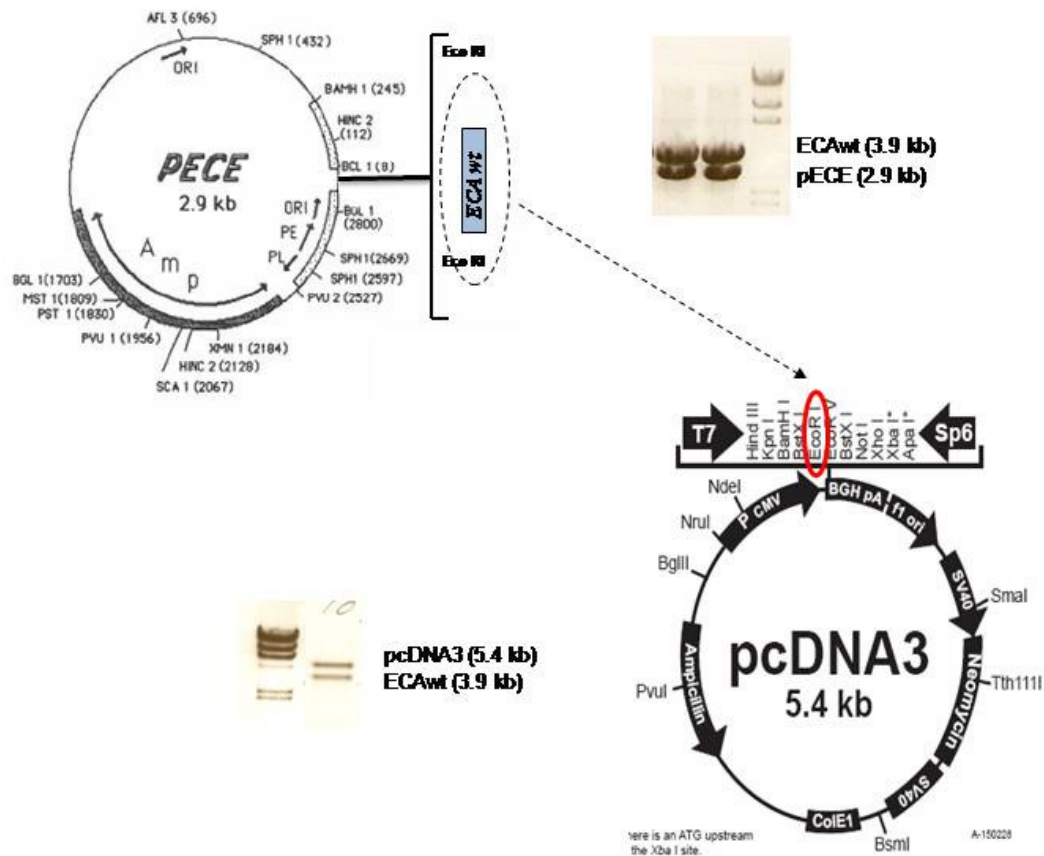


Figura 8: Construção do vetor de expressão da ECA selvagem.

4.1.2. pcDNA3-ECA-Cito-Del (Vetor para a expressão da ECA *sem a porção citoplasmática*):

Para retirar a porção citoplasmática da ECA, o cDNA da ECA selvagem foi clivado utilizando as enzimas de restrição NheI (quebra na posição 3085 da ECA) e XbaI (quebra na região região de múltiplos sítios de clonagem do plasmídeo). O fragmento retirado foi substituído por outro fragmento de 801 pb referente às posições 3085 e 3886 do cDNA da ECA. Este fragmento foi obtido por reação de PCR utilizando os primers ECA-F (5'-AGACAGCGGCCGCGTCAG-3') e ECA-R (5'-

GCTCTAGAAGAGGCTGCGGTGGCGGA-3') conforme mostrado na figura 9. O amplificado desta reação foi digerido com NheI e XbaI e clonado no pcDNA3-ECAwt também digerido com NheI e XbaI. Realizamos a confirmação dessa construção por seqüenciamento utilizando o primer (5'-TCGGCCATGTTGAGCTACTTC-3') para garantir que nenhuma mutação não esperada tenha sido introduzida durante a reação de PCR. Essa construção não tem 18 aminoácidos da porção C-terminal da ECA, entre eles, 3 de 5 resíduos de serina que servem como possíveis sítios de fosforilação no domínio citoplasmático (62).

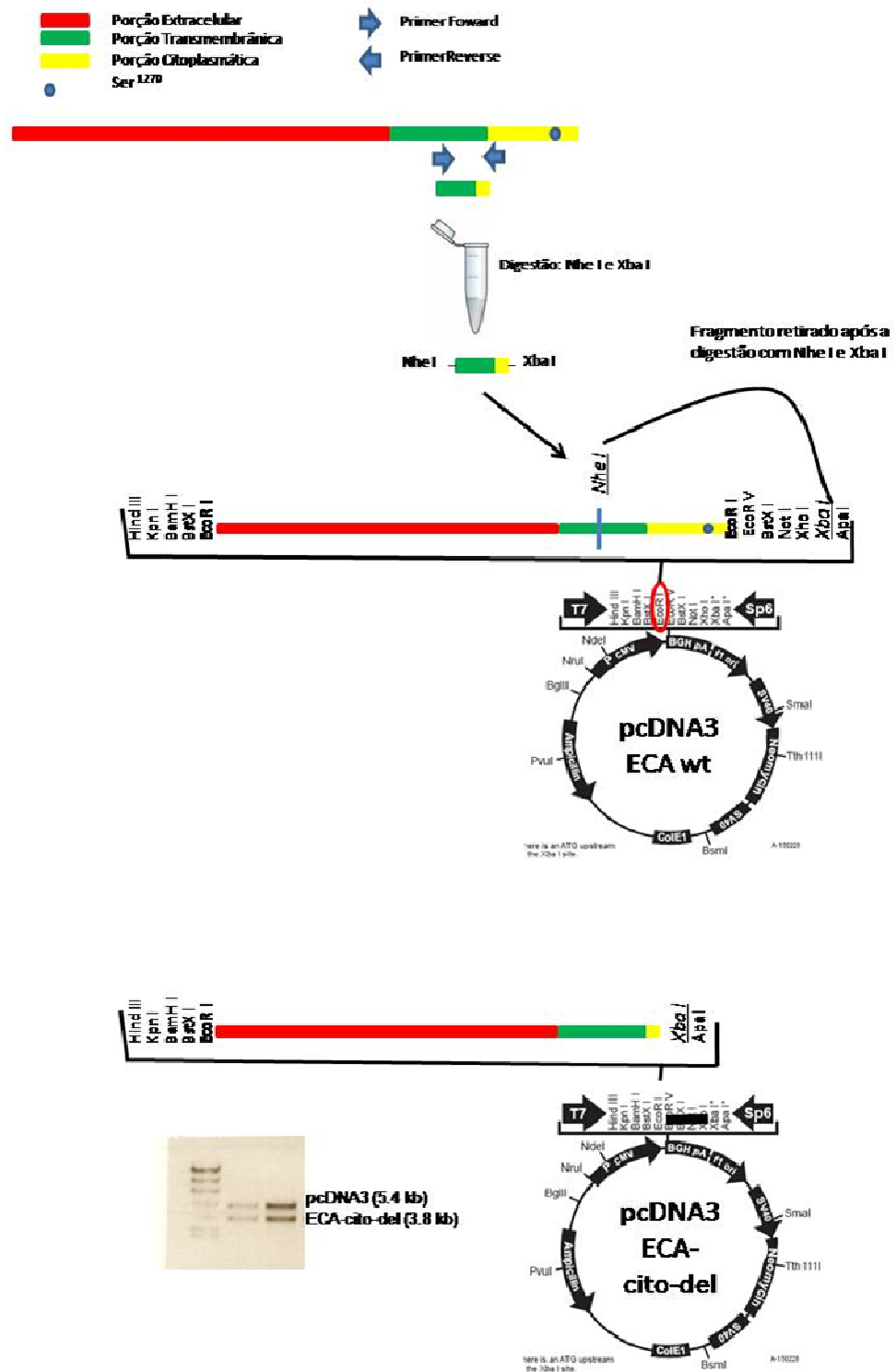


Figura 9: Construção do vetor de expressão da ECA-cito-del.

4.1.3. pcDNA3-ECA-extra-del (Vetor para a expressão da ECA sem a porção extracelular):

Este plasmídeo para a expressão da ECA truncada no aminoácido 1210, ou seja, sem sua porção extracelular, foi gentilmente cedido pelo Dr Nigel Hooper da Inglaterra (91). A figura 10 é uma representação esquemática das 3 formas como a ECA foi utilizada neste estudo.

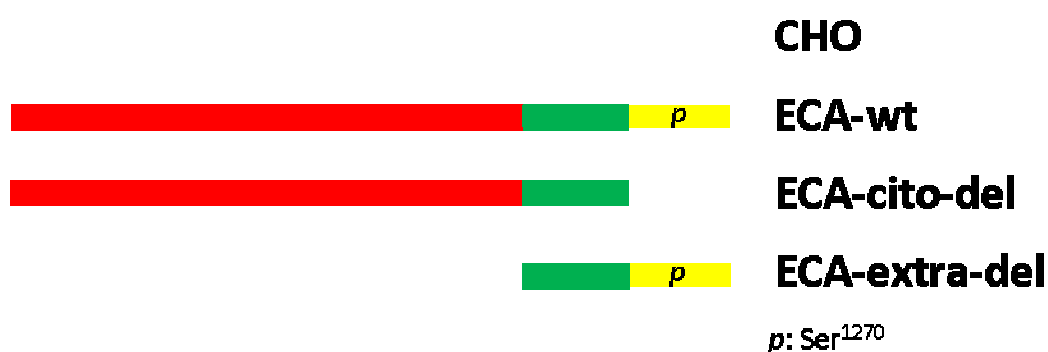


Figura 10: Representação esquemática das 3 construções da ECA utilizadas neste projeto.

4.2. CONTRUÇÃO DAS LINHAGENS CELULARES

Com os plasmídeos construídos iniciamos a produção das linhagens celulares utilizadas neste estudo. Neste sentido escolhemos as células CHO por não expressarem a ECA. Desta forma, manipulações envolvendo a expressão da ECA selvagem ou mutante poderiam ser realizadas sem a interferência de uma possível expressão endógena da ECA. A seguir serão mostrados os experimentos que demonstram o sucesso da construção dessas linhagens celulares.

4.2.1. Expressão Gênica

A construção das linhagens celulares também foi confirmada através da expressão gênica com primers específicos tanto para a porção intracelular da ECA (P1) como para a porção extracelular (P2). A figura 11 mostra a foto do gel de agarose com o produto de PCR com cada um dos pares de primers e em cada uma das linhagens celulares.

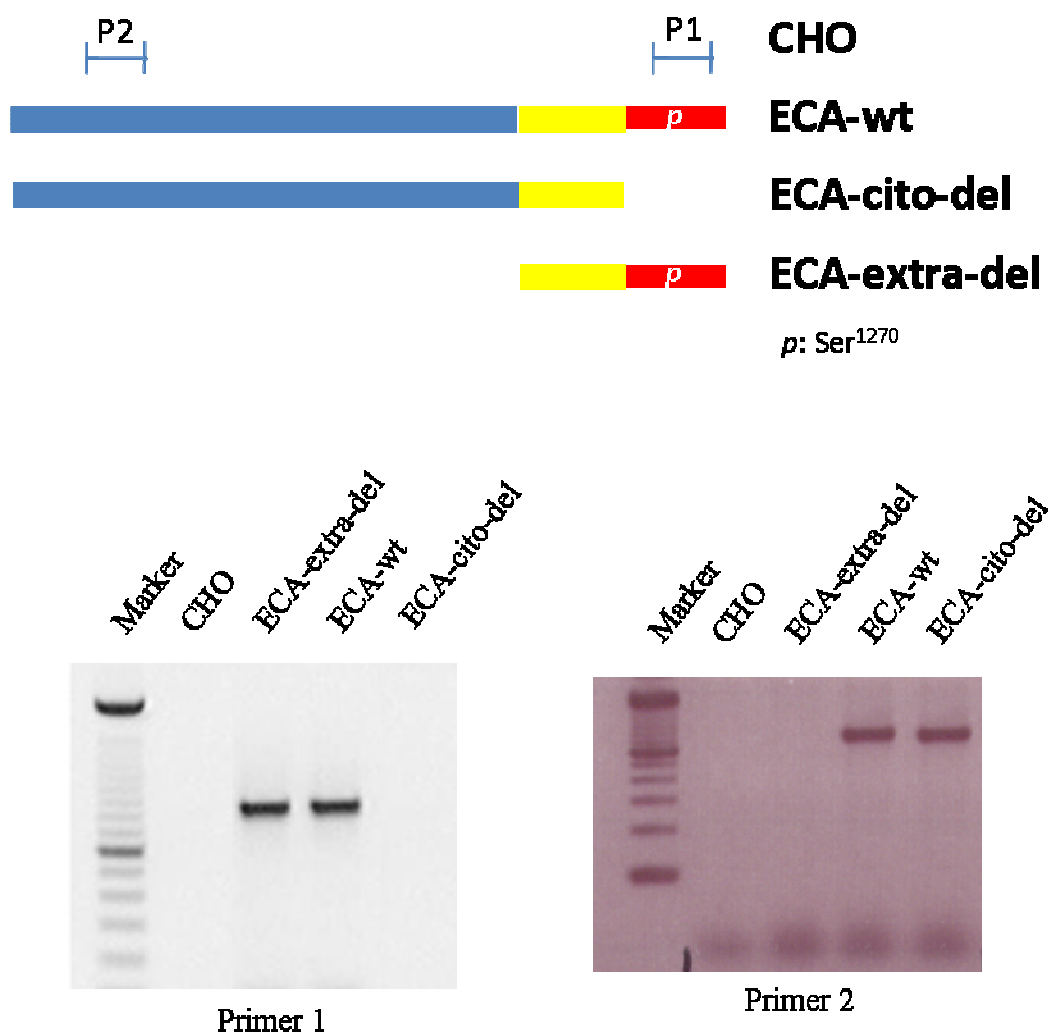


Figura 11: RT-PCR das células CHO e das linhagens ECA-wt, ECA-cito-del e ECA-extra-del. Primer 1 corresponde a região codificadora da porção intracelular da ECA; Primer 2 corresponde a região codificadora da porção extracelular da ECA.

4.2.2. Expressão Proteica

A expressão protéica da ECA nas linhagens celulares utilizadas neste projeto foi também confirmada por *imunoblotting*. Da mesma forma que para a expressão gênica, foram utilizados anticorpos que reconhecem a porção extracelular e a porção intracelular da enzima. Nas figuras 12a e b utilizamos o anticorpo monoclonal que reconhece especificamente a porção intracelular da ECA fosforilada no resíduo de Serina 1270. Na 12A observamos que somente as células ECA-wt apresentaram marcação com este anticorpo. Células CHO selvagem que não expressam a ECA e células ECA-cito-del que não possuem a porção intracelular da enzima, não são reconhecidas por este anticorpo. Já na figura 12b, um gel de acrilamida mais concentrado foi utilizado de maneira a podermos observar a expressão da ECA truncada sem a sua porção extracelular (ECA-extra-del, 45kD). Observamos marcação positiva em células ECA-extra-del e nenhuma marcação nas células ECA-wt uma vez que estas apresentam tamanho em torno de 140kD.

Por fim, na figura 12c utilizamos um anticorpo que reconhece uma região da porção extracelular da ECA. Com este anticorpo demonstramos que tanto fibroblastos como células endoteliais expressam a ECA. As células ECA-extra-del por não apresentam a região reconhecida pelo anticorpo utilizado, nenhuma marcação foi encontrada.

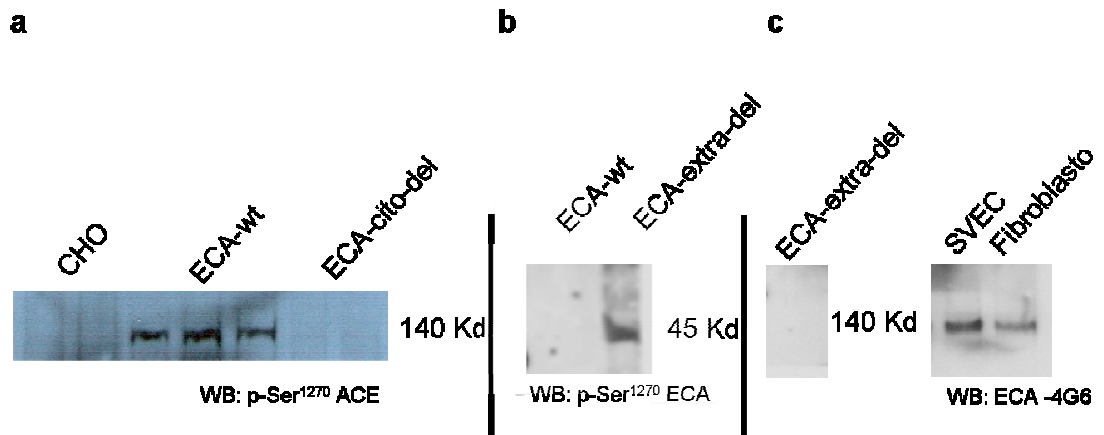


Figura 12: Confirmação da Expressão protéica da ECA nas linhagens celulares por *imunoblotting*. A) Utilização do anticorpo anti-p-Ser¹²⁷⁰ da ECA em células CHO, ECA-wt e ECA-cito-del separadas em gel 6% de acrilamida; B) Utilização do anticorpo anti-p-Ser¹²⁷⁰ da ECA em células ECA-wt e ECA-extra-del separadas em gel 12% de acrilamida;; C) Utilização do anticorpo anti-ECA (4G6- reconhece porção extracelular da ECA) em células ECA-extra-del, fibroblastos e endoteliais de humano.

4.2.3. Atividade da ECA no Lisado Celular

Linhagens celulares de expressão permanente da proteína de interesse foram construídas por meio da transfecção das células CHO com cada um dos plasmídeos de interesse (ECA-wt, ECA-cito-del e ECA-extra-del). Foram isolados 10 clones celulares (originados a partir de 1 única célula) para cada construção por meio da seleção com o antibiótico G418 (1 mg/ml). Após o período de seleção as células foram mantidas em meio de cultura também com antibiótico (250 ug/ml).

A confirmação da expressão da ECA foi inicialmente confirmada por meio da medida da atividade da enzima na presença ou ausência de um inibidor específico (Enalapril, 0,5 uM) (figura 13a). Os resultados deste

experimento confirmaram o sucesso apenas da construção das linhagens que expressam a ECA-wt e ECA-cito-del uma vez que a linhagem ECA-extra-del não apresenta os sítios catalíticos da enzima. A figura 13b representa a cinética enzimática dos dados da figura 13a. A atividade da enzima foi avaliada pela inclinação da curva representada na figura 13b

Nota-se uma menor atividade da ECA-cito-del quando comparada com a ECA-wt. O pequeno valor de atividade nas células CHO (215 ± 18 uF.min⁻¹.mg⁻¹) não foi modificado pela presença do inibidor da ECA demonstrando que essa pequena clivagem do substrato não é causada por uma possível expressão da ECA nessas células, mas sim de maneira inespecífica. Já a atividade nos clones ECA-wt (4587 ± 699 uF.min⁻¹.mg⁻¹) e ECA-cito-del (663 ± 17 uF.min⁻¹.mg⁻¹) foi completamente inibida pelo enalapril, demonstrando a presença da atividade enzimática da ECA nas linhagens celulares contruídas.

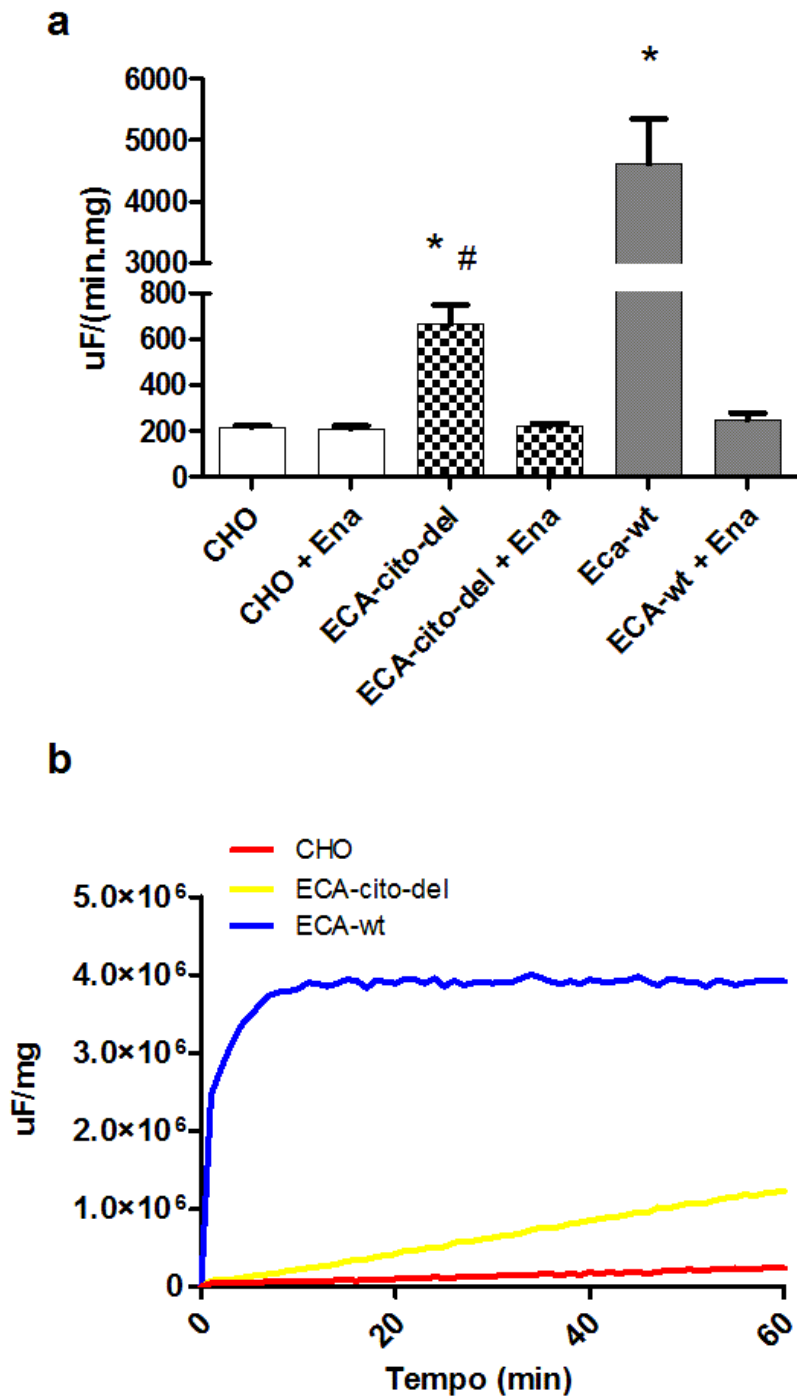


Figura 13: Atividade da ECA no lisado celular. A) valores da atividade da ECA nas células CHO (n=5) e nas construções ECA-wt (n=5) e ECA-cito-del (n=5) na presença e ausência do inibidor da ECA; B) representação gráfica da cinética da atividade da ECA. * p<0,05 vs CHO; # p<0,05 vs ECA-wt

4.2.4. Atividade da ECA no Meio de Cultura

A diferença da atividade entre a linhagem ECA-wt e a ECA-cito-del não era esperada uma vez que ambas permanecem com seus sítios catalíticos extracelulares intactos.

Uma hipótese para a menor atividade enzimática da ECA-cito-del consiste na menor estabilidade da enzima na membrana plasmática. Há dados na literatura sugerindo que a região intracelular da ECA é importante para que a enzima não seja clivada por secretases na porção extracelular entre os resíduos Arg¹²⁰³ e Ser¹²⁰⁴ (17, 125) liberando, assim, uma forma solúvel da ECA. Apesar do mecanismo de como isso pode ocorrer ainda não estar elucidado, sugere-se que seja regulado por modificações pós-transducionais na cauda citoplasmática da ECA (62, 104).

Para testar essa hipótese no nosso modelo, avaliamos a atividade da ECA no meio de cultura em que as células foram mantidas (figura 14).

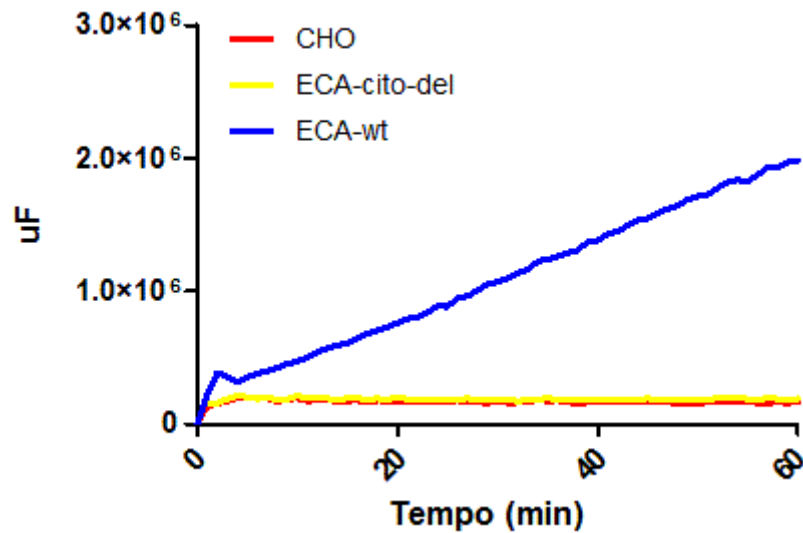


Figura 14: Representação gráfica da atividade da ECA no meio de cultura de células CHO e nos clones celulares ECA-wt e ECA-cito-del.

Observamos que a atividade enzimática no meio de cultura segue o mesmo padrão de resposta da atividade enzimática no lisado celular. Enquanto a atividade no meio de cultura da linhagem ECA-wt apresentou-se bastante elevada, a atividades no meio de cultura da linhagem ECA-cito-del foi praticamente indetectável. Dados da literatura mostram uma diminuição da atividade da ECA quando sua porção transmembrânica e citoplasmática (64 aminoácidos da região C-terminal) são removidas e a porção extracelular da ECA fica ancorada a superfície da membrana celular por uma cauda de glicofosfatidilinositol (GPI) retirada da carboxipeptidase M (92). Entretanto, apesar da atividade da ECA-wt ser o dobro da construção mutada, os autores não acharam diferenças estatisticamente significantes. Juntos com esses dados da literatura da função da cauda da ECA em impedir a clivagem

do domínio extracelular, nossos resultados sugerem que a porção citoplasmática da ECA pode exercer papel importante na regulação da atividade dos sítios catalíticos.

4.3. ECA COMO MECANOTRANSDUTOR

Para estudar a ECA como mecanosensor foram testadas as respostas tanto ao estiramento quanto ao *shear stress*. Os resultados foram inicialmente obtidos nas células CHO com expressão da ECA-wt e confirmados em cultura celular primária de fibroblasto cardíaco de rato (estiramento) e célula endotelial de veia safena humana (*shear stress*). Analisamos a fosforilação da ECA e a fosforilação da JNK, via esta já descrita como ativada em resposta ao tratamento com inibidores da ECA. A apresentação dos resultados está dividida de acordo com a força física estudada.

4.3.1. Estiramento Celular

A figura 15a mostra os resultados da fosforilação da ECA em resposta ao estiramento celular. Células CHO expressando ECA-wt foram submetidas ao estiramento de 10% por 5', 30', e 18h e a fosforilação da porção citoplasmática da ECA avaliada por *immunoblotting*. Apesar de haver uma pequena variação nos tempos estudados, não houve significância estatística entre os pontos analisados (ECA-wt: Ctrl, $100 \pm 5,6\%$; 5', $111 \pm 11\%$; 30', $101 \pm 10,5\%$; 18h, $89 \pm 7,1\%$). Com relação a ativação da JNK (figura 15b), assim como observado com relação a fosforilação da cauda citoplasmática

da ECA, também não houve diferença estatística na ativação da JNK entre os tempos observados tanto nas células CHO como nas ECA-wt (CHO: Ctrl, $100 \pm 10,2\%$; 5', $113,3 \pm 7,4\%$; 30', $109 \pm 5,6$; 18h, $103 \pm 7,6\%$; ECA-wt: Ctrl, $100 \pm 5,3\%$; 5', $116,5 \pm 10,1\%$; 30', $96,5 \pm 7,9$; 18h, $97,5 \pm 13\%$). Embora a ativação da JNK tenha também uma pequena variação nos tempos estudados, não há diferença estatística entre os pontos.

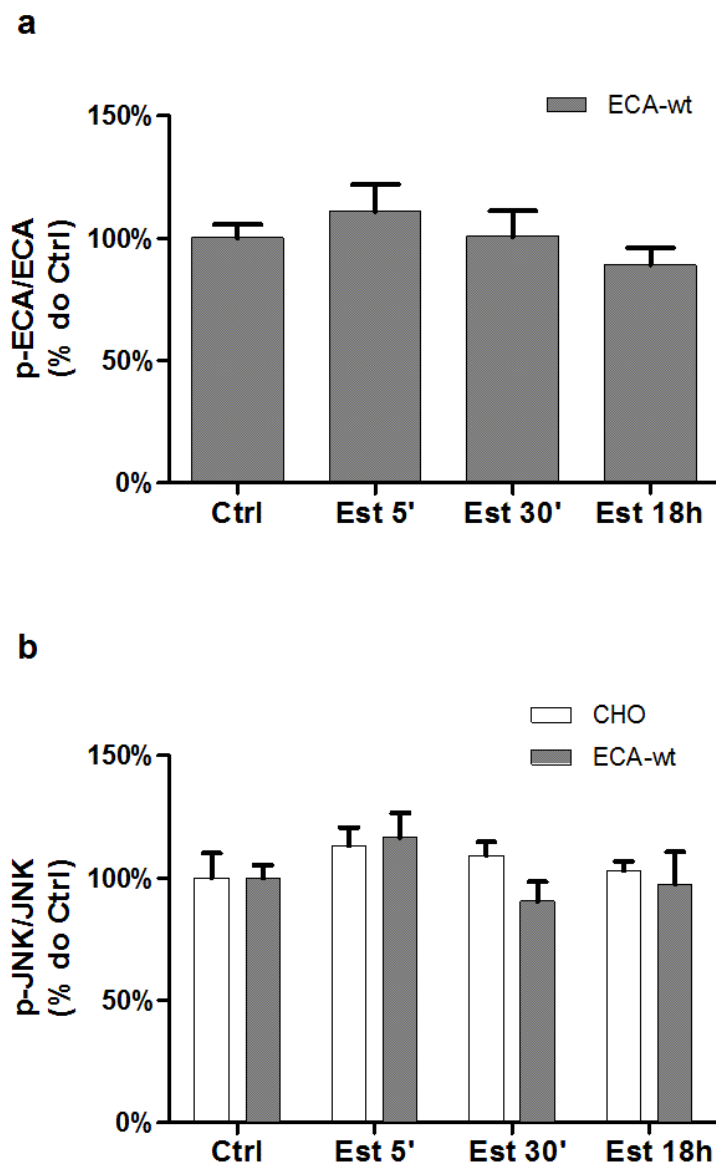


Figura 15: *Imunoblotting* das células CHO submetidas ao estiramento. A) *Imunoblotting* p-ECA Ser¹²⁷⁰/ECA. B) *Imunoblotting* p-JNK/JNK. EST = estiramento, 10%, 1Hz pelos respectivos tempos (n=4-6).

Mesmo após não ter observado efeito do estiramento sobre a fosforilação da porção citoplasmática da ECA e da JNK nas células CHO, achamos importante confirmar esse resultado em cultura primária de um tipo celular sujeito ao estiramento *in vivo* uma vez que a ativação da JNK já esta

bastante descrita na literatura e não foi observada de maneira significativa nas células CHO. Neste sentido, utilizamos cultura primária de fibroblasto cardíaco de ratos neonatos. No coração, embora não contribuam para a contração ativa das câmaras cardíacas, os fibroblastos formam uma importante matrix celular de sustentação para as forças hemodinâmicas. Tensões aplicadas sobre fibroblastos causam ativação das vias intracelulares ERK e JNK, por exemplo, de maneira dependente da presença de integrinas. A figura 16a confirma os resultados nas células CHO com expressão da ECA-wt, ou seja, que o estiramento não afeta a fosforilação da ECA de maneira estatisticamente significativa (Ctrl, $100 \pm 5,8\%$; 5', $137 \pm 15,5\%$; 30', $122 \pm 19,9$; 18h, $93 \pm 8,7\%$). Entretanto, o mesmo não foi observado com relação a JNK (figura 16b). Observamos ativação da JNK apenas com 5' de estiramento (Ctrl, $100 \pm 3,8\%$ vs 5', $177 \pm 27,3\%$, $p < 0,05$). Com 30' de estiramento ainda foi observado o aumento da p-JNK (Ctrl, $100 \pm 3,8\%$ vs 30', $139 \pm 25\%$) porém de maneira não significativa. Já após 18h de estiramento, o nível de p-JNK voltou aos níveis basais. Dessa maneira, apesar de observarmos algumas alterações nas proteínas estudadas, os dados obtidos não nos permitem concluir que a porção citoplasmática da ECA seja mecanotransdutora em resposta ao estiramento celular.

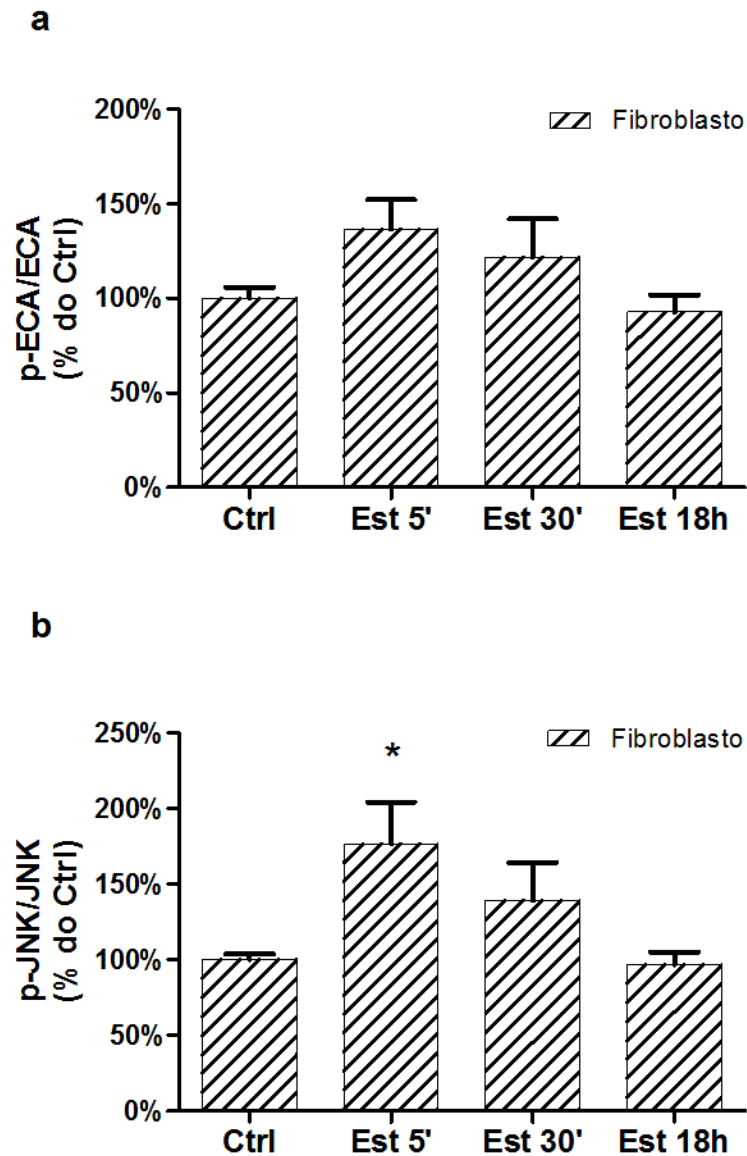


Figura 16: *Imunoblotting* dos fibroblastos cardíacos submetidos ao estiramento. A) *Imunoblotting* p-ECA Ser¹²⁷⁰/ECA. B) *Imunoblotting* p-JNK/JNK. EST = estiramento, 10%, 1hz pelos respectivos tempos (n=4-6). *p<0,05 vs Ctrl.

4.3.2. Shear Stress

A figura 17 mostra os resultados da fosforilação da ECA ao *shear stress*. Células CHO expressando a ECA-wt foram submetidas ao *shear stress* por 5', 30', e 18h e a fosforilação da porção citoplasmática da ECA

avaliada por *immunoblotting*. Observamos diminuição de 48%, 56% e 67% (figura 17a), respectivamente, na fosforilação da ECA com 5', 30' e 18h de *shear stress* em relação ao grupo controle (Ctrl, $100 \pm 7,4\%$; 5', $52,1 \pm 10,8\%$; 30', $44,9 \pm 7\%$; 18h, $33 \pm 4,2\%$). Não houve diferença significativa entre os tempos de *shear stress*.

Já esta bem descrita na literatura a via de sinalização desencadeada pela porção citoplasmática da ECA na presença de inibidores da enzima. A fosforilação da ECA, devido à ação da CK2 (casein kinase II), recruta para a sua porção citoplasmática a MAPKK MKK7, que ativa a proteína JNK. Sua ativação fosforila o fator de transcrição c-jun que transloca-se para o núcleo, forma dímeros (AP1) e regula a expressão gênica. Acredita-se que a ativação desta via resulte no aumento da expressão tanto da própria ECA como da COX-2 em resposta aos inibidores da ECA (29). Assim, decidimos verificar se além da diminuição da fosforilação da ECA, toda a via subsequente também estava inibida em resposta ao *shear stress*. A figura 17b mostra os resultados da fosforilação da JNK em resposta ao *shear stress*. Diferentemente do observado para a fosforilação da ECA, a fosforilação da JNK apresentou diminuição significativa de 26% somente após 18h de *shear stress* nas células que expressam a ECA-wt (ECA-wt: Ctrl, $100 \pm 4,7\%$; 5', $101,3 \pm 3,9\%$; 30', $89 \pm 7,6\%$; 18h, $74,7 \pm 7,2\%$). Esta diminuição da ativação da JNK parece ser dependente da presença da ECA na membrana plasmática, uma vez que células CHO, que não expressam ECA, não apresentaram alteração na fosforilação da JNK nem mesmo após

18h de *shear stress* (CHO: Ctrl, $100 \pm 9,3\%$; 5', $100,2 \pm 3,3\%$; 30', $95,3 \pm 6,7\%$; 18h, $101,1 \pm 8,3\%$) (17b).

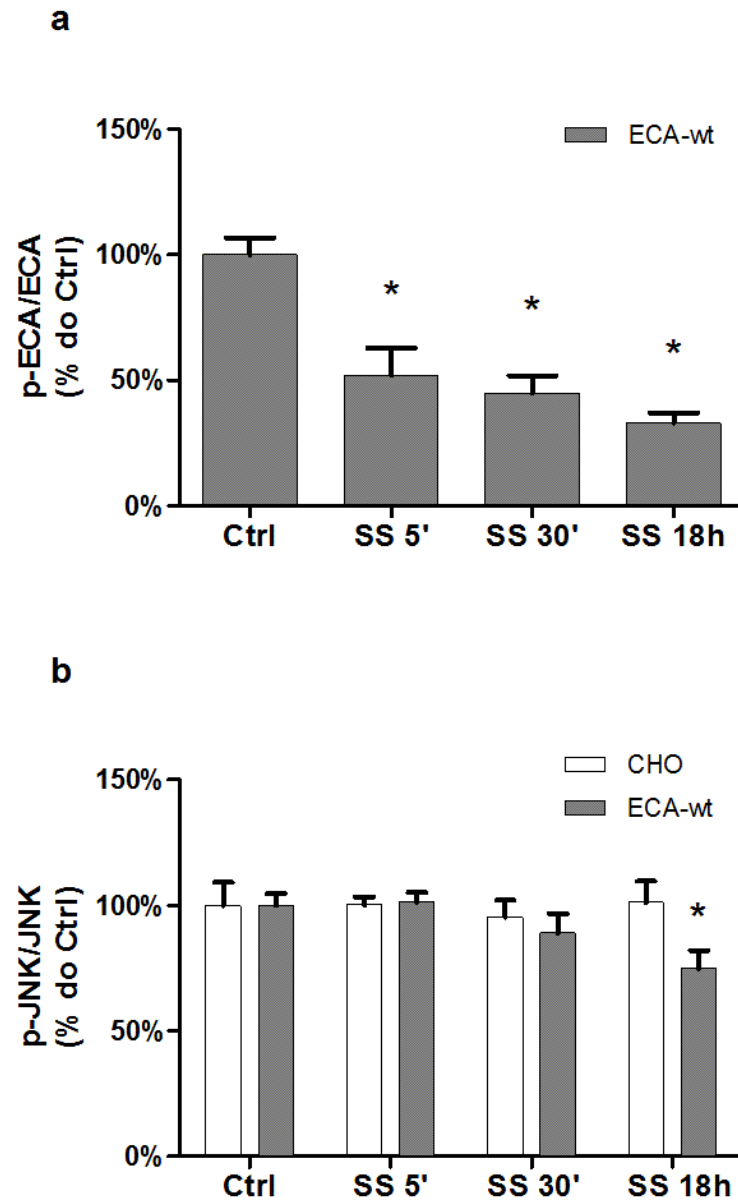


Figura 17: *Imunoblotting* das células CHO ao *shear stress*. A) *Imunoblotting* p-ECA Ser¹²⁷⁰/ECA. B) *Imunoblotting* p-JNK/JNK. SS = *shear stress*, 15 dinas/cm² pelos respectivos tempos (n=6-15). *p<0,05 vs Ctrl.

Para confirmar esses dados, cultura primária de células endoteliais obtidas a partir de veias safenas de humanos foram submetidas ao *shear*

stress nos mesmo intervalos de tempo. A figura 18a mostra que o *shear stress* diminuiu a fosforilação da ECA de maneira tempo-dependente, porém, diferentemente do observado nas células CHO, apenas com 18 h de estímulo é que observamos diferença estatística ($p < 0,05$) quando comparado às células controle (Ctrl, $100\% \pm 6,3\%$; 5', $90\% \pm 20,8\%$; 30', $66\% \pm 6,7\%$; 18h, $53\% \pm 8,7\%$). Além disso, como observado na figura 18b, a expressão protéica da própria ECA foi 34% menor após 18h de *shear stress* (Ctrl, $100\% \pm 7,7\%$; 5', $95\% \pm 12\%$; 30', $91\% \pm 8\%$; 18h, $66\% \pm 2\%$), como já demonstrado anteriormente no nosso laboratório que o *shear stress* diminui a expressão e atividade da ECA (101). A normalização da expressão da ECA foi realizada pela JNK uma vez que esta não se alterou com o *shear stress*.

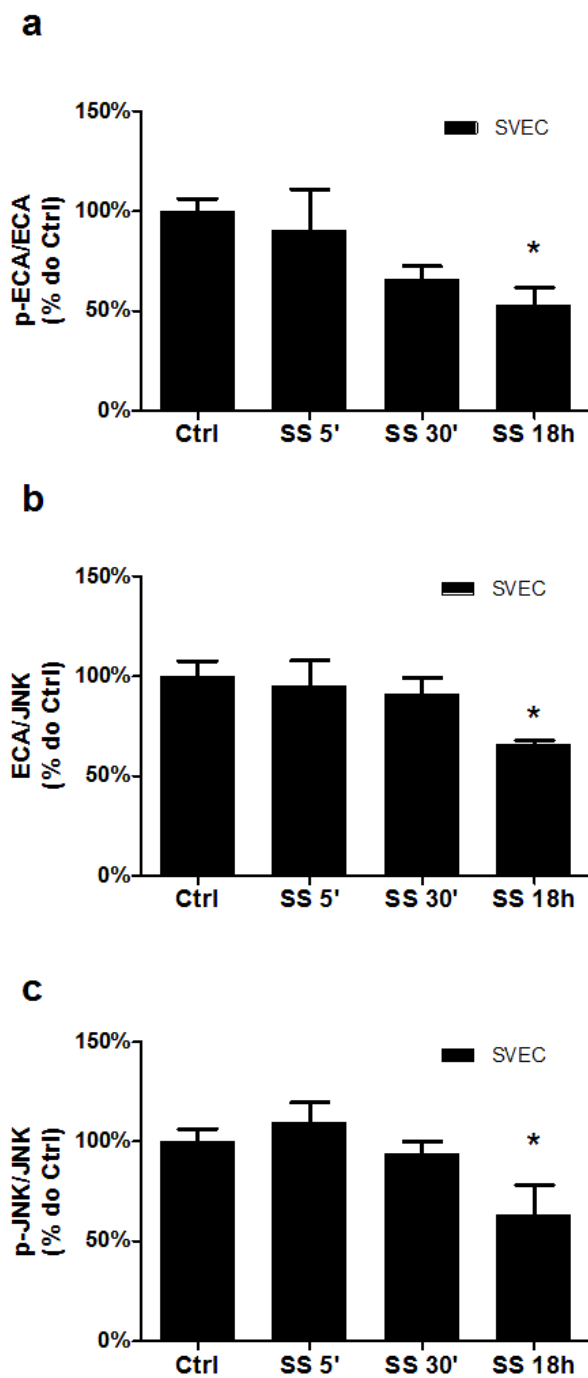


Figura 18: *Imunoblotting* das células endoteliais de veia safena humana submetidas ao *shear stress*. A) *Imunoblotting* p-ECA Ser¹²⁷⁰/ECA. B) *Imunoblotting* ECA/JNK. C) *Imunoblotting* p-JNK/JNK. SS = *shear stress*, 15 dinas/cm² pelos respectivos tempos (n=4-6). *p<0,05 vs Ctrl.

Já com relação à fosforilação da JNK (figura 18c), observamos diminuição de 37% somente após 18h de *shear stress* (Ctrl, $100 \pm 8,9\%$; 5', $110 \pm 11,7\%$; 30', $94 \pm 6,7\%$; 18h, $63 \pm 17,8\%$).

Dessa maneira, concluímos que a ECA é uma proteína mecanotransdutora de forças hemodinâmicas, ou seja, responde ao *shear stress* (diminuição da p-ECA, figura 17a e 18a), mas não ao estiramento celular (figura 15a e 16a) e interfere na modulação intracelular da JNK (diminuição da p-JNK, figura 17b e 18c).

Uma vez que já está descrito na literatura a habilidade dos inibidores da ECA em induzir a fosforilação da ECA e assim aumentar a sua própria expressão (62), e nós encontramos que o *shear stress* exerce exatamente o efeito oposto, ou seja, diminuição da fosforilação da cauda citoplasmática da ECA e diminuição da expressão da enzima, decidimos por realizar o experimento de *shear stress* na presença do inibidor da ECA. Interessantemente, não houve modificação sobre a fosforilação da ECA (Ctrl, $100 \pm 9,8\%$; 5', $110 \pm 39,8\%$; 30', $89 \pm 37,5\%$; 18h, $91 \pm 18,9\%$) (figura 19) o que sugere que as respostas estão contra-reguladas em células endoteliais de humanos.

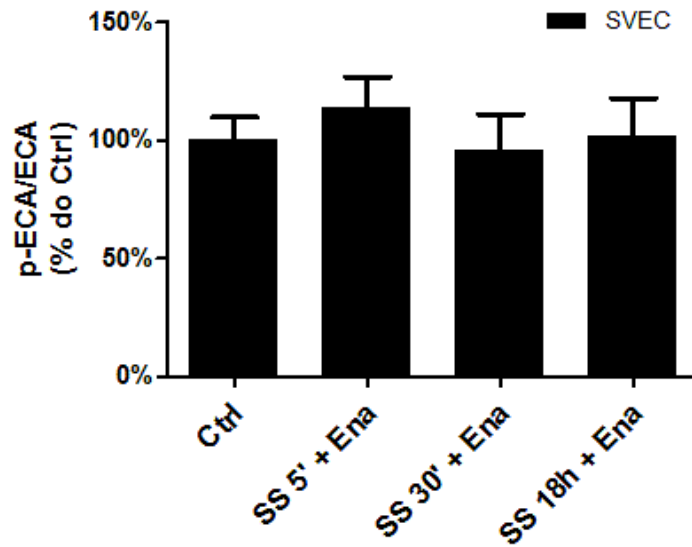


Figura 19: *Imunoblotting* das células endoteliais de humanos submetidas ao *shear stress* e tratadas com inibidor da ECA. *Imunoblotting* p-ECA Ser¹²⁷⁰/ECA. SS = *shear stress*, 15 dinas/cm² pelos respectivos tempos. Ena = Enalapril 0,5uM administrados 10' antes do início do SS (n=3).

4.4. REGULAÇÃO DA ECA PELAS FORÇAS HEMODINÂMICAS

Dados anteriores do laboratório descrevem que o *shear stress* modula a expressão da ECA (101), porém de maneira ainda desconhecida. Além disto, demonstrou que a diminuição da expressão da ECA pelo *shear stress* não é dependente da produção de NO, umas das principais moléculas vasoativas liberadas por células endoteliais em resposta ao *shear stress* (96).

Como já relatado na introdução desta tese, a fosforilação da ECA é uma das vias responsáveis por modular a sua própria expressão em resposta aos inibidores da ECA, como um *feedback* positivo da administração crônica desses fármacos. Uma vez que observamos na sessão anterior de resultados que essa fosforilação é também modulada pelo *shear stress*, fomos então estudar qual a importância dessa sinalização

na modulação da própria ECA pelo próprio *shear stress*. Para este objetivo, utilizamos as células CHO (que não expressam a ECA) e as linhagens com expressão da ECA selvagem (ECA-wt) ou com expressão da ECA sem a porção intracelular (ECA-cito-del) transfectadas com um plasmídeo repórter de expressão da luciferase controlada pela região promotora da ECA (W-luc, mais detalhes sobre esta construção foi descrito na sessão de materiais e métodos). Desta maneira, estímulos de modulação da expressão da ECA podem ser analisados através da atividade da Luciferase, um método simples, rápido e barato.

Os resultados deste experimento de gene repórter estão na figura 20 e estão representados pela atividade da Luciferase corrigido pela atividade da renila. Células CHO (sem a expressão da ECA) submetidas ao *shear stress* por 18 horas não modificaram a atividade do promotor da ECA (Ctrl, $100 \pm 15\%$; SS 18h, $105 \pm 5,5\%$). Já nas células CHO+ECA-wt (ECA selvagem, barras azuis), observamos que o *shear stress* diminuiu 40% a atividade do promotor da ECA (Ctrl, $100 \pm 7,2\%$; SS 18h, $60 \pm 8,9\%$), sugerindo um papel fundamental da presença da ECA para modular sua própria expressão em resposta ao *shear stress*. Entretanto, esta resposta poderia estar ocorrendo devido à liberação de fatores para o meio celular estimulados pelo *shear stress* e que estaria agindo de maneira parácrina no controle da expressão da ECA. Desta forma, as células CHO e ECA-wt foram submetidas ao *shear stress* por 18h e esse meio de cultura condicionado no estímulo físico foi transferido por mais 18h para uma nova placa de cultura com o mesmo tipo celular. Como pode ser observado ainda

na figura 20, esse meio condicionado não causou nenhuma alteração na atividade promotora da ECA (Ctrl, $100 \pm 7,2\%$; Cond, $108 \pm 10,8\%$) o que nos leva a descartar a hipótese da ação secundária de fatores liberados pelo *shear stress* e realça nossa evidencia da ECA como mecanotransdutora de estímulos físicos. Como controle positivo, utilizamos dois inibidores da ECA, enalapril e captopril, e observamos que ambos aumentaram a atividade do promotor da ECA (Ctrl, $100 \pm 7,2\%$; Ena, $188 \pm 12,4\%$; Cap, $153 \pm 17,7\%$).

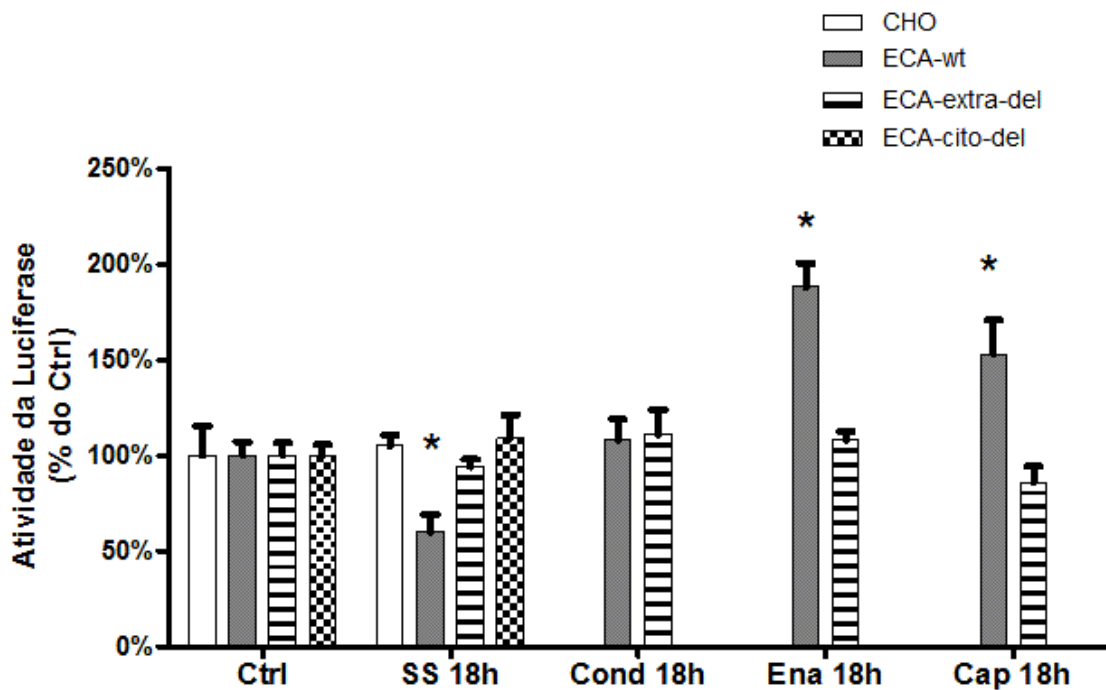


Figura 20: Atividade do promotor da ECA. SS = *shear stress*, 15 dinas/cm² por 18h. Cond = células expostas a meio de cultura condicionado no SS por 18h. Ena = Enalapril 0,5 uM. Cap = Captopril 0,5 uM (n=4-6). *p<0,05 vs Ctrl.

Uma vez demonstrada a necessidade da presença da ECA na superfície celular para regular a sua atividade promotora e negada a hipótese de fatores liberados pelo *shear stress* participando desta resposta,

nossa próxima pergunta foi buscar compreender qual o papel da porção intracelular da ECA como mecanotransdutora da sinalização citoplasmática e da porção extracelular como mecanosensora do estímulo físico. Dessa maneira, as linhagens celulares CHO, ECA-cito-del e CHO+ECA-extra-del também foram transfectadas com o plasmídeo W-luc e a resposta da atividade promotora da ECA após o *shear stress* foi avaliada (figura 20). Nenhuma das duas linhagens celulares respondeu ao *shear stress* de maneira a diminuir a atividade promotora da ECA como na ECA-wt (ECA-cito-del: Ctrl, $100 \pm 5,5\%$; SS 18h, $109 \pm 12,1\%$; ECA-extra-del: Ctrl, $100 \pm 6,6\%$; SS 18h, $94 \pm 4\%$). Estes dados demonstram que diminuição da expressão da ECA pelo *shear stress* é dependente da sinalização mediada pela sua porção citoplasmática, e que a porção extracelular da enzima exerce papel fundamental na mecanotransdução do estímulo físico.

4.5. PARTICIPAÇÃO DA c-jun N-TERMINAL KINASE

Por fim, para comprovar a participação da via da JNK na regulação da ECA, células ECA-wt foram transfectadas com o plasmídeo reporter W-luc e tratadas por 18 horas com o inibidor específico da JNK (SP600125: 10 e 20nM), como que se mimetizássemos a condição do *shear stress* de diminuição da JNK. Assim, verificamos se a diminuição da JNK, por si só, já seria suficiente para diminuir a atividade do promotor da ECA, uma vez que nossos resultados sugerem que esta via está inibida via fosforilação citoplasmática da ECA pelo *shear stress*. A figura 21 mostra que a inibição basal dessa via foi suficiente para diminuir a atividade do promotor da ECA

em 56% para ambas as doses o que reforça a participação dessa via intracelular em modular a expressão da ECA.

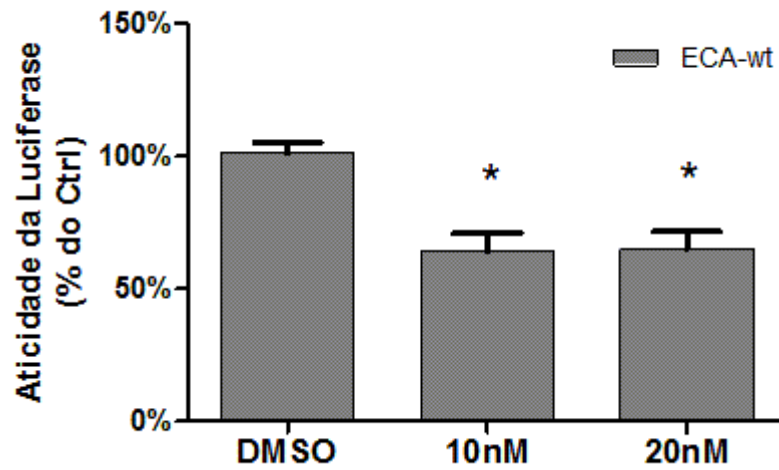


Figura 21: Atividade do promotor da ECA em células ECA-wt tratadas com o inibidor da JNK SP600125. Tratamentos por 18h (n=7-9). *p<0,05 vs Ctrl.

5. RESULTADOS – CAPÍTULO II

Com objetivo de estudar o receptor AT1 como mecanosensor ao *shear stress*, utilizamos as células CHO (que não expressam o receptor AT1) e células CHO transfectadas permanentemente com o plasmídeo de expressão do receptor AT1a de rato. Essa linhagem celular foi gentilmente fornecida pelo Prof. Dr. Claudio Miguel Costa-Neto, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

5.1. CONFIRMAÇÃO DA EXPRESSÃO DO RECEPTOR AT1 NAS CÉLULAS CHO

5.1.1. Expressão gênica do receptor AT1a

Para confirmar a presença do receptor AT1a na membrana celular avaliamos a expressão gênica do receptor por RT-PCR. A figura 22 mostra que apenas as células CHO+AT1 expressam o receptor AT1a sendo as células CHO negativas. Como controle positivo utilizamos tanto fibroblasto cardíaco como cardiomiócitos extraídos de ratos neonatos.

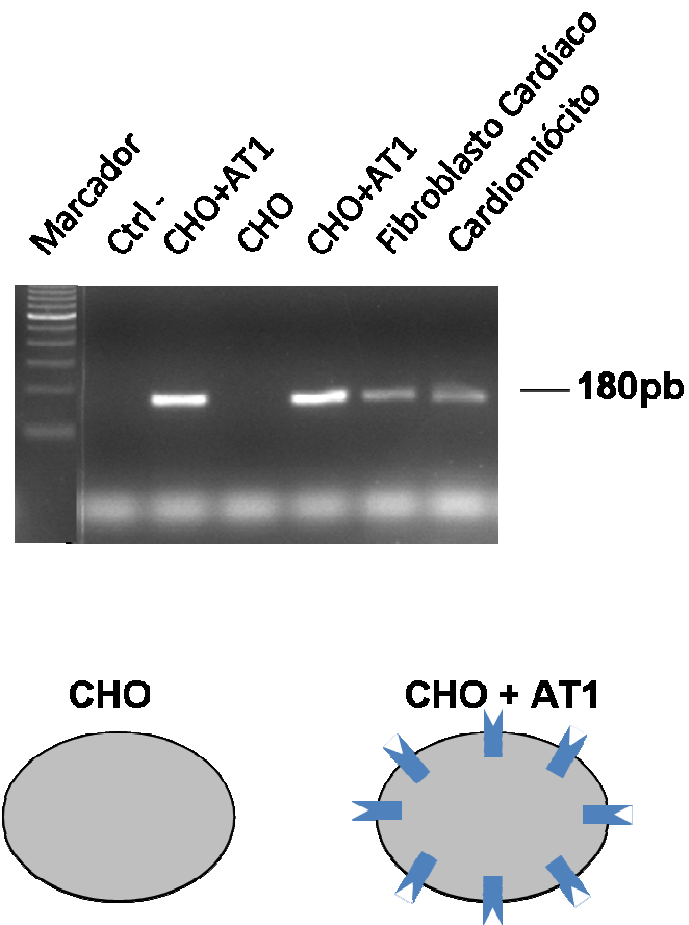


Figura 22: Expressão gênica do receptor AT1 nas células CHO, CHO+AT1a. Cardiomiócito e fibroblasto cardíaco de ratos neonatos foram utilizados como controle positivo.

5.1.2. Ensaio de Binding

A figura 23 mostra o resultado de *binding* para Ang II em células CHO e CHO+AT1a. Observa-se que, somente nas células CHO+AT1a (figura 23, linha azul), a medida que aumentamos a concentração da angiotensina II “fria” (não marcada, eixo x), observamos a diminuição da ligação da angiotensina “quente” (triciada, H³, eixo y). O mesmo não foi observado

quando o ensaio foi realizado nas células CHO, onde apenas uma marcação inespecífica e insignificante foi observada (figura 23, linha vermelha).

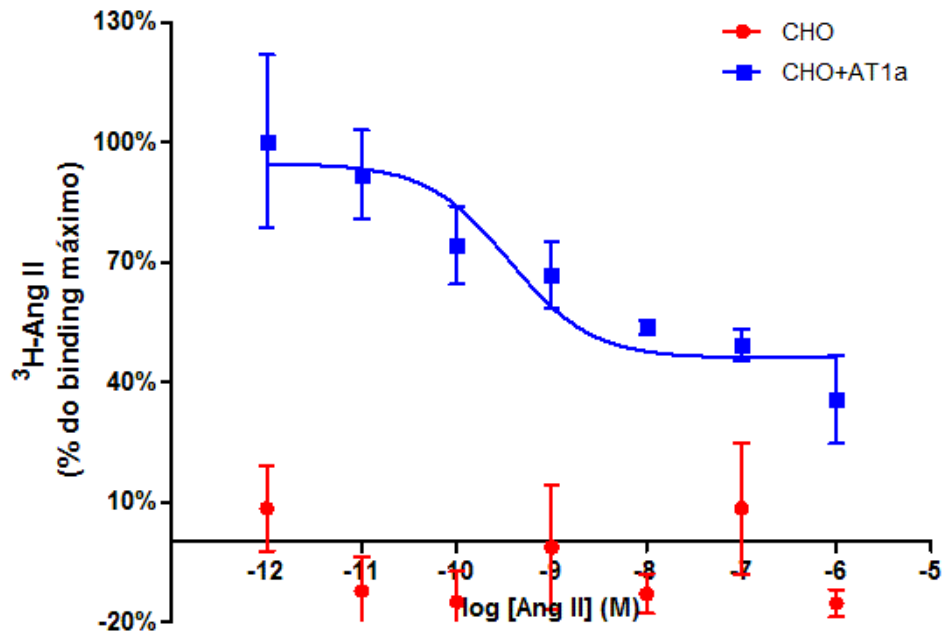


Figura 23: Ensaio de *binding* nas células CHO e CHO+AT1 (n=2).

5.1.3. Transiente de cálcio

Outro ensaio funcional realizado foi à determinação do transiente de cálcio intracelular ativado pela angiotensina II. Neste ensaio, as células são incubadas com um fluoróforo (Fluo-3-AM) que emite fluorescência quando ligado ao cálcio. Este fluoróforo é ligado a um grupo ester que facilita sua penetração celular. Uma vez dentro das células, este grupamento é clivado pelas esterases presentes no compartimento intracelular das células o que o mantém restrito ao citosol.

O resultado da figura 24 mostra um rápido e transiente aumento do cálcio intracelular nas células CHO+AT1a (entre 5 e 30 segundos de estimulação com angiotensina II) que não foi observado nas células CHO. Quando este mesmo experimento foi realizado na presença de um quelante de Ca^{2+} extracelular, observou-se apenas um primeiro pico de fluorescência devido a entrada de cálcio no citosol proveniente de reservas intracelulares, porém ausente o segundo pico de fluorescência dependente de entrada de cálcio do meio extracelular.

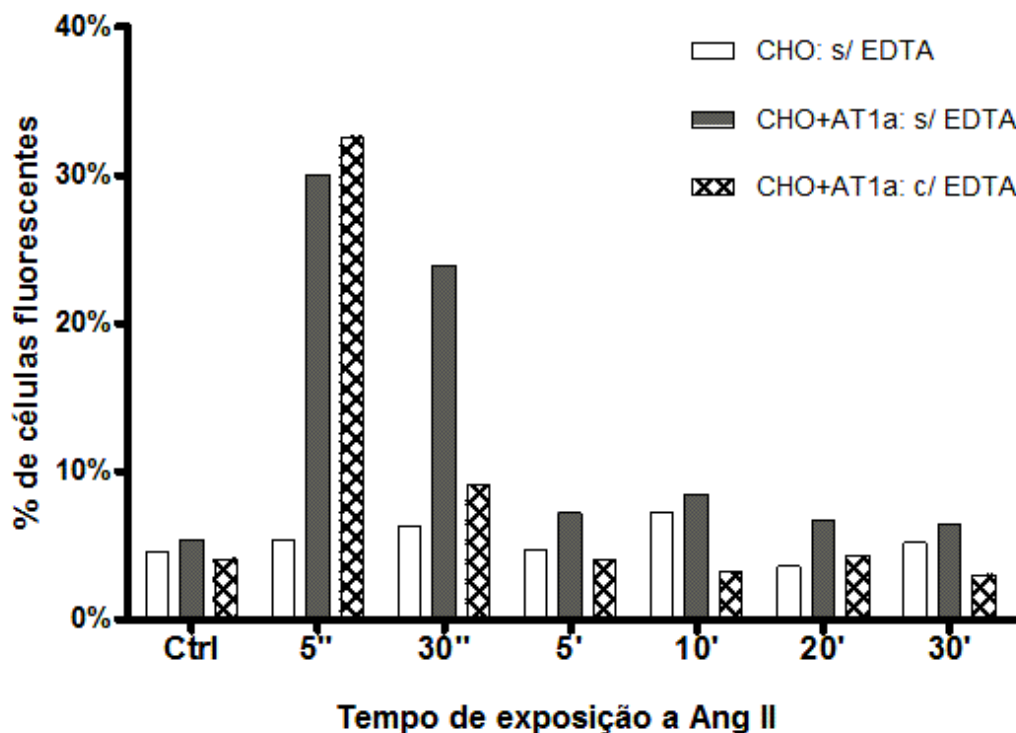


Figura 24: Ensaio de transiente de cálcio nas células CHO e CHO+AT1a. EDTA 5mM; Ang II 1uM.

5.1.4. Sinalização intracelular

Todos os resultados apresentados em relação à ativação do receptor AT1 foram avaliados de acordo com a ativação da ERK, uma vez que, as vias estudadas (JAK2, Src, Proteína G) em algum momento convergem para a ativação desta molécula.

Inicialmente, observamos se no estado basal somente a presença de receptores AT1a seria suficiente para causar ativação intrínseca da ERK. Quando comparado a fosforilação da ERK entre célula CHO e célula CHO+AT1a, não foi observado diferença significativa (figura 25a; CHO, 100% ± 12% vs CHO+AT1a, 112% ± 21%) sugerindo, portanto, que o receptor AT1a selvagem não apresenta ativação constitutiva da ERK intracelular.

Células CHO e CHO+AT1a foram cultivadas na ausência de soro fetal bovino por pelo menos 12h antes de serem tratadas por 10' com doses crescentes de angiotensina II (Ang II; 0, 0.1, 10 e 1000 nM). A fosforilação da ERK foi analisada por *immunoblotting* (figura 25b). Observa-se ativação de ERK em resposta a Ang II somente nas células CHO+AT1a (CHO: 0 nM, 100% ± 5%; 0.1 nM, 100% ± 6%; 10 nM, 97% ± 5%; 1000 nM, 106% ± 3%; CHO+AT1: 0 nM, 100% ± 9%; 0.1 nM, 166% ± 12%; 10 nM, 187% ± 15%; 1000 nM, 304% ± 16%) . Esta resposta é inibida por bloqueadores específicos do receptor AT1 conforme mostrado na figura 27a.

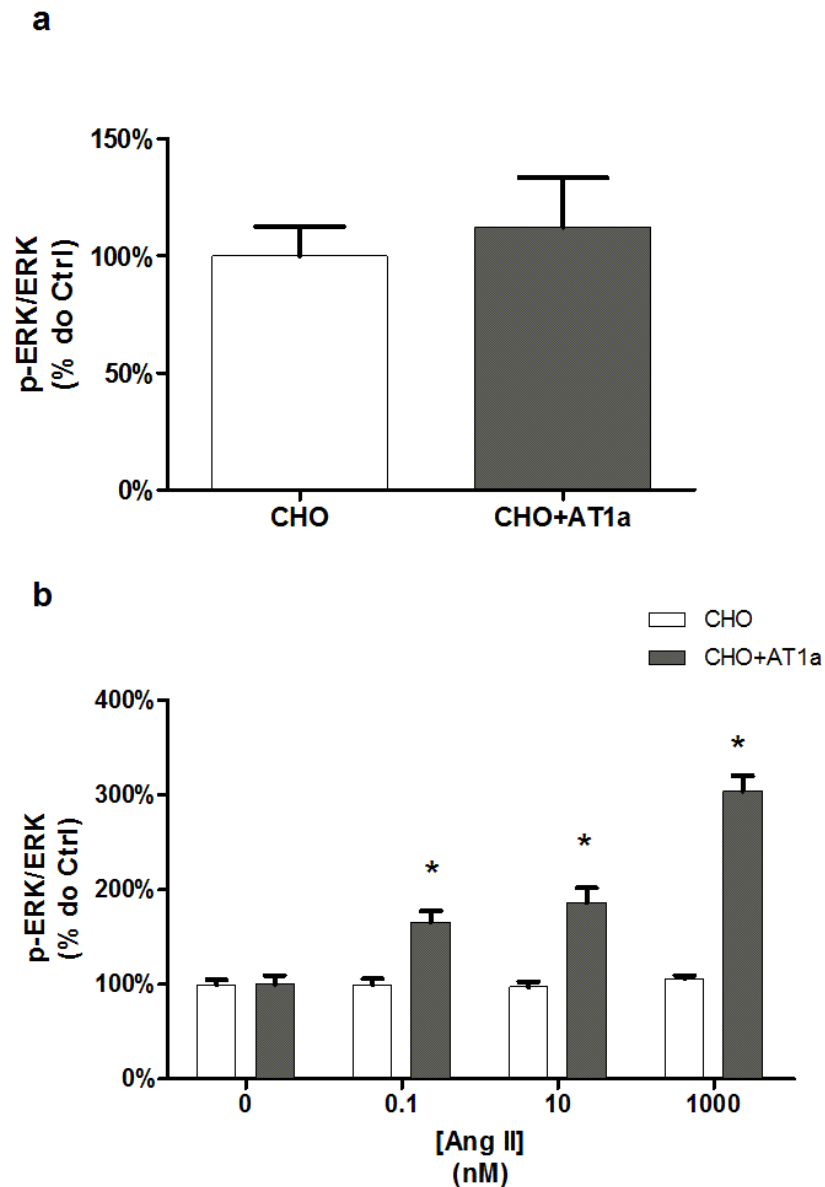


Figura 25: Sinalização do receptor AT1a. A) Ativação constitutiva do receptor AT1a analisada pela ativação da ERK em condições basais. B) Curva de dose de Ang II sobre a ativação da ERK nas células CHO e CHO+AT1a. Tratamento com Ang II por 10' (n=8). * $p < 0.05$ vs 0 nM.

Assim, demonstramos a presença do receptor AT1a de maneira funcional na membrana celular das células CHO+AT1a e a ausência nas células CHO.

5.2. ATIVAÇÃO DO RECEPTOR AT1 PELO *SHEAR STRESS*

Para todos os experimentos de *shear stress* (SS) as células CHO e CHO+AT1a foram cultivadas na ausência de soro fetal bovino por pelo menos 12h. As células foram submetidas ao *shear stress* de 15 dinas/cm² por 10' e a fosforilação da ERK (p-ERK/ERK) foi avaliada por *imunoblotting* (figura 26). Não foi observada ativação da ERK nas células CHO submetidas ao SS (figura 26; Ctrl, 100% ± 14% vs SS 10', 116% ± 7%). Já as células CHO+AT1a responderam ao estímulo físico com aumento de 2,8 vezes da fosforilação da ERK quando comparado a células estáticas (figura 26; Ctrl 100% ± 6% vs SS 10', 287% ± 26%, p<0.05).

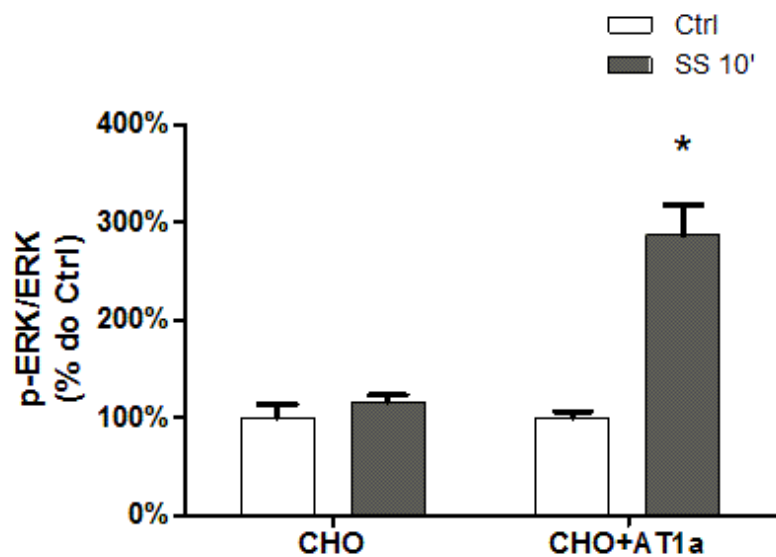


Figura 26: Ativação da ERK em resposta ao *shear stress* em células CHO e CHO+AT1a. SS = *shear stress*, 15 dinas/cm², 10' (n=6-9). * p<0.05 vs Ctrl.

Assim, esse resultado demonstra que o receptor AT1 pode ser ativado também em resposta ao *shear stress*.

5.3. CAPACIDADE DOS BLOQUEADORES DO RECEPTOR AT1 EM IMPEDIR A ATIVAÇÃO DO RECEPTOR PELO *SHEAR STRESS* E POTENCIALIZAR A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

Para avaliar se bloqueadores específicos do receptor AT1 inibem a ativação induzida pelo *shear stress*, células CHO+AT1a foram tratadas com Losartan e Candesartan, que são 2 bloqueadores que sabidamente inibem a ativação do receptor pela Ang II. A administração dos bloqueadores (1 μ M) foi sempre realizada por 30' antes de serem submetidas ao *shear stress* em células cultivadas na ausência de soro fetal bovino por pelo menos 12h. A figura 27a mostra que a dose dos bloqueadores utilizada é eficiente em impedir a ativação da ERK pela Ang II (10^{-7} M). Observa-se que Losartan e Candesartan impediram completamente os 300% de ativação da ERK pelo tratamento por 10' com angiotensina II (Ang II, 304% \pm 33%; +Losartan, 117% \pm 15%; + Candesartan, 101% \pm 10%). Já a figura 27b mostra Losartan e Candesartan possuem capacidades distintas de inibir a ativação da ERK pelo *shear stress*. Observa-se que o Losartan não diminuiu de maneira significativa a ativação da ERK pelo *shear stress* (SS, 280% \pm 26% vs SS + Los, 237% \pm 43%, $p > 0.05$). Já o Candesartan (SS, 280% \pm 26% vs SS + Cand, 120% \pm 12%, $p < 0.05$) diminuiu 89% da ativação da ERK pelo *shear stress* de maneira significativa. Além disso, o bloqueio fornecido pelo

Candesartan (SS+Cand, 120% \pm 12% vs Cand, 94% \pm 24%, $p < 0.05$) fez com que os níveis de ativação da ERK voltassem a ficar semelhantes às células controle mantidas em condições estáticas.

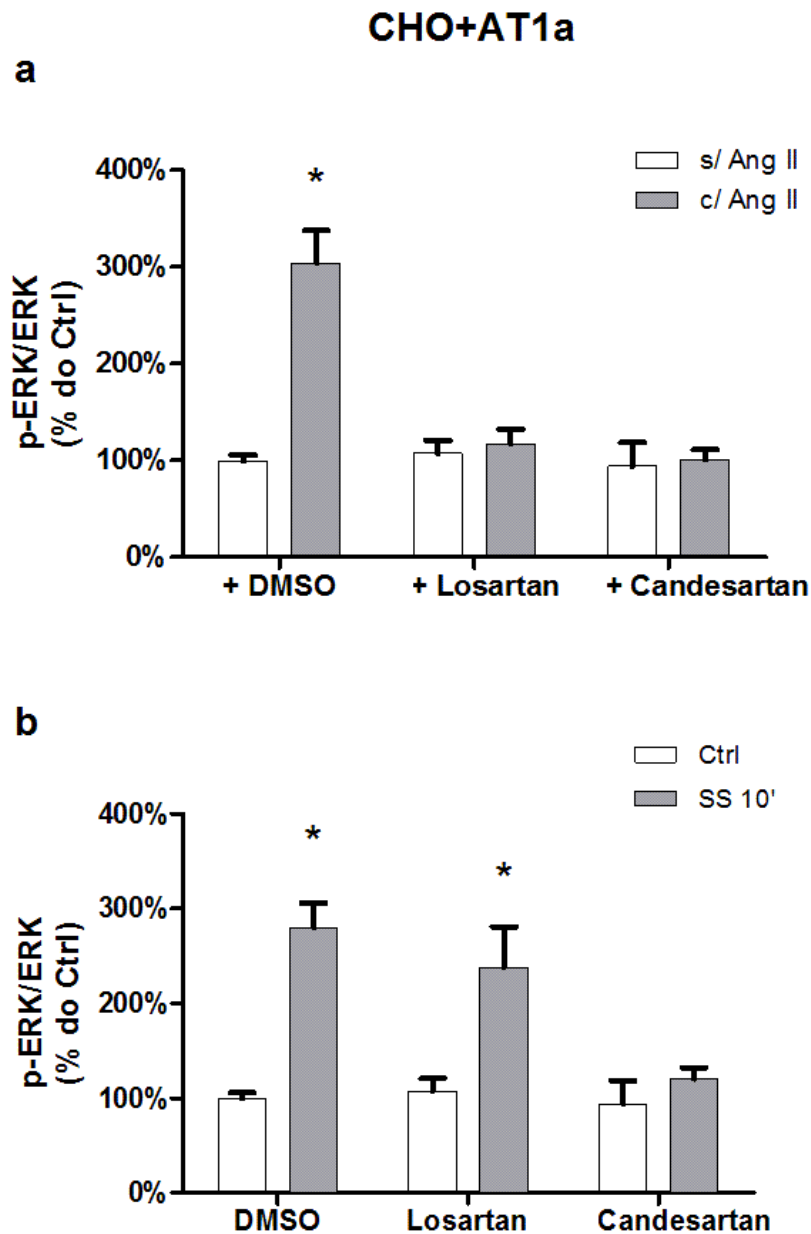


Figura 27: Papel dos bloqueadores do AT1 em impedir a ativação; A) em resposta a angiotensina II, B) em resposta ao *shear stress*. Células CHO+AT1a; SS, *shear stress*, 15 dinas/cm², 10'. Candesartan e Losartan, 10⁻⁶ M, Angiotensina II, 10⁻⁷ M, 10' (n=5-10). * $p < 0.05$ vs células s/ angII ou Ctrl.

Para melhor avaliar esta distinção de efeito do Losartan e Candesartan em bloquear o receptor AT1 em resposta ao *shear stress*, células CHO+AT1a foram tratadas simultaneamente com angiotensina II e submetidas ao *shear stress* por 10 minutos. Observa-se pela figura 28 que a administração de angiotensina II junto com o *shear stress* induz aumento de ~60% na ativação da ERK comparado com os 2 estímulos isolados (Ctrl, 100% ± 14%; Ang II, 250% ± 26%; SS 10', 242% ± 17%; Ang II + SS 10', 334% ± 33%). Somente a administração previa de Candesartan normalizou a ativação da ERK pelos 2 estímulos (Ctrl, 100% ± 14%; Ang II + SS 10' + Cand, 128% ± 19%) , enquanto o bloqueio com o Losartan foi parcial (Ctrl, 100% ± 14%; Ang II + SS 10' + Los, 262% ± 28%).

Assim, os dados obtidos até o momento demonstram que os receptores AT1 são ativados pelo *shear stress* (figura 26), e que bloqueadores específicos do receptor bloqueiam de maneira distinta essa ativação mecânica (figuras 27 e 28).

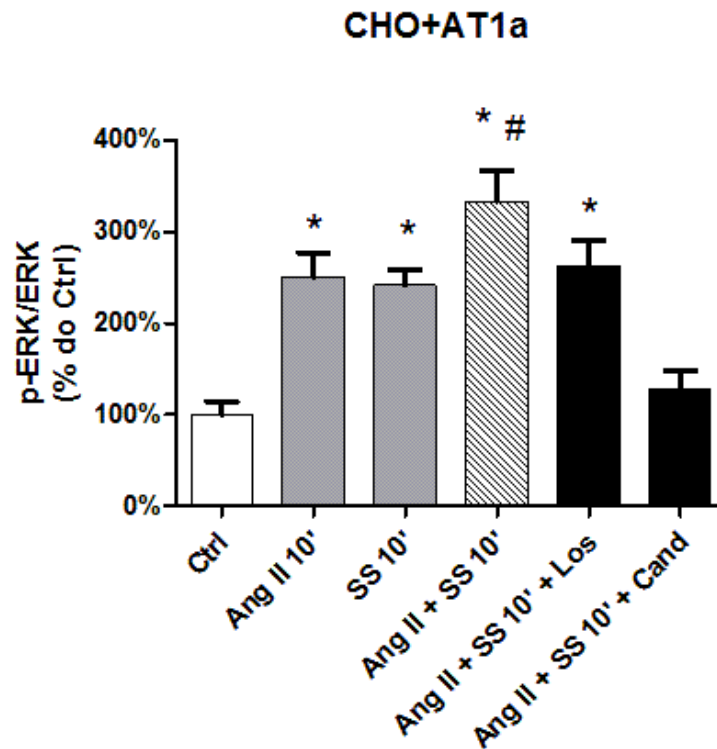


Figura 28: Papel dos bloqueadores do AT1 em células CHO+AT1a estimuladas com angiotensina II e *shear stress* simultaneamente. SS, *shear stress*, 15 dinas/cm², 10'. Candesartan e Losartan, 10⁻⁶M, Angiotensina II, 10⁻⁷M, 10' (n=5-11). * p<0.05 vs Ctrl e Ang II+SS+Cand, # p<0.05 vs Ang II, SS e Ang II+SS+Los.

Estes dados foram obtidos em linhagem celular de células CHO onde a única diferença era a presença do receptor AT1 (CHO vs. CHO+AT1). Para avaliar se os efeitos observados ocorrem em células que expressam o receptor AT1, os dados foram confirmados em cultura primária de células endoteliais de veia safena de humanos (SVEC, *safenous vein endothelial cells*). As células endoteliais expressam AT1 e encontram-se constantemente expostas ao *shear stress* por estarem em contato direto com o fluxo sanguíneo.

Assim como nas células CHO+AT1, Losartan e Candesartan bloquearam completamente a ativação do receptor AT1 em células endoteliais humanas tratadas com Ang II (figura 29a - Ang II, $166\% \pm 23\%$; +Losartan, $104\% \pm 2\%$; +Candesartan, $83\% \pm 7\%$), porém apresentaram eficiência de bloqueio distinto quando as células foram estimuladas pelo *shear stress* (figura 29b - SS, $165\% \pm 10\%$; +Losartan, $170\% \pm 11\%$; +Candesartan, $123\% \pm 2\%$). Embora as células tratadas com Candesartan e submetidas ao *shear stress* tenham ainda uma ativação residual de 23%, esse valor não foi significativamente diferente das células que só foram tratadas com o Candesartan (Candesartan, $102\% \pm 8\%$ VS SS+Candesartan, $123\% \pm 2\%$).

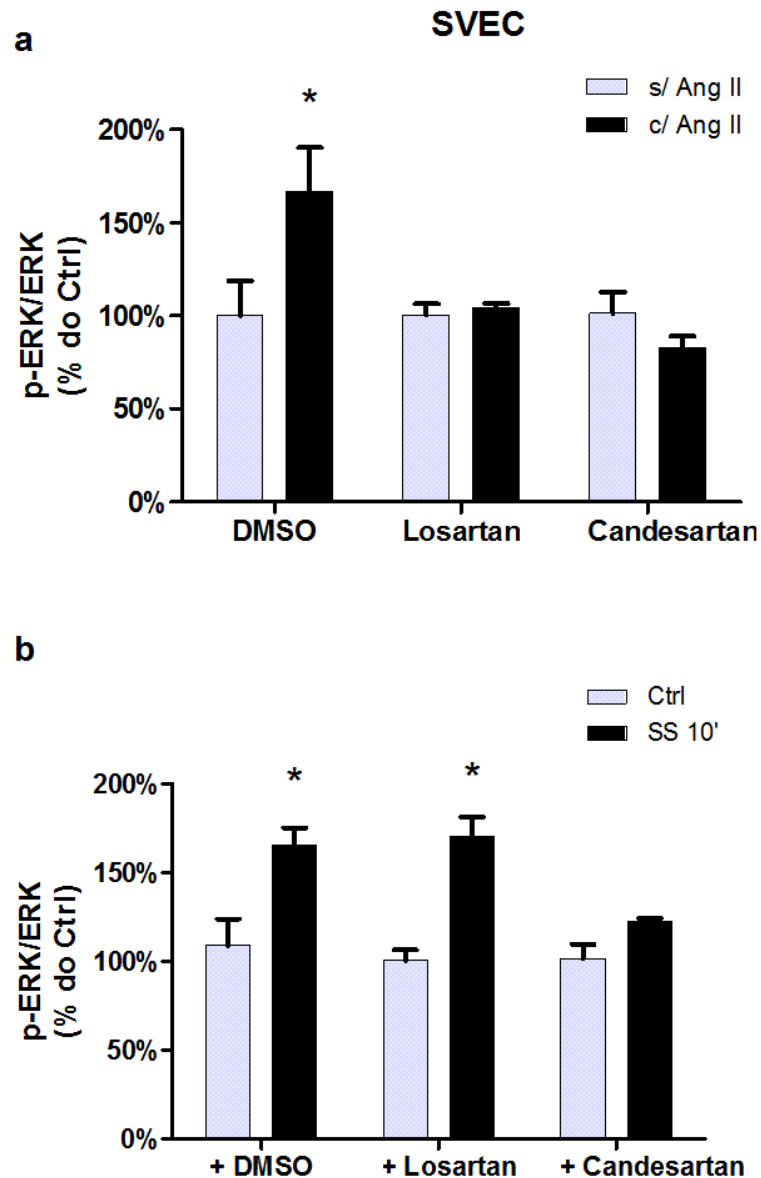


Figura 29: Papel dos bloqueadores do AT1 em impedir a ativação; A) em resposta a angiotensina II, B) em resposta ao *shear stress*. Células SVEC, células endoteliais de veia safena humana; SS, *shear stress*, 15 dinas/cm², 10'. Candesartan e Losartan, 10⁻⁶M; Angiotensina II, 10⁻⁷M, 10' (n=4-8); * p<0.05 vs células s/ angII ou Ctrl.

A linhagem celular CHO é bastante utilizada para estudar o sistema renina angiotensina, principalmente a ECA e o receptor AT1, pois ela não

expressa nenhum dos componentes do sistema renina angiotensina. Dessa maneira, podemos descartar em células CHO que a ativação do receptor AT1 após o *shear stress* seja secundária ao efeito autócrino ou parácrino da angiotensina II liberada no meio de cultura. Entretanto, o mesmo não pode ser afirmado com relação a células endoteliais de humanos. Assim, foi medida a liberação de angiotensina II para o meio de cultura nas células SVEC após o *shear stress* (figura 30). Não foi observado aumento significativo na produção de angiotensina II após o *shear stress* (Ctrl, $4.5 \pm 0.18 \times 10^{-12}$ M vs SS 10', $4.8 \pm 0.23 \times 10^{-12}$ M)

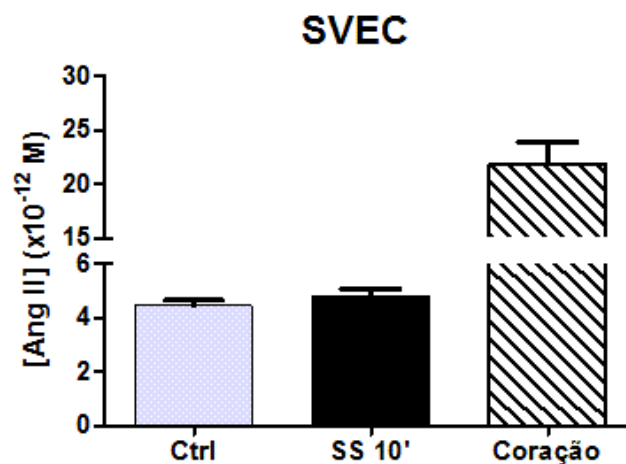


Figura 30: Liberação de angiotensina II no meio de cultura extracelular pelo *shear stress* em células endoteliais humanas. Como controle positivo do ensaio a AngII foi dosado em coração de rato (n=5).

Interessantemente, o Candesartan além de impedir a ativação do AT1 pelo *shear stress*, este antagonista também aumentou a liberação de óxido nítrico induzida pelo *shear stress*. Observa-se pela figura 31a que o

Candesartan potencializou a produção de nitrito (NO_2), um metabolito do oxido nítrico, pelo *shear stress* (DMSO, $100\% \pm 8\%$; Losartan, $116\% \pm 4\%$; Candesartan, $130\% \pm 19\%$; SS 10', $168\% \pm 10\%$; +Losartan, $165\% \pm 13\%$; +Candesartan, $236\% \pm 26\%$) que pode ser, pelo menos parcialmente explicada pela maior fosforilacao da eNOS (oxido nítrico sintase endotelial) observada pela figura 31b (DMSO, $100\% \pm 12\%$; Losartan, $105\% \pm 12\%$; Candesartan, $112\% \pm 12\%$; SS 10', $137\% \pm 11\%$; +Losartan, $147\% \pm 10\%$; +Candesartan, $196\% \pm 13\%$). Somente uma pequena regulação foi observada tanto na produção de nitrito quanto na fosforilação da eNOS pelos antagonistas do receptor AT1 na ausência da força física.

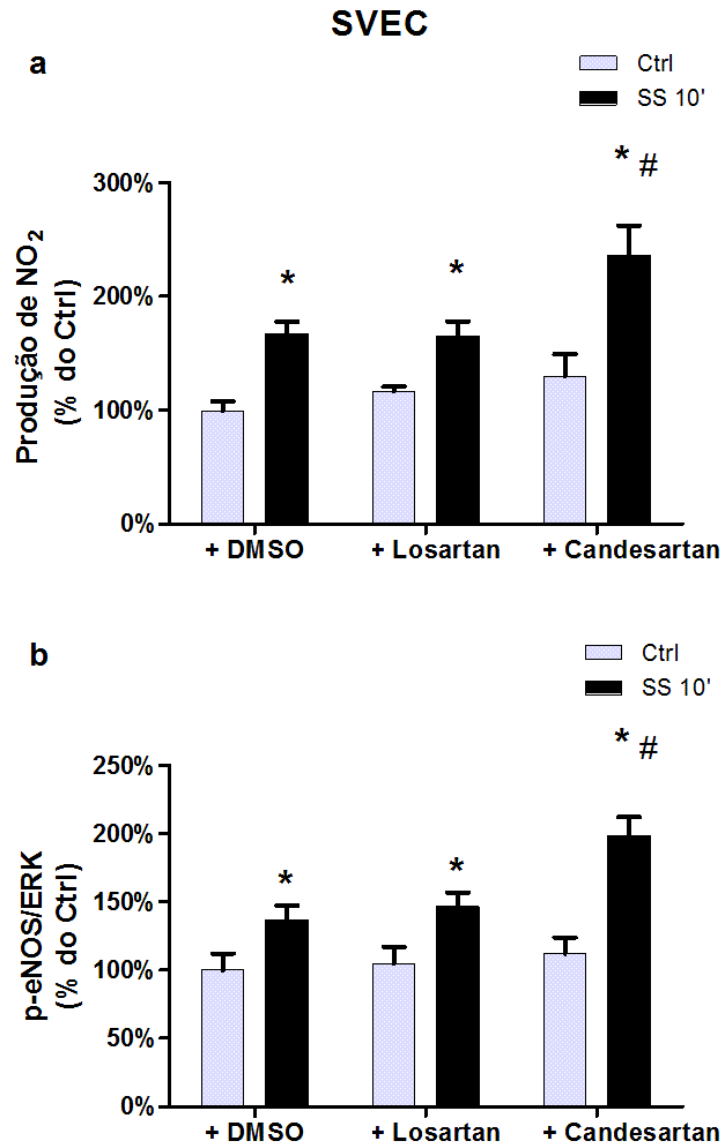


Figura 31: Produção de NO e regulação da eNOS pelo *shear stress* na presença dos antagonistas do receptor AT1. A) Dosagem de nitrito no meio de cultura após 10 minutos de *shear stress*. B) Ativação da eNOS pelo *shear stress*. Células SVEC, células endoteliais de veia safena humana; SS, *shear stress*, 15 dinas/cm², 10'. Candesartan e Losartan, 10⁻⁶M (n=4-8). * p<0.05 vs Ctrl; # p<0.05 vs SS 10' e SS 10'+Los.

Em resumo, os dados obtidos tanto em linhagem celular CHO quanto em células endoteliais humanas demonstram que os receptores AT1 são ativados pelo *shear stress* (figura 26), existe diferença entre os bloqueadores

do receptor em impedir essa ativação mecânica (figura 27, 28 e 29) e que o Candesartan é capaz de potencializar a ativação da eNOS e produção de óxido nítrico pelo *shear stress*.

A eNOS pode ter sua ativação regulada seja por fosforilação ou por ativação direta pelo cálcio, por exemplo, como acontece nos momentos iniciais do *shear stress* (entre segundos e minutos). Na tentativa de bloquear o transiente de cálcio induzido pela angiotensina II com os antagonistas do receptor AT1 utilizados neste trabalho, um resultado interessante foi observado. A figura 32 mostra que o Candesartan, mas não o Losartan, induziu aumento na entrada de cálcio para dentro do citosol em células CHO+AT1a que foi bloqueado na presença de um quelante de cálcio extracelular, EDTA. Na figura 32a mostramos uma representação gráfica do aumento temporal da entrada de cálcio nas células na presença do Candesartan. No eixo "x" tem-se a intensidade de fluorescência e no eixo "y" o número de eventos ou células analisadas. O deslocamento da curva para a direita, como observado no caso do Candesartan, indica aumento no cálcio dentro do citoplasma das células. Já a figura 32b significa a quantificação do número de células fluorescentes ao longo do tempo. Observamos aumento do número de células fluorescentes (indicativo do aumento do cálcio intracelular) já a partir de 10 minutos na presença do Candesartan e aumento sistemático até 60 minutos após. Nota-se também que esse aumento no cálcio intracelular deve-se a entrada de íons do meio extracelular uma vez que esta resposta não foi mais observada na presença do EDTA.

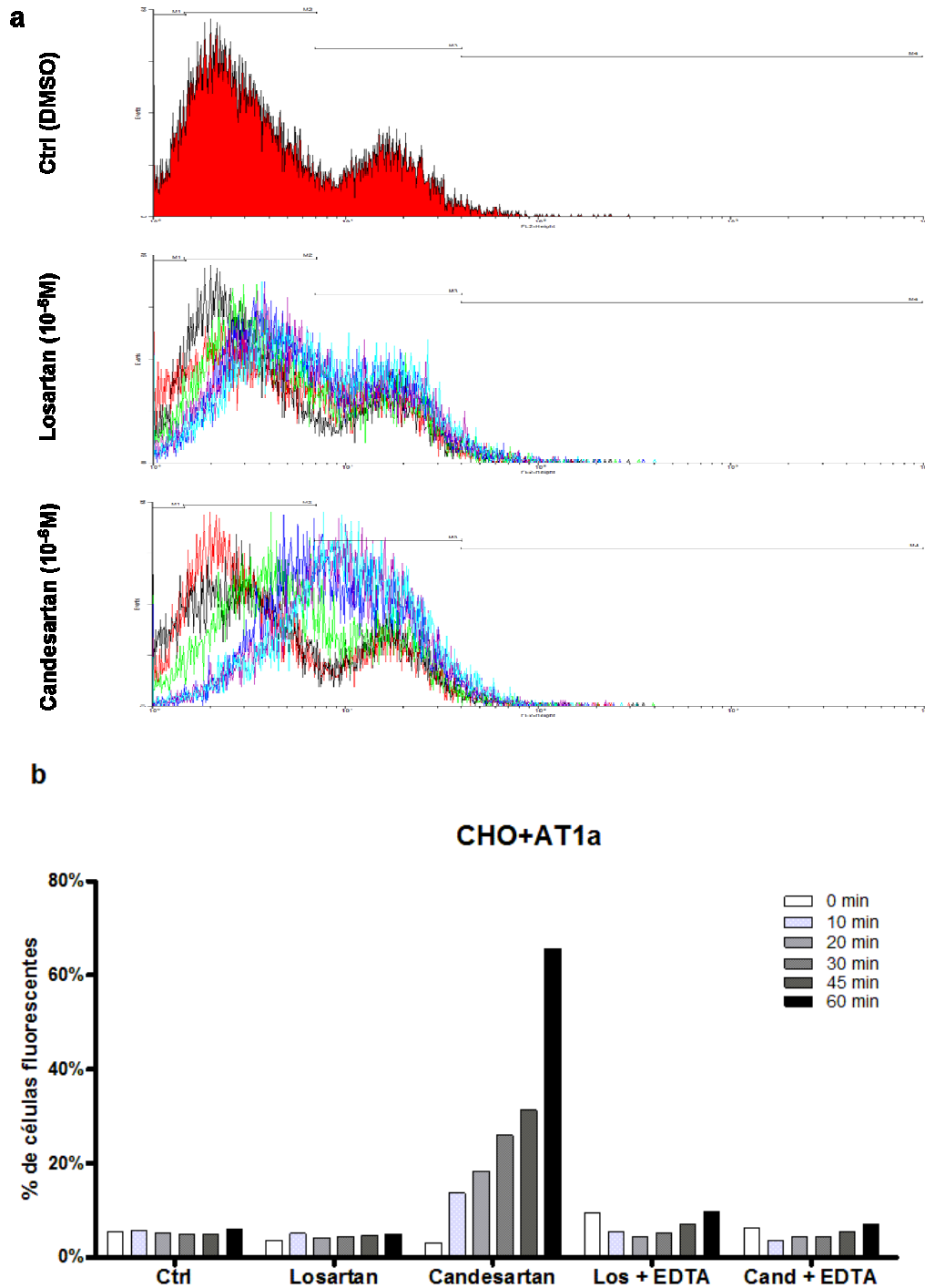


Figura 32: Transiente de cálcio na presença dos bloqueadores do receptor AT1. A) Figura representativa do aumento do cálcio intracelular avaliado por citometria de fluxo. No eixo “x” a intensidade da fluorescência e no eixo “y” o numero de eventos. B) Análise do transiente de cálcio ativado pelos antagonistas do receptor AT1. Células CHO+AT1a; Candesartan e Losartan, $10^{-6}M$.

No presente trabalho não testamos a participação deste transiente de cálcio na ativação da eNOS e conseqüente na produção do óxido nítrico. Entretanto, vale a pena observar que, apesar do *shear stress* ser de apenas 10 minutos, o antagonista do receptor foi adicionado ao meio de cultura 30 minutos antes, contabilizando, ao final do *shear stress* um total de 40 minutos de atuação sobre as células, tempo esse que, como observado pela figura 32b, quase 40% de todas as células já apresentam aumento no cálcio intracelular.

Recentemente foi publicado que o Valsartan é capaz de regular a interação entre o receptor AT1 e a eNOS de maneira a interferir na produção do oxido nítrico (110). Neste trabalho o autor utilizou uma dose maior do antagonista do receptor que a utilizada neste trabalho (10^{-5} M) e observou aumento de 0.05nM para 0.2nM (4x, 3 horas), 0.4nM (8x, 6 horas) e 0.6nM (12x, 12 horas) de oxido nítrico no meio de cultura. Considerando que o Vasartan possui estrutura química bastante semelhante ao Candesartan, acreditamos que no nosso estudo o Candesartan deve estar atuando como catalisador da produção do oxido nítrico pelo *shear stress* uma vez que utilizamos dose e tempo inferiores aos encontrados na literatura.

Um fato que nos chamou a atenção foi que o Candesratan (10^{-5} M) induziu morte celular em células endoteliais humanas logo nas primeiras 6 horas de tratamento. O mesmo não foi observado com o Losartan (10^{-5} M) ou com doses menores de Candesartan (10^{-6} M) (figura 33). Estes resultados sugerem que doses muito elevadas do Candesartan podem ativar vias de apoptose devido ao aumento to cálcio intracelular. Ainda que este dado

necessite ser melhor investigado, parece que há um limiar de ativação ótimo do cálcio intracelular que pode exercer efeitos benéficos sobre a célula porém, doses acima desse limiar podem ativar vias apoptóticas intracelulares.

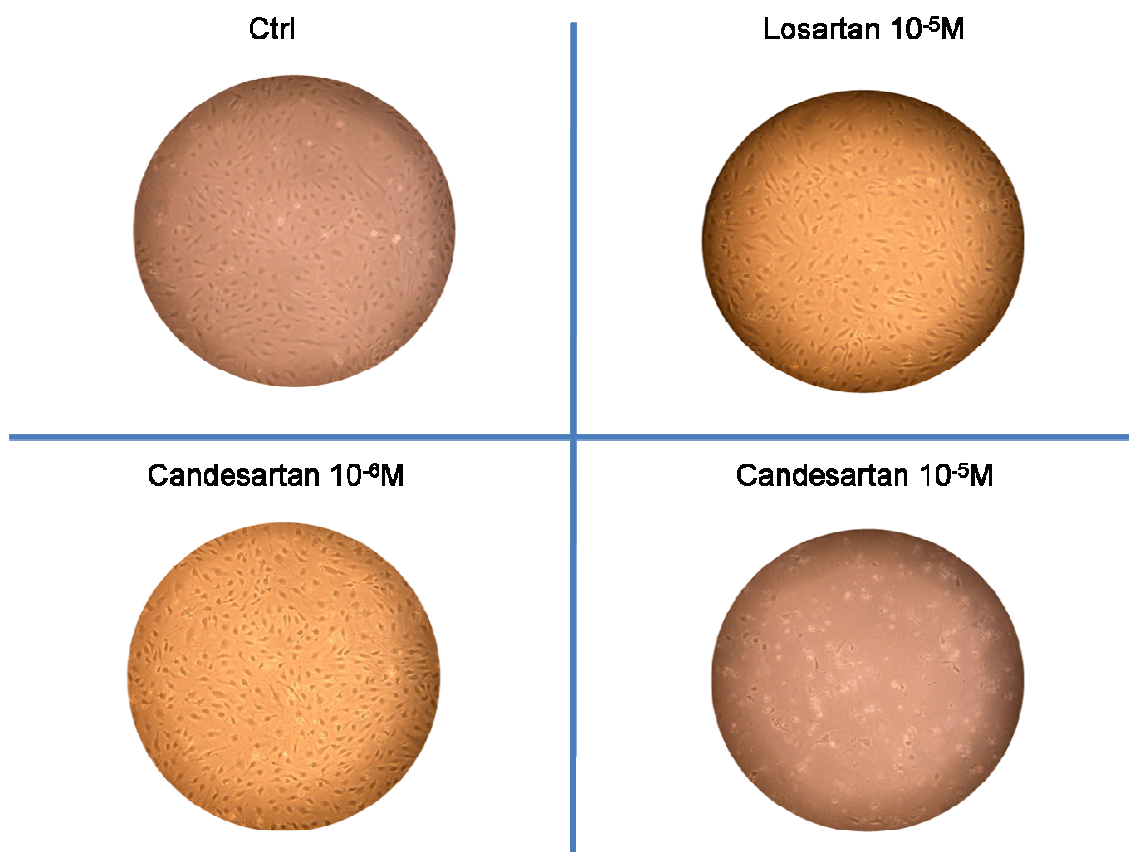


Figura 33: Fotos de células endoteliais humanas tratadas com diferentes doses do antagonista do receptor AT1 por 6h.

5.4. INTERAÇÃO *SHEAR STRESS* E ANGIOTENSINA II SOBRE O RECEPTOR AT1

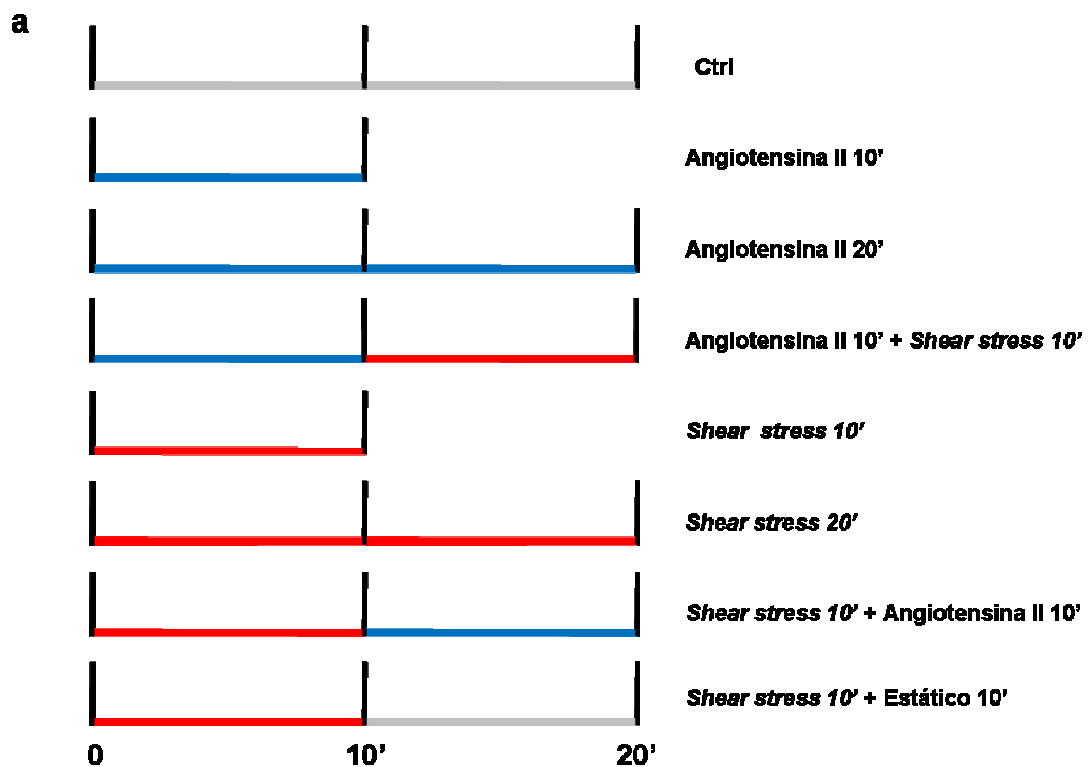
Para avaliar se o receptor AT1 internaliza em resposta ao *shear stress* da mesma maneira que ocorre com a Ang II foram realizados os

experimentos conforme mostrado na figura 12a. Se a internalização ou dessensibilização dos receptores em resposta ao *shear stress* estiver ocorrendo, esperamos não observar mais ativação da ERK em resposta a angiotensina II após o *shear stress*. A figura 34a mostra os grupos experimentais utilizados para este objetivo.

A figura 34b mostra o resultado da administração prévia de angiotensina II sobre o efeito da ativação da ERK pelo *shear stress*. Um grupo controle necessário neste experimento foi a presença da angiotensina II por 20' pois após os primeiros 10 minutos de administração de angiotensina II, não havia tempo hábil para que o meio de cultura fosse trocado (de maneira a remover a angiotensina II) antes de iniciar o estímulo de *shear stress*. Assim, o estímulo de *shear stress* após a administração da angiotensina II foi também realizado na presença do peptídeo no meio de cultura, como já demonstrado anteriormente. Entretanto, observamos que a angiotensina II ativa a ERK após 10 minutos ($263\% \pm 21\%$), porém esta resposta é diminuída após 20 minutos ($105\% \pm 25\%$). O *shear stress* após 10 minutos de angiotensina II manteve ativada a ERK ($205\% \pm 21\%$), ainda que em níveis ligeiramente menores que o estímulo de angiotensina II ou *shear stress* sozinhos ($265\% \pm 25\%$). Esses resultados mostram que a angiotensina II não impede a ativação do receptor pelo *shear stress*.

A figura 34c mostra a ativação da ERK pela angiotensina II após a exposição das células ao *shear stress*. Observa-se que, diferentemente do *shear stress* que manteve a ERK ativada mesmo após a administração de angiotensina II, o peptídeo não conseguiu exercer efeito significativo sobre a

ativação da ERK após as células serem inicialmente submetidas ao *shear stress* ($135\% \pm 27\%$). Esse resultado sugere que o *shear stress* induz alguma modificação sobre o receptor AT1 de forma que ele não responda mais a angiotensina II. Esta modificação pode ser explicada pela internalização dos receptores pelo *shear stress*, ou ainda alterações conformacionais que não permitem mais o acesso da angiotensina II para ativar o receptor (126).



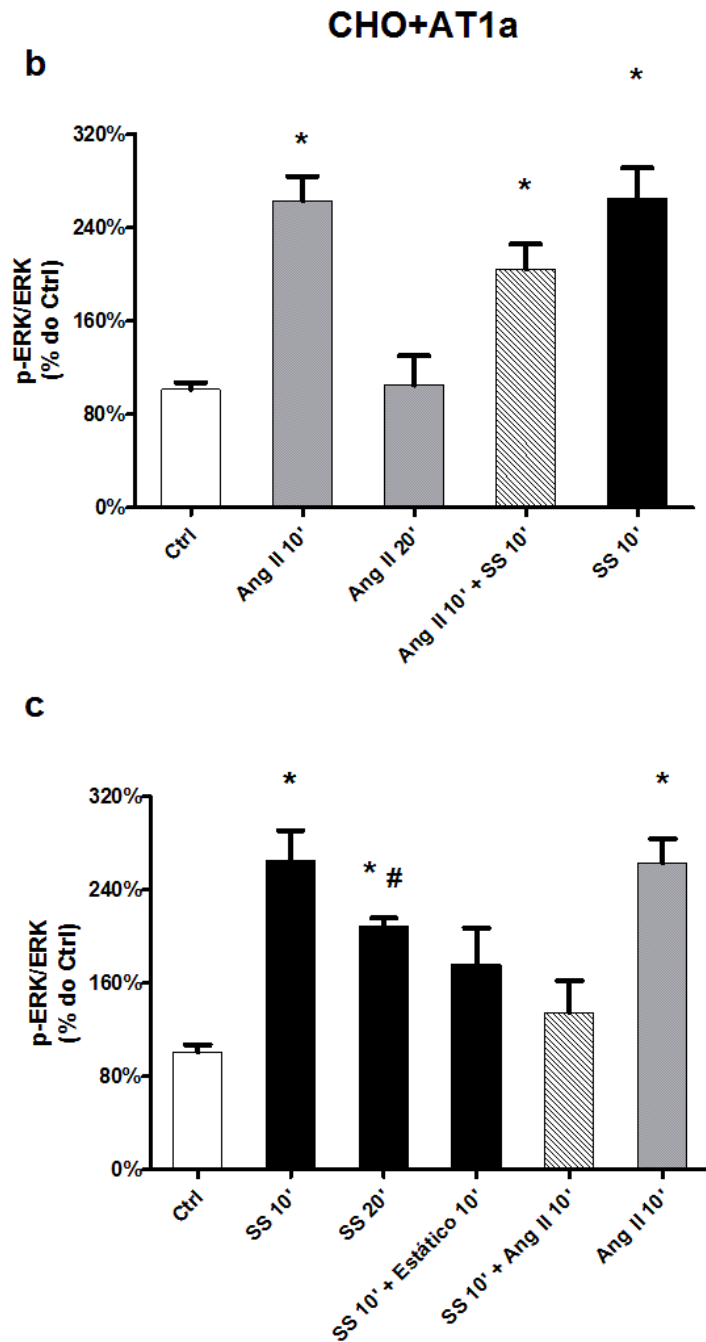


Figura 34: Interação na ativação da ERK pelo *shear stress* e pela angiotensina II. A) Desenho experimental utilizado B) Ativação da ERK em células expostas primeiro a angiotensina II e depois ao *shear stress*. C) Ativação da ERK em células expostas primeiro ao *shear stress* e depois a angiotensina II. Células CHO+AT1a; SS, *shear stress*, 15 dinas/cm², 10'. Angiotensina II, 10⁻⁷M. n=8-10. * p<0.05 vs ou Ctrl; # p<0.05 vs SS 10' e Ang II (n=6-15).

5.5. VIA INTRACELULAR ATIVADA PELO AT1a EM RESPOSTA AO SHEAR STRESS

Como já discutido anteriormente, o receptor AT1 é capaz de ativar diversas vias de sinalização intracelular, que convergem na a ativação de uma mesma proteína intracelular, a ERK $\frac{1}{2}$. O receptor AT1 é capaz de ativar vias intracelulares de maneira dependente ou independentes a proteína G. Nossa primeira abordagem foi investigar vias intracelulares iniciadas pela atividade tirosina quinase do receptor (via independente da proteína G). Nesse sentido, 2 vias foram inicialmente estudadas, Src e Jak-2.

A figura 35 mostra a ativação da proteína Src. Observa-se que o *shear stress* ativou essa via de maneira semelhante tanto em células CHO como em células CHO+AT1a (CHO: Ctrl, 100% \pm 4% vs SS 10', 130% \pm 10%. CHO+AT1a: Ctrl, 100% \pm 9% vs SS 10', 127% \pm 6%) indicando que a Src é ativada pelo shears stress independente do receptor AT1. Além disso, dados da literatura mostram que a fosforilação da Src pelo receptor AT1 causa ativação da ERK via transativação do receptor de EGF (48). Assim, a não ativação de Src por *shear stress* pode ser devido ao fato de que células CHO não expressam o receptor de EGF (83).

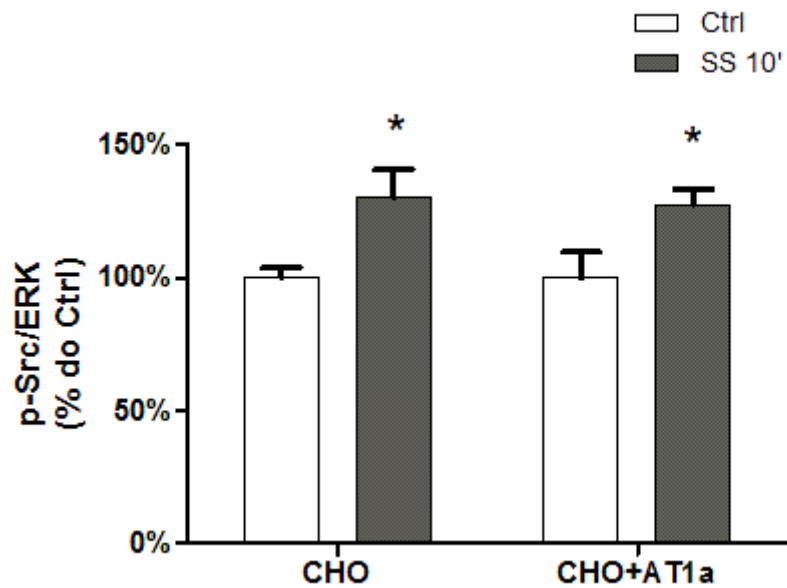


Figura 35: Ativação da Src pelo *shear stress*. SS, *shear stress*, 15 dinas/cm², 10' (n=5-8). * p<0.05 vs ou Ctrl.

A figura 36a mostra a ativação da Jak-2. Essa via é particularmente interessante, pois já foi demonstrado que o estiramento ativa Jak-2 via receptor AT1 (133). Novamente observou-se que as células CHO e CHO+AT1a ativaram a Jak-2 de maneira semelhante em resposta ao *shear stress* (CHO: Ctrl, 100% ± 8% vs SS 10', 129% ± 8%. CHO+AT1a: Ctrl, 100% ± 9% vs SS 10', 141% ± 8%). Este dado foi confirmado com a utilização de um bloqueador específico da fosforilação da Jak-2, o AG-490. A figura 36a mostra que a dose utilizada do inibidor de JAK-2 foi eficiente em inibir sua fosforilação pelo *shear stress* (92% ± 12%). Além disto, como mostrado na figura 36b a presença do inibidor AG-490 não modificou a ativação da ERK pelo *shear stress* em células CHO+AT1a (Ctrl, 100% ± 8%; SS 10', 286% ± 21%; AG490, 104% ± 34% vs SS 10' + AG490, 279% ±

34%). Estes dados demonstram que Jak-2 não participa da via na ativação da ERK pelo *shear stress*.

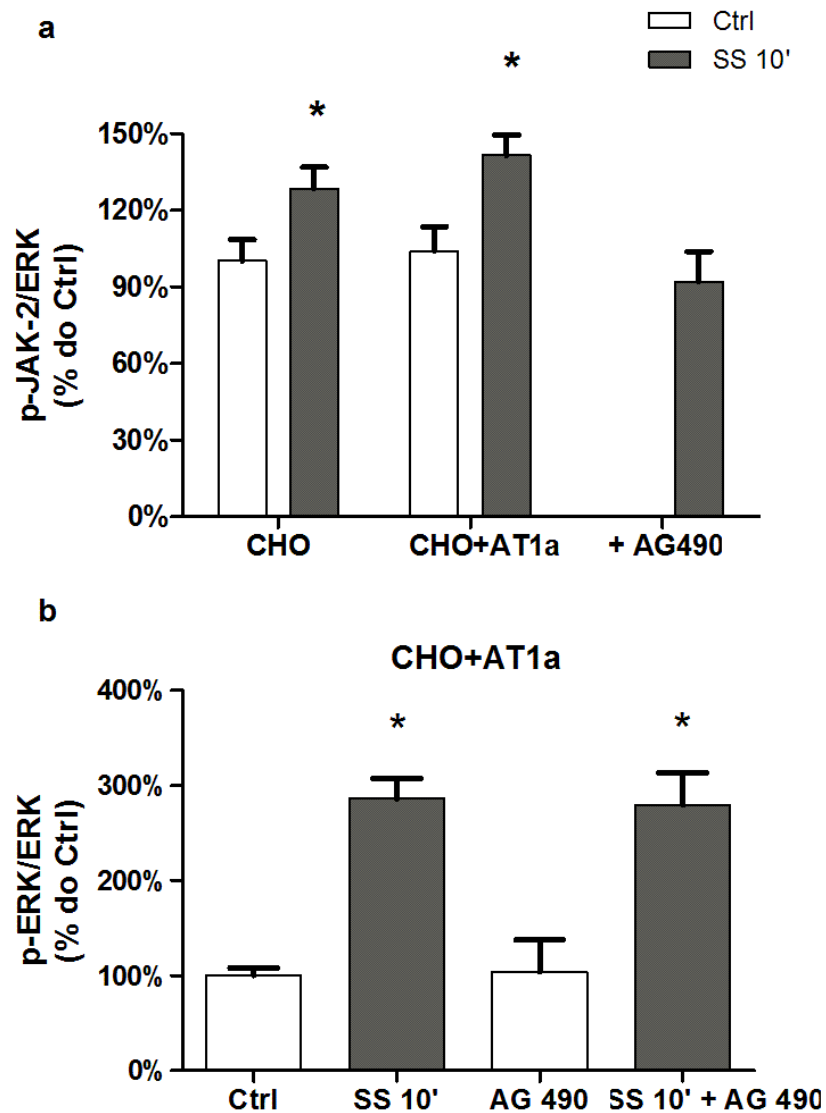


Figura 36: Participação Jak-2 na mecanotransdução do *shear stress* pelo receptor AT1. A) Ativação da Jak-2 pelo SS. B) Bloqueio da Jak-2 pelo AG490. SS, *shear stress*, 15 dinas/cm², 10'. AG-490, inibidor da Jak-2, 100mM (n=4-8). * p<0.05 vs ou Ctrl.

A via intracelular ativada pelo receptor AT1 mais estudada é a via dependente da subunidade α_q da proteína G. Uma vez ativada, uma cascata de eventos intracelulares é ativado e uma resposta tradicionalmente observada e associada à ativação da ERK é o aumento do cálcio intracelular. Dessa maneira utilizamos 2 quelantes de cálcio (bapta-AM, intracelular; e EGTA, extracelular) para estudar ativação do receptor AT1 via proteína-G levando a ativação de ERK intracelular (figura 37). A figura 37a mostra os resultados obtidos de ativação da ERK pelo *shear stress* na presença do Bapta-AM, quelante de cálcio intracelular. Observa-se uma diminuição de 23% ($p>0,05$) da ativação da ERK pelo *shear stress* na ausência de cálcio intracelular (Ctrl, $100\% \pm 13\%$; SS 10', $284\% \pm 19\%$; Bapta-AM, $123\% \pm 11\%$ vs SS 10' + Bapta-AM, $219\% \pm 27\%$). Já com a retirada do cálcio extracelular com EGTA, houve uma inibição significativa ($p<0,05$) de 37% (figura 37b) (Ctrl, $100\% \pm 13\%$; SS 10', $284\% \pm 19\%$; EGTA, $94\% \pm 13\%$ vs SS 10' + EGTA, $180\% \pm 20\%$).

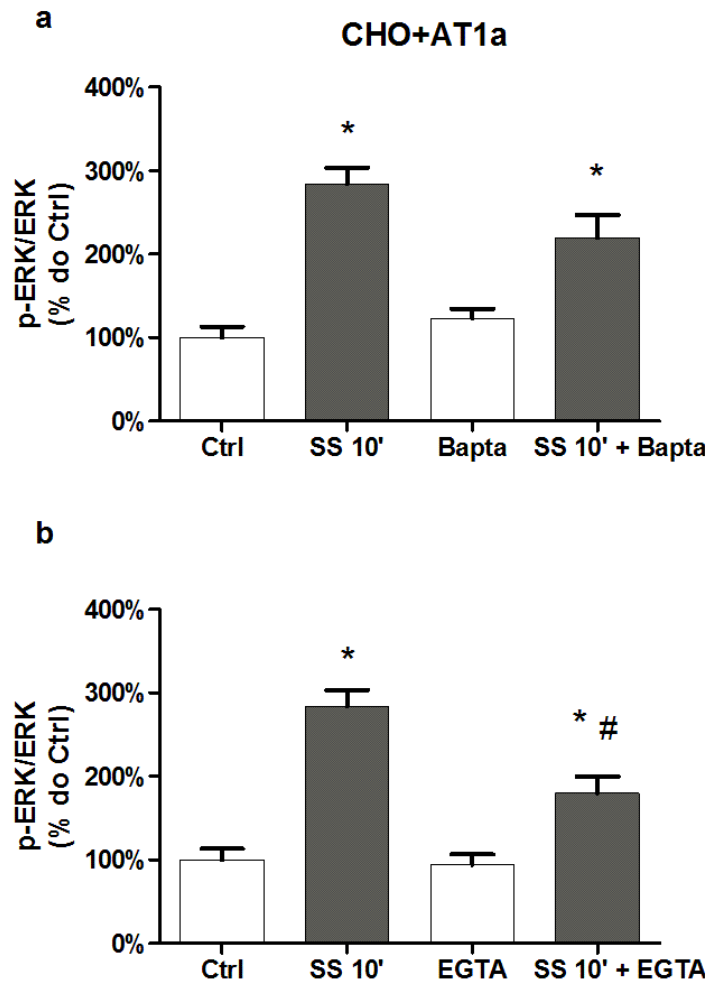


Figura 37: Participação do Cálcio para ativação da ERK pelo *shear stress* pelo receptor AT1. A) Participação do cálcio intracelular. B) Participação do cálcio intracelular. SS, *shear stress*, 15 dinas/cm², 10' (n=6-12); 200μM de Bapta e 5mM de EGTA. * p<0.05 vs Ctrl; #p<0.05 vs SS 10'.

Para confirmar a participação da via da proteína G_{αq} acoplada ao receptor AT1 na mecanotransdução ao *shear stress*, procuramos na literatura por um inibidor específico para essa subunidade da proteína G. Apesar de não existir nenhum comercialmente disponível, encontramos um desenvolvido pela empresa Astellas Pharma (YM-254890) (113) e que nos

foi gentilmente cedido pelo Dr Satya Kunapuli da *Temple University Medical School*, Filadelfia.

A figura 38 mostra que a administração do YM-254890 foi eficiente em inibir parcialmente a ativação da ERK pelo *shear stress*, mas não o suficiente para igualar-se ao controle (Ctrl, 100% \pm 12%; SS 10', 285% \pm 19%; YM, 81% \pm 15% vs SS 10' + YM, 208% \pm 12%).

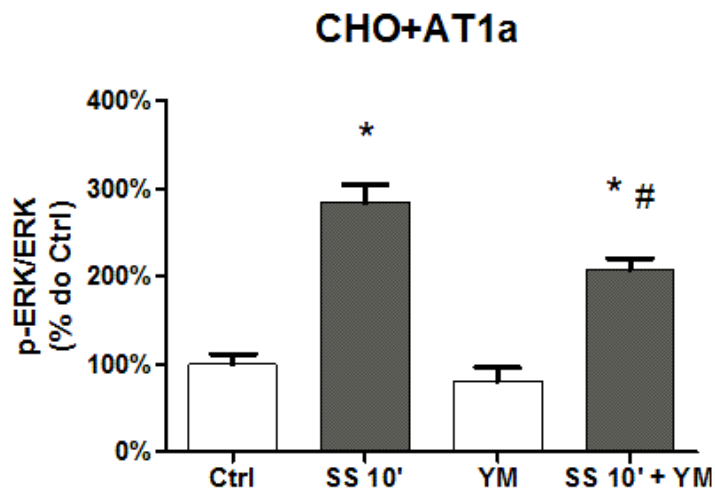


Figura 38: Inibição específica da proteína G_{α_q} . SS, *shear stress*, 15 dinas/cm², 10' (n=10-15); 100nM de YM. * $p < 0.05$ vs Ctrl; # $p < 0.05$ vs SS 10'.

Portanto, esses resultados sugerem que a ERK é ativada em resposta ao *shear stress* e que este sinal é mediado, pelo menos em parte, pela via clássica de ativação do receptor AT1 da proteína G_{α_q} .

5.6. MODIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DO RECEPTOR AT1 PELO *SHEAR STRESS* PROLONGADO

Dados prévios do nosso grupo e resultados do capítulo 1 desse projeto mostram que o *shear stress* é capaz de modular a expressão da ECA em células endoteliais. Nesse sentido, fomos observar se o *shear stress* prolongado (24h) também seria capaz de modular a expressão do receptor AT1 em células endoteliais. A figura 39 mostra a expressão gênica do receptor AT1 em células endoteliais submetidas a 24h de *shear stress*. Observamos que a expressão gênica do receptor AT1 diminuiu cerca de 50% nas células submetidas ao *shear stress* comparado a células que permaneceram em condições estáticas (Ctrl, 1 vs SS 24h, 0.48 ± 0.16). Neste gráfico o grupo controle não tem desvio padrão, pois feita a análise separada de cada indivíduo no estado basal e após o *shear stress* 24h assumindo que a expressão do estático como 1 para cada indivíduo. Sendo assim, a média do grupo controle ou estático foi de 1, sem desvio padrão.

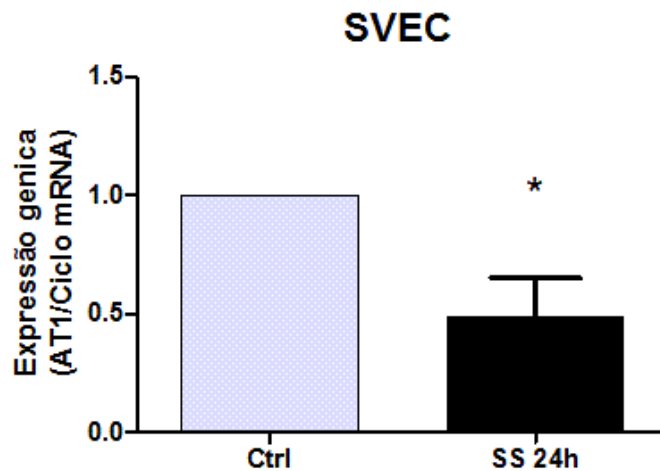


Figura 39: Expressão gênica do receptor AT1 em células endoteliais de humano. SS, *shear stress*, 15 dinas/cm², 124h. n=6. Neste gráfico o grupo controle não tem desvio padrão, pois feita a análise separada de cada indivíduo no estado basal e após o *shear stress* 24h assumindo que a expressão do estático como 1 para cada indivíduo. Sendo assim, a média do grupo controle ou estático foi de 1, sem desvio padrão. * p<0.05 vs Ctrl.

Uma vez que dados anteriores mostram que diminuição da expressão da ECA pelo *shear stress* é regulada por ela própria (Capítulo I, figura 20), avaliamos se o mesmo poderia ocorrer com o receptor AT1. Neste sentido utilizamos a mesma abordagem que utilizada pela ECA de estudo através de gene repórter. Na figura 40 comparamos a diferença na atividade promotora do receptor AT1a em células CHO versus células CHO+AT1a. Observamos que ambos os grupos celulares quando submetidos ao *shear stress* responderam com diminuição da atividade promotora do receptor AT1 avaliada pela atividade da luciferase (CHO: Ctrl, 100% ± 6% vs SS 24h, 76% ± 4%; CHO+AT1: Ctrl, 100% ± 4% vs SS 24h, 79%). Ainda, assim como observado com a ECA, temos que o meio condicionado pelo *shear stress*

não influenciou a atividade do promotor do receptor, ou seja, o efeito não é secundário a liberação de outro fator.

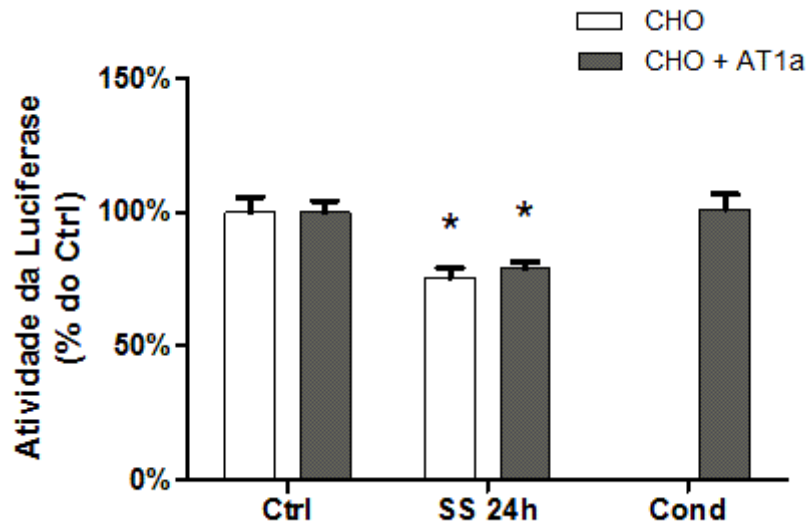


Figura 40: Expressão gênica do receptor AT1 em células endoteliais de humano. SS, *shear stress*, 15 dinas/cm², 124h. Cond = células expostas a meio de cultura condicionado no SS por 24h. n=5-12. * p<0.05 vs Ctrl.

Assim, nossos resultados sugerem que a modulação da expressão do receptor AT1 pelo *shear stress* ocorre diretamente pela ação da força física e não por fatores autócrinos ou parácrinos liberados pelas células.

Discussão

6. Discussão

Desde a descoberta da renina em 1898, o sistema renina angiotensina (SRA) é visto como um sistema enzimático linear com características endócrinas. O advento das técnicas de biologia molecular nos anos 80 não modificou a visão de um modelo linear, mas ampliou o seu potencial de ação para efeitos parácrinos e autócrinos, uma vez que os diferentes componentes estão presentes em um mesmo tecido ou célula. Estas características são consistentes com uma variedade de ações para que o sistema exerça suas contribuições na manutenção da homeostase cardiovascular. Os dados apresentados neste trabalho mostram uma característica adicional do sistema, pois dois de seus mais importantes componentes, a ECA e o receptor AT1 podem ser ativados e modulados diretamente por estímulos físicos, como o *shear stress*. A relevância desses achados ainda não está determinada, mas potencialmente aumentará os níveis de complexidade do sistema.

No capítulo I mostramos que o *shear stress* diminui a fosforilação da ECA no resíduo de Serina¹²⁷⁰ em resposta ao *shear stress* tanto em células CHO transfectadas com a ECA (ECA-wt, figura 17a) como em cultura primária de células endoteliais humanas de veia safena (SVEC, figura 18a). Essa diminuição ocorre desde 5 minutos de *shear stress* até 18h. Além disso, somente células ECA-wt e SVEC, mas não células CHO, têm a fosforilação da JNK diminuída após 18h de *shear stress* (figura 17b e 18c). Nosso grupo já descreveu anteriormente que a ECA tem sua expressão diminuída em resposta ao *shear stress* (101). Nesse trabalho, confirmamos

esse dado por *immunoblotting* e demonstramos que a diminuição na expressão da ECA ocorre por diminuição da fosforilação da própria ECA (figuras 18a e 20) e por diminuição da atividade da JNK (figura 21). Através de ensaio com gene repórter e utilização de mutações na estrutura da ECA, demonstramos que a porção extracelular da enzima é essencial para que toda essa cascata de eventos ocorra (figura 20). Por fim, demonstramos também que os sinais de fosforilação da ECA, diminuído pelo *shear stress* e aumentado com iECAs, se equilibram quando as manipulações são realizadas de maneira concomitante (figura 19). Quando avaliado a ECA como mecanosensora ao estiramento celular, não observamos alteração na fosforilação do resíduo de serina¹²⁷⁰ após o estiramento (figura 16). Essa é a primeira vez que uma enzima transmembranica é descrita como mecanostransdutora para forças hemodinâmicas.

No capítulo II abordamos se o receptor AT1 seria mecanosensor para o *shear stress* uma vez que já existem estudos demonstrando resposta mecanosensora do receptor ao estiramento celular (127, 133). Observamos que o receptor AT1 é ativado após 10 minutos de *shear stress* em células CHO+AT1a (figura 26). A via intracelular ativada é dependente da ativação da proteína G e de cálcio extracelular (figuras 37b e 38). O Candesartan, mas não o Losartan é capaz de bloquear a resposta de ativação do receptor pelo *shear stress* (CHO+AT1a figura 27b; SVEC figura 29b). Em cultura primária de células endoteliais humanas, o Candesartan potencializou a produção de NO induzida pelo *shear stress* (figura 31a) que pode ser explicado pelo aumento da entrada de cálcio para o citoplasma de maneira

tempo dependente, que não foi observado com o Losartan (figura 32). A pré-exposição de células CHO+AT1 ao *shear stress* as tornam menos responsivas a angiotensina II, enquanto a pré-exposição à angiotensina II pouco afeta a resposta ao *shear stress* (figuras 34b e c). Por fim, a exposição prolongada ao *shear stress* (24h) diminui a expressão dos receptores AT1 em cultura primária de células endoteliais (figura 39) de maneira independente da sinalização ativada pelos receptores AT1 na membrana celular (figura 40). Esse é o primeiro estudo que descreve um receptor acoplado a proteína G e com grande relevância para a fisiopatologia do sistema cardiovascular, como mecanotransdutor para o *shear stress*.

REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE COMPONENTES DO SRA PELO *SHEAR STRESS*

O SRA via ativação do receptor AT1 pela angiotensina II, pode participar de diversas fases do desenvolvimento da formação da aterosclerose vascular (86). Inicialmente, a angiotensina II altera o estado redox das células endoteliais aumentando a concentração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (115). Essas EROs são capazes de interagir com o óxido nítrico (NO) de maneira a inativá-lo e contribuir para a progressão e instabilidade das placas ateroscleróticas (103). A angiotensina II altera também a expressão de genes codificadores para citocinas, fatores de crescimento e moléculas de adesão relacionadas com a condição inflamatória vascular. Estimula a adesão de monócitos e neutrófilos às células endoteliais pela da indução da expressão de P-selectina, ICAM-1 e

VCAM-1 em células endoteliais e musculares lisas. E por fim, aumenta os níveis de MCP-1 (proteína de quimiotaxia de monócitos), interleucina-8 e IP-10, potentes ativadores de neutrófilos (93, 117).

O *shear stress* tem sido considerado fator de proteção vascular prevenindo o desenvolvimento de processos inflamatórios, devido a fatores produzidos pelo endotélio (34, 85, 116) e a capacidade de estimular a expressão de genes (16).

Nosso grupo já demonstrou que, o *shear stress* além desses diversos efeitos já descritos, também é capaz de modular a expressão da ECA em células endoteliais o que poderia influenciar na produção local de angiotensina II (101). Além disso, estudos genéticos de associação com o polimorfismo da ECA já demonstraram que indivíduos hipertensos com o genótipo DD (maior atividade circulante da ECA) apresentam vasodilatação dependente do endotélio prejudicada em relação a indivíduos II ou ID (menor atividade circulante da ECA), o que sugere a participação da ECA nessa modulação da função endotelial (95). No presente trabalho, encontramos mais um potencial efeito vasoprotetor do *shear stress* sobre a camada endotelial. Além da diminuição da expressão da ECA, nosso trabalho demonstra que o *shear stress* também diminui a expressão do receptor AT1 o que favoreceria ainda mais a uma menor ação da angiotensina II. Entretanto, com a demonstração de que a ECA e o receptor AT1 podem também ser ativados por forças hemodinâmicas, a menor formação de angiotensina II pode não ser suficiente para impedir completamente a ativação do SRA. Estudos adicionais serão necessários para melhor

esclarecer a importância fisiológica ou patológica desta atividade mecanosensora da ECA e do AT1.

MECANOTRANSDUÇÃO ATIVADO PELA ECA E REGULAÇÃO DE SUA EXPRESSÃO PELO *SHEAR STRESS*

Devido aos diversos efeitos benéficos que a liberação de NO exerce sobre a função endotelial (124), nosso grupo investigou anteriormente qual seria o papel do NO liberado pelo *shear stress* na regulação da expressão da ECA. Foi observado que o NO participa da manutenção da expressão ECA em condições estáticas, mas que a produção do NO pelo *shear stress* não está associada com a diminuição da expressão da ECA pelo estímulo físico (96).

A descrição de que a ECA pode ser fosforilada na sua cauda citoplasmática e com isto controlar a sua expressão, trouxe a possibilidade da ECA perceber estímulos físicos pela sua porção extracelular ou transmembranica e ativar vias de sinalização intracelular. Estudos iniciais que descrevem essa sinalização intracelular pela ECA mostraram que inibidores da ECA e a bradicinina são capazes induzir a fosforilação do resíduo de serina¹²⁷⁰ e, via uma série de eventos intracelulares dependentes da JNK, aumentar a expressão da própria ECA e da ciclooxigenase-2 (60, 61). Além dessa modulação gênica, a fosforilação da ECA é essencial para mantê-la ancorada a membrana plasmática, evitando, por mecanismos ainda não conhecidos, a ação de secretases sobre a sua porção extracelular (62). Baseado nesses dados, nossa hipótese foi que o a ECA, *per se*, seria capaz

de perceber o estímulo físico, diminuir sua fosforilação, diminuir a ativação da JNK e conseqüentemente ser responsável por diminuir sua própria expressão com o *shear stress*.

Nesse trabalho mostramos que a expressão da ECA pelo *shear stress* somente foi diminuída nas células que expressam a ECA na membrana celular. Para avaliar as propriedades mecanosensora e mecanotransdutora da ECA, mutantes da ECA truncada sem a porção extracelular ou sem a porção intracelular foram construídos e a expressão da ECA avaliada. Uma vez que ambas as construções não modificaram a atividade do promotor da ECA em resposta ao *shear stress*, concluímos que ambas as porções são importantes para a ECA ativar a via de sinalização intracelular, a porção extracelular essencial como mecanosensora e a porção intracelular fundamental como mecanotransdutora da força física.

Sabendo-se de que a presença da ECA é essencial para a regulação da sua própria atividade promotora, fomos então avaliar a regulação da fosforilação da ECA no resíduo de serina¹²⁷⁰ e a via intracelular descrita, a JNK. Observamos em células ECAwt que a fosforilação da ECA diminuiu logo com 5 minutos e se manteve por até 18h de *shear stress*. Já nas células endoteliais humanas, a diminuição foi menos acentuada e só foi observado diferença estatisticamente significativa com 18h de shear (com 30 minutos de *shear stress* há diminuição de 34% na fosforilação do resíduo porém não significativa). Com relação à fosforilação da JNK, a diminuição da sua atividade também só foi observada em células que expressam a ECA,

porém, de maneira diferente ao observado com a pECA-ser¹²⁷⁰ a diminuição da JNK só foi observada após 18h de *shear stress*.

A confirmação da participação da JNK como via moduladora da expressão da ECA foi feita através da utilização de um inibidor da JNK (SP600125). Células estáticas tratadas com esse inibidor tiveram diminuição da atividade promotora da ECA o que comprova que a própria diminuição da JNK, como observado com o *shear stress, per se*, é suficiente para modular a expressão da ECA.

A via da JNK representa um subgrupo das MAP kinases que são ativadas essencialmente por citocinas inflamatórias e outras situações de estresse como exposição a luz ultravioleta, choque térmico ou osmótico e desequilíbrio redox (22). Três diferentes genes codificam para as 3 diferentes proteínas: JNK 1 e 2 que são ubiqüitaneamente expressas, e JNK 3 que é restrita ao sistema nervoso central (111). A ativação dessa via intracelular tem sido encontrada ativada em diversos processos patológicos como câncer (56), insuficiência cardíaca (68), doenças neurodegenerativas (46), obesidade, aterosclerose, diabetes (111), artrite (42), asma (84) e outros processos inflamatórios (54).

Dentre esses diversos processos que envolvem a ativação da JNK, a aterosclerose é uma das mais discutidas na literatura. A aterosclerose no contexto vascular é uma resposta inflamatória sistêmica relacionada com distúrbios metabólicos que envolvem células T, macrófagos e células do sistema vascular (33). Utilizando-se de animais ApoE^{-/-}, Ricci e cols. demonstraram que a JNK (principalmente JNK 2) é essencial para o

desenvolvimento da aterosclerose nesse modelo genético (100). Mais recentemente, estudos com animais $JNK2^{-/-}$ demonstraram que esse modelo experimental tem maior expressão de enzimas do sistema antioxidante como a superóxido dismutase (SOD) e por isso é mais resistente a desenvolver a disfunção endotelial, um dos primeiros passos para o início da aterosclerose (90). Além disso, já foi demonstrado também que a ativação da JNK é um importante via relacionada com a ativação das células endoteliais nos estágios iniciais do desenvolvimento da aterosclerose em resposta a agentes pro-inflamatórios (TNF α , IL-1) (25) e induz a expressão de moléculas de adesão como V-CAM e I-CAM (3, 23). Já nos estágios mais avançados, a JNK está relacionada com a ativação de vias pro-apoptóticas e de degradação de matrix extracelular e conseqüente ruptura da placa de aterosclerose (33, 72).

A modulação da JNK pelo *shear stress* é bastante debatida na literatura e diversos cenários são encontrados dependendo do tipo celular utilizado, da intensidade e padrão do *shear stress* aplicado, e ao tempo de estímulo aplicado. Alguns estudos observaram que há um aumento nos momentos iniciais do *shear stress* (pico até os 30 min iniciais), tendo as integrinas papel fundamental como mecanotransdutores, porém uma diminuição para níveis menores que o basal após 1h de estímulo em células endoteliais (13). Essa diminuição persiste por períodos mais prolongados, como 16 e 24 horas de *shear* e pode estar associada com os efeitos antiaterogênicos. Já a pré-exposição de células endoteliais ao *shear stress* é

fortemente capaz de impedir a ativação da JNK por fatores pro-inflamatórios (129).

Entretanto, recentemente foi demonstrado que tipos de matrizes extracelulares distintos podem levar a diferenças de ativação da JNK pelo *shear stress* (40). Estudos anteriores já haviam mostrado que diversos tipos celulares quando aderidos em membrana basal composta predominantemente por colágeno mantêm-se em estado quiescente, enquanto que, se mantidas sobre membrana basal composta predominantemente de fibronectina ou fibrinogênio, adquirem características proliferativas e migratórias (109). Hahn e cols. demonstraram que células endoteliais normalmente estão aderidas sobre uma membrana basal composta de laminina e colágeno IV, e que regiões de *shear stress* oscilatório, onde há a maior predisposição para o desenvolvimento de aterosclerose, há aumento da expressão de fibronectina na lamina basal (40). Em estágios mais avançados da lesão vascular, há também o surgimento de fibrinogênio nessas regiões. Interessantemente, quando as células endoteliais são plaqueadas sobre fibronectina, mas não sobre colágeno, apresentam mediadores de processos inflamatórios (NF- κ B, PAK e JNK) ativados em resposta ao *shear stress*, sugerindo que alterações na matriz subendotelial vascular podem contribuir para a formação de processos inflamatórios (40, 88, 89). Assim, nossos dados de diminuição da ativação da JNK se justificam uma vez que nossas células estavam plaqueadas sobre gelatina (colágeno denaturado) de maneira a melhorar a aderência das células sobre a placa.

Dessa maneira, sugerimos que o *shear stress* e a administração de iECAs tem efeitos opostos sobre a modulação da ECA pela mesma via intracelular. Isto fica mais evidente quando submetemos células endoteliais humanas ao *shear stress* concomitantemente com a administração de inibidores da ECA e nenhuma das manipulações prevaleceu sobre a outra na modulação da fosforilação da cauda citoplasmática da ECA. O significado fisiológico da via intracelular modulada pela ECA seja pelo *shear stress*, seja pelos iECAs ou mesmo pela administração conjunta dos dois tratamentos ainda necessita ser melhor explorado. Estudos *in vivo* neste sentido são complicados, pois é muito difícil isolar somente os efeitos da porção intracelular da ECA.

Diversos estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que a sobrecarga pressórica ou o estiramento celular aumentam a expressão gênica de alguns componentes do SRA, entre eles, a ECA (43, 52, 76, 107). Por esse motivo, assim como foi abordado para o *shear stress*, nosso objetivo foi estudar qual a participação da sinalização intracelular ativada pela ECA nesta modulação.

Diferentemente do observado com o *shear stress*, não observamos alteração na fosforilação do resíduo de serina¹²⁷⁰ após os tempos de estiramento observado (5min, 30 min e 18h) tanto em células ECAwt ou em fibroblastos cardíacos. Como esperado, a atividade da JNK aumentou com o estiramento. Apesar de não termos confirmado o aumento da expressão da ECA com o estiramento, nossos resultados sugerem que o aumento da expressão da enzima, já demonstrado na literatura, pode ocorrer via a ativação da JNK, uma vez que demonstramos a participação dessa via na

modulação da atividade promotora da ECA. Entretanto, a ativação da JNK pelo estiramento parece não ser via fosforilação da porção citoplasmática da ECA.

MECANOTRANSDUÇÃO ATIVADO PELO RECEPTOR AT1 E REGULAÇÃO DE SUA EXPRESSÃO PELO *SHEAR STRESS*

A atividade promotora do receptor AT1a mostrou-se diminuída de maneira independente a presença do receptor na membrana celular e a exposição de células estáticas a meio de cultura condicionado no *shear stress* por 24h não alterou a atividade promotora do receptor. Este dado sugere que o receptor AT1 não participa da sua diminuição de expressão induzida pelo *shear stress*, e ocorre de maneira independente de fatores autócrinos e/ou parácrinos liberados no meio de cultura. Entretanto, essa segunda conclusão deve ser vista com cuidado devido a limitações do método de utilização de meio condicionado. Moléculas como o NO, por exemplo, depois de produzidas e liberadas em resposta ao *shear stress* são rapidamente metabolizadas e, portanto não podem ser consideradas nesse tipo de experimento. Somente substâncias que permanecem estáveis e se acumulam de maneira significativa no meio de cultura durante o *shear stress* serão transferidas para as outras células.

Dados da literatura sugerem a participação do PPAR γ na modulação dos receptores AT1 (6, 132). Assim como *shear stress* laminar, a ativação do PPAR γ também exerce efeitos anti-inflamatórios na parede vascular por inibir a expressão de moléculas de adesão e estimular a produção de NO

(70). Além disso, já está bem descrito que o *shear stress* laminar ativa PPAR γ em células endoteliais (71, 98). Por outro lado, resultados da literatura mostram que tanto o telmisartan, um bloqueador do receptor AT1 com capacidade de ativar PPAR γ , como outros agonistas do PPAR γ são capazes de diminuir a expressão do receptor AT1 (108). Dessa maneira, pode-se especular que a ativação do PPAR γ com o *shear stress* possa ser responsável por essa diminuição da expressão do receptor.

Um fato interessante foi que células CHO expressando receptor AT1a na membrana celular levou ativação de ERK após 10 minutos de estímulo por *shear stress*, o que não foi observado nas células CHO selvagem. Esse resultado é uma forte evidência da participação do receptor AT1 como mecanotransdutor ao *shear stress*. Já é bem demonstrado que o receptor AT1 é capaz de ativar vias de sinalização intracelulares dependentes e independentes de proteína G (87). Enquanto que no estiramento a via da Jak-2 é ativada pelo receptor AT1 (133), no *shear stress* esta via parece não participar da mecanotransdução ativada pelo receptor. Nossos dados sugerem que a via dependente de proteína G $_q$ /IP3/Ca $^{2+}$ participa da ativação do receptor AT1 pelo *shear stress*, porém nenhuma das intervenções realizadas inibiu completamente a ativação da ERK sugerindo que alguma outra via possa estar participando desta resposta.

Uma possível via de ativação da ERK pelo receptor AT1 que não estudamos é pela produção de espécies reativas de oxigênio (10, 35), via esta bastante importante principalmente em células endoteliais. Entretanto, o modo classicamente descrito que a angiotensina II estimula a produção de

EROs é pela ativação da NADPH oxidase (119, 131), entretanto, alguns trabalhos em células CHO mostram que esta linhagem celular não expressa nenhuma das isoformas da Nox, necessária para a formação do complexo protéico da NADPH oxidase (15).

Receptores acoplados à proteína G (GPCRs), ou receptores com 7 domínios transmembrânicos, constituem a maior família de proteínas do organismo. Mais de 1000 diferentes GPCRs já foram clonados desde o início dos anos 90 (63). Seus ligantes abrangem uma enorme variedade de moléculas como neurotransmissores, peptídeos, lipídios, glicoproteínas, nucleotídeos, íons e proteases (32). Além disso, estímulos exógenos como luz, odor e paladar também podem ser traduzidos por essa classe de receptores (44, 65). Apesar disso tudo, o estudo do papel dessa classe de receptores como mecanotransdutores para o *shear stress* é muito pequeno. No nosso conhecimento somente 2 trabalhos realmente abordaram esse assunto de maneira a procurar possíveis GPCRs candidatos para a mecanotransdução (12, 73), sendo que somente 1 utilizou-se de células endoteliais (12). Outros trabalhos abordam a participação da proteína G, e não de receptores acoplados a elas, utilizando-se de abordagens promiscuas como por exemplo a inibição de toda uma classe de proteínas G (53, 75) ou a reconstituição de proteínas G em membranas de fosfolípidos (38, 39).

Chachisvilis *et al.* em 2006, apesar de estudarem a participação do GPCR B2 de bradicinina como mecanosensor ao *shear stress*, não avaliou a ativação especificamente de vias intracelulares pelo receptor, mas sim que o

shear stress é capaz de induzir alterações conformacionais sobre o receptor (alterações essas diferentes das induzidas pelo agonista) (12). Essa observação se aplica mais então ao receptor B2 como mecanosensor, mas não confirma sua função como mecanotransdutor do *shear stress*. Além disso, em 2001, Bergaya e cols. já haviam demonstrado que animais KO para calicreínas teciduais (enzima necessária para a formação da bradicinina) têm a vasodilatação induzida pelo fluxo prejudicada (7), sugerindo, portanto, a necessidade do ligante bradicinina para a ativação dos receptores B2 pelo fluxo sanguíneo.

Assim, nossos resultados são a primeira evidência da participação de um receptor em específico acoplado a proteína G como mecanotransdutor ao *shear stress*.

DIFERENÇA NA ATIVAÇÃO DO RECEPTOR AT1 POR ANGIOTENSINA II OU POR *SHEAR STRESS* - PAPEL DO BRAs

Nesse trabalho nós também testamos a eficiência de 2 bloqueadores do receptor AT1 em impedir a ativação do receptor pelo *shear stress*. Observamos tanto em células CHO+AT1a como em cultura primária de células endoteliais que somente o Candesartan, mas não o Losartan, conseguiu impedir a ativação do receptor pelo *shear stress*. Além disso, o Candesartan potencializou a produção do NO pelo *shear stress*. Dessa maneira, podemos sugerir que o Candesartan pode ter efeitos benéficos adicionais sobre a função endotelial através de 2 mecanismos ainda não

descritos: bloqueio da ativação mecânica do receptor e potencialização da produção de NO induzida pelo *shear stress*.

A capacidade do Candesartan em impedir a ativação do receptor por estímulos mecânicos já esta bem descrita na literatura com relação ao estiramento (126, 133). Acredita-se que essa capacidade é devida a presença de carboxila no anel imidazol, que confere à molécula maior interação com o receptor, e está ausente na estrutura do Losartan (8, 126). Esta carboxila parece conferir aos BRAs a característica de agonista inverso, que é um bloqueador que compete com o agonista natural e impedir a ativação constitutiva do receptor (28, 55, 79). Mais recentemente, com a demonstração da ativação do receptor AT1 por estiramento mecânico, tem sido mostrado que uma molécula agonista inversa também tem a capacidade de impedir modificações estruturais resultante de estímulos físicos (126, 127). Nossos resultados mostram que da mesma maneira que no estiramento, o Candesartan, mas não o Losartan, bloqueia ativação do receptor AT1 pelo *shear stress*.

A estrutura dos GPCRs tem bastante plasticidade, isto é, o receptor pode assumir diferentes conformações dependendo do ligante (26, 59). Podemos comparar 3 diferentes “ligantes” ou “ativadores” do receptor AT1 que causam alterações conformacionais distintas e ativam vias de sinalização específicas (Ang II, [Sar¹, Ile⁴, Ile⁸] Ang II (SII), e estiramento) (77, 122, 126). Os dados obtidos neste trabalho sugerem que uma conformação diferente das já descritas pode estar ocorrendo sobre o receptor induzida pelo *shear stress*. Em primeiro lugar, acreditamos que a

ativação pelo *shear stress* seja diferente da angiotensina II, pois enquanto ambos Losartan e Candesartan são capazes de bloquear a ativação do AT1 pela angiotensina II, somente o Candesartan é capaz de bloquear o *shear stress* de ativar o receptor. Em segundo lugar, acreditamos que a ativação pelo *shear stress* seja diferente da [Sar¹, Ile⁴, Ile⁸] Ang II (SII) porque o tempo de ativação das vias intracelulares ativadas por cada estímulo é diferente. E por último, acreditamos também que a ativação pelo *shear stress* seja diferente da ativação pelo estiramento pois as vias intracelulares ativadas não são as mesmas.

Conclusões

7. Conclusões

Em conjunto, os dados apresentados dão suporte à idéia de que a ECA e o receptor AT1 da angiotensina II podem perceber estímulos físicos, como o *shear stress*, e eliciar cascatas de sinalização intracelular.

Muito embora a relevância fisiopatológica destes achados não esteja esclarecida, é importante salientar que:

1. O mecanismo de diminuição da expressão da ECA em resposta ao *shear stress* foi elucidado e envolve a fosforilação de um resíduo intracelular;
2. O receptor AT1 da angiotensina, pertencente à classe dos receptores acoplados da proteína G, pode ser ativado de maneira ligante-independente por *shear stress* e, mais importante, estes efeitos são modulados de maneira distinta por diferentes bloqueadores dos receptores da angiotensina (BRAs) amplamente utilizados no tratamento de doenças cardiovasculares.

Referências Bibliográficas

8. Referências Bibliográficas

1. IMS Health. *IMS MIDAS Quantum*, 2007.
2. ISIS-4: a randomised factorial trial assessing early oral captopril, oral mononitrate, and intravenous magnesium sulphate in 58,050 patients with suspected acute myocardial infarction. ISIS-4 (Fourth International Study of Infarct Survival) Collaborative Group. *Lancet* 345: 669-685, 1995.
3. **Ahmad M, Theofanidis P, and Medford RM.** Role of activating protein-1 in the regulation of the vascular cell adhesion molecule-1 gene expression by tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem* 273: 4616-4621, 1998.
4. **Araujo MC, Melo RL, Cesari MH, Juliano MA, Juliano L, and Carmona AK.** Peptidase specificity characterization of C- and N-terminal catalytic sites of angiotensin I-converting enzyme. *Biochemistry* 39: 8519-8525, 2000.
5. **Atlas SA.** The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *J Manag Care Pharm* 13: 9-20, 2007.
6. **Banks T and Oyekan A.** Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation attenuated angiotensin type 1-mediated but enhanced angiotensin type 2-mediated hemodynamic effects to angiotensin II in the rat. *J Hypertens* 26: 468-477, 2008.
7. **Bergaya S, Meneton P, Bloch-Faure M, Mathieu E, Alhenc-Gelas F, Levy BI, and Boulanger CM.** Decreased flow-dependent dilation in carotid arteries of tissue kallikrein-knockout mice. *Circ Res* 88: 593-599, 2001.
8. **Bhuiyan MA, Ishiguro M, Hossain M, Nakamura T, Ozaki M, Miura S, and Nagatomo T.** Binding sites of valsartan, candesartan and losartan with

angiotensin II receptor 1 subtype by molecular modeling. *Life Sci* 85: 136-140, 2009.

9. **Bradford MM.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254, 1976.

10. **Cai H, Griendling KK, and Harrison DG.** The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Trends Pharmacol Sci* 24: 471-478, 2003.

11. **Campos LC, Miyakawa AA, Barauna VG, Cardoso L, Borin TF, Dallan LA, and Krieger JE.** Induction of CRP3/MLP expression during vein arterialization is dependent on stretch rather than shear stress. *Cardiovasc Res* 83: 140-147, 2009.

12. **Chachisvilis M, Zhang YL, and Frangos JA.** G protein-coupled receptors sense fluid shear stress in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 15463-15468, 2006.

13. **Chien S.** Mechanotransduction and endothelial cell homeostasis: the wisdom of the cell. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H1209-1224, 2007.

14. **Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jr., Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT, Jr., and Roccella EJ.** Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension* 42: 1206-1252, 2003.

15. **Choi H, Leto TL, Hunyady L, Catt KJ, Bae YS, and Rhee SG.** Mechanism of angiotensin II-induced superoxide production in cells

reconstituted with angiotensin type 1 receptor and the components of NADPH oxidase. *J Biol Chem* 283: 255-267, 2008.

16. **Chu TJ and Peters DG.** Serial analysis of the vascular endothelial transcriptome under static and shear stress conditions. *Physiol Genomics* 34: 185-192, 2008.

17. **Chubb AJ, Schwager SL, van der Merwe E, Ehlers MR, and Sturrock ED.** Deletion of the cytoplasmic domain increases basal shedding of angiotensin-converting enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 314: 971-975, 2004.

18. **Coates D.** The angiotensin converting enzyme (ACE). *Int J Biochem Cell Biol* 35: 769-773, 2003.

19. **Cooper Gt, Kent RL, Uboh CE, Thompson EW, and Marino TA.** Hemodynamic versus adrenergic control of cat right ventricular hypertrophy. *J Clin Invest* 75: 1403-1414, 1985.

20. **Davies PF.** Hemodynamic shear stress and the endothelium in cardiovascular pathophysiology. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 6: 16-26, 2009.

21. **Davies PF, Shi C, Depaola N, Helmke BP, and Polacek DC.** Hemodynamics and the focal origin of atherosclerosis: a spatial approach to endothelial structure, gene expression, and function. *Ann N Y Acad Sci* 947: 7-16; discussion 16-17, 2001.

22. **Davis RJ.** Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103: 239-252, 2000.

23. **De Cesaris P, Starace D, Starace G, Filippini A, Stefanini M, and Ziparo E.** Activation of Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase pathway by tumor necrosis factor alpha leads to intercellular adhesion molecule-1 expression. *J Biol Chem* 274: 28978-28982, 1999.
24. **de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, and Unger T.** International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 52: 415-472, 2000.
25. **Deng Y, Ren X, Yang L, Lin Y, and Wu X.** A JNK-dependent pathway is required for TNFalpha-induced apoptosis. *Cell* 115: 61-70, 2003.
26. **Deupi X and Kobilka B.** Activation of G protein-coupled receptors. *Adv Protein Chem* 74: 137-166, 2007.
27. **Duffy AA, Martin MM, and Elton TS.** Transcriptional regulation of the AT1 receptor gene in immortalized human trophoblast cells. *Biochim Biophys Acta* 1680: 158-170, 2004.
28. **Dupre DJ, Rola-Pleszczynski M, and Stankova J.** Inverse agonism: more than reverting constitutively active receptor signaling. *Biochem Cell Biol* 82: 676-680, 2004.
29. **Fleming I.** Signaling by the angiotensin-converting enzyme. *Circ Res* 98: 887-896, 2006.
30. **Fleming I, Kohlstedt K, and Busse R.** New fACEs to the renin-angiotensin system. *Physiology (Bethesda)* 20: 91-95, 2005.
31. **Gembardt F, Heringer-Walther S, van Esch JH, Sterner-Kock A, van Veghel R, Le TH, Garrelds IM, Coffman TM, Danser AH, Schultheiss HP,**

- and Walther T.** Cardiovascular phenotype of mice lacking all three subtypes of angiotensin II receptors. *Faseb J* 22: 3068-3077, 2008.
32. **Gether U.** Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr Rev* 21: 90-113, 2000.
33. **Glass CK and Witztum JL.** Atherosclerosis. the road ahead. *Cell* 104: 503-516, 2001.
34. **Gloe T, Sohn HY, Meininger GA, and Pohl U.** Shear stress-induced release of basic fibroblast growth factor from endothelial cells is mediated by matrix interaction via integrin $\alpha(v)\beta3$. *J Biol Chem* 277: 23453-23458, 2002.
35. **Gorin Y, Ricono JM, Wagner B, Kim NH, Bhandari B, Choudhury GG, and Abboud HE.** Angiotensin II-induced ERK1/ERK2 activation and protein synthesis are redox-dependent in glomerular mesangial cells. *Biochem J* 381: 231-239, 2004.
36. **Gosse P.** Left ventricular hypertrophy as a predictor of cardiovascular risk. *J Hypertens Suppl* 23: S27-33, 2005.
37. **Graham FL and van der Eb AJ.** A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52: 456-467, 1973.
38. **Gudi S, Nolan JP, and Frangos JA.** Modulation of GTPase activity of G proteins by fluid shear stress and phospholipid composition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 2515-2519, 1998.
39. **Gudi SR, Clark CB, and Frangos JA.** Fluid flow rapidly activates G proteins in human endothelial cells. Involvement of G proteins in mechanochemical signal transduction. *Circ Res* 79: 834-839, 1996.

40. **Hahn C, Orr AW, Sanders JM, Jhaveri KA, and Schwartz MA.** The subendothelial extracellular matrix modulates JNK activation by flow. *Circ Res* 104: 995-1003, 2009.
41. **Hahn C and Schwartz MA.** Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 53-62, 2009.
42. **Han Z, Boyle DL, Chang L, Bennett B, Karin M, Yang L, Manning AM, and Firestein GS.** c-Jun N-terminal kinase is required for metalloproteinase expression and joint destruction in inflammatory arthritis. *J Clin Invest* 108: 73-81, 2001.
43. **Hirsch AT, Talsness CE, Schunkert H, Paul M, and Dzau VJ.** Tissue-specific activation of cardiac angiotensin converting enzyme in experimental heart failure. *Circ Res* 69: 475-482, 1991.
44. **Hoon MA, Adler E, Lindemeier J, Battey JF, Ryba NJ, and Zuker CS.** Putative mammalian taste receptors: a class of taste-specific GPCRs with distinct topographic selectivity. *Cell* 96: 541-551, 1999.
45. **Huang H, Kamm RD, and Lee RT.** Cell mechanics and mechanotransduction: pathways, probes, and physiology. *Am J Physiol Cell Physiol* 287: C1-11, 2004.
46. **Hunot S, Vila M, Teismann P, Davis RJ, Hirsch EC, Przedborski S, Rakic P, and Flavell RA.** JNK-mediated induction of cyclooxygenase 2 is required for neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 665-670, 2004.
47. **Hunter T.** Signaling--2000 and beyond. *Cell* 100: 113-127, 2000.

48. **Hunyady L and Catt KJ.** Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. *Mol Endocrinol* 20: 953-970, 2006.
49. **Hunyady L, Gaborik Z, Shah BH, Jagadeesh G, Clark AJ, and Catt KJ.** Structural determinants of agonist-induced signaling and regulation of the angiotensin AT1 receptor. *Mol Cell Endocrinol* 217: 89-100, 2004.
50. **Hunyady L and Turu G.** The role of the AT1 angiotensin receptor in cardiac hypertrophy: angiotensin II receptor or stretch sensor? *Trends Endocrinol Metab* 15: 405-408, 2004.
51. **Ichihara A, Sakoda M, Kurauchi-Mito A, Kaneshiro Y, and Itoh H.** Renin, prorenin and the kidney: a new chapter in an old saga. *J Nephrol* 22: 306-311, 2009.
52. **Iizuka K, Machida T, Kawaguchi H, and Hirafuji M.** Pulsatile mechanical pressure promotes Angiotensin-converting enzyme expression in aortic smooth muscle cells. *Cardiovasc Drugs Ther* 22: 383-390, 2008.
53. **Jo H, Sipos K, Go YM, Law R, Rong J, and McDonald JM.** Differential effect of shear stress on extracellular signal-regulated kinase and N-terminal Jun kinase in endothelial cells. Gi2- and Gbeta/gamma-dependent signaling pathways. *J Biol Chem* 272: 1395-1401, 1997.
54. **Johnson GL and Nakamura K.** The c-jun kinase/stress-activated pathway: regulation, function and role in human disease. *Biochim Biophys Acta* 1773: 1341-1348, 2007.
55. **Kenakin T.** Efficacy as a vector: the relative prevalence and paucity of inverse agonism. *Mol Pharmacol* 65: 2-11, 2004.

56. **Kennedy NJ and Davis RJ.** Role of JNK in tumor development. *Cell Cycle* 2: 199-201, 2003.
57. **Kent RL, Uboh CE, Thompson EW, Gordon SS, Marino TA, Hooper JK, and Cooper Gt.** Biochemical and structural correlates in unloaded and reloaded cat myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 17: 153-165, 1985.
58. **Knoll R, Hoshijima M, and Chien K.** Cardiac mechanotransduction and implications for heart disease. *J Mol Med* 81: 750-756, 2003.
59. **Kobilka BK and Deupi X.** Conformational complexity of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* 28: 397-406, 2007.
60. **Kohlstedt K, Brandes RP, Muller-Esterl W, Busse R, and Fleming I.** Angiotensin-converting enzyme is involved in outside-in signaling in endothelial cells. *Circ Res* 94: 60-67, 2004.
61. **Kohlstedt K, Busse R, and Fleming I.** Signaling via the angiotensin-converting enzyme enhances the expression of cyclooxygenase-2 in endothelial cells. *Hypertension* 45: 126-132, 2005.
62. **Kohlstedt K, Shoghi F, Muller-Esterl W, Busse R, and Fleming I.** CK2 phosphorylates the angiotensin-converting enzyme and regulates its retention in the endothelial cell plasma membrane. *Circ Res* 91: 749-756, 2002.
63. **Kolakowski LF, Jr.** GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels* 2: 1-7, 1994.
64. **Komuro I.** Molecular mechanism of mechanical stress-induced cardiac hypertrophy. *Jpn Heart J* 41: 117-129, 2000.

65. **Kramkowski K, Mogielnicki A, and Buczko W.** The physiological significance of the alternative pathways of angiotensin II production. *J Physiol Pharmacol* 57: 529-539, 2006.
66. **Li C and Xu Q.** Mechanical stress-initiated signal transduction in vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo. *Cell Signal* 19: 881-891, 2007.
67. **Li YS, Haga JH, and Chien S.** Molecular basis of the effects of shear stress on vascular endothelial cells. *J Biomech* 38: 1949-1971, 2005.
68. **Liang Q and Molkentin JD.** Redefining the roles of p38 and JNK signaling in cardiac hypertrophy: dichotomy between cultured myocytes and animal models. *J Mol Cell Cardiol* 35: 1385-1394, 2003.
69. **Libby P.** Coronary artery injury and the biology of atherosclerosis: inflammation, thrombosis, and stabilization. *Am J Cardiol* 86: 3J-8J; discussion 8J-9J, 2000.
70. **Liu Y, Zhang Y, Schmelzer K, Lee TS, Fang X, Zhu Y, Spector AA, Gill S, Morisseau C, Hammock BD, and Shyy JY.** The antiinflammatory effect of laminar flow: the role of PPARgamma, epoxyeicosatrienoic acids, and soluble epoxide hydrolase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 16747-16752, 2005.
71. **Liu Y, Zhu Y, Rannou F, Lee TS, Formentin K, Zeng L, Yuan X, Wang N, Chien S, Forman BM, and Shyy JY.** Laminar flow activates peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in vascular endothelial cells. *Circulation* 110: 1128-1133, 2004.
72. **Lusis AJ.** Atherosclerosis. *Nature* 407: 233-241, 2000.

73. **Makino A, Prossnitz ER, Bunemann M, Wang JM, Yao W, and Schmid-Schonbein GW.** G protein-coupled receptors serve as mechanosensors for fluid shear stress in neutrophils. *Am J Physiol Cell Physiol* 290: C1633-1639, 2006.
74. **Malek A and Izumo S.** Physiological fluid shear stress causes downregulation of endothelin-1 mRNA in bovine aortic endothelium. *Am J Physiol* 263: C389-396, 1992.
75. **Malek AM, Jiang L, Lee I, Sessa WC, Izumo S, and Alper SL.** Induction of nitric oxide synthase mRNA by shear stress requires intracellular calcium and G-protein signals and is modulated by PI 3 kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 254: 231-242, 1999.
76. **Malhotra R, Sadoshima J, Brosius FC, 3rd, and Izumo S.** Mechanical stretch and angiotensin II differentially upregulate the renin-angiotensin system in cardiac myocytes In vitro. *Circ Res* 85: 137-146, 1999.
77. **Martin SS, Holleran BJ, Escher E, Guillemette G, and Leduc R.** Activation of the angiotensin II type 1 receptor leads to movement of the sixth transmembrane domain: analysis by the substituted cysteine accessibility method. *Mol Pharmacol* 72: 182-190, 2007.
78. **Menard J.** Anthology of the renin-angiotensin system: a one hundred reference approach to angiotensin II antagonists. *J Hypertens Suppl* 11: S3-11, 1993.
79. **Miura S, Kiya Y, Kanazawa T, Imaizumi S, Fujino M, Matsuo Y, Karnik SS, and Saku K.** Differential bonding interactions of inverse agonists

of angiotensin II type 1 receptor in stabilizing the inactive state. *Mol Endocrinol* 22: 139-146, 2008.

80. **Miyakawa AA, de Lourdes Junqueira M, and Krieger JE.** Identification of two novel shear stress responsive elements in rat angiotensin I converting enzyme promoter. *Physiol Genomics* 17: 107-113, 2004.

81. **Morishita R, Gibbons GH, Ellison KE, Lee W, Zhang L, Yu H, Kaneda Y, Ogihara T, and Dzau VJ.** Evidence for direct local effect of angiotensin in vascular hypertrophy. In vivo gene transfer of angiotensin converting enzyme. *J Clin Invest* 94: 978-984, 1994.

82. **Morishita R, Gibbons GH, Tomita N, Zhang L, Kaneda Y, Ogihara T, and Dzau VJ.** Antisense oligodeoxynucleotide inhibition of vascular angiotensin-converting enzyme expression attenuates neointimal formation: evidence for tissue angiotensin-converting enzyme function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 915-922, 2000.

83. **Morrison P, Saltiel AR, and Rosner MR.** Role of mitogen-activated protein kinase kinase in regulation of the epidermal growth factor receptor by protein kinase C. *Biol Chem* 271: 12891-12896, 1996.

84. **Nath P, Eynott P, Leung SY, Adcock IM, Bennett BL, and Chung KF.** Potential role of c-Jun NH2-terminal kinase in allergic airway inflammation and remodelling: effects of SP600125. *Eur J Pharmacol* 506: 273-283, 2005.

85. **Nguyen HC, Grossi EA, LeBoutillier M, 3rd, Steinberg BM, Rifkin DB, Baumann FG, Colvin SB, and Galloway AC.** Mammary artery versus

saphenous vein grafts: assessment of basic fibroblast growth factor receptors. *Ann Thorac Surg* 58: 308-310; discussion 310-301, 1994.

86. **Nickenig G.** Central role of the AT(1)-receptor in atherosclerosis. *J Hum Hypertens* 16 Suppl 3: S26-33, 2002.

87. **Oro C, Qian H, and Thomas WG.** Type 1 angiotensin receptor pharmacology: signaling beyond G proteins. *Pharmacol Ther* 113: 210-226, 2007.

88. **Orr AW, Hahn C, Blackman BR, and Schwartz MA.** p21-activated kinase signaling regulates oxidant-dependent NF-kappa B activation by flow. *Circ Res* 103: 671-679, 2008.

89. **Orr AW, Sanders JM, Bevard M, Coleman E, Sarembock IJ, and Schwartz MA.** The subendothelial extracellular matrix modulates NF-kappaB activation by flow: a potential role in atherosclerosis. *J Cell Biol* 169: 191-202, 2005.

90. **Osto E, Matter CM, Kouroedov A, Malinski T, Bachschmid M, Camici GG, Kilic U, Stallmach T, Boren J, Iliceto S, Luscher TF, and Cosentino F.** c-Jun N-terminal kinase 2 deficiency protects against hypercholesterolemia-induced endothelial dysfunction and oxidative stress. *Circulation* 118: 2073-2080, 2008.

91. **Pang S, Chubb AJ, Schwager SL, Ehlers MR, Sturrock ED, and Hooper NM.** Roles of the juxtamembrane and extracellular domains of angiotensin-converting enzyme in ectodomain shedding. *Biochem J* 358: 185-192, 2001.

92. **Parkin ET, Tan F, Skidgel RA, Turner AJ, and Hooper NM.** The ectodomain shedding of angiotensin-converting enzyme is independent of its localisation in lipid rafts. *J Cell Sci* 116: 3079-3087, 2003.
93. **Pastore L, Tessitore A, Martinotti S, Toniato E, Alesse E, Bravi MC, Ferri C, Desideri G, Gulino A, and Santucci A.** Angiotensin II stimulates intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression by human vascular endothelial cells and increases soluble ICAM-1 release in vivo. *Circulation* 100: 1646-1652, 1999.
94. **Paul M, Poyan Mehr A, and Kreutz R.** Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev* 86: 747-803, 2006.
95. **Perticone F, Ceravolo R, Maio R, Ventura G, Zingone A, Perrotti N, and Mattioli PL.** Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism is associated with endothelium-dependent vasodilation in never treated hypertensive patients. *Hypertension* 31: 900-905, 1998.
96. **Pertrini CM, Miyakawa AA, Laurindo FR, and Krieger JE.** Nitric oxide regulates angiotensin-I converting enzyme under static conditions but not under shear stress. *Braz J Med Biol Res* 36: 1175-1178, 2003.
97. **Pfeffer MA, Braunwald E, Moye LA, Basta L, Brown EJ, Jr., Cuddy TE, Davis BR, Geltman EM, Goldman S, Flaker GC, and et al.** Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survival and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators. *N Engl J Med* 327: 669-677, 1992.

98. **Qin X, Tian J, Zhang P, Fan Y, Chen L, Guan Y, Fu Y, Zhu Y, Chien S, and Wang N.** Laminar shear stress up-regulates the expression of stearoyl-CoA desaturase-1 in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res* 74: 506-514, 2007.
99. **Rella M, Elliot JL, Revett TJ, Lanfear J, Phelan A, Jackson RM, Turner AJ, and Hooper NM.** Identification and characterisation of the angiotensin converting enzyme-3 (ACE3) gene: a novel mammalian homologue of ACE. *BMC Genomics* 8: 194, 2007.
100. **Ricci R, Sumara G, Sumara I, Rozenberg I, Kurrer M, Akhmedov A, Hersberger M, Eriksson U, Eberli FR, Becher B, Boren J, Chen M, Cybulsky MI, Moore KJ, Freeman MW, Wagner EF, Matter CM, and Luscher TF.** Requirement of JNK2 for scavenger receptor A-mediated foam cell formation in atherogenesis. *Science* 306: 1558-1561, 2004.
101. **Rieder MJ, Carmona R, Krieger JE, Pritchard KA, Jr., and Greene AS.** Suppression of angiotensin-converting enzyme expression and activity by shear stress. *Circ Res* 80: 312-319, 1997.
102. **Roig E, Perez-Villa F, Morales M, Jimenez W, Orus J, Heras M, and Sanz G.** Clinical implications of increased plasma angiotensin II despite ACE inhibitor therapy in patients with congestive heart failure. *Eur Heart J* 21: 53-57, 2000.
103. **Ross R.** Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J* 138: S419-420, 1999.
104. **Santhamma KR, Sadhukhan R, Kinter M, Chattopadhyay S, McCue B, and Sen I.** Role of tyrosine phosphorylation in the regulation of cleavage

secretion of angiotensin-converting enzyme. *J Biol Chem* 279: 40227-40236, 2004.

105. **Santos RA, Ferreira AJ, and Simoes ESAC.** Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis. *Exp Physiol* 93: 519-527, 2008.

106. **Saville B.** A scheme for the colorimetric determination of microgram amounts of thiols. *Analyst* 83: 670-672, 1958.

107. **Schunkert H, Dzau VJ, Tang SS, Hirsch AT, Apstein CS, and Lorell BH.** Increased rat cardiac angiotensin converting enzyme activity and mRNA expression in pressure overload left ventricular hypertrophy. Effects on coronary resistance, contractility, and relaxation. *J Clin Invest* 86: 1913-1920, 1990.

108. **Schupp M, Clemenz M, Gineste R, Witt H, Janke J, Helleboid S, Hennuyer N, Ruiz P, Unger T, Staels B, and Kintscher U.** Molecular characterization of new selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulators with angiotensin receptor blocking activity. *Diabetes* 54: 3442-3452, 2005.

109. **Schwartz MA and Assoian RK.** Integrins and cell proliferation: regulation of cyclin-dependent kinases via cytoplasmic signaling pathways. *J Cell Sci* 114: 2553-2560, 2001.

110. **Su KH, Tsai JY, Kou YR, Chiang AN, Hsiao SH, Wu YL, Hou HH, Pan CC, Shyue SK, and Lee TS.** Valsartan regulates the interaction of angiotensin II type 1 receptor and endothelial nitric oxide synthase via Src/PI3K/Akt signalling. *Cardiovasc Res* 82: 468-475, 2009.

111. **Sumara G, Belwal M, and Ricci R.** "Jnking" atherosclerosis. *Cell Mol Life Sci* 62: 2487-2494, 2005.
112. **Suo J, Oshinski JN, and Giddens DP.** Blood flow patterns in the proximal human coronary arteries: relationship to atherosclerotic plaque occurrence. *Mol Cell Biomech* 5: 9-18, 2008.
113. **Takasaki J, Saito T, Taniguchi M, Kawasaki T, Moritani Y, Hayashi K, and Kobori M.** A novel Galphaq/11-selective inhibitor. *J Biol Chem* 279: 47438-47445, 2004.
114. **Thomas WG.** Regulation of angiotensin II type 1 (AT1) receptor function. *Regul Pept* 79: 9-23, 1999.
115. **Touyz RM.** Reactive oxygen species as mediators of calcium signaling by angiotensin II: implications in vascular physiology and pathophysiology. *Antioxid Redox Signal* 7: 1302-1314, 2005.
116. **Traub O and Berk BC.** Laminar shear stress: mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18: 677-685, 1998.
117. **Tummala PE, Chen XL, Sundell CL, Laursen JB, Hammes CP, Alexander RW, Harrison DG, and Medford RM.** Angiotensin II induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in rat vasculature: A potential link between the renin-angiotensin system and atherosclerosis. *Circulation* 100: 1223-1229, 1999.
118. **Unger T, Chung O, Csikos T, Culman J, Gallinat S, Gohlke P, Hohle S, Meffert S, Stoll M, Stroth U, and Zhu YZ.** Angiotensin receptors. *J Hypertens Suppl* 14: S95-103, 1996.

119. **Ushio-Fukai M, Tang Y, Fukai T, Dikalov SI, Ma Y, Fujimoto M, Quinn MT, Pagano PJ, Johnson C, and Alexander RW.** Novel role of gp91(phox)-containing NAD(P)H oxidase in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis. *Circ Res* 91: 1160-1167, 2002.
120. **van Kats JP, Methot D, Paradis P, Silversides DW, and Reudelhuber TL.** Use of a biological peptide pump to study chronic peptide hormone action in transgenic mice. Direct and indirect effects of angiotensin II on the heart. *J Biol Chem* 276: 44012-44017, 2001.
121. **Varagic J, Trask AJ, Jessup JA, Chappell MC, and Ferrario CM.** New angiotensins. *J Mol Med* 86: 663-671, 2008.
122. **Wei H, Ahn S, Shenoy SK, Karnik SS, Hunyady L, Luttrell LM, and Lefkowitz RJ.** Independent beta-arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 10782-10787, 2003.
123. **Wigler M, Silverstein S, Lee LS, Pellicer A, Cheng Y, and Axel R.** Transfer of purified herpes virus thymidine kinase gene to cultured mouse cells. *Cell* 11: 223-232, 1977.
124. **Wink DA and Mitchell JB.** Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 25: 434-456, 1998.
125. **Woodman ZL, Oppong SY, Cook S, Hooper NM, Schwager SL, Brandt WF, Ehlers MR, and Sturrock ED.** Shedding of somatic angiotensin-converting enzyme (ACE) is inefficient compared with testis ACE despite cleavage at identical stalk sites. *Biochem J* 347 Pt 3: 711-718, 2000.

126. **Yasuda N, Miura S, Akazawa H, Tanaka T, Qin Y, Kiya Y, Imaizumi S, Fujino M, Ito K, Zou Y, Fukuhara S, Kunimoto S, Fukuzaki K, Sato T, Ge J, Mochizuki N, Nakaya H, Saku K, and Komuro I.** Conformational switch of angiotensin II type 1 receptor underlying mechanical stress-induced activation. *EMBO Rep* 9: 179-186, 2008.
127. **Yatabe J, Sanada H, Yatabe MS, Hashimoto S, Yoneda M, Felder RA, Jose PA, and Watanabe T.** Angiotensin II type 1 receptor blocker attenuates the activation of ERK and NADPH oxidase by mechanical strain in mesangial cells in the absence of angiotensin II. *Am J Physiol Renal Physiol* 296: F1052-1060, 2009.
128. **Yoshiyama M, Nakamura Y, Omura T, Izumi Y, Matsumoto R, Oda S, Takeuchi K, Kim S, Iwao H, and Yoshikawa J.** Angiotensin converting enzyme inhibitor prevents left ventricular remodelling after myocardial infarction in angiotensin II type 1 receptor knockout mice. *Heart* 91: 1080-1085, 2005.
129. **Yoshizumi M, Abe J, Tsuchiya K, Berk BC, and Tamaki T.** Stress and vascular responses: atheroprotective effect of laminar fluid shear stress in endothelial cells: possible role of mitogen-activated protein kinases. *J Pharmacol Sci* 91: 172-176, 2003.
130. **Zaman MA, Oparil S, and Calhoun DA.** Drugs targeting the renin-angiotensin-aldosterone system. *Nat Rev Drug Discov* 1: 621-636, 2002.
131. **Zhang H, Schmeisser A, Garlich CD, Plotze K, Damme U, Mugge A, and Daniel WG.** Angiotensin II-induced superoxide anion generation in

human vascular endothelial cells: role of membrane-bound NADH-/NADPH-oxidases. *Cardiovasc Res* 44: 215-222, 1999.

132. **Zhao SM, Shen LH, Li HW, Wang L, Chen H, Wang YL, and Guo CY.** Down-regulation of the expression of angiotensin II type 1 receptor in neonatal rat cardiac fibroblast by activation of PPARgamma signal pathway. *Chin J Physiol* 51: 357-362, 2008.

133. **Zou Y, Akazawa H, Qin Y, Sano M, Takano H, Minamino T, Makita N, Iwanaga K, Zhu W, Kudoh S, Toko H, Tamura K, Kihara M, Nagai T, Fukamizu A, Umemura S, Iiri T, Fujita T, and Komuro I.** Mechanical stress activates angiotensin II type 1 receptor without the involvement of angiotensin II. *Nat Cell Biol* 6: 499-506, 2004.

Aneiros



1. Aprovação CAPPesq



APROVAÇÃO


A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 10.05.06, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 387/06, intitulado: "Papel do domínio citoplasmático da enzima conversora de angiotensina-1 como feitor da mecanotransdução no sistema cardiovascular" apresentado pela **COMISSÃO CIENTÍFICA E DE ÉTICA DO INSTITUTO DO CORAÇÃO**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: Prof. Dr. Eduardo Moacyr Krieger

Pesquisador (a) Executante: Sr. Valério Garrone Barauna

CAPPesq, 10 de Maio de 2006.


PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

2. Aprovação da Comissão Científica do Instituto do Coração



Mem. CC. 1713



São Paulo, 09 de novembro de 2006.

Ao
Prof. Dr. Eduardo Moacyr Krieger

Ref.: Protocolo de Pesquisa SDC 2796/06/041

A Comissão Científica do Instituto do Coração, apreciou na sessão 506/06/20 de 09.11.2006, a aprovação do auxílio FAPESP (nº 2004/15707-3) e FINEP (nº 3842/2004-FNS) do Protocolo de Pesquisa SDC 2796/06/041 “Papel do Domínio Citoplasmático da Enzima Conversora de Angiotensina-I como Feitor da Mecanotransdução no Sistema Cardiovascular”, e foi o seguinte parecer: “Ciente”.

Atenciosamente,

Selma C. Quiaia Fortunato
Secretária da Comissão Científica
InCor - HC.FMUSP

1. Aprovação CAPPesq – Identificação e caracterização de proteínas modificadas em veias safenas arterializadas.



DIRETORIA CLÍNICA

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 23.09.04, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **638/04**, intitulado: "Identificação e caracterização de proteínas modificadas em veias safena arterializadas" apresentado pela **COMISSÃO CIENTÍFICA E DE ÉTICA DO INSTITUTO DO CORAÇÃO**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Pesquisador(a) Responsável: Prof. Dr. José Eduardo Krieger

Pesquisador(a) Executante: Dra. Luciene Cristina Gastalho Campos

CAPPesq, 23 de Setembro de 2004.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

OBSERVAÇÃO: Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996 inciso IX.2 letra "c")

Anexo III

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU
RESPONSÁVEL LEGAL**

- 1. NOME DO PACIENTE :**.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE N° :**SEXO :** .M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO**N°** **APTO:**
BAIRRO:**CIDADE**
CEP:.....**TELEFONE:DDD** (.....)
- 2. RESPONSÁVEL LEGAL**.....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :**SEXO:** M F
DATA NASCIMENTO.:/...../.....
ENDEREÇO:.....**N°** **APTO:**
BAIRRO:..... **CIDADE:**
CEP:.....**TELEFONE: DDD** (.....).....
-

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:

ECA e Receptor AT1 participam da mecanotransdução de sinais hemodinâmicos independentemente da angiotensina II.

PESQUISADOR: José Eduardo Krieger

CARGO/FUNÇÃO: Diretor INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL N° 61539

UNIDADE DO HCFMUSP: Incor - Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular.

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO (x) **RISCO MÍNIMO** () **RISCO MÉDIO** ()

RISCO BAIXO () **RISCO MAIOR** ()

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

3. DURAÇÃO DA PESQUISA : 3 anos

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

1. justificativa e os objetivos da pesquisa: o objetivo deste estudo é compreender porque a “ponte de safena” entope após um certo período. quando a mesma é colocada para substituir uma artéria coronária que estava “entupida” e que por isso provocou um infarto no indivíduo. Este estudo pode ser justificado pelo motivo que muitos dos indivíduos que passam pela cirurgia de revascularização cardíaca, precisam retornar após algum tempo ao hospital para trocar suas “pontes de safena”, pois estas estão “entupidas”.

2. procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais: **você participará deste estudo após ser submetido a cirurgia de revascularização cardíaca.**

3. desconfortos e riscos esperados: **não haverá nenhum risco e desconforto devido a pesquisa, pois não será realizado nada além do que a cirurgia necessite. Apenas os segmentos de veias safenas que não serão utilizados para construir a “ponte de safena” será utilizada para a pesquisa, ou seja, utilizaremos a veia que sobrar e que seria descartada.**

4. benefícios que poderão ser obtidos: este estudo contribuirá para a descoberta de novas terapias para implantação da veia safena no coração, beneficiando o paciente a não ter que passar pelo desconforto de uma nova cirurgia após de algum tempo.

5. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo:

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

1. acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas: você pode e deve fazer todas as perguntas que julgar necessária antes de participar do estudo

2. liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência: a sua participação no estudo é voluntária, mas você tem plena liberdade para não aceitar participar da pesquisa, sem incorrer em nenhuma penalidade. O seu atendimento médico não será prejudicado caso você decida não participar.

3. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade:

4. disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.

5. viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Prof. Dr. José Eduardo Krieger InCor – Av. Dr. Éneas de Carvalho Aguiar, 44
Tel: 3069-5579/ 5069

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, de de 200 .

Assinatura do sujeito da pesquisa ou
responsável legal

Assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)