



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

João Alfredo de Moraes Gomes da Silva

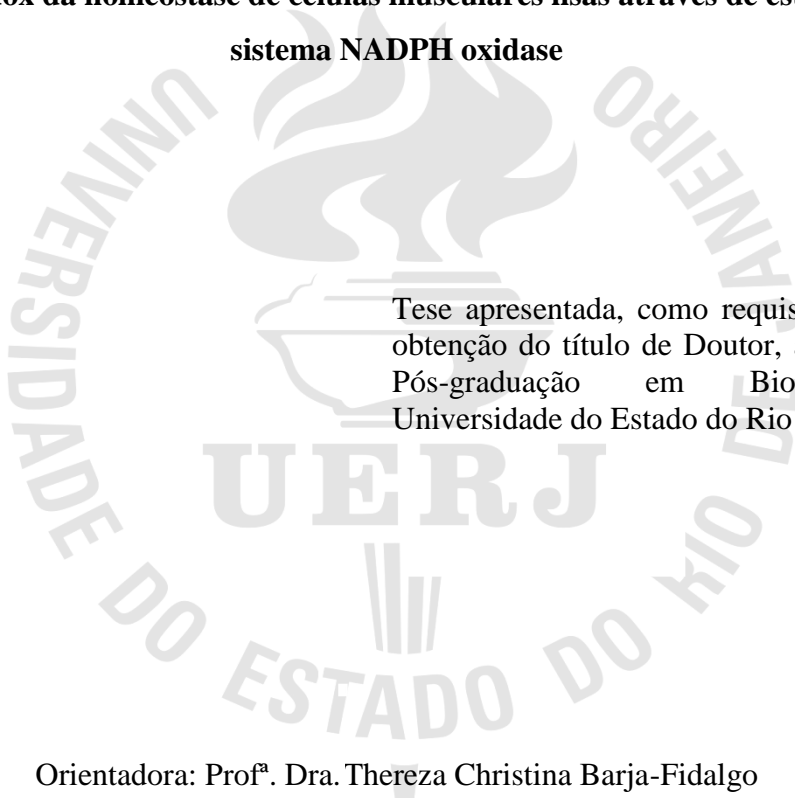
**Modulação redox da homeostase de células musculares lisas através de
estimuladores do sistema NADPH oxidase**

Rio de Janeiro

2011

João Alfredo de Moraes Gomes da Silva

Modulação redox da homeostase de células musculares lisas através de estimuladores do sistema NADPH oxidase



Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof^a. Dra. Thereza Christina Barja-Fidalgo

Coorientadora: Prof^a. Dra. Maria Augusta Arruda

Rio de Janeiro

2011

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

S586 Silva, João Alfredo de Moraes Gomes da.
Modulação redox da homeostase de células musculares lisas através
de estimuladores do sistema NADPH / João Alfredo de Moraes Gomes da
Silva. - 2011.
108 f.

Orientadora: Thereza Christina Barja Fidalgo.
Coorientadora: Maria Augusta Arruda.

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de
Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Aterosclerose – Teses 2. Doenças cardiovasculares – Fatores de risco –
Teses. 3. NADPH oxidase. 4. Heme – Teses. 5. Integrinas – Fisiologia. I.
Fidalgo, Thereza Christina Barja. II. Arruda, Maria Augusta. III. Universidade
do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes.
IV. Título.

CDU 616.13-004.6

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta
tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

João Alfredo de Moraes Gomes da Silva

Modulação redox da homeostase de células musculares lisas através de estimuladores do sistema NADPH oxidase

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 09 de dezembro de 2011.

Coorientadora: Prof^ª. Dra. Maria Augusta Arruda

Banca Examinadora:

Prof^ª. Dra. Thereza Christina Barja-Fidalgo (Orientadora)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. André Luiz Franco Sampaio
Fundação Oswaldo Cruz

Prof. Dr. Cláudio de Azevedo Canetti
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Marcelo Torres Bozza
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Rodolfo Mattos Albano
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro
2011

DEDICATÓRIA

À minha mãe.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Christina Barja-Fidalgo por toda atenção, dedicação, orientação e, sobretudo, paciência. Sinto-me honrado em ser seu aluno (já são quase 10 anos).

À Dr^a. Maria Augusta, por ter me co-orientado nesta tese. A grande responsável pela ideia do heme.

À Dr^a. Iolanda Margherita Fierro por sempre estarem solícitas e ajudarem nas discussões científicas.

Ao Pedro, grande amigo da turma de mestrado e doutorado. Um irmão que fiz ao longo desta jornada.

Aos outros bons amigos de laboratório e UERJ: Edward, Érica, Fábio, Gabi, Léo, Heitor, Isis, Marcelo, Pedro Antônio, Rafael e Tiago.

Às meninas do laboratório, pelo toque de leveza e beleza que colocam no ambiente de trabalho: Andreza, Carol, Cristiane, Renata, Simone e Vany.

Ao Dr. Emiliano pelo apoio em todos os momentos necessários.

Aos meus pais, responsáveis por tudo que sou. Espero um dia poder retribuir, pelo menos um pouco, todo amor que recebi durante minha vida. Minha prioridade é a felicidade de vocês.

À minha querida esposa Mariana, que sempre esteve ao meu lado, nos bons e maus momentos.

E a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento desta tese.

Conhecimento real é saber
a extensão da própria ignorância.

Confúcio

RESUMO

MORAES, João Alfredo. *Modulação redox da homeostase de células musculares lisas através de estimuladores do sistema NADPH oxidase*. 2011. 108 f. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

As doenças cardiovasculares representam a principal causa de morte nos países ocidentais. Dentre essas doenças, a aterosclerose é que mais se destaca, sendo caracterizada pelo acúmulo de células musculares lisas vasculares (CMLV). O efeito patológico das CMLV em resposta a diferentes estímulos pode acarretar em disfunções nestas células. É notável que a aterosclerose ocorra principalmente em vasos sinuosos onde ocorre um forte turbilhonamento do fluxo sanguíneo, que pode acarretar em hemólise e, conseqüentemente, acúmulo de heme livre. Além disso, no processo de aterogênese as moléculas de adesão, principalmente integrinas, são de crucial importância durante a resposta de CMLV. Nesse trabalho nosso objetivo inicial foi avaliar o efeito do heme livre nas funções de CMLV, bem como os mecanismos moleculares por trás desses efeitos. Em uma segunda parte, investigamos o envolvimento da integrina $\alpha 1\beta 1$ no efeito da Angiotensina II (Ang II) em CMLV. Nós observamos que o heme livre é capaz de induzir a proliferação e migração de CMLV via espécies reativas de oxigênio (ERO) provenientes da NADPHoxidase (NADPHox). Adicionalmente vimos que o heme ativa vias de sinalização redox-sensíveis relacionadas à proliferação celular, como MAPKinases e o fator de transcrição NF κ B. Também observamos que há uma ligação entre a NADPHox e o sistema heme oxigenase (HO), uma vez que o heme induz a expressão de HO-1 e o pré-tratamento das CMLV com inibidores de HO levam ao aumento tanto o efeito proliferação quanto a indução de ERO promovidas pelo heme. Além disso, vimos que o efeito contra-regulatório promovido pela HO ocorre devido as metabolites do heme: biliverdina, bilirrubina e monóxido de carbono. Por último, quando bloqueamos tanto a NADPHox quanto o sistema HO o heme não teve efeito algum na proliferação de CMLV. Em um segundo estudo, observamos que o efeito da Ang II sobre a migração de CMLV foi inibido quando as células foram pré-tratadas com o ligante da integrina $\alpha 1\beta 1$, a desintegrina Obtustatina. A seguir observamos que o efeito da Ang II na ativação de FAK e na colocalização actina-ILK é dependente da integrina $\alpha 1\beta 1$, que possivelmente ativa PKC α , uma vez que vimos que a produção de ERO induzida por Ang II foi inibida pela Obtustatina. Vimos que a indução da expressão de ILK por Ang II em CMLV é dependente da integrina $\alpha 1\beta 1$ e também observamos que a Obtustatina inibiu o desacoplamento de ILK da FAK, uma vez que a Obtustatina bloqueou a fosforilação de FAK induzida por Ang II (processo crucial para o desacoplamento da ILK). Nós também observamos que a Ang II induz, via integrina $\alpha 1\beta 1$, a fosforilação de AKT e a diminuição da expressão de p21, provavelmente via ILK. Corroborando estes dados, nós mostramos que o pré-tratamento com Obtustatina induziu um estacionamento na fase G0 e diminuição da proliferação de CMLV tratadas com Ang II. Portanto, mostramos nesse trabalho que o heme livre induz a ativação de CMLV via NADPHox, que é elegantemente contra-regulado pelo sistema HO. Além disso, sugerimos que a integrina $\alpha 1\beta 1$ pode ser um importante alvo molecular para o desenvolvimento de intervenções mais efetivas para a aterosclerose.

Palavras chave: Doenças cardiovasculares. NADPHox. Heme oxigenase. Integrinas.

ABSTRACT

MORAES, João Alfredo. *Redox modulation of smooth muscle cells homeostasis via inducers of NADPHoxidase system*. 2011. 108 f. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

Cardiovascular diseases represent the major mortality reason in western countries. Among these diseases, atherosclerosis is the most prominent one, which is characterized by vascular smooth muscle cell (VSMC) accumulation. The pathological effect of VSMC in response to different stimuli is able to induce VSMC dysfunctions. Notably, this cardiovascular disease occurs mainly in sinuous vessels with turbulent blood flow, which may lead to hemolysis and consequent free heme accumulation. Furthermore, in atherogenesis the adhesion molecule, mainly integrins, were of crucial importance during the VSMC response. In this work our aim was to elucidate the effect of free heme in VSMC, as well the molecular mechanisms underlying this process. In a second part, we investigated the role of $\alpha 1\beta 1$ integrin in Angiotensin II (Ang II) effect on VSMC. We observed that free heme is able to induce VSMC proliferation in a Reactive Oxygen Species (ROS) derived from NADPHoxidase (NADPHox) dependent manner. Additionally, heme activates proliferation-related redox-sensitive signaling routes, such as MAPKinases and the transcription factor NF κ B. It was also observed a critical crosstalk between NADPHox and heme oxygenase (HO) system, once heme induces HO-1 expression and VSMC pretreatment with HO inhibitors increased heme proliferative effect and ROS production. Accordingly, we observed that the counter-regulatory effect promoted by HO occurs due heme metabolites: biliverdin, bilirubin and carbon monoxide. Finally, when both NADPHox and HO system were blocked, heme had no effect on VSMC proliferation. In a second part, we observed that the chemotactic effect of Ang II on VSMC was abolished when the cells were pretreated with the $\alpha 1\beta 1$ integrin ligand, the disintegrin Obtustatin. Then, we observed that the Ang II effect on FAK activation and actin-ILK colocalization is integrin $\alpha 1\beta 1$ dependent, which possibly activates PKC α , once we observed that the ROS production induced by Ang II was inhibited by Obtustatin. We demonstrated by western blotting that ILK induction by Ang II is dependent of $\alpha 1\beta 1$ integrin and we also observed that Obtustatin inhibited the uncoupling of ILK to FAK, once Obtustatin blocked the FAK phosphorylation induced by Ang II (crucial process to ILK uncoupling). We also observed that Ang II induced, via $\alpha 1\beta 1$ integrin, AKT phosphorylation, and p21 expression reducement, probably via ILK. Corroborating these data we demonstrated that the pretreatment with Obt induced G1 phase arrest and diminishment of VSMC proliferation treated with AngII. Thus we showed that free heme induces VSMC activation via NADPHox, which is elegantly counter-regulated by HO-1. Furthermore, we suggest that $\alpha 1\beta 1$ integrin may be an important target molecule to the development of more effective therapeutic interventions in atherosclerosis.

Keywords: Cardiovascular diseases. NADPHox. Heme Oxygenase. Integrins.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-------------|---|----|
| Figura 1 – | Mecanismos de aterogênese..... | 18 |
| Figura 2 – | Molécula do heme..... | 20 |
| Figura 3 – | Ilustração de biossíntese do heme..... | 21 |
| Figura 4 – | Estado inativo e ativo do complexo NADPH oxidase..... | 25 |
| Figura 5 – | Vias de sinalização que podem ser moduladas por ERO..... | 26 |
| Figura 6 – | Catálise do heme pelo sistema HO..... | 28 |
| Figura 7 – | Principais vias de sinalização ativadas por integrinas..... | 30 |
| Figura 8 – | Papel dual da ILK: proteína adaptora e quinase..... | 31 |
| Figura 9 – | Representação esquemática da ativação da integrina $\alpha v\beta 3$ em CMLV através da ligação do LTB4 ao BLT1-GPCR..... | 33 |
| Figura 10 – | Imagem obtida em microscópio ótico de células A7r5..... | 37 |
| Figura 11 – | Representação esquemática de uma câmara de Boyden modificada..... | 38 |
| Figura 12 – | Efeito do heme sobre a migração e proliferação de CMLV | 45 |
| Figura 13 – | Efeito do heme sobre a migração e proliferação de CMLV: Envolvimento de ERO..... | 46 |
| Figura 14 – | Efeito do heme sobre a produção de ERO em CMLV..... | 47 |
| Figura 15 – | Efeito do heme sobre a migração e proliferação de CMLV: Envolvimento da NADPH oxidase..... | 49 |
| Figura 16 – | Efeito do heme sobre a migração e proliferação de CMLV: Envolvimento da ERK..... | 51 |
| Figura 17 – | Efeito do heme sobre a fosforilação da ERK em CMLV..... | 52 |
| Figura 18 – | Efeito do heme sobre a translocação nuclear de NF κ B em CMLV..... | 53 |
| Figura 19 – | Efeito do heme sobre a translocação nuclear de NF κ B em CMLV..... | 54 |
| Figura 20 – | Efeito do heme sobre a expressão de HO-1 e HO-2 em CMLV..... | 55 |
| Figura 21 – | Efeito do heme sobre a proliferação de CMLV: Papel do sistema HO..... | 56 |

| | |
|---|----|
| Figura 22 – Efeito do heme sobre o ciclo mitótico de CMLV..... | 57 |
| Figura 23 – Efeito do heme sobre a produção de ERO em CMLV | 58 |
| Figura 24 – Efeito do heme sobre a proliferação de CMLV: Papel dos metabólitos do heme..... | 60 |
| Figura 25 – Efeito do heme sobre a proliferação de CMLV: Contra-regulação da NADPH oxidase e HO..... | 62 |
| Figura 26 – Efeito da Ang II sobre a migração de CMLV: Papel da integrina $\alpha 1\beta 1$ | 63 |
| Figura 27 – Efeito da Ang II sobre a fosforilação de FAK em CMLV: Papel da integrina $\alpha 1\beta 1$ e da PKC α | 64 |
| Figura 28 – Efeito da Ang II sobre a colocalização Actina-ILK em CMLV: Papel da integrina $\alpha 1\beta 1$ e da PKC α | 66 |
| Figura 29 – Efeito da Ang II sobre a produção de ERO em CMLV: Papel da integrina $\alpha 1\beta 1$ | 68 |
| Figura 30 – Efeito da Ang II sobre a expressão de ILK em CMLV: Papel da integrina $\alpha 1\beta 1$ | 69 |
| Figura 31 – Efeito da Ang II sobre o desacoplamento da ILK da FAK em CMLV..... | 70 |
| Figura 32 – Efeito da Ang II sobre a fosforilação de AKT e degradação de p21 em CMLV: Papel da integrina $\alpha 1\beta 1$ | 71 |
| Figura 33 – Efeito da Ang II sobre a proliferação de CMLV: Papel da integrina $\alpha 1\beta 1$ | 72 |
| Figura 34 – Efeito da Ang II sobre o ciclo mitótico de CMLV: Papel da integrina $\alpha 1\beta 1$ | 73 |
| Figura 35 – Conclusão 1..... | 82 |
| Figura 36 – Conclusão 2..... | 83 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------------------------------|---|
| AngII | Angiotensina II |
| BSA | Albumina de soro bovino |
| CML | Células Musculares Lisas vasculares |
| CO | Monóxido de Carbono |
| CO ₂ | Dióxido de Carbono |
| CoA | Coenzima A |
| DHR | Diidrorodamina-123 |
| CPM | Contagem Por Minuto |
| EDTA | Ácido etileno diamino tetracético |
| ERO | Espécie Reativa de Oxigênio |
| ERK-2 | Proteína quinase regulada por estímulo extracelular-2 |
| DAPI | 6-Diamidino-2-Fenilindol |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle's Médium |
| DNA | Ácido Desoxirribonucléico |
| DPI | Difenileneiodonio |
| ECL | (Ensaio) Quimioluminescência aprimorada |
| FCS | Soro fetal de bezerro |
| Fe ⁺² | Ferro |
| Ferroprotoporfirina IX | Heme |
| H ³ | Trítio |
| HO• | Radical Hidroxil |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de Hidrogênio |
| HEPES | Ácido Etanosulfônico 4-(2-Hidroxietil) Poperazina-1 |
| HO | Heme Oxigenase |
| HSP | <i>Heat Shock Protein</i> |
| IBGE | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística |
| IGF | Fator de crescimento semelhante à insulina |
| IgG | Imunoglobulina G |
| IL-1 β | Interleucina 1 β |
| IL-6 | Interleucina 6 |

| | |
|------------------|--|
| IL-17 | Interleucina 17 |
| LDL | Lipoproteína de baixa densidade |
| LTB ₄ | Leucotrieno B ₄ |
| MAPK | Proteína quinase ativada por mitógeno |
| NADPH | Nicotinamida adenina dinucleotídeo-fosfato Oxidase |
| NFκB | Fator de transcrição nuclear κ B |
| NO | Óxido nítrico |
| O ⁻ | Ânion superóxido |
| O ₂ | Oxigênio |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| PBS | Tampão fosfato |
| PDGF | Fator de crescimento derivado de plaquetas |
| PI3K | Fosfatidil inositol 3quinase |
| PKC | Proteína quinase C |
| PMSF | Fluoreto de fenilmetilsulfonil |
| PVDF | Polivinilideno difluorido |
| SDS | Dodecilssulfato de Sódio |
| SDS-PAGE | Eletroforese sob condições desnaturantes |
| SnPP | Estanho Protoporfirina IX |
| SOD | Superóxido Dismutase |
| TCA | Ácido Tricloro Acético |
| ZnPP | Zinco Protoporfirina IX |

SUMÁRIO

| | | |
|-------|---|----|
| | INTRODUÇÃO | 14 |
| 1 | OBJETIVOS | 34 |
| 1.1 | Objetivo Geral 1ª parte | 34 |
| 1.1.1 | <u>Objetivos específicos</u> | 34 |
| 1.2 | Objetivo Geral 2ª parte | 34 |
| 1.2.1 | <u>Objetivos específicos</u> | 35 |
| 2 | MATERIAIS E MÉTODOS | 36 |
| 2.1 | Reagentes | 36 |
| 2.2 | Cultura de células | 36 |
| 2.3 | Quimiotaxia in vitro | 37 |
| 2.4 | Proliferação | 39 |
| 2.5 | Análise da produção de ERO | 39 |
| 2.5.1 | <u>DHR</u> | 39 |
| 2.5.2 | <u>CM-H₂DCFDA</u> | 40 |
| 2.6 | Obtenção de extrato celular | 40 |
| 2.7 | “Immunoblotting” | 41 |
| 2.8 | Imunocitoquímica | 41 |
| 2.9 | Análise do Ciclo Celular | 42 |
| 2.10 | Análise estatística | 42 |
| 3 | RESULTADOS | 44 |
| 3.1 | Resultados 1ª parte | 44 |
| 3.1.1 | <u>Heme induz a migração e proliferação de CMLV de modo redox-sensível</u> | 44 |
| 3.1.2 | <u>Heme induz a produção de ERO via NADPH oxidase</u> | 47 |
| 3.1.3 | <u>Os efeitos do heme na migração e proliferação de CMLV são dependentes de ERO provenientes da NADPH oxidase</u> | 48 |
| 3.1.4 | <u>Heme ativa vias de sinalização redox-sensíveis</u> | 50 |
| 3.1.5 | <u>Heme induz a expressão de HO-1</u> | 54 |
| 3.1.6 | <u>A ativação do sistema HO contra-regula o efeito do Heme sobre a proliferação de CMLV</u> | 55 |
| 3.1.7 | <u>Metabólitos do heme reverterem o efeito do inibidor da HO-1 sobre a proliferação de CMLV</u> | 59 |

| | | |
|-------|--|----|
| 3.1.8 | <u>Contra-regulação dos sistemas NADPH oxidase e HO sobre o efeito do heme em CMLV.....</u> | 61 |
| 3.2 | Resultados 2ª parte..... | 63 |
| 3.2.1 | <u>A integrina $\alpha1\beta1$ modula o efeito da angiotensina II na migração de CMLV.....</u> | 63 |
| 3.2.2 | <u>A associação Actina-ILK induzida pela Ang II em CMLV é mediada pela integrina $\alpha1\beta1$.....</u> | 65 |
| 3.2.3 | <u>A integrina $\alpha1\beta1$ modula o efeito da Ang II em CMLV sobre a produção de ERO.....</u> | 67 |
| 3.2.4 | <u>O desacoplamento FAK-ILK induzido pela Ang II em CMLV é mediado pela integrina $\alpha1\beta1$.....</u> | 69 |
| 3.2.5 | <u>A integrina $\alpha1\beta1$ modula os efeitos da Ang II em CMLV sobre a ativação de AKT e degradação da p21.....</u> | 71 |
| 3.2.6 | <u>Os efeitos da Ang II em CMLV sobre a proliferação celular são dependentes da integrina $\alpha1\beta1$.....</u> | 72 |
| 4 | DISCUSSÃO..... | 74 |
| 4.1 | Discussão 1ª parte..... | 74 |
| 4.2 | Discussão 2ª parte..... | 77 |
| 5 | CONCLUSÃO..... | 81 |
| 5.1 | Conclusão 1ª parte..... | 81 |
| 5.2 | Conclusão 2ª parte..... | 81 |
| | REFERÊNCIAS..... | 84 |
| | APÊNDICE – - Heme modulates smooth muscle cell functions via NADPH oxidase: a counter-regulatory role for heme oxygenase system | 92 |

INTRODUÇÃO

Doenças cardiovasculares

As doenças cardiovasculares representam a maior causa de morte humana no mundo ocidental alcançando, em 2008, 30% do total de óbitos da população mundial (OMS). No Brasil estes números são bem próximos, alcançando 29,4% do total de óbitos da população brasileira (dados de 2007, emitidos pelo Ministério da Saúde). Segundo a OMS a tendência é que este número aumente cada vez mais, com perspectiva de saltar de 17,3 milhões de óbitos em 2008 para 23,6 milhões em 2030 (OMS).

Dois fatores explicam a elevação deste índice ao longo dos anos: o aumento da expectativa de vida e a mudança de hábitos da população. Em 1930, a expectativa média de vida de um brasileiro atingia os 41 anos, enquanto que em 2005 a expectativa de vida subiu para 71,9 anos (IBGE). Entretanto, além de um aumento na expectativa de vida, também ocorreu uma grande mudança nos hábitos não somente de brasileiros, como também de toda a população do mundo ocidental. Entre as mudanças de hábitos temos uma diminuição na atividade física, uma elevação nos níveis de estresse e, sobretudo, as mudanças nos hábitos alimentares. Hipócrates (460 – 377 a.c.) já alertava para a necessidade de termos uma alimentação saudável (Cheng, 2001). Não obstante, ao longo do século XX foi ocorrendo uma mudança dos hábitos alimentares, com uma dieta cada vez mais rica em gordura saturada. Portanto, o aumento da expectativa de vida associado às mudanças de hábitos da população determinou uma grande elevação na incidência de doenças cardiovasculares.

Grande parte das mortes ocorridas por doenças cardiovasculares ocorre devido à obstrução de artérias que irrigam o coração, levando à isquemia do miocárdio, ou de artérias que irrigam o cérebro, causando isquemia cerebral (principal forma de acidente vascular cerebral). Indiscutivelmente, a principal doença que causa obstrução do vaso sanguíneo é a aterosclerose.

Aterosclerose

Foi de Leonardo da Vinci o primeiro relato sobre um vaso com aterosclerose. Na ocasião, ele comparou as artérias de pessoas jovens com artérias de indivíduos idosos (Keele, 1972), observando que, nestes últimos, os vasos apresentavam um maior espessamento. Da Vinci atribuiu a morte súbita dos idosos que observara ao endurecimento de suas artérias, criando assim o conceito de arteriosclerose (grego: *skleros* = duro).

O principal tipo de arteriosclerose é a aterosclerose, que representa um endurecimento do vaso devido à formação de uma placa de ateroma. Como a aterosclerose ocorre essencialmente em artérias é comum a confusão entre os termos aterosclerose e arteriosclerose. Diferentemente de sua parônima, a palavra aterosclerose foi criada muito depois, em 1904, por Marchand e em sua essência significa endurecimento causado por papa de milho (grego *Atheros* = papa de milho, *skleros* = duro) pois Marchand, após observar a placa de ateroma, comparou-a a uma papa de milho (Keele, 1972).

Ao longo do século XX, algumas teorias foram descritas na tentativa de se explicar a aterosclerose. A primeira teoria descrita e aceita por mais tempo durante o século XX, foi a teoria lipídica (Moreton 1947; Gofman, 1950). A teoria era muito simples, dizia que o excesso de lipídios ingeridos pelo homem seria convertido a LDL (lipoproteína de baixa densidade) que, em altas concentrações no plasma, se depositaria na parede das artérias levando à formação da placa de ateroma. Esta teoria, contudo, não respondia algumas questões importantes, tais como o que levaria à infiltração de LDL na camada íntima (composta por células endoteliais), o que levaria ao processo inflamatório na placa de ateroma e o porquê da localização da LDL em placas.

Em 1973 foi descrita a teoria da resposta à injúria (Ross e Glomset, 1973), que prega que a formação da placa de ateroma, ou aterogênese, ocorre devido a uma injúria na parede da artéria. Diferentes agentes (como hipertensão, colesterol, fumo) são capazes de lesionar a camada de células endoteliais, promovendo uma reação do vaso à lesão e assim, o desenvolvimento do processo de aterosclerose. Concomitante ao desenvolvimento dessas teorias, ao longo do século XX vários pesquisadores notaram que ocorria um processo inflamatório no local da placa de ateroma, surgindo assim a idéia para a teoria da inflamação. O Dr. Peter Libby, da Universidade de Harvard, é um dos principais defensores da teoria da inflamação, afirmando que o evento crucial para o desenvolvimento da aterosclerose é a ocorrência de um processo inflamatório (Libby, 2002). A teoria da inflamação de certa forma

rejeita a teoria lipídica, pois afirma que a inflamação que leva à aterogênese não ocorre necessariamente por um excesso de lipídios plasmáticos, mas também pode ocorrer por outros fatores (Libby, 2002, 2003).

A teoria que melhor explica o desenvolvimento da aterosclerose é a teoria da oxidação lipídica, que completaria as outras já mencionadas. Nesta teoria o principal responsável pela aterogênese é a LDL-oxidada (Quinn e col., 1987; Saini e col., 2005). O excesso de ERO (Espécies Reativas de Oxigênio) na circulação, que pode ocorrer devido a hábitos como o tabagismo e alcoolismo, facilita a oxidação das LDL circulantes. Vale ressaltar que um indivíduo com níveis normais de LDL plasmáticos, mas com elevado valor de ERO circulantes, pode apresentar LDL-oxidada refutando, em parte, a crítica de Libby na teoria da inflamação. Outra explicação de como a LDL estaria sendo oxidada veio através de estudos que mostraram que o anion superóxido ($O^{\cdot -}$) proveniente da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase é capaz de levar à sua oxidação lipídica (Aviram e col., 1996). Uma vez oxidada, a LDL é capaz de recrutar monócitos (Quinn e col., 1987) e gerar um processo inflamatório (Schönbeck e col., 2002), levando à injúria das células endoteliais (Saini e col., 2005). Contudo, a teoria da inflamação não pode ser descartada pois outras moléculas, liberadas a priori ou a posteriori à LDL-oxidada, também podem gerar um processo inflamatório e, conseqüentemente, induzir a aterogênese.

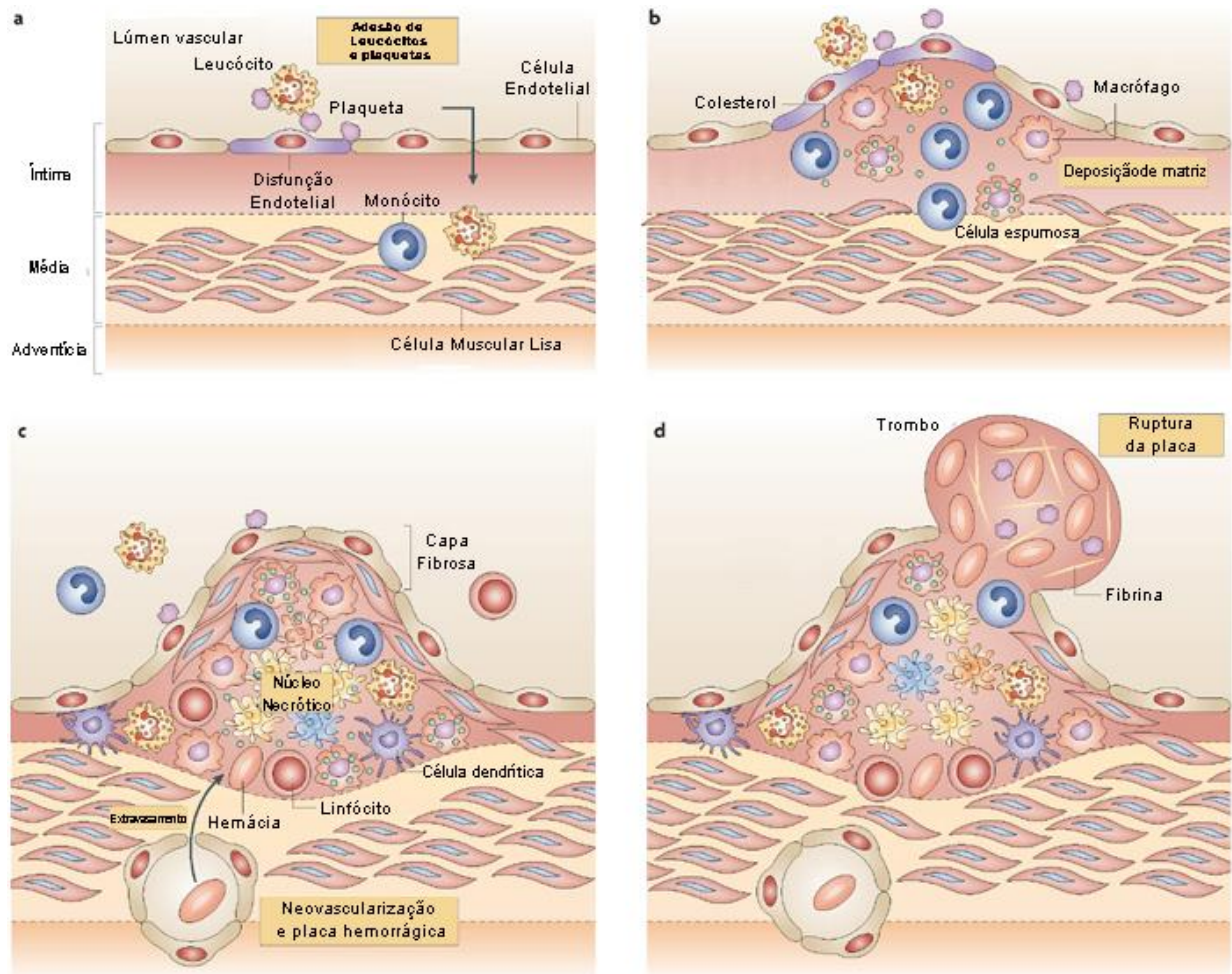
Atualmente a idéia mais aceita é de que todos esses processos se completam: a LDL-oxidado induziria uma inflamação local gerando dano às células endoteliais e provocando uma resposta resolutiva para esta lesão (Hansson e Libby, 2006; Libby e col., 2010).

Mecanismos da aterogênese

Desta maneira, uma vez oxidada, a LDL pode se infiltrar pela camada de células endoteliais do vaso (íntima), acumulando-se principalmente nas regiões de entroncamento dos vasos. Localizado na camada sub-íntima, a LDL-oxidada é capaz de recrutar monócitos circulantes que rolam, aderem e transmigram através das células endoteliais (Quinn e col., 1987; Saini e col., 2005). A fagocitose da LDL-oxidada por monócitos que chegam na sub-íntima induz uma modificação do fenótipo destas células que, armazenando ésteres de colesterol, se transformam em células espumosas que deixam de ser responsivas e vão se concentrar no centro da placa de ateroma. Após sofrerem processo de necrose estas células

darão origem ao núcleo necrótico da placa (Weber e col, 2008; Ley e col., 2011). O acúmulo de células espumosas na sub-íntima causa dano às células endoteliais, podendo levar a remoção local de parte da íntima. A exposição da matriz extracelular e o acúmulo das células espumosas induz ativação das plaquetas circulantes e sua conseqüentemente agregação e formação de trombos nestes locais de falha da íntima. Todo o quadro formado até este momento, como a presença de LDL-oxidada e células espumosas, ruptura da íntima e agregação plaquetária, favorece a migração e proliferação de células musculares lisas vasculares (CMLV), que estão localizadas em uma camada mais interna, a camada média. O estabelecimento da placa de ateroma ocorre quando as CMLV migram até a região de falha do endotélio e através da deposição de proteínas da matriz extracelular, formam a placa fibrosa conferindo estabilidade à placa de ateroma (Figura 1; Hansson e Libby, 2006; Libby e col., 2010). Voltando à teoria proposta pelo Dr. Peter Libby, um processo inflamatório seria capaz de gerar todo o quadro de aterogênese. Contudo, mediadores inflamatórios podem ser liberados não somente no início do processo de aterosclerose se iniciar, mas também ao longo da doença, afetando fortemente as CMLV e contribuindo assim para o estabelecimento da aterosclerose.

Figura 1 - Mecanismos de aterogênese



Nature Reviews | Immunology

Legenda: A. Disfunção endotelial e adesão plaquetária e leucocitária; B. Infiltração de LDL oxidado e formação de células espumosas; C. Apoptose de células espumosas formando o núcleo necrótico e a formação da placa fibrosa pelas CMLV; D. Ruptura da placa.

Fonte: Adaptado de Weber e col., 2008.

Células musculares lisas vasculares (CMLV): Ativação e Função

As CMLV localizam-se na camada média, sendo delimitadas pelas camadas elásticas interna e externa e circundadas por matriz extracelular rica em colágeno, elastina e vitronectina, dentre outras. A principal função das CMLV é o controle da atividade contrátil da parede vascular, o que leva à manutenção do tônus vascular. Por outro lado, uma disfunção das CMLV pode representar grande importância na aterogênese (Cecchetti e col., 2011).

No processo de aterosclerose ocorre a migração e proliferação de CMLV em resposta a estímulos diversos, sendo a lesão de células endoteliais o evento crucial para que ocorram estes eventos, uma vez que o endotélio lesado deixa de produzir substâncias anti-proliferativas como o óxido nítrico e TGF- β (Majack, 1987; Garg e Hassid, 1989). Já as plaquetas, ativadas pela lesão endotelial, podem liberar mediadores e fatores de crescimento como IGF e PDGF, que ativam vias de sinalização relacionadas à migração e a proliferação celular (Bornfeldt e col., 1994; Hauck e col., 2000).

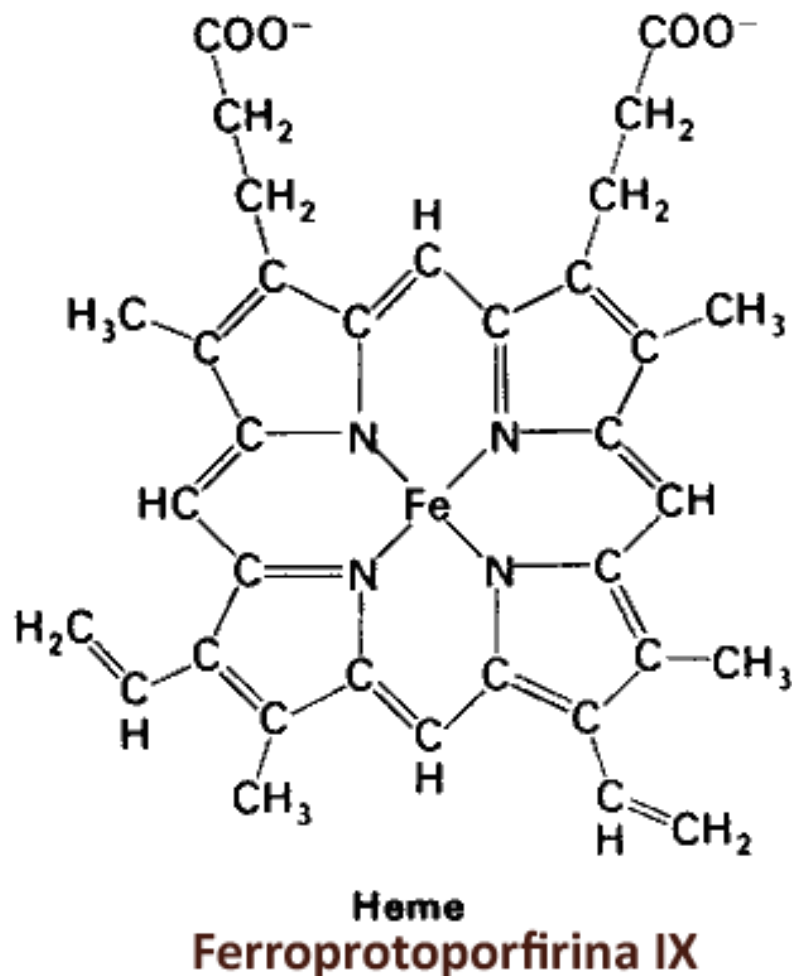
Contribui também para tal quadro a angiotensina II (Ang II), gerada através da ativação do sistema renina-angiotensina, que ocorre em abundância na aterosclerose (Diet e col., 1996; Jorgensen e col., 2001). O sistema renina-angiotensina também se encontra ativado na hipertensão, que por sua vez pode induzir aterogênese. A Ang II é também um poderoso agente quimiotático para CMLV (Dubey e col., 1995), sendo capaz de ativar fatores de transcrição como o fator nuclear-kappa B (NF κ B), responsável pela produção de mediadores inflamatórios (Kranzhofer e col., 1999), citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-17) (Wang e Newman, 2003; Patel e col., 2007; Ravoux e col., 2007) e mediadores lipídicos como o leucotrieno B₄ (LTB₄) que, por sua vez, podem modular a expressão de moléculas de adesão como as integrinas, que desempenham também um importante papel na aterogênese (Heller e col., 2005; Moraes e col., 2010). Em comum, a maioria desses mediadores é capaz de induzir um aumento de ERO, que por sua vez já foram descritas como importantes para a aterogênese (Griendling e col., 2000; Paravicini e Touyz, 2008; Cave, 2009).

Além desses mediadores citados, uma outra molécula pode se evidenciar como importante para a aterogênese. Sabendo-se que a aterosclerose ocorre em locais de entroncamentos de vasos (onde os vasos são muito sinuosos), isto leva a um forte turbilhonamento sanguíneo (que pode ser aumentado na hipertensão), fazendo com que as hemácias se choquem fortemente contra a parede dos vasos, podendo culminar em hemólise. Desta forma, durante diferentes etapas da aterogênese a hemólise pode acarretar uma grande liberação de heme livre nesses vasos (Olgun e col., 2004), o que nos levaria a rever a importância desta molécula para um novo papel. Além de uma possível atuação do heme diretamente nas células, também já foi mostrado que o heme é capaz de diretamente oxidar o LDL (Balla e col., 1991; Miller e Shaklai, 1999). Portanto o heme pode ser relevante não somente para o início da aterogênese mas também pode contribuir para o seu desenvolvimento.

Heme

A ferroprotoporfirina IX (heme, figura 2) é importante em diferentes funções fisiológicas, desde o transporte de O_2 pela hemoglobina e a transferência de elétrons na cadeia respiratória, como também está presente em diferentes enzimas durante um episódio inflamatório.

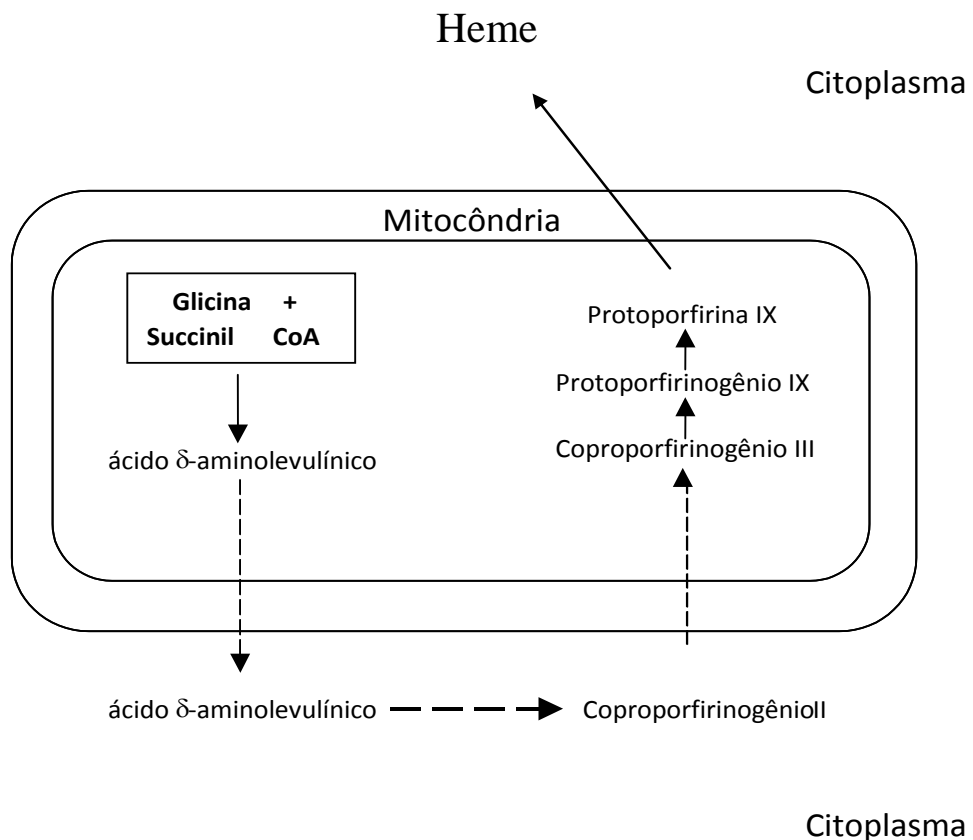
Figura 2 - Molécula do heme



Por ser importante para diferentes processos biológicos, o heme é constitutivamente sintetizado tanto na mitocôndria quanto no citoplasma. A enzima δ -aminolevulinato sintase apresenta grande importância na síntese do heme pois é capaz de adicionar glicina à succinil-CoA, gerando δ -aminolevulinato que é precursor da protoporfirina IX. Por último, um átomo

de Fe^{+2} é adicionado ao anel porfirínico, gerando assim a molécula do heme (figura 3). O heme, por sua vez, pode regular sua síntese de duas formas, inibindo a ação da enzima δ -aminolevulinato sintase ou através da indução da heme oxigenase (HO), responsável por sua degradação (Ryter e Tyrrel, 2000).

Figura 3 - Ilustração da biossíntese do heme



Entretanto, em algumas situações pode ocorrer um aumento exacerbado da concentração do heme, como na hemólise durante a aterosclerose, ou também em outros processos patológicos de diferentes etiologias, tais como malária, a anemia falciforme e a talassemia, a isquemia e reperfusão e episódios de coagulação intravascular disseminada. Estes processos apresentam em comum a inflamação local ou sistêmica, ao longo de sua ocorrência (Gonçalves e col., 2001; Solovey e col, 2001).

Durante episódios hemolíticos a concentração de heme no leito vascular chega a níveis muito elevados (próximo a $20 \mu\text{M}$), tornando difícil a sua neutralização. A principal enzima

capaz de neutralizar os efeitos deletérios do heme é a hemopexina, devido a sua elevada afinidade pelo heme ($K_d < 1 \text{ pM}$). A hemopexina é capaz de seqüestrar o heme, alocando-o dentro de sua estrutura em um local conhecido como “heme-pocket”. A partir desta etapa a hemopexina segue para o fígado, onde o heme será degradado (Smith e Morgan, 1984). Entretanto, quando ocorrem altas concentrações de heme na circulação, a hemopexina não é capaz de inativar todo o heme livre e o organismo lança uma segunda linha de defesa para neutralizar o heme: através da albumina plasmática. A albumina é capaz de se ligar ao heme, porém somente através de ligações hidrofóbicas, o que torna seu efeito muito fraco, pois o heme a qualquer momento pode se difundir livremente para membranas celulares, pois uma de suas principais características é ser uma molécula anfipática. Na aterosclerose, por exemplo, essas linhas de defesa contra o heme não são capazes de neutralizá-lo, possibilitando a ação do heme nesses locais de hemólise (Olgun e col., 2004). Uma vez livre, o heme pode gerar inflamação vascular, como descrito em diferentes trabalhos. A administração intravenosa de heme causa tromboflebite em voluntários saudáveis, devido a um processo inflamatório seguido de obstrução vascular (Simionatto e col., 1988). Pacientes com anemia falciforme, que possuem altas concentrações de heme circulante, têm altos níveis de vaso-oclusão (Gonçalves e col., 2001). Além disso, animais transgênicos com anemia falciforme apresentam inflamação vascular (Belchner e col., 2003). Seguindo a teoria da inflamação, podemos associar um quadro de inflamação vascular como um possível passo para o desenvolvimento da aterosclerose. Entretanto, como mencionado anteriormente, o heme pode ocasionar uma inflamação vascular, e também pode diretamente oxidar a LDL, outro passo crucial para a aterogênese (Balla e col., 1991; Miller e Shaklai, 1999).

Mecanismo de ação do heme

Diferentes estudos têm mostrado que o heme é um importante agente pró-inflamatório (Ryter e Tyrrel, 2000). Por ser uma molécula anfótera, o heme pode facilmente atravessar as membranas celulares e atuar diretamente no citossol. Entretanto, já foi demonstrado que o heme pode ativar o toll-like receptor 4 e que seu efeito, talvez indireto, pode ser mediado por receptores acoplados à proteína G (Figueiredo e col., 2007; Porto e col., 2007). Nosso grupo tem caracterizado o heme como uma importante molécula pró-inflamatória devido ao seu forte poder de ativação de neutrófilos, evidenciando que a principal forma de ação do heme é

através da ativação do complexo enzimático NADPH oxidase, uma importante fonte geradora de ERO (Graça-Souza e col., 2002; Arruda e col., 2006). Hasan e Schafer também mostraram que o heme é capaz de induzir a produção de ERO em CMLV, também via NADPH oxidase. Essas ERO por sua vez, são capazes de ativar diferentes vias de sinalização redox-sensíveis, podendo modular diferentes funções celulares (Fadeel e Kagan, 2003 e Melley e col., 2005). Por outro lado, o heme é capaz de induzir o sistema HO, gerando metabólitos que possuem efeitos antiinflamatórios e antioxidantes.

NADPH oxidase

As ERO são formadas por diferentes mecanismos: podem surgir como resultado da interação da radiação ionizante com moléculas biológicas, podem se originar da respiração celular ou podem ser induzidas por enzimas, como o complexo NADPH oxidase.

Foram descritos pelo menos sete membros do complexo NADPH oxidase: NOX-1 a NOX-5, DUOX-1 e 2 e, dependendo do tipo celular, há um arranjo próprio destas enzimas (Halliwell e Gutteridge, 2007). Já está estabelecida a idéia de que as ERO possam atuar como importantes moléculas sinalizadoras, pois são pequenas e podem se difundir facilmente, sendo produzidas de várias formas, algumas delas rápidas e controláveis. Além disso há vários mecanismos para a sua rápida remoção.

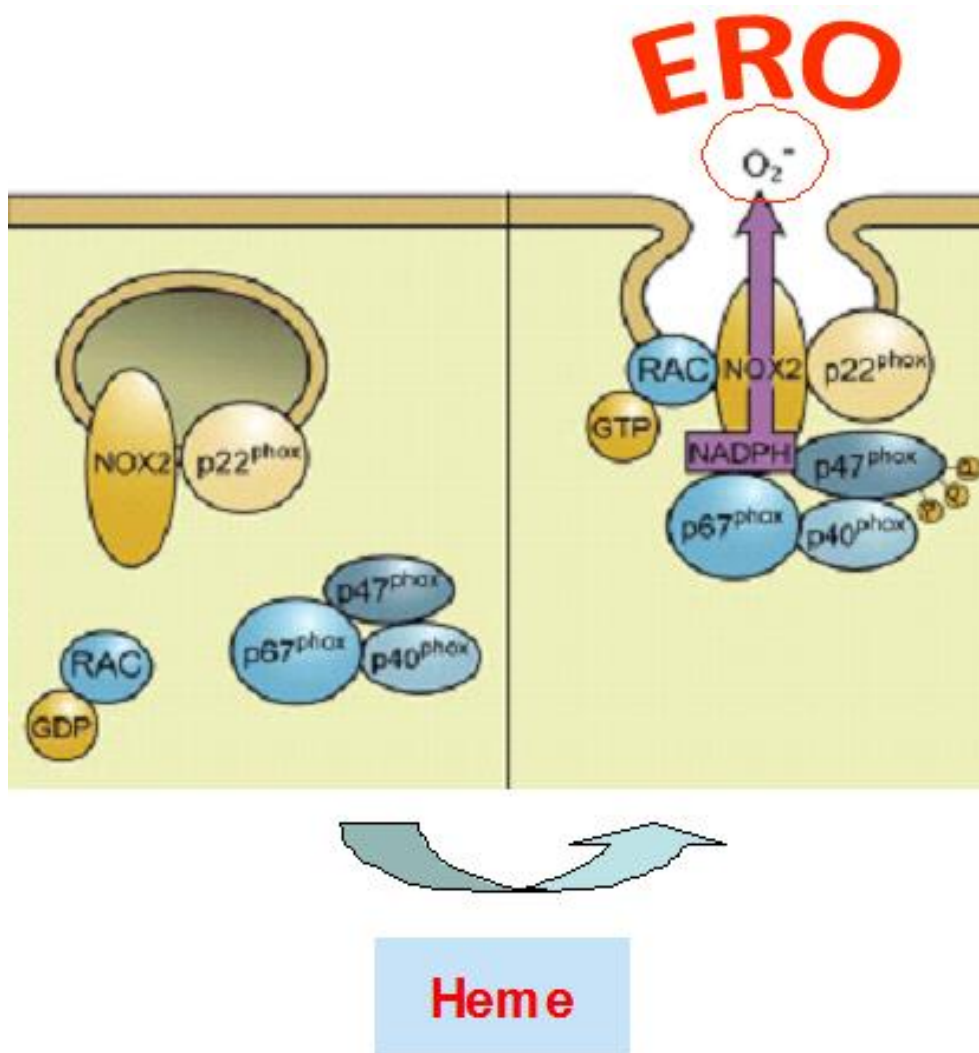
Dentre os diversos sistemas geradores de ERO, o único exclusivamente especializado em sua geração é o complexo multiprotéico NADPH oxidase com constituintes na membrana plasmática (gp91^{phox} e p22^{phox}, que formam o flavocitocromo b₅₅₈) e citoplasmáticos (p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} e a proteína G reguladora Rac) (Griendling e col., 2000; Dworakowski e col., 2006).

A CMLV, assim como algumas outras células, necessita de uma produção constante de ERO para a sua homeostase. Entretanto essa produção pode se elevar frente a alguns estímulos e parte da NADPH oxidase que se encontrava inativa, ou seja, com suas subunidades desacopladas muda sua conformação e inicia o processo de geração de ERO. Uma vez que a célula é ativada, os componentes citossólicos migram para a membrana, associando-se ao flavocitocromo b₅₅₈. Esse acoplamento é indispensável para a ativação do complexo. O acoplamento ocorre através de uma cascata de sinalização na qual a família da proteína quinase C (PKC) exerce um papel preponderante. Dentre as proteínas desta família, a

PKC α é a principal PKC ativada por agentes pró-inflamatórios em CMLV. Entretanto, estudos sugerem uma via independente de PKC, com envolvimento de uma tirosina quinase (Kawakami e col., 1998). A partir do acoplamento induzido por moléculas como o heme, por exemplo, tem início a geração de ERO, conforme ilustrado na figura 4. O flavocitocromo b₅₅₈ contém tanto grupamento flavina quanto heme e uma seqüência adicional para a ligação do NADPH. Este parece ser responsável pela transferência de elétrons do NADPH citossólico para o O₂ no meio extracelular, gerando então O₂⁻, um importante agente redutor e oxidante. Na presença de SOD, O₂⁻ é convertido em H₂O₂. Se houver íons de ferro no meio, O₂⁻ e H₂O₂ interagem para formar HO•, uma das espécies oxidantes mais instáveis conhecidas. Há ainda a geração de peroxinitrito (ERO mais citotóxica), formado a partir da reação de O₂⁻ com óxido nítrico (NO) (van der Vliet e col., 1994).

A ativação do fluxo de elétrons no flavocitocromo parece ser regulada pela associação com p47^{phox}, p67^{phox} e Rac. A p47^{phox}, que é extensivamente fosforilada durante a ativação da oxidase, parece iniciar o acoplamento, enquanto a p67^{phox} aparentemente ativa a catálise pelo flavocitocromo por mecanismos ainda obscuros. Apesar de ser indispensável para a ativação da NADPH oxidase, o papel da proteína G Rac permanece incerto (Kim e Dianuer, 2001). Também é indefinido o papel da p40^{phox}, uma vez que alguns estudos sugerem que seja uma subunidade inibitória e outros que seja uma chaperona para o complexo citossólico p47^{phox} - p67^{phox}. Contudo, o p40^{phox} não é indispensável à conformação ativa da oxidase, como já foi constatado em sistemas "cell-free" (Fuchs e col., 1995).

Figura 4 - Estado inativo e ativo do complexo NADPH oxidase



Fonte: Adaptado de Griendling e col., 2000.

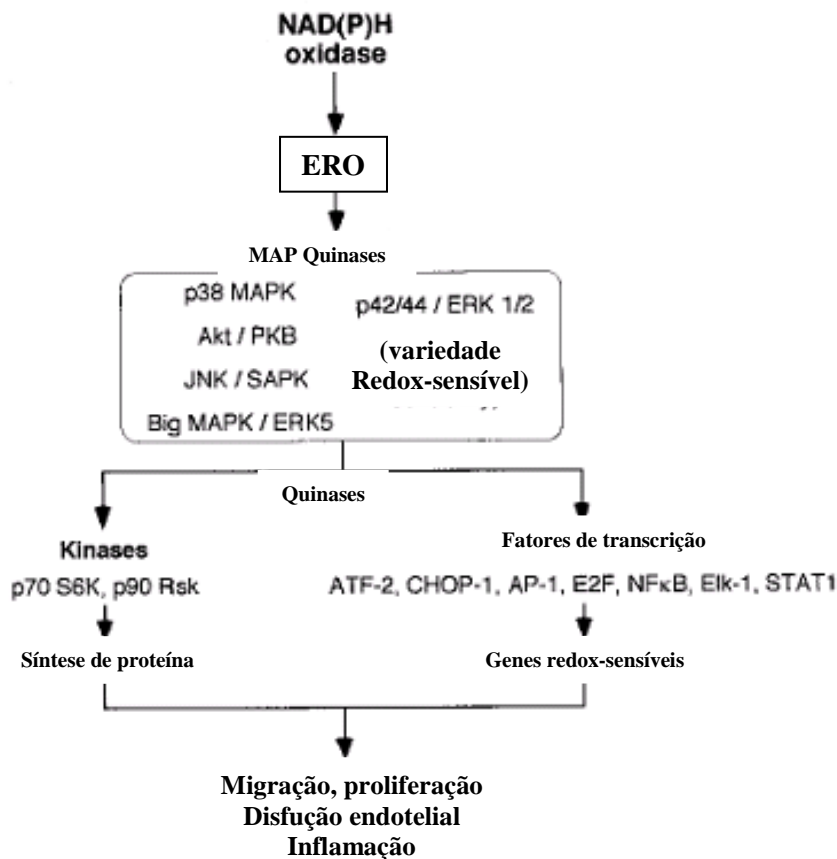
As ERO são de grande importância para a homeostasia celular e o aumento de sua produção pode levar a uma série de efeitos celulares, todos estes modulados pelo importante papel que as ERO desempenham como sinalizadoras. Os níveis elevados de ERO são capazes de alterar cascatas de sinalização e induzir mudanças em fatores de transcrição que controlam respostas imediatas ao estresse (Fadell e Kagan, 2003 e Melley e col., 2005).

Ainda não foi bem elucidado como as ERO são capazes de ativar ou inibir quinases e fosfatases, bem como fatores de transcrição, entretanto muitos trabalhos consideram as ERO como segundo-mensageiros de diferentes vias de sinalização (Adler e col., 1999). Dentre as vias que podem ser moduladas pelas ERO, temos uma importante via relacionada à proliferação celular, com o envolvimento da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), das proteínas

quinases ativadas por mitógenos (MAPK) e do NFκB. Além de vias relacionadas à proliferação celular, as ERO também estão envolvidas com vias relacionadas à disfunção endotelial, inflamação, migração e hipertrofia (Griendling e col., 2000, Figura 5).

Mesmo com tantas evidências mostrando o papel sinalizador das ERO, ainda permanece um pouco obscuro como as ERO seriam capazes de ativar vias de sinalização. Entretanto, é importante ressaltar que a concentração de ERO é um ponto crucial para a resposta celular. A princípio, elevadas concentrações de ERO podem causar dano de DNA, sendo assim citotóxicas, enquanto que a produção de níveis menores de ERO são as responsáveis por participar da sinalização celular (Martin e Barret, 2002).

Figura 5 - Vias de sinalização que podem ser moduladas por ERO



Fonte: Adaptado de Griendling e col., 2000.

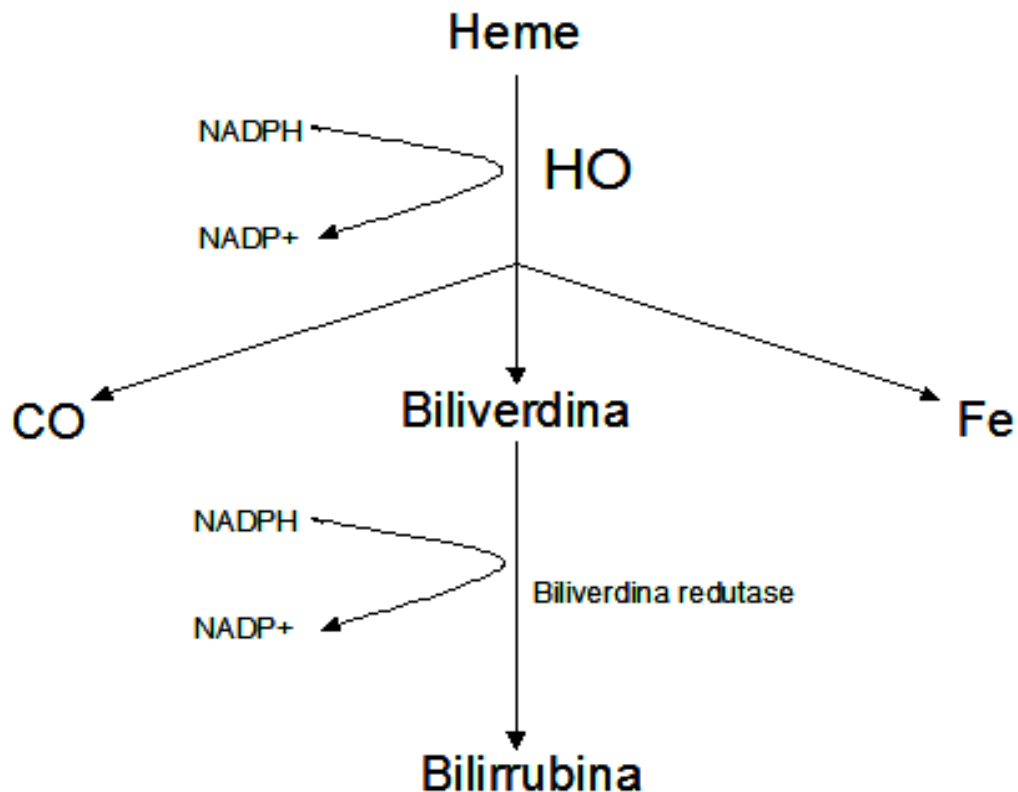
Heme Oxigenase

A HO é uma enzima microsomal encontrada em diferentes tecidos e é responsável por catabolizar o heme em monóxido de carbono (CO), ferro e biliverdina, que por sua vez é convertida em bilirrubina pela biliverdina redutase (figura 6). O sistema HO possui três diferentes isoformas: uma constitutiva (HO-2), encontrada principalmente no cérebro e testículos (Bellner e col., 2009), uma induzida (HO-1), também conhecida como *heat shock protein-32* (hsp32), expressa constitutivamente apenas no baço, reconhecido sítio de hemólise (Peterson e col., 2009) e outra constitutiva (HO-3), encontrada no cérebro e no testículo, porém com afinidade pelo heme muito menor que as outras. Das três isoformas, se destaca a HO-1, devido a sua alta afinidade pelo heme.

A HO-1 tem sua expressão induzida não só pelo próprio heme, mas também por uma série de fatores como estresse oxidativo, hipóxia, hiperóxia, mediadores pró e anti-inflamatórios, calor, radiação ultravioleta e metais pesados, sendo os produtos da sua catálise implicados nos mais diversos processos fisiológicos e fisiopatológicos (Wagener e col., 2003). Sua atividade está relacionada à inibição da injúria causada por isquemia-reperfusão, estresse oxidativo, inflamação, rejeição a transplante, apoptose entre outros (Amersi e col., 1999; Brouard e col., 2000,2002; Otterbein e Choi, 2000; Willoughby e col., 2000; Sato e col., 2001). Tais efeitos são mediados por um ou mais dos produtos por ela gerados. O heme encontra-se normalmente associado a proteínas e confinado em compartimentos intracelulares, onde desempenha seu papel fisiológico. Contudo existem pequenos “pools” intracelulares de heme livre agindo tanto como precursor como regulador da síntese de biomoléculas. Porém, o heme livre no meio extracelular tem efeitos deletérios *per se* como catalisador da peroxidação lipídica (Tappel, 1955), da oxidação de LDL (Balla e col., 1991; Miller e Shaklai, 1999) e da reação de Fenton (Cadenas, 1989).

Os metabólitos do heme são bem descritos como agentes antioxidantes (Stocker e col., 1987; Stocker, 2004) e anti-proliferativos (Nakao e col., 2005; Ollinger e col., 2005; Hasan e Schafer, 2008). Há, inclusive, estudos mostrando que esses metabólitos poderiam ter importância no tratamento da aterosclerose, através da inibição da proliferação/migração de CMLV (Ollinger e col., 2005, 2007). Contudo, não há nenhum estudo correlacionando o efeito do heme em CMLV com o envolvimento do sistema HO.

Figura 6 - Sistema HO catabolizando o heme



Fonte: Adaptado de Peterson e col., 2009.

Integrinas

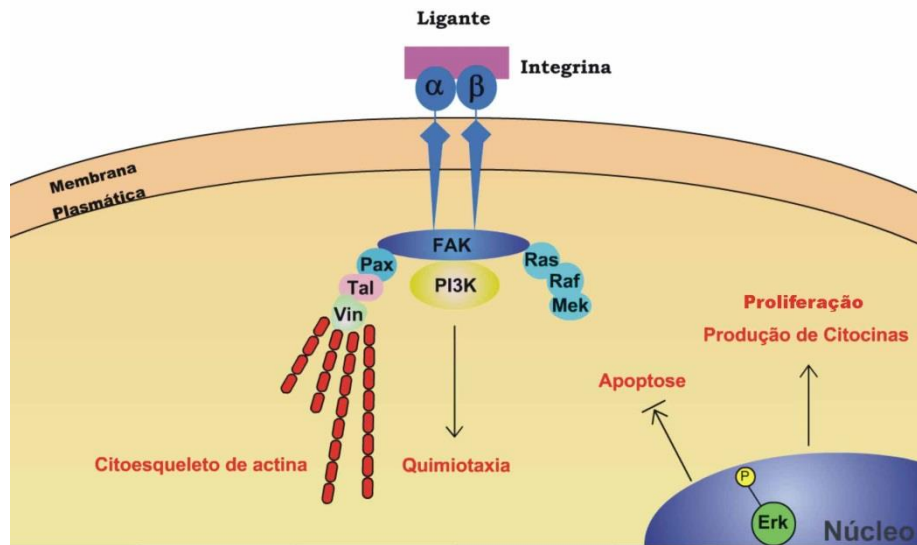
Como mencionado anteriormente, moléculas de adesão como as integrinas, podem desempenhar também um importante papel na aterogênese. Integrinas são proteínas heterodiméricas, que possuem uma subunidade α ligada de forma não covalente a uma subunidade β . Ambas as subunidades possuem uma região transmembrana e um grande domínio extracelular. Seus domínios citoplasmáticos estão associados ao citoesqueleto de actina e a diversas proteínas adaptadoras (Hynes, 1992; Clark e Brugge, 1995; Schwartz e col., 1995). As integrinas são as principais moléculas de adesão envolvidas nas interações célula-célula e célula-matriz. A maioria das integrinas reconhece em seus ligantes a sequência tripeptídica Arg-Gli-Asp (RGD), presentes em diferentes proteínas da matriz extracelular.

Além de atuarem como mecano-receptores para a migração celular, devido a sua capacidade de interagir diretamente com o citoesqueleto de actina, as integrinas podem atuar como receptores capazes de transmitir informação do meio extracelular para o interior da célula, e vice-versa, ativando diferentes vias de transdução de sinal. Assim, a transdução do sinal via integrina ocorre tanto do lado extra- para o intracelular (“outside-in”), como também inversamente (“inside-out”). Dependendo do ligante e da integrina que o reconhece e do tipo celular, diferentes vias de sinalização podem ser ativadas (Campbell e Humphries., 2011).

As integrinas estão constitutivamente expressas na superfície das células quiescentes em um estado conformacional inativo. Durante um estímulo, como a ativação das CMLV por exemplo, as integrinas passam a um estado ativado de maior afinidade pelo ligante, podendo levar também a um aumento da expressão desses receptores (Cecchetti e col., 2011).

O reconhecimento do ligante pela integrina pode levar a ativação de diversas vias de sinalização envolvendo proteínas quinases, em especial tirosina-quinases. A ativação de FAK (quinase de adesão focal), uma tirosina quinase não acoplada a um receptor, é característica da via de sinalização das integrinas. Dentre outras vias de sinalização ativadas por FAK, merece destaque a da PI3K (Chen e Guan, 1994). Por ser uma quinase lipídica, a PI3K ativada libera produtos lipídicos (como o fosfoinositol trifosfato: PIP₃), que atuam como segundos mensageiros ativando AKT (PKB) (Burgering e Coffey, 1995), que modula diversas funções celulares tais como migração, produção de citocinas e proliferação (Reiske e col., 1999; Fruman e Cantley, 2002). As integrinas também podem levar à ativação da via Ras/Raf/MAPK conduzindo à fosforilação e translocação nuclear de ERK1/2, membro da família das MAPK que, uma vez no núcleo, pode fosforilar e ativar outras proteínas e fatores de transcrição, modulando assim a expressão gênica (figura 7). Tanto a via da PI3K quanto a da ERK podem ativar o NFκB, induzindo a proliferação celular (Sundaram, 2006).

Figura 7 - Principais vias de sinalização ativadas por integrinas



Fonte: Moraes e col., 2010.

A ativação de cascatas de sinalização intracelular via integrina medeia importantes funções das CMLV, como migração e proliferação, podendo também induzir alterações na expressão gênica. Foi demonstrado que a integrina $\alpha 5\beta 1$ tem um importante papel, uma vez que ao se ligar à fibronectina há a indução da proliferação celular (Davenpeck e col., 2001; Egidius e col. 2007). Também a integrina $\alpha_v\beta 3$, que se liga a diferentes proteínas da matriz extracelular, como trombospontina, fibronectina, osteopontina e vitronectina, é capaz de modular a migração e a proliferação de CMLV. O bloqueio desta integrina na CMLV impede a migração e proliferação por interferir na ativação de determinadas vias de sinalização (Jones e col., 1996; Varadarajulu e col., 2005; Moraes e col., 2010).

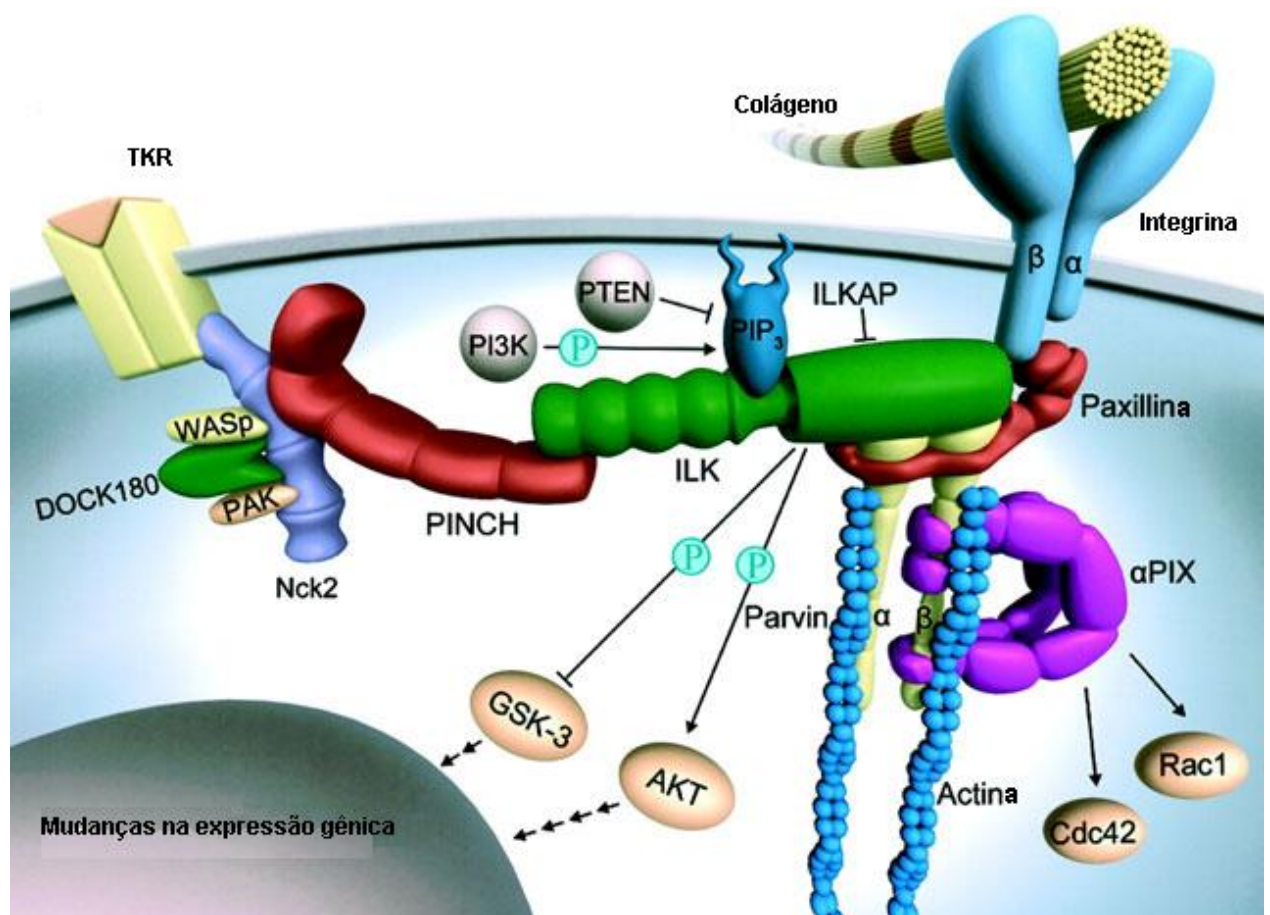
Vários grupos de pesquisa vêm investigando os mecanismos moleculares envolvidos na transativação de receptores, em especial entre integrinas e receptores tirosina-quinase (TKR) ou receptores acoplados à proteína G (GPCR). Tem sido descrito que a ativação de vias de sinalização intracelulares associadas à integrina pode levar à ativação (inside-out) de receptores de fatores de crescimento (como EGR/ VEGFR) em diferentes tipos celulares (Shepard e col., 2008; Koch e col., 2011). Inversamente, a ativação de TKR em diferentes tipos celulares pode disparar a sinalização celular caracteristicamente associada a integrinas (Streuli e Akhtar, 2009; Watanabe e col., 2011; Flinder e col., 2011).

Um importante ponto da sinalização via integrina que poderia estar envolvido na modulação da transativação entre receptores (GPCR ou TKR) com a molécula de adesão é a

Integrin-Linked Kinase (ILK). Já foi descrito que essa quinase desempenha o papel de uma proteína adaptadora do citoesqueleto como também de proteína quinase, podendo fosforilar substratos importantes para a atividade ou sobrevivência celular, como a AKT (Fig 8), no entanto o mecanismo pelo qual isso ocorre ainda não foi elucidado (Brakebusch e Fässler, 2003; Wickström e col., 2010). Além disso, a ILK tem sido descrita tanto como ativadora de integrinas quanto moduladora de sinais transmitidos por elas. Portanto, a ILK seria uma interessante candidata de estudo para se melhor entender como ocorre a interação entre integrinas e GPCR / TKR.

Assim, devido à importância das integrinas nos processos de adesão, migração e também em outras diferentes funções celulares em CMLV, o uso de ligantes seletivos para essas moléculas de adesão pode representar um grande avanço na descoberta de novos alvos terapêuticos para doenças cardiovasculares.

Figura 8 - Papel dual da ILK: proteína adaptadora e quinase



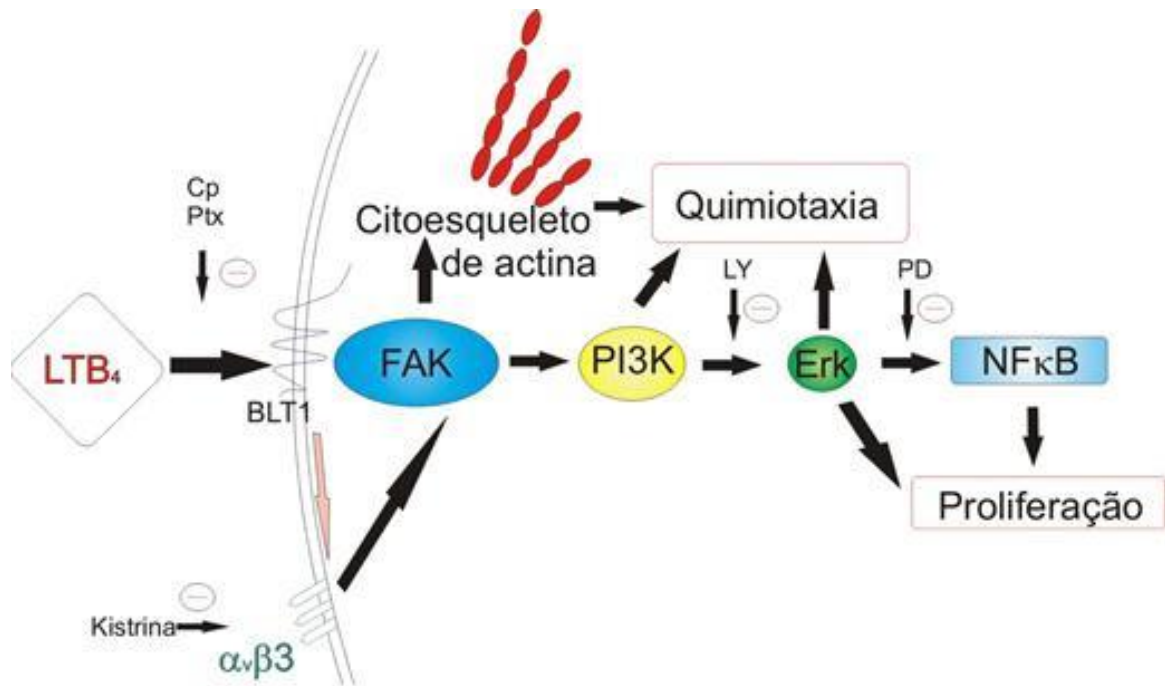
Fonte: Adaptado de Brakebusch e Fässler, 2003.

Desintegrinas

Um importante achado referente aos estudos das interações entre integrinas e seus ligantes foi a descoberta, originalmente em venenos de serpentes, de potentes antagonistas da agregação plaquetária e da adesão celular dependente de integrinas, denominados desintegrinas (Gould e col., 1990). As desintegrinas são peptídeos de baixo peso molecular, ricas em resíduos de cisteína que se ligam seletivamente a integrinas, podendo atuar como agonistas ou antagonistas.

As desintegrinas podem ser utilizadas para se tentar compreender a importância de determinadas integrinas em diferentes funções celulares. Já foi demonstrado, por exemplo, que a kistrina (antagonista da integrina $\alpha_v\beta_3$) foi capaz de inibir a quimiotaxia de CMLV induzidas por IGF-1 (Jones e col., 1996). Além disso, nosso grupo mostrou recentemente através do uso da kistrina, que o LTB_4 é capaz de modular suas funções através da integrina $\alpha_v\beta_3$, ativando diferentes vias de sinalização, induzindo a migração e proliferação celular (Fig 9; Moraes e col., 2010). As desintegrinas vêm portanto se mostrando como importantes ferramentas no estudo do papel das integrinas sobre a modulação de diferentes funções das CMLV.

Figura 9 - Representação esquemática da ativação da integrina $\alpha\beta3$ em CMLV através da ligação do LTB_4 ao BLT1-GPCR



Fonte: Moraes e col., 2010.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo Geral 1ª parte

Estudar o efeito do heme livre nas funções de CMLV, assim como os mecanismos moleculares por trás desses efeitos.

1.1.1 Objetivos específicos

- Investigar o efeito do heme na migração e proliferação de CMLV;
- Verificar, através do uso de antioxidante e do inibidor do complexo NADPH oxidase, o envolvimento de ERO nos efeitos do heme em CMLV;
- Avaliar se o heme é capaz de induzir a produção de ERO em CMLV e investigar a possível fonte da produção de ERO;
- Investigar se o efeito do heme sobre as CMLV é modulado por vias de sinalização redox-sensíveis, bem como avaliar o efeito do heme na ativação destas vias;
- Avaliar o papel do sistema HO no efeito do heme sobre a proliferação de CMLV;
- Identificar uma possível contra-regulação entre os produtos dos sistemas HO e NADPH oxidase sobre efeito do heme em CMLV.

1.2 Objetivo Geral 2ª parte

Utilizando como ferramenta a desintegrina Obtustatina, ligante seletiva da integrina $\alpha 1\beta 1$, investigar o envolvimento da integrina $\alpha 1\beta 1$ na modulação do efeito da angiotensina II, além disso, investigar uma possível participação da ILK na modulação desse efeito.

1.2.1 Objetivos específicos

- Investigar o papel modulatório da integrina $\alpha 1\beta 1$ sobre o efeito da Ang II na migração de CMLV;
- Avaliar um possível envolvimento da integrina $\alpha 1\beta 1$ sobre o efeito da Ang II no rearranjo do citoesqueleto de actina de CMLV, assim como a associação actina-ILK;
- Investigar o papel da integrina $\alpha 1\beta 1$ sobre o efeito da Ang II na produção de ERO em CMLV;
- Elucidar o momento em que a ILK se dissocia da FAK e atua como proteína com atividade tirosina quinase em CMLV tratadas com Ang II, assim como avaliar um possível papel modulatório da integrina $\alpha 1\beta 1$;
- Investigar o papel modulatório da integrina $\alpha 1\beta 1$ sobre o efeito da Ang II na proliferação de CMLV;

2 MATERIAIS E MÉTODOS

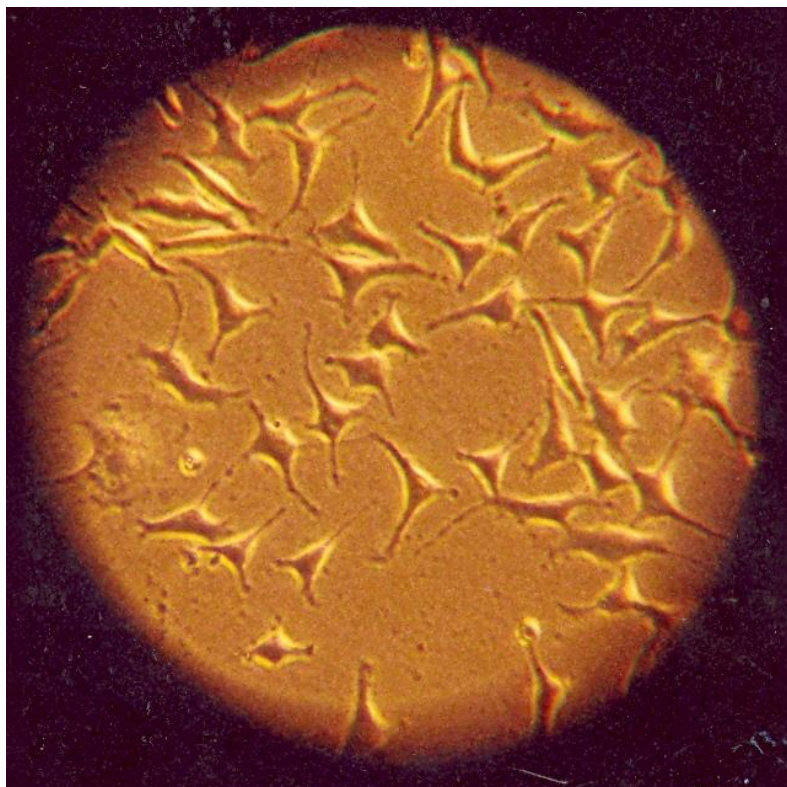
2.1 Reagentes

Angiotensina II (Ang II), difenileneiodonio (DPI), HEPES, tripsina, EDTA, albumina de soro bovino (BSA), PMSF, benzamidina, leupeptina e inibidor de tripsina foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) e soro fetal de bezerro (FCS) foram adquiridos da GIBCO-BRL (Carlsbad, CA, EUA). Membranas de difluoreto de polivinilideno (PVDF) foram adquiridas da Amersham (Piscataway, NJ, EUA). Todos os anticorpos utilizados foram comprados da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EUA). O sistema ECL foi obtido da Pierce Biotechnology (Rockford, IL, EUA). Heme e o dímero de tricarbonildiclororutenio (II) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). A desintegrina Obtustatina foi doada pelo Dr. Cezary Marcinkiewicz.

2.2 Cultura de células

As células A7r5 (Figura 10), provenientes da aorta torácica de ratos, foram obtidas da American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) sendo doadas pelo Dr. Jamil Assreuy. A cultura foi realizada em meio DMEM contendo 10% FCS, penicilina 50 U/mL e estreptomicina 100 µg/mL. As culturas foram incubadas à 37°C em atmosfera de 5% CO₂. As passagens das células foram feitas quando as células estavam confluentes, através da dissociação com tripsina 0.1% / EDTA 0.01% e depois plaqueadas em novas garrafas de cultura (no máximo até 12 passagens).

Figura 10 - Células musculares lisas vasculares



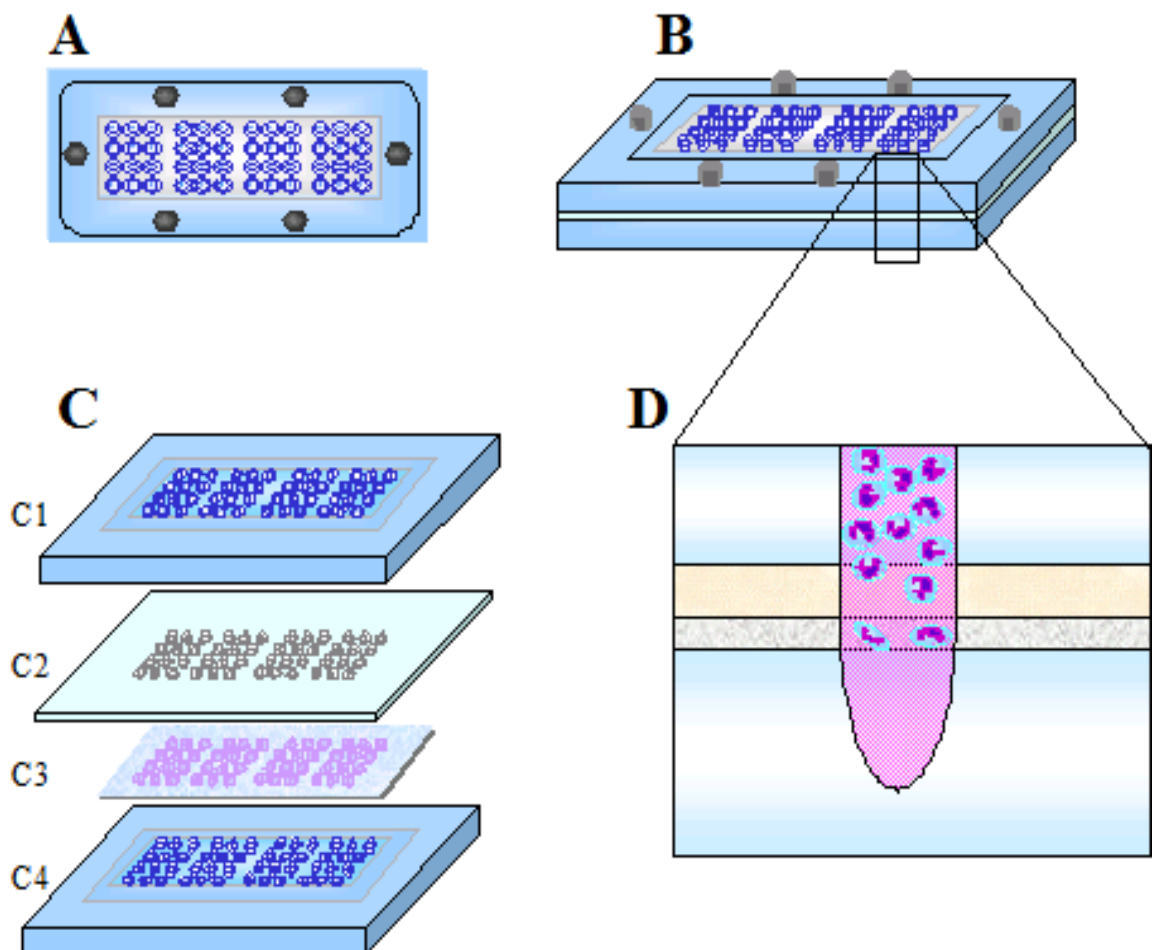
Legenda: Imagem obtida em microscópio ótico de células A7r5 após 2 dias de cultura.

2.3 Quimiotaxia *in vitro*

Os ensaios de quimiotaxia foram realizados em câmara de Boyden modificada (figura 11) com 48 poços (Neuroprobe Microchemotaxis System), utilizando filtros de policarbonato com poro de 10 μm . Antes de serem submetidas ao ensaio de quimiotaxia, as CMLV foram incubadas com DMEM, livre de soro, por 1 h à 37°C em atmosfera de 5% CO_2 . Após este período as CMLV foram submetidas à migração em direção à parte inferior da câmara e ficaram retidas no filtro onde puderam ser identificadas e contadas (ver adiante). Em determinados experimentos, as células foram pré-incubadas com DPI (10 μM), Trolox (100 μM), PD98059 (10 μM) ou Obtustatina (100 nM) 30 min antes da adição à parte superior da câmara de Boyden (10^5 por poço). Heme (10–30 μM) ou Ang II (100 nM) foram adicionados na parte inferior da câmara (28 μL). Depois da incubação à 37°C em atmosfera de 5% CO_2 por 4 h, as células que migraram para a superfície inferior da membrana foram fixadas com

Giemsa. As células aderentes na parte inferior das membranas são contadas através de microscopia óptica (400 vezes de aumento). Em cada poço, 5 campos visuais aleatórios foram contados, e a média foi usada como medida da migração das CMLV. Em cada experimento 12 poços da parte inferior da câmara foram preenchidos somente com meio DMEM, sendo utilizados como controle negativo.

Figura 11 - Representação esquemática de uma câmara de Boyden modificada



Legenda: A. Vista superior. B. Vista lateral. C. Compartimentos da câmara: C1 – Compartimento superior, C2 – Silicone que separa os compartimentos, C3 – Filtro de policarbonato e C4 – Compartimento inferior da câmara. D. Representação em maior aumento de um poço da câmara.

2.4 Proliferação celular

As CMLV foram plaqueadas (10^3 células por poço) em placas de 96 poços com DMEM contendo 10% FCS por 24 h à 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. No dia seguinte as células foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas com DMEM, sem soro, por 1 h. Os grupos que receberam pré-tratamento foram pré-incubados com DPI (10 µM), Trolox (100 µM), PD98059 (10 µM), SnPP (3 µM), ZnPP (10 µM) ou Obtustatina (100 nM) por 30 min, a seguir as células foram incubadas com heme (10 µM) ou Ang II (100 nM) por 48h. 24h antes do fim da incubação, timidina [H^3] foi inserida em todos os poços. Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS e fixadas com TCA 10% por 20 min. Depois as células foram novamente lavadas duas vezes com PBS e lisadas com NaOH 0,2 N. O conteúdo celular foi transferido para um filtro denso e deixado “overnight” para secar. No dia seguinte os filtros foram levados para um cintilador, para a análise da radiação emitida em contagem por minuto (CPM).

2.5 Análise da produção de ERO

2.5.1 DHR

A produção de ERO em CMLV foi verificada em microscopia de fluorescência através do monitoramento da oxidação de dihidrorodamina 123 (DHR) à rodamina, por H₂O₂. CMLV foram plaqueadas (8×10^4 células) em lamínulas e deixadas “overnight” em meio DMEM contendo 10% FCS. No dia seguinte as células foram lavadas três vezes com PBS e foi repostado o meio DMEM, desta vez sem soro, e incubadas por 1 h à 37°C em atmosfera de 5% CO₂. Alguns grupos foram pré-tratados com DPI (10 µM). Depois de 30 minutos, as células foram incubadas com DHR (50 µM) e estimuladas com Heme (10 µM) por 1 h. As lamínulas foram lavadas duas vezes com PBS e montadas em lâminas, através da utilização de 20 mM de *N*-propilgalacto e solução de glicerol 80% em PBS antes de serem examinadas em

microscopia (Olympus BX40 equipado com epifluorescência). As imagens foram então digitalizadas e processadas utilizando o software Adobe Photoshop.

2.5.2 Análise da Produção de ERO através de sonda fluorescente CM-H₂DCFDA

A produção de ERO em CMLV foi verificada através da oxidação da sonda CM-H₂DCFDA (5-(and-6)-clorometil-2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato, acetil-ester). As CMLV foram plaqueadas (5 x 10³ células) em placas de 96 poços e deixadas “overnight” em meio DMEM contendo 10% FCS. No dia seguinte as células foram lavadas três vezes com PBS e foi repostado o meio DMEM, desta vez sem soro e incubadas por 1 h à 37°C em atmosfera de 5% CO₂. Alguns grupos foram pré-tratados com DPI (10 µM), ZnPP (10 µM) ou Obtustatina (100 nM). Depois de 30 min, as células foram incubadas com CM-H₂DCFDA (10 µM) e estimuladas com Heme (10 µM) ou Ang II (100 nM) por diferentes tempos. A fluorescência gerada pelo DCF é proporcional a taxa de oxidação da sonda CM-H₂DCFDA, que por sua vez indica a atividade de oxidação celular e os níveis de ERO intracelular. A fluorescência foi monitorada em diferentes tempos pela excitação e emissão de ondas entre 485nm e 530nm, no fluorímetro Victor.

2.6 **Obtenção de extrato celular**

As CMLV foram plaqueadas (10⁶ células) em placas de 24 poços com DMEM contendo 10% FCS por 24 h à 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. No dia seguinte as células foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas com DMEM, sem soro, por 1 h. Os grupos que receberam pré-tratamento com DPI (10 µM), Obtustatina (100 nM) ou Ro 31-8220 (100 nM) foram incubados por 30 min, a seguir as células foram incubadas com Heme (10 µM) ou Ang II (100 nM) por diferentes tempos.

Após a incubação, as CMLV foram lisadas em tampão de lise (HEPES 50 mM, pH 6.4, MgCl₂ 1 mM, EDTA 10 mM, Triton X-100 1%, DNase 1 µg/ml, RNase 0.5 µg/ml, PMSF 1 mM, benzamidina 1 mM, leupeptina 1 µg/mL e inibidor de tripsina 1 µM/mL).

2.7 “Immunoblotting”

O conteúdo total de proteína dos extratos celulares foi determinado pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Os lisados celulares foram desnaturados em tampão de amostra (Tris·HCl 50 mM, pH 6.8, SDS 1%, 2-ME 5%, glicerol 10% e azul de bromofenol 0.001%), sendo aquecidas (100° C) em banho seco por 3 minutos. O equivalente à 50 µg de proteína foi fracionado por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) desnaturante a 12% para proteína de médio peso molecular (Actina e ERK-2) e 15% para proteína de baixo peso molecular (HO-1 e HO-2). O padrão de peso molecular correu em paralelo para se estimar o peso molecular das amostras. Após uma hora de eletroforese à 150V e 50mA, os géis foram eletrotransferidos à 15V e 328mA (sistema de transferência semi-seco BIO-RAD) durante uma hora para uma membrana em difluoreto de polivinilideno, em tampão NaCl 150 mM, NaH₂PO₄ 10mM, pH 7,2. Depois de transferidas as proteínas, as membranas foram bloqueadas em solução Tween-PBS (Tween-20 0,1%) contendo BSA 5%. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas “overnight” à 4°C na presença de anticorpo primário (1:1000) contra a proteína a ser estudada. Após lavagem (3x) em Tween-PBS, as membranas foram incubadas por uma hora com anticorpo secundário conjugado à peroxidase (1:10000) por uma hora. As proteínas imunoreativas foram visualizadas pela detecção de sua quimioluminescência (ECL). As bandas foram quantificadas através de densitometria, utilizando o software Adobe Photoshop.

2.8 Imunocitoquímica

CMLV foram plaqueadas (8×10^4 células) em lamínulas e deixadas “overnight” em meio DMEM contendo 10% FCS. No dia seguinte as células foram lavadas três vezes com PBS e foi repostado o meio DMEM, desta vez sem soro e incubadas por 1 h à 37°C em atmosfera de 5% CO₂ antes dos ensaios. Alguns grupos foram pré-tratados com DPI (10 µM), Obtustatina (100 nM) ou Ro 31-8220 (100 nM). Depois de 30 minutos, as células foram estimuladas com Heme (10 µM) ou Ang II (100 nM) por 30 min (colocalização actina-ILK) ou 1 h (translocação nuclear de NFκB). A seguir as lamínulas foram lavadas duas vezes com

PBS e as células foram fixadas com paraformaldeído 4% / sacarose 4% em PBS por 20 min. As células foram então lavadas três vezes com PBS e incubadas por 2 h com faloidina conjugada à rodamina. A seguir as células foram lavadas três vezes e incubadas “overnight” com anticorpo primário (1:200) contra a proteína a ser estudada, à temperatura ambiente. No dia seguinte as lamínulas foram lavadas 3 vezes com PBS e incubadas por 1 h com anticorpo secundário conjugado à FITC (1:200). Após esse tempo as células foram novamente lavadas 3 vezes com PBS e incubadas por 1 min com DAPI (1:5000) e novamente lavadas com PBS. As lamínulas foram montadas em lâminas, através da utilização de 20 mM de *N*-propilgalacto e solução de glicerol 80% em PBS antes de serem examinadas em microscopia (Olympus BX40 equipado com epifluorescência). As imagens foram então digitalizadas e processadas utilizando o software Adobe Photoshop.

2.9 Análise do ciclo celular

As CMLV foram plaqueadas (10^5 células por poço) em placas de 24 poços com DMEM contendo 10% FCS por 24 h à 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. No dia seguinte as células foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas com DMEM, sem soro, por “overnight”. Os grupos que receberam pré-tratamento foram pré-incubados com DPI (10 µM), ZnPP (10 µM) ou Obtustatina (100 nM) por 30 min, a seguir as células foram incubadas com heme (10 µM) ou Ang II (100 nM) por 24 ou 48 h. Ao final da incubação as células foram tripsinizadas e fixadas em etanol 70% por 20 min. A seguir foram incubadas com PI por 30 min e submetidas à citometria de fluxo (Cflow Accuri C6). A zona M18 representa as células que estão na fase sub-G0, as células na zona M17 estão na fase estacionária G0 e as células na zona M16 estão na fase S/G2, como é possível ver através do conteúdo total de DNA (marcado por PI).

2.10 Análise estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente através do teste one-way ANOVA, seguido pelo teste-t de Bonferroni. Nos ensaios de produção de ERO por DCF, foi realizado

Two-way ANOVA, seguido de teste-t ponto a ponto. Foi determinada como significância estatística $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

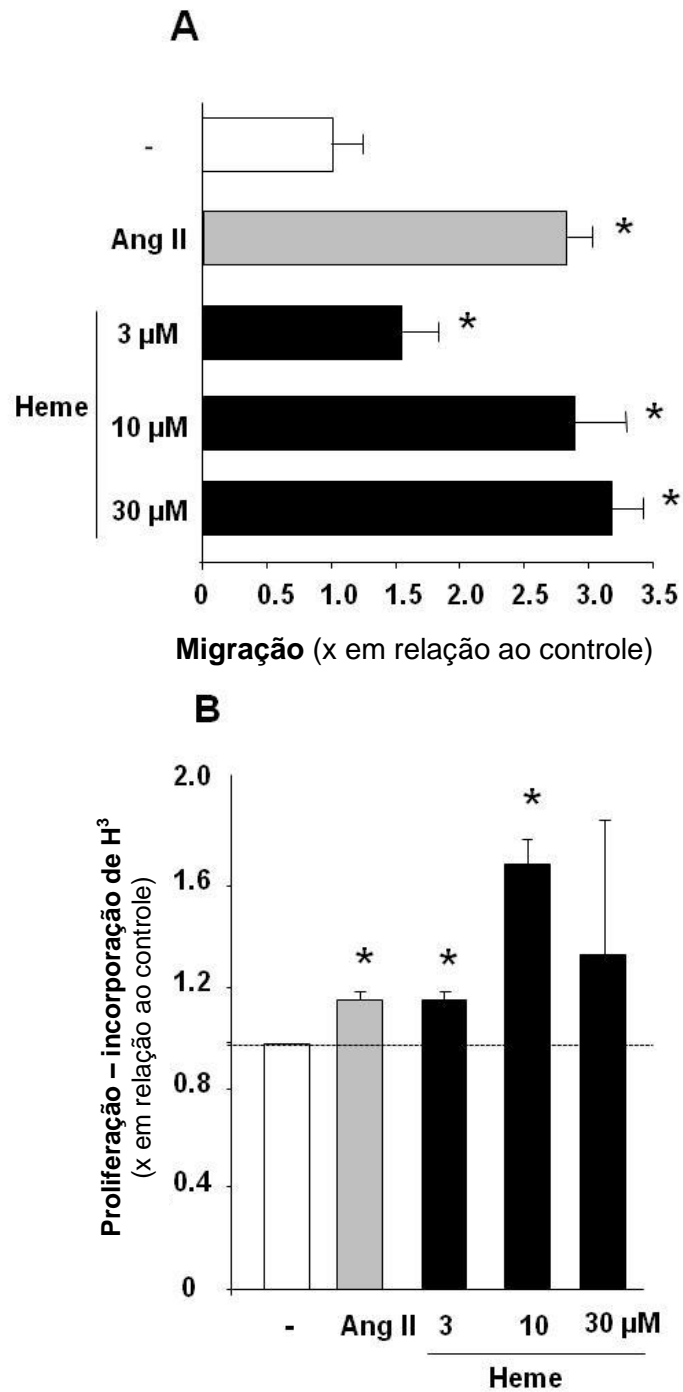
3.1 Resultados 1ª parte

3.1.1 Heme induz a migração e proliferação de CMLV de modo redox-sensível

Inicialmente estudamos o efeito do heme em duas crucias funções de CMLV que ocorrem em doenças cardiovasculares: migração e proliferação. O efeito do heme na quimiotaxia de CMLV foi avaliado, *in vitro*, através de câmara de Boyden modificada (ver materiais e métodos). A figura 12.a mostra que o Heme é um potente agente quimiotático para CMLV, exercendo maior efeito nas concentrações de 10 e 30 μM . Já a figura 12.b mostra efeitos similares do heme na proliferação de CMLV. Seu efeito em concentrações $\geq 10 \mu\text{M}$ é bem próximo daquele observado para a Ang II (100 nM), um clássico agente quimiotático e pró-proliferativo utilizado como controle positivo (figura 12).

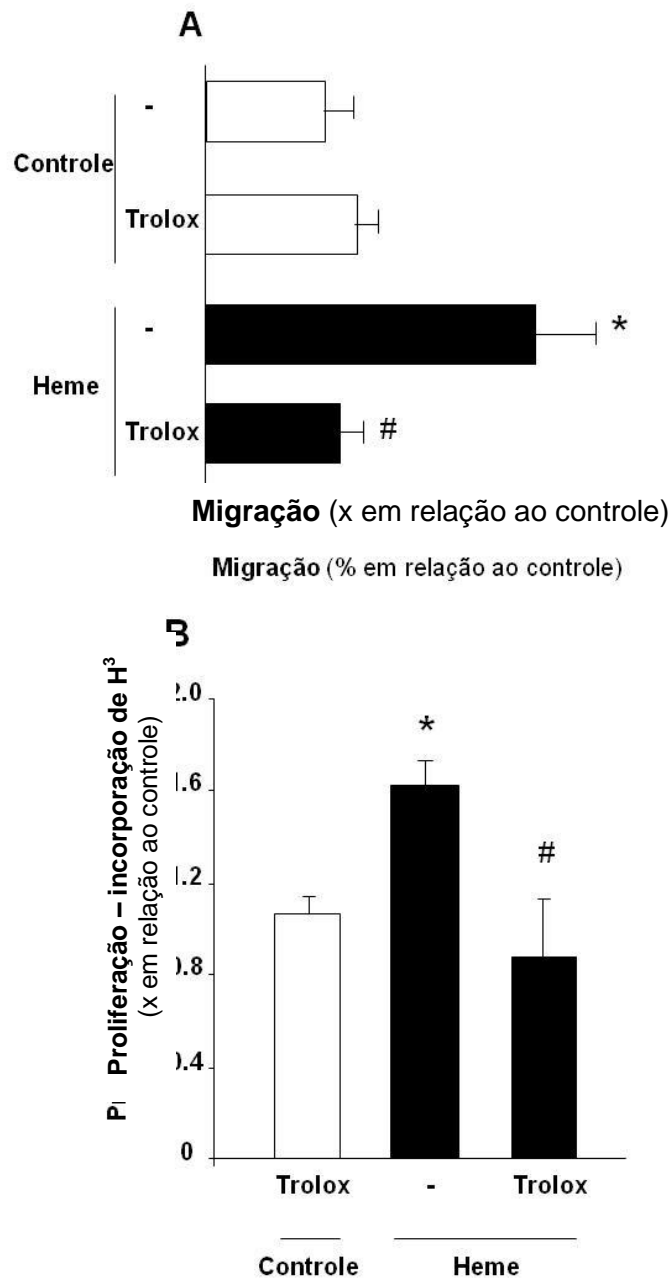
Além desses efeitos observados, também verificamos que o heme atua de maneira redox-sensível, uma vez que o antioxidante trolox (100 μM) foi capaz de inibir o efeito do heme em CMLV, tanto na migração (figura 13.a), quanto na proliferação (figura 13.b).

Figura 12 - Efeito do heme sobre a migração e proliferação de CMLV



Legenda: A. CMLV foram colocadas na câmara de Boyden modificada e colocadas para migrar em direção à Ang II (100 nM) ou heme (3-30 µM). B. CMLV foram incubadas com Ang II (100nM) ou heme (3-30 µM) por 48h. Os resultados são representativos de 3 até 5 experimentos diferentes. Os dados representam média ± DP (* p<0.05 vs CMLV não tratadas).

Figura 13 - Efeito do heme sobre a migração e proliferação de CMLV: Envolvimento de ERO



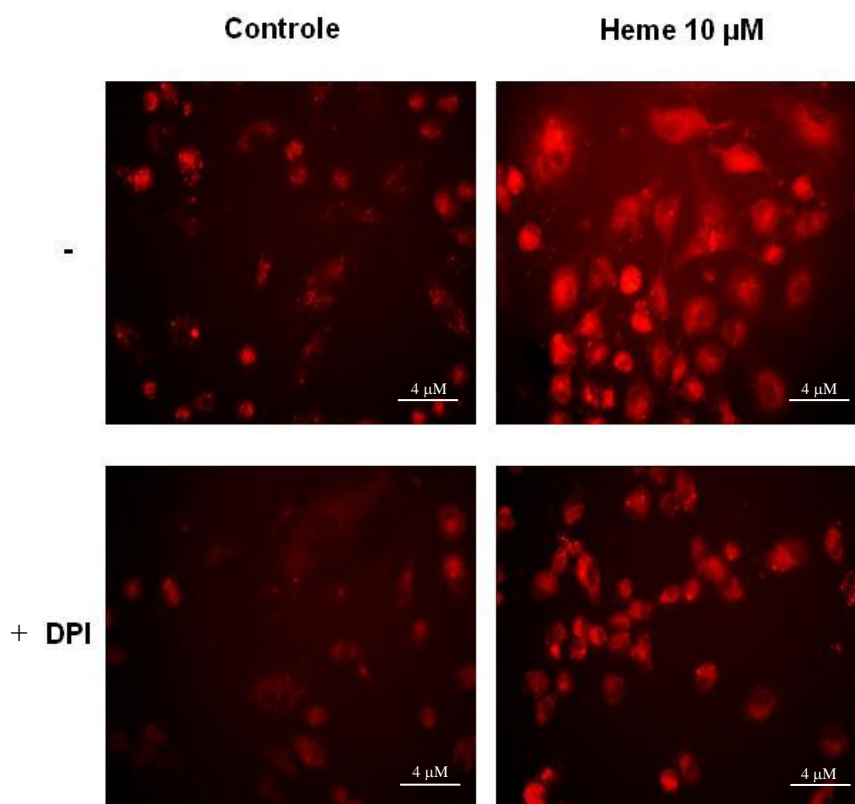
Legenda: A. CMLV foram colocadas na câmara de Boyden modificada e colocadas para migrar em direção ao heme (10 μ M), quando indicado, as células foram pré-tratadas com trolox (100 μ M). B. CMLV foram incubadas com heme (10 μ M) por 48h e quando indicado, foram pré-tratadas com trolox (100 μ M). Os resultados são representativos de 3 experimentos diferentes. Os dados representam média \pm DP (* $p < 0.05$ vs CMLV não tratadas; # $p < 0.05$ vs CMLV tratadas com heme).

3.1.2 Heme induz a produção de ERO via NADPH oxidase

A partir dos resultados mostrando que os efeitos do heme nas CMLV são redox-sensíveis, avaliamos se esta molécula seria capaz de induzir a geração de ERO nas células estudadas. Desta forma, vimos que após 30 min, o heme (10 μM) foi capaz de induzir potentemente a produção de ERO (figura 14).

Trabalhos anteriores mostraram que o heme é capaz de induzir a geração de ERO via complexo NADPH oxidase em diferentes tipos celulares (Arruda e col., 2006; Hasan e Schafer, 2008). Corroborando esses dados, vimos que a produção de ERO induzida pelo heme (10 μM) ocorre a partir da NADPH oxidase, uma vez que o inibidor deste complexo enzimático (DPI 10 μM) foi capaz de inibir o efeito do heme em CMLV (Figura 14).

Figura 14 - Efeito do heme sobre a produção de ERO em CMLV

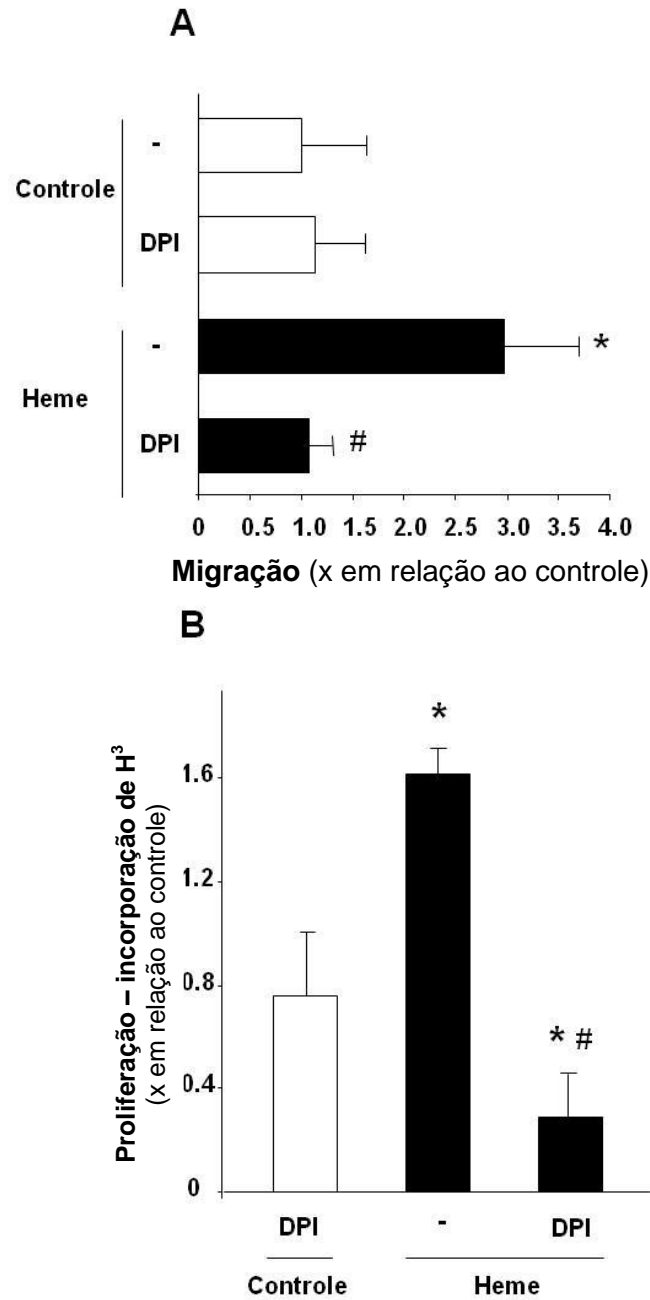


Legenda: As células foram incubadas com heme (10 μM) por 1 h e quando indicado, foram pré-tratadas com DPI (10 μM). A produção de ERO foi avaliada por microscopia de fluorescência, através da observação de rodamina, produto da oxidação de diidrorodamina 123 (DHR). Os resultados são representativos de quatro experimentos diferentes.

3.1.3 Os efeitos do heme na migração e proliferação de CMLV são dependentes de ERO provenientes da NADPH oxidase

Uma vez que o efeito do heme na geração de ERO era dependente da NADPH oxidase, voltamos a analisar o efeito do heme na migração e proliferação de CMLV para avaliar a importância desta fonte geradora de ERO nestas funções. Primeiramente, vimos que as CMLV pré-tratadas com DPI (10 μ M) não migraram em direção ao heme (10 μ M), evidenciando assim a importância da NADPH oxidase no efeito do heme (figura 15.a). A seguir vimos que o DPI (10 μ M) também foi capaz de inibir o efeito do heme (10 μ M) na proliferação de CMLV mas, curiosamente, o inibidor da NADPH oxidase não somente inibiu o efeito do heme, como também promoveu uma forte redução da proliferação em relação ao controle (figura 15.b).

Figura 15 - Efeito do heme sobre a migração e proliferação de CMLV: Envolvimento da NADPH oxidase



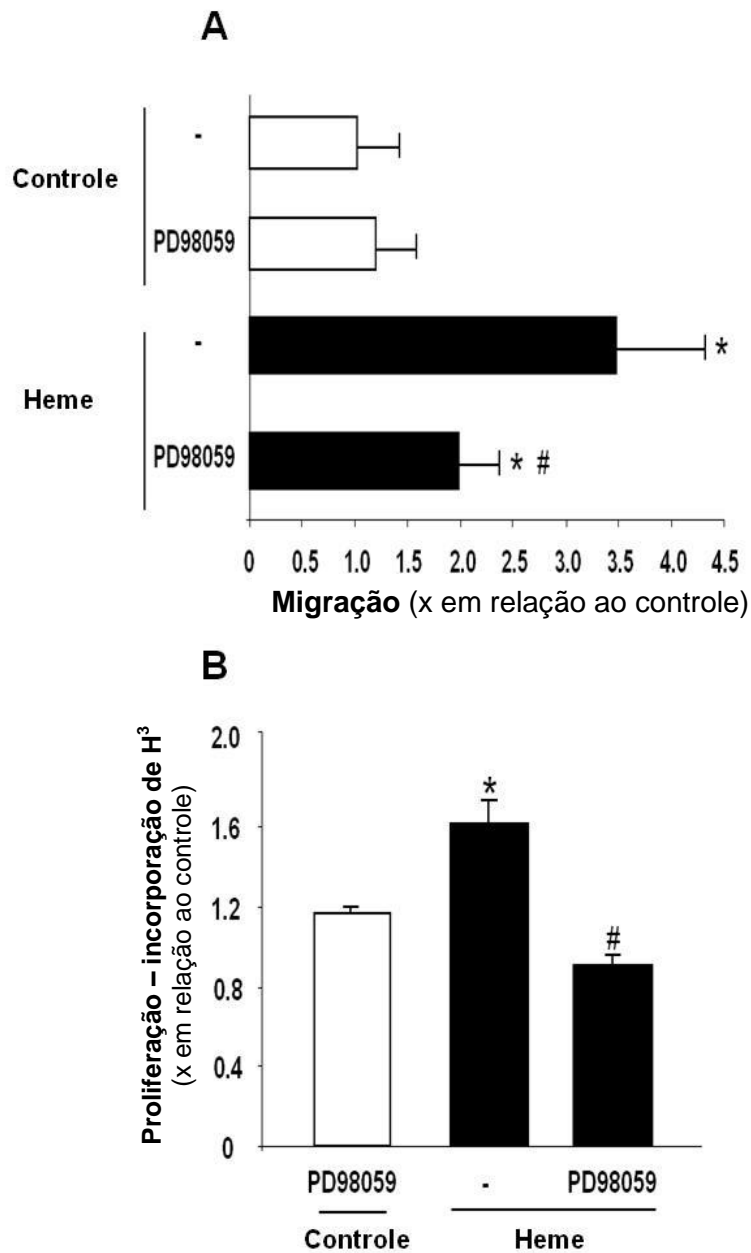
Legenda: A. CMLV foram colocadas na câmara de Boyden modificada e colocadas para migrar em direção ao heme (10 μ M). Quando indicado, as células foram pré-tratadas com DPI (10 μ M). B. CMLV foram incubadas com heme (10 μ M) por 48h e quando indicado, foram pré-tratadas com DPI (10 μ M). Os resultados são representativos de 3 até 6 experimentos diferentes. Os dados representam média \pm DP (* $p < 0.05$ vs CMLV não tratadas; # $p < 0.05$ vs CMLV tratadas com heme).

3.1.4 Heme ativa vias de sinalização redox-sensíveis

Como agentes sinalizadores as ERO são capazes de ativar importantes vias de sinalização redox-sensíveis. Dentre as principais moléculas redox-sensíveis, se destaca a ERK-2, um importante membro da família MAPKinase (Sundaram, 2006) que está relacionada a migração e principalmente à proliferação de CMLV (Graf e col., 1997; Hu e col., 1997). Utilizando o inibidor indireto de ERK-2, PD98059 (10 μ M), vimos que o efeito do heme (10 μ M) na migração de CMLV foi parcialmente inibido (figura 16.a). Por outro lado, o PD98059 (10 μ M) foi capaz de bloquear o efeito do heme na proliferação celular induzida pelo heme (figura 16.b).

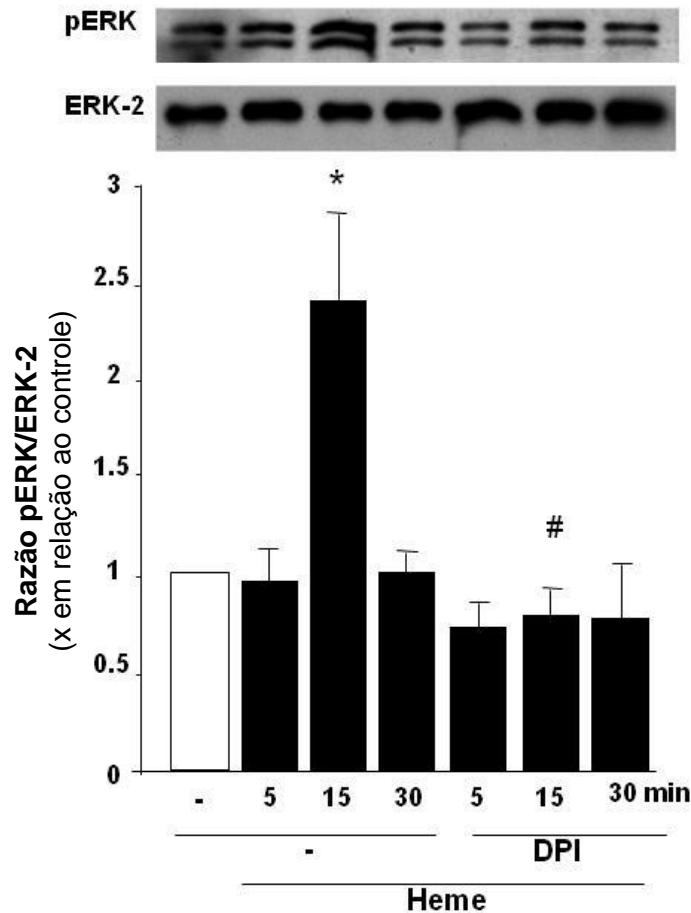
Confirmando a importância da ativação de ERK-2 nos efeitos do heme sobre CMLV, observamos que o heme (10 μ M) foi capaz de induzir fortemente a fosforilação de ERK-2 (15 min) em CMLV (figura 17), sendo este efeito dependente da ativação da NADPH oxidase, uma vez que o DPI (10 μ M) inibiu o efeito do heme (10 μ M) sobre a fosforilação de ERK-2 (figura 17). Outras MAPK, JNK e p38, também foram investigadas, no entanto não observamos alterações induzidas pelo heme em CMLV (dados não mostrados).

Figura 16 - Efeito do heme sobre a migração e proliferação de CMLV: Envolvimento da ERK



Legenda: A. CMLV foram colocadas na câmara de Boyden modificada e colocadas para migrar em direção ao heme (10 μ M). Quando indicado, as células foram pré-tratadas com PD98059 (10 μ M). B. CMLV foram incubadas com heme (10 μ M) por 48h e quando indicado, foram pré-tratadas com PD98059 (10 μ M). Os resultados são representativos de 3 experimentos diferentes. Os dados representam média \pm DP (* $p < 0.05$ vs CMLV não tratadas; # $p < 0.05$ vs CMLV tratadas com heme).

Figura 17 - Efeito do heme sobre a fosforilação da ERK em CMLV



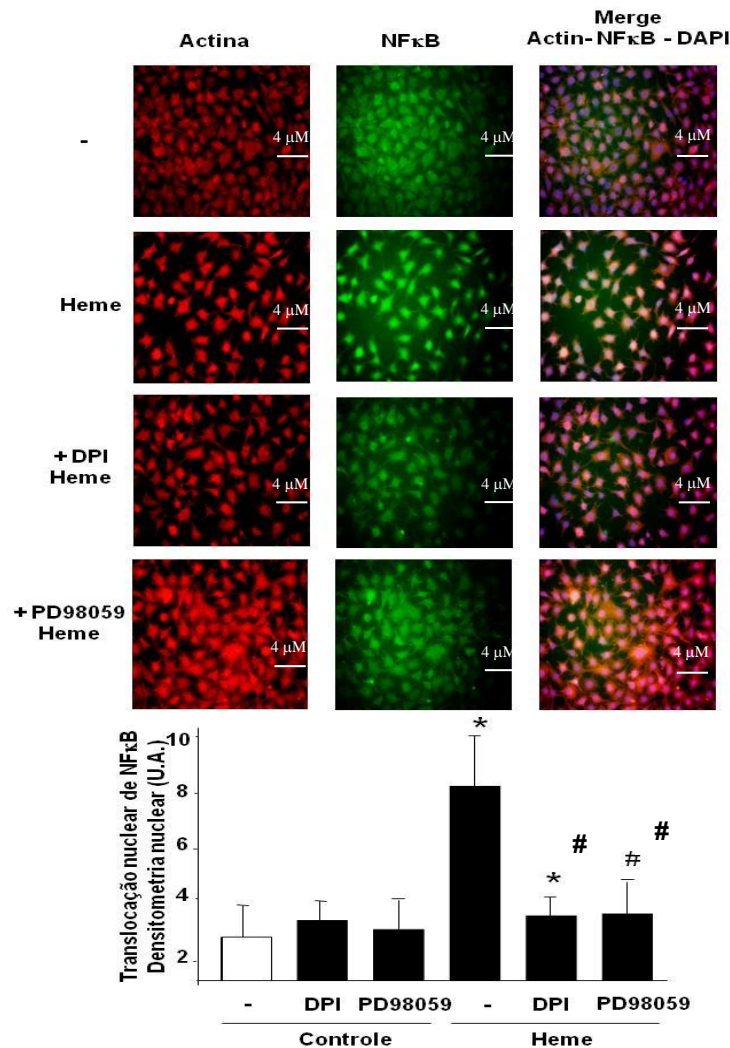
Legenda: As células foram incubadas com heme (10 μ M) por diferentes tempos e quando indicado, foram pré-tratadas com DPI (10 μ M). O extrato celular total foi submetido ao ensaio de “immunoblotting” com anticorpo policlonal anti-pERK (acima) e com anticorpo policlonal anti-ERK-2 (abaixo). Os resultados são representativos da densitometria de 3 experimentos diferentes. Os dados representam média \pm DP (* $p < 0.05$ vs CMLV não tratadas; # $p < 0.05$ vs CMLV tratadas com heme).

A seguir avaliamos o envolvimento de outra importante molécula redox-sensível, o fator de transcrição NF κ B (Haddad, 2002). A atividade deste fator de transcrição pode ser avaliada através de sua translocação para o núcleo, onde irá induzir a transcrição gênica. Desta forma, vimos que o heme (10 μ M) foi capaz de induzir a translocação nuclear do NF κ B em CMLV após 1h de tratamento (figura 18). Como observado anteriormente com a fosforilação de ERK-2, o inibidor da NADPH oxidase também foi capaz de inibir o efeito do heme (10 μ M) na ativação do NF κ B em CMLV (figura 18). Por fim, também vimos que o efeito do heme na ativação de NF κ B é dependente de ERK, uma vez que PD98059 (inibidor de ERK) foi capaz de reverter o efeito do heme (figura 18). Corroborando estes dados, vimos

através de immunoblotting de extrato nuclear que o heme foi capaz de induzir a translocação nuclear de NFκB após 1h de tratamento, sendo este efeito dependente da NADPH oxidase (figura 19).

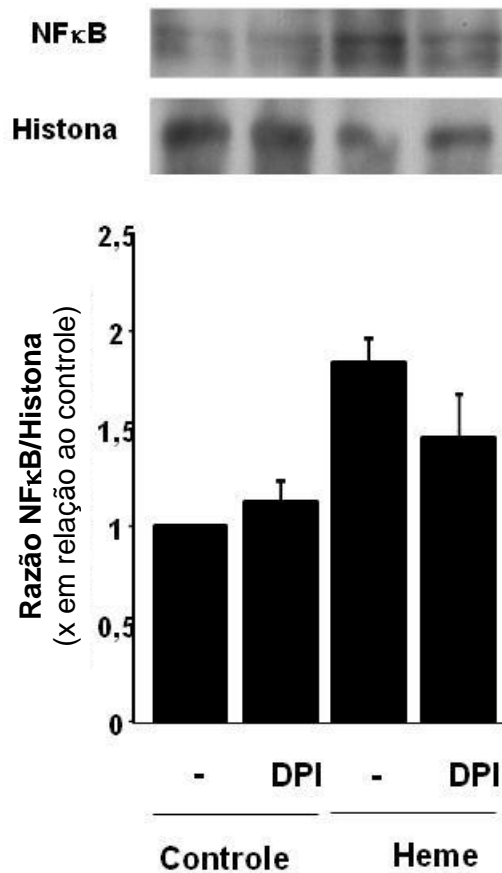
Em conjunto estes resultados indicam que o heme é capaz de ativar importantes vias de sinalização redox-sensíveis via NADPH oxidase, levando assim à proliferação e migração de CMLV.

Figura 18 - Efeito do heme sobre a translocação nuclear de NFκB em CMLV



Legenda: As células foram incubadas com heme (10 μM) por 1 h. Quando indicado, foram pré-tratadas com DPI ou PD98059 (10 μM). As células foram fixadas e marcadas com faloidina-rodamina, anticorpo anti-NFκB e DAPI. No primeiro painel, à esquerda, é possível visualizar o citoesqueleto de actina das CMLV, no painel do centro é possível visualizar o NFκB e à direita a união das imagens do citoesqueleto de actina ao NFκB e ao núcleo marcado com DAPI. Abaixo das figuras, está o gráfico com a densitometria realizada somente nos núcleos das CMLV. As imagens foram obtidas através de microscopia de fluorescência e as imagens são representativas de cinco campos diferentes observados em cada experimento. Os resultados são representativos de dois experimentos diferentes. Os dados representam média ± DP (* p<0.05 vs CMLV não tratadas; # p<0.05 vs CMLV tratadas com heme).

Figura 19 - Efeito do heme sobre a translocação nuclear de NFκB em CMLV

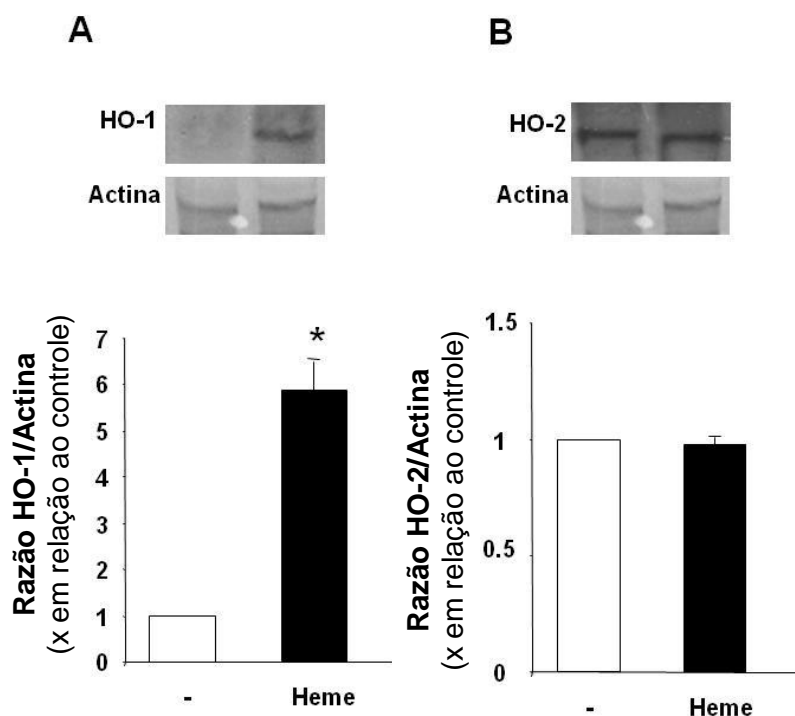


Legenda: CMLV foram incubadas com heme (10 μ M) por 1h e quando indicado, foram pré-tratadas com DPI (10 μ M). O extrato nuclear foi submetido ao ensaio de “immunoblotting” com anticorpo policlonal anti-NFκB (acima) e com anticorpo policlonal anti-histona (abaixo). Os resultados são representativos da densitometria de 2 experimentos diferentes. Os dados representam média \pm DP.

3.1.5 Heme induz a expressão de HO-1

Como mencionado anteriormente, a molécula do heme pode ser metabolizada pelo sistema HO, gerando CO, ferro e biliverdina-bilirrubina. Após 24h de tratamento das CMLV com heme observamos que este (10 μ M) não alterou a expressão da isoforma constitutiva, HO-2, nas CMLV (figura 20). Contudo, o heme (10 μ M) foi capaz de induzir a expressão da isoforma induzida, HO-1, após 24h de tratamento (figura 20).

Figura 20 - Efeito do heme sobre a expressão de HO-1 e HO-2 em CMLV

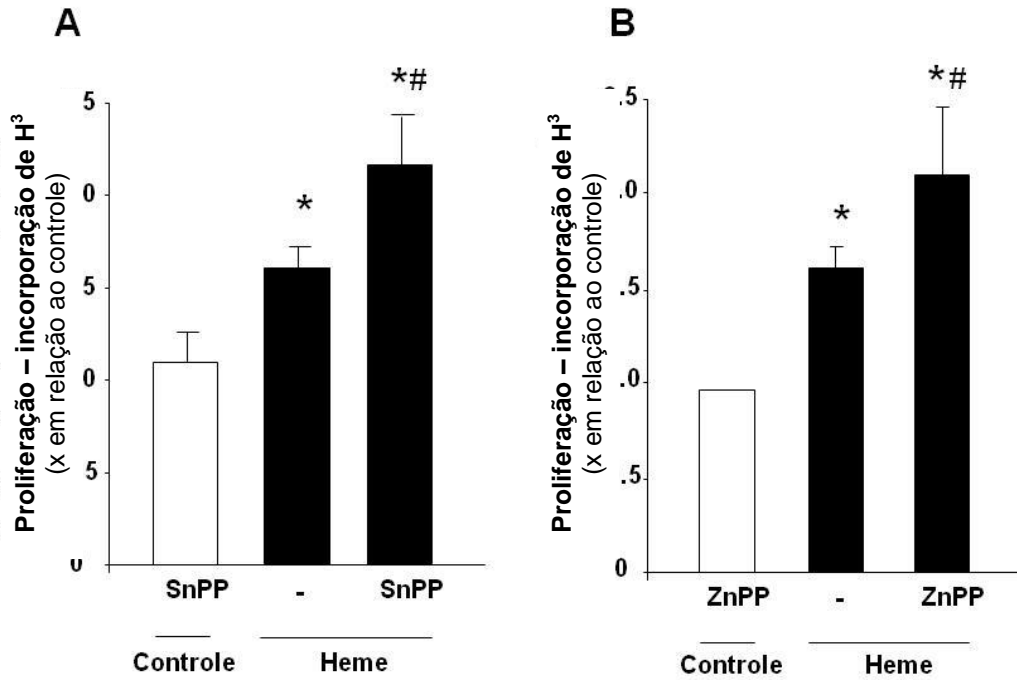


Legenda: As células foram incubadas com heme (10 μ M) por 24 h e em A. o extrato celular total foi submetido ao ensaio de “immunoblotting” com anticorpo policlonal anti-HO-1 (acima) e com anticorpo policlonal anti-actina (abaixo); em B. o extrato celular total foi submetido ao ensaio de “immunoblotting” com anticorpo policlonal anti-HO-2 (acima) e com anticorpo policlonal anti-actina (abaixo). Os resultados são representativos da densitometria de 3 experimentos diferentes (* $p < 0.05$ vs CMLV não tratadas).

3.1.6 A ativação do sistema HO contra-regula o efeito do Heme sobre a proliferação de CMLV

Uma vez observado a HO-1 está sendo induzida pelo heme em CMLV, investigamos se a atividade desta enzima poderia estar modulando o efeito do heme sobre a proliferação celular. Assim, pré-tratamos as CMLV com o inibidor geral de HO, estanho protoporfirina IX (SnPP 3 μ M) ou com o inibidor seletivo de HO-1, zinco protoporfirina IX (ZnPP 10 μ M) e a seguir tratamos com heme (10 μ M). As concentrações escolhidas para os inibidores foram as concentrações máximas testadas sem efeito sobre a proliferação basal de CMLV. A figura 21 mostra que tanto o inibidor geral de HO, como o específico de HO-1, foram capazes de potencializar o efeito do heme na proliferação de CMLV (figura 21).

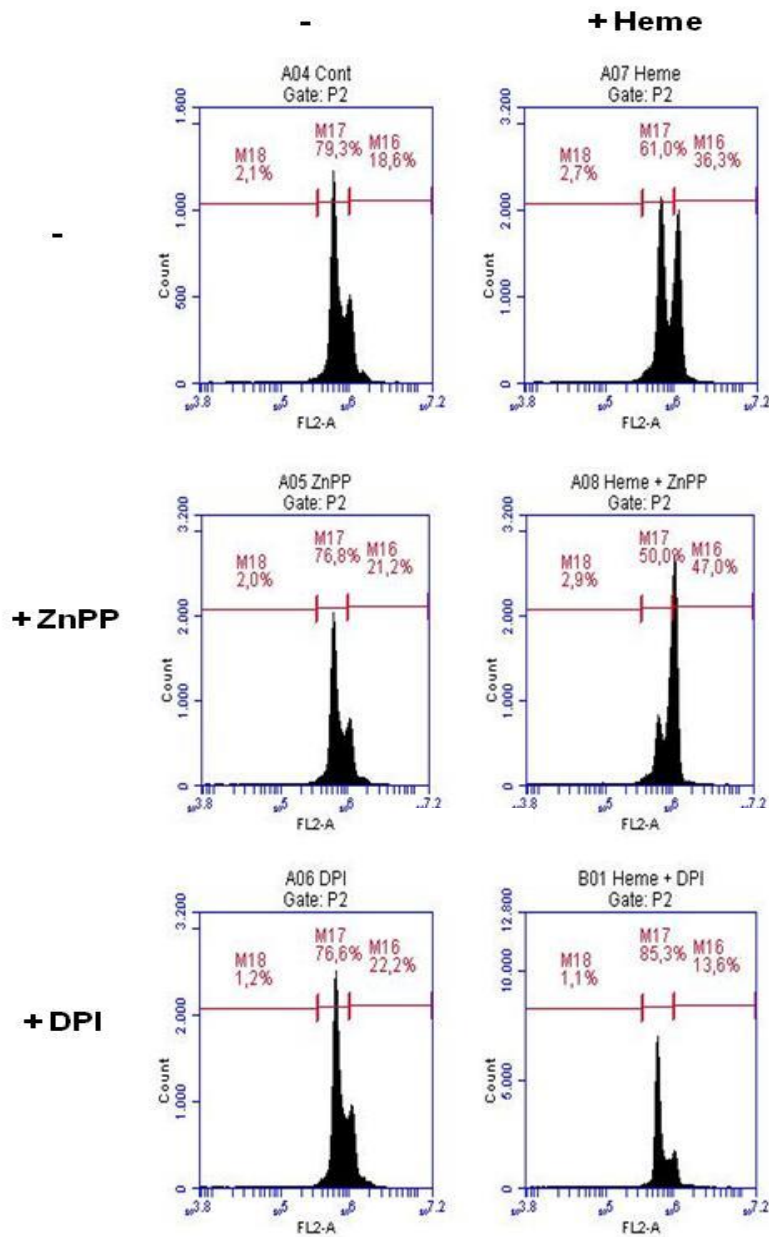
Figura 21 - Efeito do heme sobre a proliferação de CMLV: Papel do sistema HO



Legenda: CMLV foram incubadas com heme (10 μ M) por 48h e, quando indicado, foram pré-tratadas com **A.** SnPP (3 μ M) ou **B.** ZnPP (10 μ M). Os resultados são representativos de 3 a 5 experimentos diferentes. Os dados representam média \pm DP (* $p < 0.05$ vs CMLV não tratadas; # $p < 0.05$ vs CMLV tratadas com heme).

A análise do ciclo celular de CMLV tratadas com heme confirmou estes dados (figura 22). Vimos que o heme foi capaz de induzir um aumento de 18,6% para 36,3% da fase G2. As células tratadas com heme e ZnPP chegaram à 47% na fase G2. Por outro lado, o pré-tratamento com DPI diminuiu o percentual de células em G2 para 13,6% e, interessante, aumentou o percentual de células na fase G0 de 79,3% para 85,3%, mostrando assim que o DPI está envolvido em um aumento de células na fase G0 e não na apoptose.

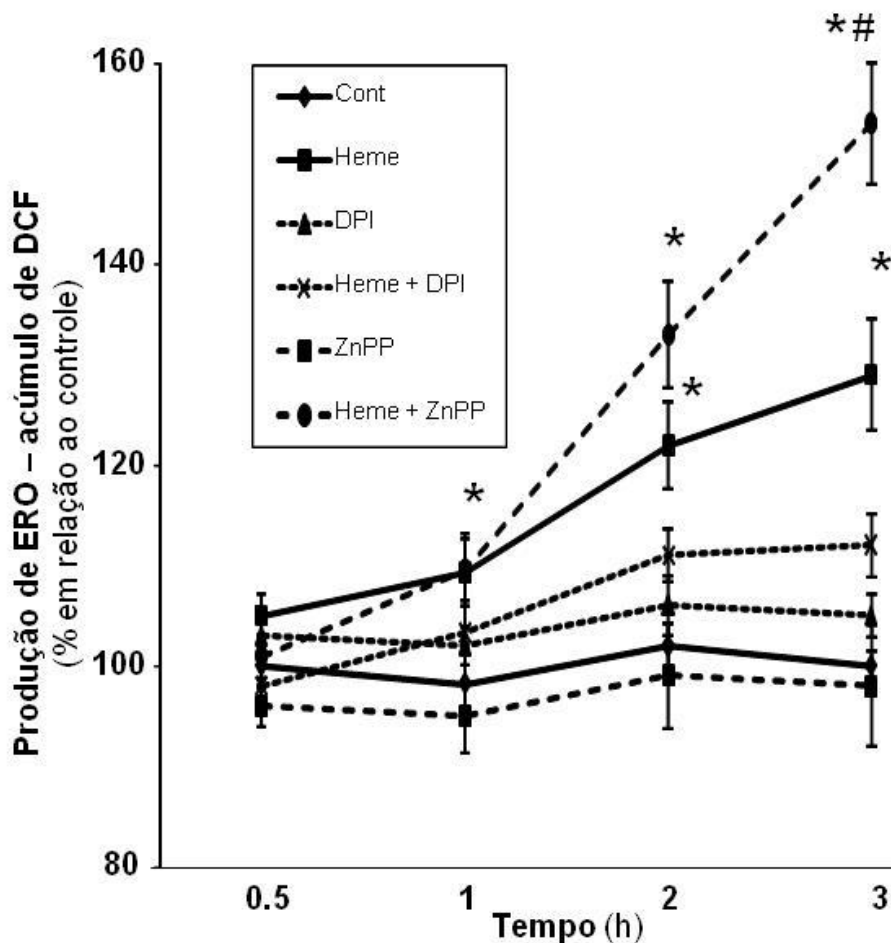
Figura 22 - Efeito do heme sobre o ciclo mitótico de CMLV



Legenda: As células foram incubadas ou não com heme (10 μ M) e quando indicado foram pré-tratadas com DPI (10 μ M) ou ZnPP (10 μ M) por 48h. A primeira zona (M18) representa as células que estão na fase sub-G0, as células na zona intermediária (M17) estão na fase estacionária G0 e as células na zona à direita (M16) estão na fase S/G2, como é possível ver através do conteúdo total de DNA (marcado por PI). Os resultados são representativos de 3 experimentos diferentes.

Para melhor compreender o efeito da inibição de HO na potencialização do efeito proliferativo do heme, resolvemos avaliar a participação do sistema HO na produção de ERO induzida pelo heme em CMLV através do ensaio de oxidação de CM-DCH₂DCFDA. Como observado anteriormente em outro ensaio, o DPI (10 μ M) inibiu o efeito do heme (10 μ M) na produção de ERO. O inibidor específico de HO1 (ZnPP) não afetou *per se* a produção de ERO, contudo, na presença de heme a inibição de HO-1 potenciou a produção de ERO, quando comparado ao heme sozinho (figura 23). Assim podemos concluir que por um lado o heme é capaz de induzir a proliferação de CMLV via NADPH oxidase e por outro lado o sistema HO é capaz de atenuar o efeito do heme.

Figura 23 - Efeito do heme sobre a produção de ERO em CMLV

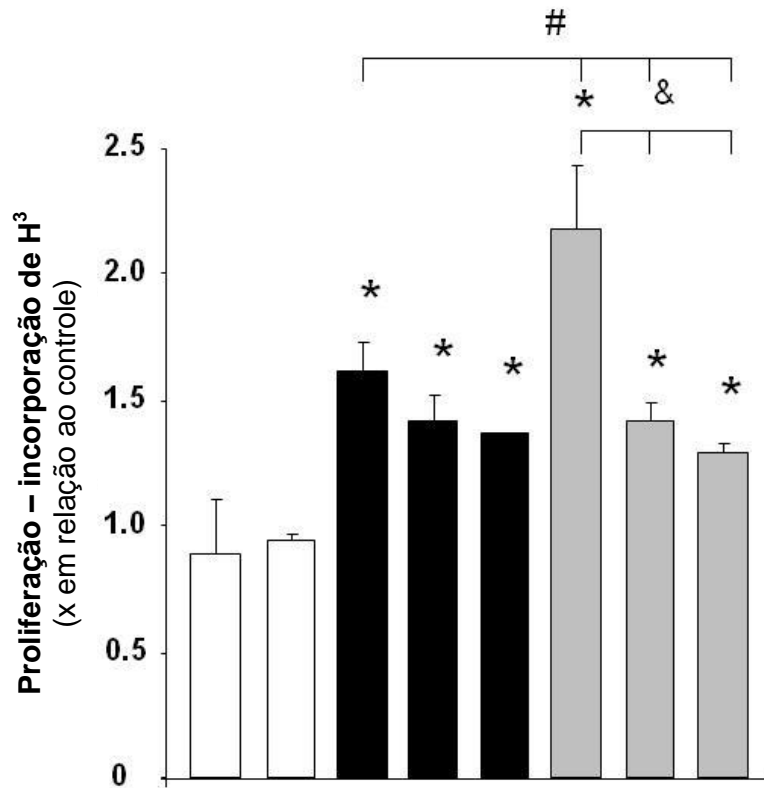


Legenda: Quando indicado, as CMLV foram pré-tratadas com ZnPP (10 μ M) ou DPI (10 μ M) e a seguir incubadas com Heme (10 μ M) por diferentes tempos. A cada tempo avaliado, a placa de 96 poços com a amostra foi levada ao fluorímetro Victor para que fosse feita a leitura da fluorescência (DCF). Os resultados são representativos de 3 experimentos diferentes. Os dados representam média \pm DP (* $p < 0.05$ vs CMLV não tratadas; # $p < 0.05$ vs CMLV tratadas com heme).

3.1.7 Metabólitos do heme revertem o efeito do inibidor da HO-1 sobre a proliferação de CMLV

Para investigar o papel dos produtos da metabolização do heme pela HO sobre a proliferação de CMLV, as células foram tratadas com biliverdina (10 μM), bilirrubina (10 μM) e também com um doador de CO, tricarbonildiclororutenio (II) (10 μM). Embora na concentração usada os metabólitos não tenham tido efeito sobre a proliferação basal de CMLV, nem sobre a proliferação induzida pelo heme (10 μM)(figura 24), eles inibiram significativamente a potencialização causada pela SnPP (3 μM) sobre o efeito proliferativo do heme (figura 24), mostrando assim a importância dos metabólitos do heme no efeito contra-regulatório promovido pelo sistema HO.

Figura 24 - Efeito do heme sobre a proliferação de CMLV: Papel dos metabólitos do heme



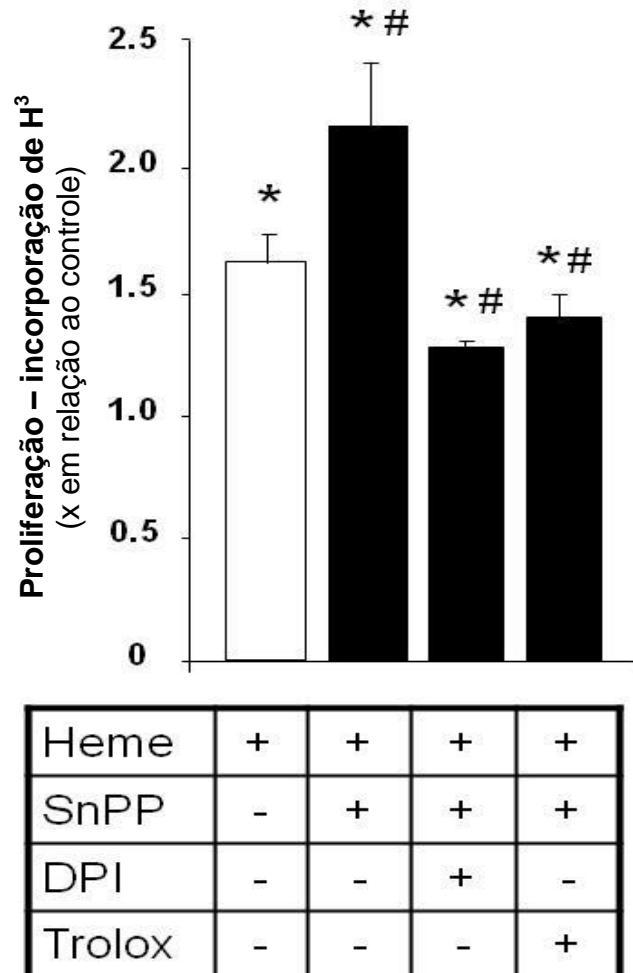
| | | | | | | | | |
|--------------|---|---|---|---|---|---|---|---|
| CO | + | - | - | + | - | - | + | - |
| BV + BR + CO | - | + | - | - | + | - | - | + |
| Heme | - | - | + | + | + | + | + | + |
| SnPP | - | - | - | - | - | + | + | + |

Legenda: CMLV foram incubadas ou não com Heme (10 μ M) e quando indicado foram pré-tratadas com CO (10 μ M) e/ou BV + BR + CO (10 μ M de cada) e/ou SnPP (3 μ M) por 48h. Os resultados são representativos de 3 a 5 experimentos diferentes. Os dados representam média \pm DP (* $p < 0.05$ vs CMLV não tratadas; # $p < 0.05$ vs CMLV tratadas com heme; & vs CMLV tratadas com heme + SnPP).

3.1.8 Contra-regulação dos sistemas NADPH oxidase e HO sobre o efeito do heme em CMLV

O bloqueio simultâneo da produção de ERO e de metabólitos da HO inibiu significativamente o efeito proliferativo do heme (10 μM)(figura 25). Efeito similar foi observado quando as CMLV foram tratadas com o antioxidante Trolox (100 μM) e com o inibidor do sistema HO, SnPP (3 μM)(figura 25), enfatizando assim que a produção de ERO é essencial na modulação da resposta proliferativa do heme e que este efeito seria contra regulado pelos produtos da HO.

Figura 25 - Efeito do heme sobre a proliferação de CMLV: Contra-regulação da NADPH oxidase e HO



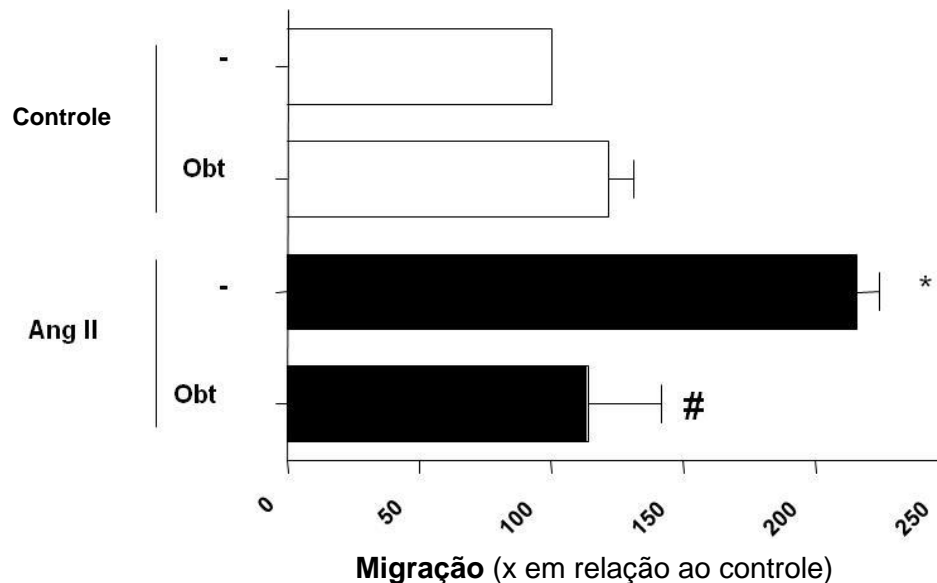
Legenda: CMLV foram incubadas com heme (10 μ M) e quando indicado foram pré-tratadas com DPI (10 μ M) e/ou SnPP (3 μ M) e/ou Trolox (100 μ M) por 48h. Os resultados são representativos de 3 experimentos diferentes. Os dados representam média \pm DP (* $p < 0.05$ vs CMLV não tratadas; # $p < 0.05$ vs CMLV tratadas com heme).

3.2 Resultados 2ª parte

3.2.1 A integrina $\alpha 1\beta 1$ modula o efeito da angiotensina II na migração de CMLV

Sabendo-se que a Ang II é uma potente ativadora de CMLV, modulando funções como migração e proliferação, resolvemos avaliar a importância de diferentes integrinas para a modulação deste efeito. As CMLV foram desafiadas para migrar, *in vitro*, em função de um gradiente de Ang II (100 nM). Diferentes desintegrinas foram testadas para o pré-tratamento das CMLV, com a finalidade de inibir sua migração em direção à Ang II. Neste estudo, optamos pela Obtustatina (100 nM), ligante seletivo da integrina $\alpha 1\beta 1$, pois foi a desintegrina que melhor inibiu o efeito da Ang II na migração de CMLV (figura 26).

Figura 26 - Efeito da Ang II sobre a migração de CMLV: Papel da integrina $\alpha 1\beta 1$

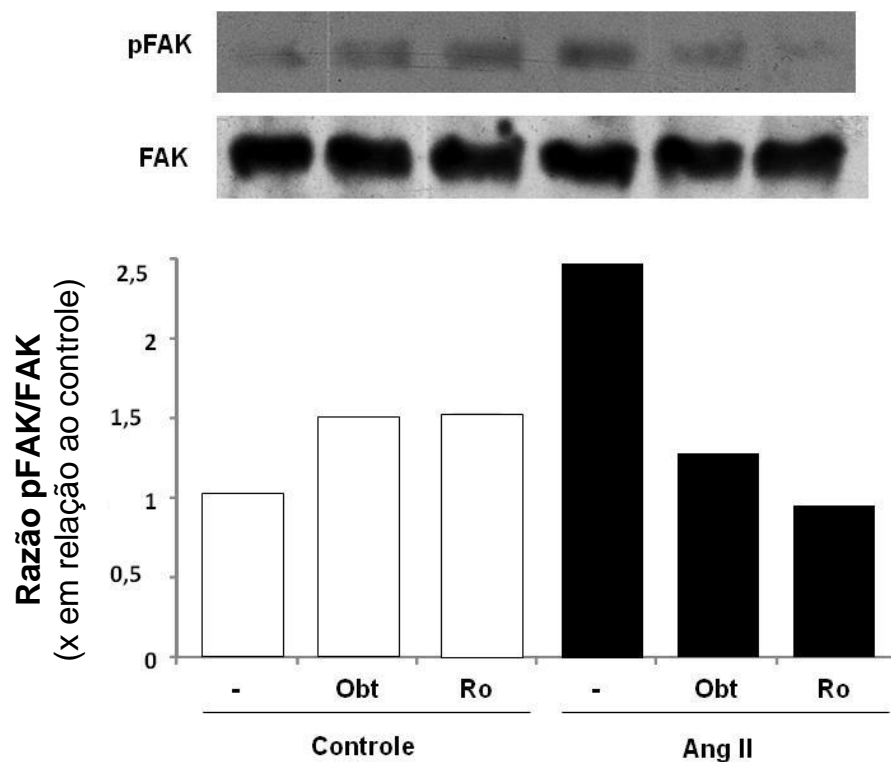


Legenda: CMLV foram colocadas na câmara de Boyden modificada e colocadas para migrar em direção à Ang II (100 nM). Quando indicado, as células foram pré-tratadas com Obtustatina (100 nM). Os resultados são representativos de 3 experimentos diferentes. Os dados representam média \pm DP (* $p < 0.05$ vs CMLV não tratadas; # $p < 0.05$ vs CMLV tratadas com Ang II).

Durante a migração celular é necessário a formação de pontos de adesão focal que, por sua vez, dependem da ativação da FAK. Como vimos anteriormente que a integrina $\alpha 1\beta 1$ modula os efeitos da Ang II na migração de CMLV, resolvemos avaliar se a integrina também

estaria modulando o efeito da Ang II na ativação de FAK. A figura 27 mostra que a Obtustatina (100 nM) foi capaz de inibir totalmente o efeito da Ang II (100 nM) sobre a fosforilação de FAK após 15 min. Nesta figura também podemos observar que Ro 31-8220 (100 nM), inibidor seletivo da PKC- α , foi capaz de inibir o efeito da Ang II (100 nM) sobre a fosforilação de FAK, efeito este esperado, uma vez que PKC- α é um dos primeiros alvos moleculares da Ang II (figura 27).

Figura 27 - Efeito da Ang II sobre a fosforilação de FAK em CMLV: Papel da integrina $\alpha 1\beta 1$ e da PKC α

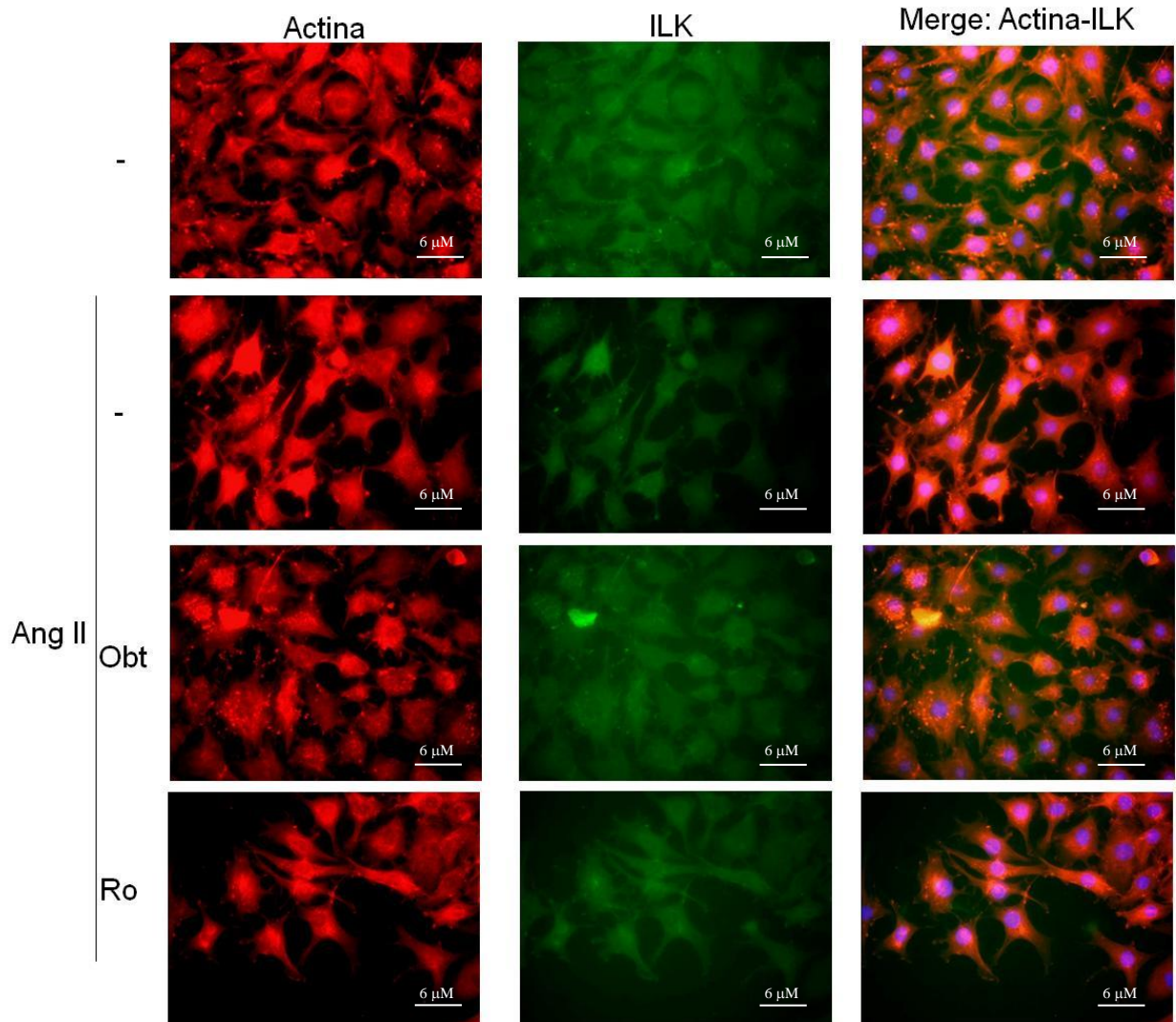


Legenda: CMLV foram incubadas com Ang II (100 nM) por 15 min e quando indicado, foram pré-tratadas com Obtustatina (100 nM) e Ro 31-8220 (100 nM). O extrato celular total foi submetido ao ensaio de "immunoblotting" com anticorpo policlonal anti-pFAK (acima) e com anticorpo policlonal anti-FAK (abaixo). Os resultados são representativos de 3 experimentos diferentes.

3.2.2 A associação Actina-ILK induzida pela Ang II em CMLV é mediada pela integrina $\alpha 1\beta 1$

Além dos pontos de adesão focal é necessário um rearranjo do citoesqueleto de actina para que a célula possa realizar o processo de migração. Recentes trabalhos mostram que o rearranjo do citoesqueleto de actina pode ser modulado pela ILK, que pode se associar diretamente à actina (Takao e col., 2003; Qian e col., 2005). Através de microscopia de fluorescência, vimos que a Ang II após 30 min foi capaz de induzir um forte rearranjo do citoesqueleto de actina que se colocaliza com a ILK. Quando as CMLV foram pré-tratadas com Obtustatina (100 nM) e tratadas com Ang II (100 nM) vimos uma diminuição na formação de filamentos de actina e, conseqüentemente, uma diminuição na colocalização com ILK, diminuindo de forma geral a associação actina-ILK. Já quando pré-tratamos as CMLV com Ro 31-8220 (100 nM) e tratamos com Ang II (100 nM) não vimos alteração no rearranjo do citoesqueleto de actina (comparado ao controle), no entanto vimos uma diminuição na colocalização da ILK com actina (figura 28).

Figura 28 - Efeito da Ang II sobre a colocalização Actina-ILK em CMLV: Papel da integrina $\alpha 1\beta 1$ e da PKC α



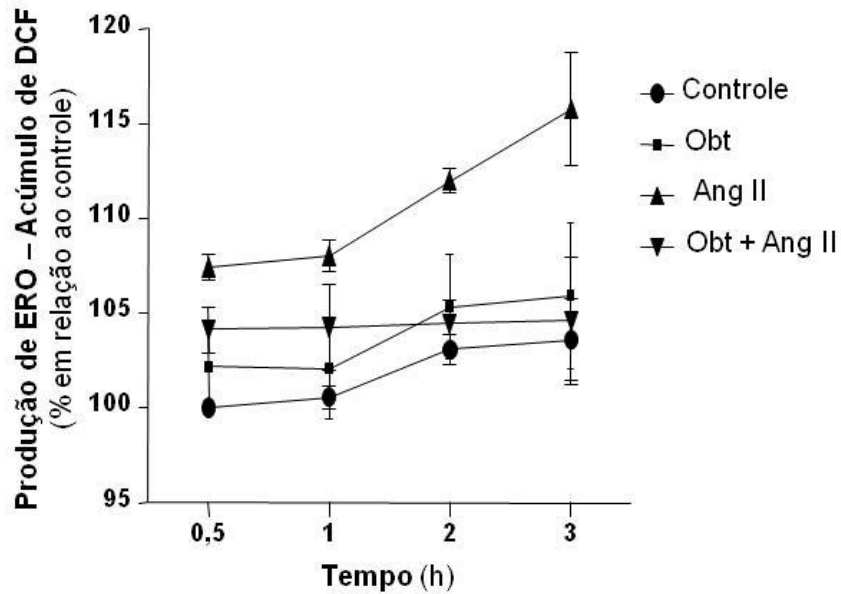
Legenda: CMLV foram incubadas com Ang II (100 nM) por 30 min, quando indicado, foram pré-tratadas com obtustastina (100 nM) ou Ro 31-8220 (100 nM). As células foram fixadas e marcadas com faloidina-rodamina, anticorpo anti-ILK e DAPI. As imagens foram obtidas através de microscopia de fluorescência e as imagens são representativas de cinco campos diferentes observados em cada experimento. Os resultados são representativos de três experimentos diferentes.

3.2.3 A integrina $\alpha 1\beta 1$ modula o efeito da Ang II em CMLV sobre a produção de ERO

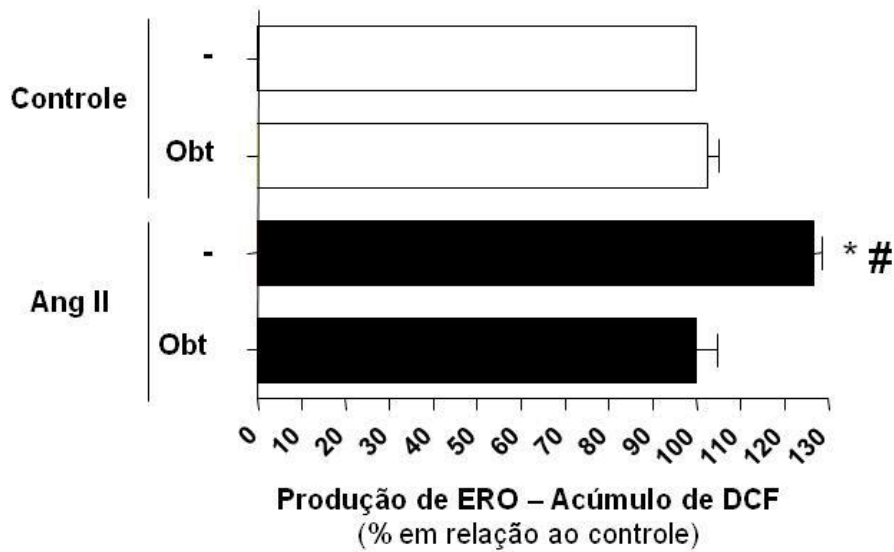
Tendo em vista que a obtustatina foi capaz de inibir os efeitos da Ang II em CMLV sobre a migração e colocalização actina-ILK de forma semelhante ao inibidor de PKC α , resolvemos avaliar o efeito da Obtustatina sobre a produção de ERO, uma vez que é bem estabelecido que a Ang II é capaz de induzir ERO principalmente através da PKC α (Herrera e col., 2010). Na figura 29 observamos que a Obtustatina (100 nM) foi capaz de inibir o efeito da Ang II (100 nM) em CMLV sobre a produção de ERO tanto em tempos curtos (A) quanto após 24 h (B) de tratamento.

Figura 29 - Efeito da Ang II sobre a produção de ERO em CMLV: Papel da integrina $\alpha 1\beta 1$

A



B

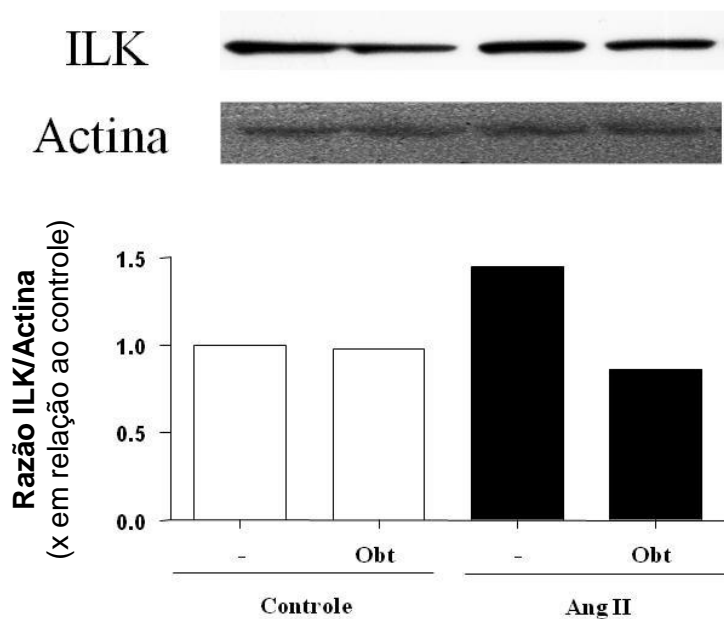


Legenda: CMLV quando indicado foram pré-tratadas com obtustastina (100 nM) e a seguir incubadas com Ang II (100 nM) e com a sonda CM-H₂DCFDA por 0,5-3 h (A) e 24 h (B). A cada tempo avaliado, a placa de 96 poços com a amostra foi levada ao fluorímetro Victor para que fosse feita a leitura da fluorescência (DCF). Os resultados são representativos de 3 experimentos diferentes.

3.2.4 O desacoplamento FAK-ILK induzido pela Ang II em CMLV é mediado pela integrina $\alpha 1\beta 1$

Li e col. (2009) mostraram um interessante mecanismo no qual a osteopontina induz a fosforilação de FAK, sendo esta fosforilação seguida pela dissociação ILK da FAK e consequente ativação da ILK. Este trabalho nos inspirou a tentar responder em qual momento a ILK deixa de desempenhar seu papel como proteína adaptadora para atuar como proteína quinase. Inicialmente vimos que o aumento do conteúdo de ILK em CMLV promovido pela Ang II (100 nM) é dependente da integrina $\alpha 1\beta 1$ (figura 30), uma vez que a Obtustatina (100 nM) bloqueou o efeito da Ang II após 24h.

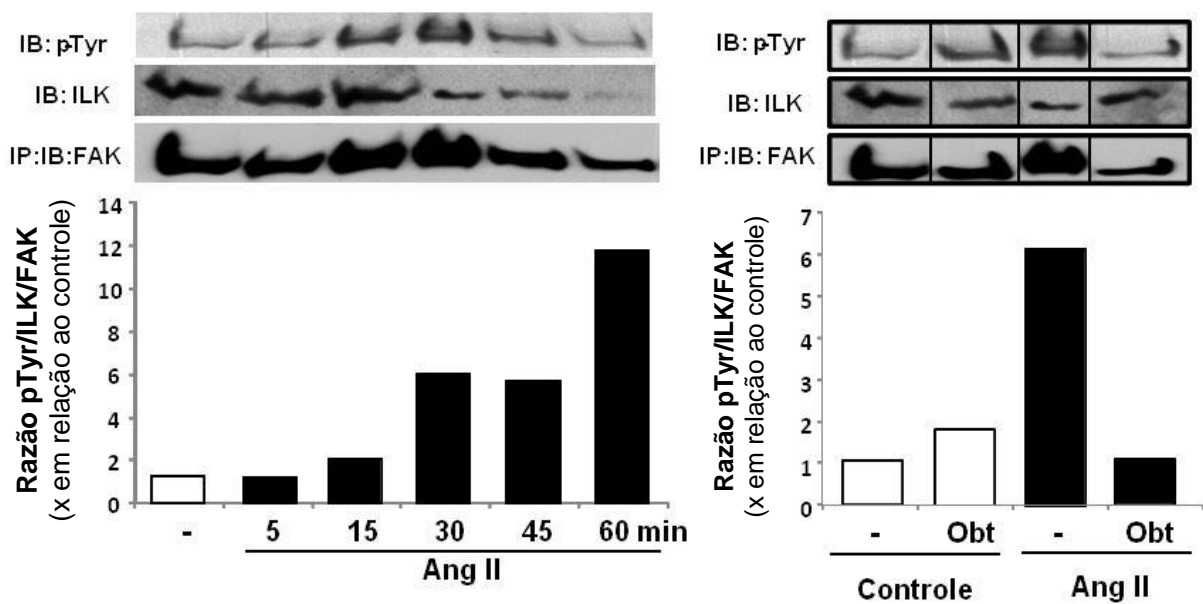
Figura 30 - Efeito da Ang II sobre a expressão de ILK em CMLV: Papel da integrina $\alpha 1\beta 1$



Legenda: CMLV foram incubadas com Ang II (100 nM) por 24h e quando indicado, foram pré-tratadas com Obtustatina (100 nM). O extrato celular total foi submetido ao ensaio de “immunoblotting” com anticorpo policlonal anti-ILK (acima) e com anticorpo policlonal anti-actina (abaixo). Os resultados são representativos de 4 experimentos diferentes.

A seguir tentamos entender os mecanismos pelos quais a ILK pode modular os efeitos da Ang II em CMLV. Neste ensaio a FAK foi imunoprecipitada e o blotting foi realizado para pTyr (para avaliar a ativação da FAK), para ILK (para avaliar a associação FAK-ILK) e para FAK. Na figura 31, vimos que a partir de 15 min é possível observar que Ang II (100 nM) induz um aumento na fosforilação de FAK em CMLV (como visto na figura 27), sendo a ativação máxima de FAK visualizada após 30 min. Interessantemente, após 30 min começa a ocorrer uma grande diminuição de ILK associada à FAK. Quando pré-tratamos as CMLV com Obtustatina (100 nM) para a seguir tratarmos com Ang II (100 nM) por 30 min, vimos que a Obtustatina não somente inibiu o efeito da Ang II sobre a fosforilação de FAK, como também manteve a ILK associada à FAK.

Figura 31 - Efeito da Ang II sobre o desacoplamento da ILK da FAK em CMLV

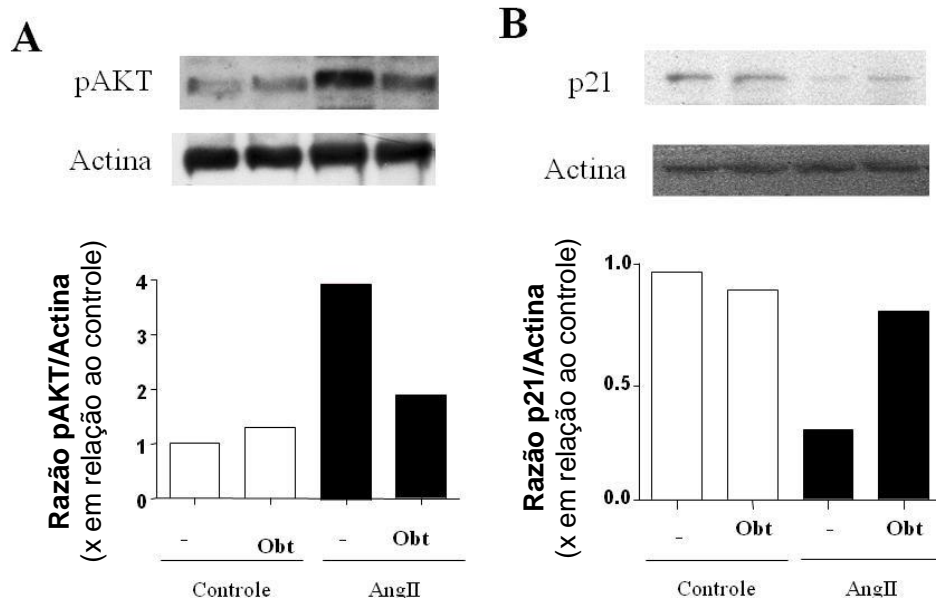


Legenda: As células foram incubadas com Ang II (100 nM) por diferentes tempos e quando indicado, foram pré-tratadas com Obtustatina (100 nM) e tratadas com Ang II por 30 min. O extrato celular total foi submetido à imunoprecipitação para FAK para em seguida ser realizado “immunoblotting” com anticorpo policlonal anti-pTyr (acima), anticorpo policlonal anti-ILK (meio) e com anticorpo policlonal anti-FAK (abaixo). Os gráficos foram construídos através da razão da densitometria de pTyr pela ILK (em relação ao controle) e em seguida foi feita a normalização pela FAK total (através de uma nova razão). Os resultados são representativos de 2 experimentos diferentes.

3.2.5 A integrina $\alpha 1\beta 1$ modula os efeitos da Ang II em CMLV sobre a ativação de AKT e degradação da p21

De acordo com a hipótese de nosso estudo após a CMLV ser ativada por Ang II a ILK (provavelmente após 30 min) deixa de exercer sua atividade como proteína adaptadora e passa a exercer sua atividade como proteína quinase. Na falta de ferramentas para se saber a participação exata da ILK (atualmente não existe inibidor), resolvemos avaliar o efeito da Ang II sobre duas proteínas que são moduladas diretamente pela ILK (AKT e p21). A figura 32.a mostra que a Ang II (100 nM) foi capaz de induzir a fosforilação de AKT em 30 min e esta fosforilação é dependente da integrina $\alpha 1\beta 1$. A figura 31.b mostra que a Ang II (100 nM) foi capaz de induzir a degradação de p21 após 24h e, semelhante à figura 32.a, a Obtustatina (100 nM) foi capaz de reverter o efeito da Ang II.

Figura 32 - Efeito da Ang II sobre a fosforilação de AKT e degradação de p21 em CMLV: Papel da integrina $\alpha 1\beta 1$

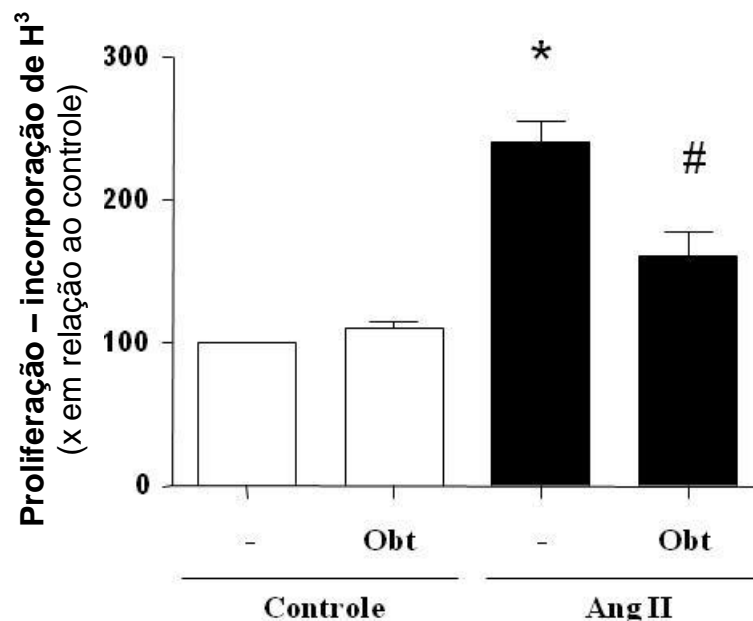


Legenda: CMLV foram incubadas com Ang II (100 nM) por 30 min (A) e 24 h (B) e quando indicado, foram pré-tratadas com Obtustatina (100 nM). O extrato celular total foi submetido ao ensaio de “immunoblotting” com anticorpo policlonal anti-actina (abaixo) e (A) com anticorpo policlonal anti-pAKT (acima) e (B) com anticorpo policlonal anti-p21 (acima) Os resultados são representativos de 3 experimentos diferentes.

3.2.6 Os efeitos da Ang II em CMLV sobre a proliferação celular são dependentes da integrina $\alpha 1\beta 1$

A ativação de AKT está ligada diretamente à indução da proliferação celular, já a degradação de p21 está ligada à promoção do ciclo celular na fase G2, induzindo também a proliferação. Portanto avaliamos o envolvimento da integrina $\alpha 1\beta 1$ no efeito da Ang II na proliferação celular e também na indução do ciclo celular na fase G2. Vimos inicialmente que a Ang II (100 nM) foi capaz de induzir a proliferação de CMLV após 48 h e este efeito é dependente da integrina $\alpha 1\beta 1$ (figura 33).

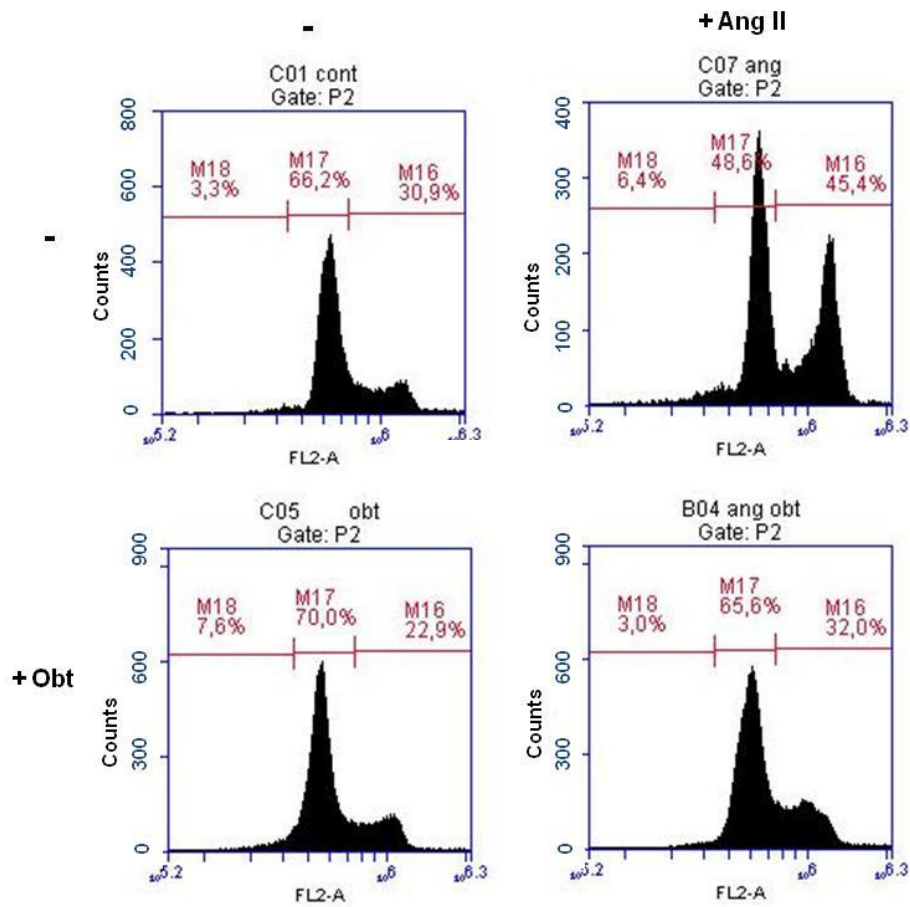
Figura 33 - Efeito da Ang II sobre a proliferação de CMLV: Papel da integrina $\alpha 1\beta 1$.



Legenda: CMLV foram incubadas com Ang II (100 nM) por 48h e quando indicado, foram pré-tratadas com Obtustatina (100 nM). Os resultados são representativos de 3 experimentos diferentes. Os dados representam média \pm DP (* $p < 0.05$ vs CMLV não tratadas; # $p < 0.05$ vs CMLV tratadas com Ang II).

A seguir, através da análise do ciclo celular, observamos que a indução à fase G2 promovida pela Ang II (100 nM) após 24h de tratamentos das CMLV é dependente da integrina $\alpha 1\beta 1$ (figura 34).

Figura 34 - Efeito da Ang II sobre o ciclo mitótico de CMLV: Papel da integrina $\alpha 1\beta 1$



Legenda: CMLV foram incubadas ou não com Ang II (100 nM) e quando indicado foram pré-tratadas com Obtustatina (100 nM) por 24 h. A primeira zona (M18) representa as células que estão na fase sub-G0, as células na zona intermediária (M17) estão na fase estacionária G0 e as células na zona à direita (M16) estão na fase S/G2, como é possível ver através do conteúdo total de DNA (marcado por PI). Os resultados são representativos de 3 experimentos diferentes.

4 DISCUSSÃO

4.1 Discussão 1ª parte

Em algumas regiões de entroncamento da vasculatura, o forte turbilhamento sanguíneo pode levar ao choque das hemácias na parede dos vasos, culminando em hemólise. O heme livre em altas concentrações pode exceder a capacidade da hemopexina em seqüestrá-lo, resultando em heme livre na circulação (Olgun e col., 2004). Corroborando estes dados, estudos preliminares indicam que pacientes com doenças cardiovasculares em diferentes níveis de desenvolvimento apresentam níveis elevados de heme livre no plasma comparados a indivíduos sadios (Amabile e col., não publicado). Uma vez livre, o heme pode se tornar um potente indutor da oxidação do LDL, induzindo a aterogênese (Balla e col., 1991; Miller e Shaklai, 1999). Além disso, o heme também pode ter seu efeito modulado por TLR4 ou por receptores acoplados à proteína G (Figueiredo e col., 2007; Porto e col. 2007). Neste trabalho, evidenciamos um novo papel para a molécula de heme. Mostramos pela primeira vez, que o heme é capaz de ativar diretamente as CMLV, o que poderia levar a disfunções vasculares e, conseqüentemente, aterogênese.

Diferentes trabalhos têm mostrado que o heme é capaz de induzir o complexo NADPH oxidase em diferentes tipos celulares (Arruda e col., 2006; Hasan e Schafer, 2008). Uma vez ativado, esse complexo enzimático gera ERO, que por sua vez pode ativar diferentes vias de sinalização redox-sensíveis, como a via da MAPKinase. A ativação desta via pode levar à fosforilação e translocação nuclear de ERK-2, importante membro da família das MAPK que, uma vez no núcleo, pode fosforilar e ativar outras proteínas e fatores de transcrição modulando a expressão gênica. Tanto as ERO, quanto a via da ERK-2 podem ativar um importante fator de transcrição, o NFκB, que está relacionado à proliferação celular (Sundaram, 2006). Com base nesta informação, nós também mostramos que o efeito do heme em CMLV ocorre via NADPH oxidase, ativando moléculas redox-sensíveis, como ERK-2 e NFκB. Corroborando nosso trabalho, diversos estudos têm relacionado a atividade da NADPH oxidase à doenças cardiovasculares, bem como sugerindo que este complexo é um potencial alvo para intervenções farmacológicas (Griendling e col., 2000; Paravicini e Touyz, 2008; Cave, 2009).

Neste trabalho como ferramenta para inibição da NADPH oxidase utilizamos o DPI, que atua como inibidor de flavoproteínas e conseqüentemente inibe a NADPH oxidase, que é composta por flavoenzimas. Embora não seja seletivo o efeito inibitório do DPI sobre a NADPH oxidase, seu uso continua sendo o mais empregado e mais eficiente para este fim (Kleniewska e col., 2011). O efeito inibitório do DPI sobre a produção de ERO induzida por heme é inquestionável, contudo não podemos descartar que o DPI estaria inibindo outras flavoproteínas, entre elas a NADPH-ubiquinona oxidoreductase, importante para a produção de ERO mitocondrial (Diphenyleneiodonium, an NAD(P)H Oxidase Inhibitor, also Potently Inhibits Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production Yunbo Li, Michael A. Trush). Conforme descrito por Cross e Jones (Biochem J. 1986 Jul 1;237(1):111-6. The effect of the inhibitor diphenylene iodonium on the superoxide-generating system of neutrophils. Specific labelling of a component polypeptide of the oxidase. Cross AR, Jones OT) utilizamos a concentração de 10 μ M de DPI como ponto central de nossa curva para a inibição da NADPH oxidase. Vimos que concentrações superiores de DPI afetaram a viabilidade celular e concentração inferior à 10 μ M não teve o mesmo efeito que 10 μ M, por isso optamos por esta concentração (dado não mostrado). Este dado também nos permite sugerir que a concentração de 10 μ M não estaria afetando a produção de ERO mitocondrial, pois a viabilidade celular não foi afetada. Já concentrações superiores inibiriam a produção de ERO mitocondrial, afetando assim a sobrevivência celular, o que está em conformidade com estudos preliminares envolvendo a inibição de ERO pelo DPI em células epiteliais gástricas ativadas pelo heme (Barcellos-de-Souza, não publicado). Por último, o DPI também pode inibir a NO sintase, inibindo uma possível produção ERO através do desacoplamento de NO sintase endotelial, no entanto descartamos essa possibilidade pois vimos que o heme foi capaz de induzir ERO em curtos tempos, o que dificilmente ocorreria pelo desacoplamento da NO sintase endotelial.

Presentes em CMLV estão, principalmente, as NOX1, NOX4 e NOX5, sendo a NOX4 principal responsável pela modulação dos efeitos em CMLV (The Nox Family of NADPH Oxidases: Friend or Foe of the Vascular System? Takac I, Schröder K, Brandes RP. Curr Hypertens Rep. 2011 Nov 10.). Como todas as NOX possuem flavoproteínas, todas podem ser inibidas pelo DPI, o que nos impede de identificar qual NOX estaria sendo ativada por heme. Uma forma de se avaliar qual NOX estaria modulando o efeito do heme seria silenciando diferentes NOX, no entanto o silenciamento de uma NOX pode induzir uma superexpressão de outra, gerando um falso resultado. Sendo assim não podemos concluir neste trabalho qual NOX estaria modulando o efeito do heme em CMLV.

Peyton e col. (2007) observaram que inibidores do sistema HO eram capazes de induzir a proliferação de CMLV, sugerindo que o CO fosse a molécula crucial que impediria a proliferação dessas células. Neste trabalho também vimos que concentrações superiores a 10 μ M de SnPP eram capazes de induzir a proliferação de CMLV (dados não mostrados). Entretanto optamos por utilizar concentrações inferiores que não afetassem a proliferação basal, permitindo desta maneira avaliar a importância do sistema HO no efeito do heme.

Interessantemente, nós mostramos que o efeito do heme na proliferação de CMLV é endogenamente contra-regulado pelo sistema HO, especificamente HO-1, que pode atuar de duas formas: diminuindo a biodisponibilidade de heme livre e gerando metabólitos do heme que possuem propriedades antioxidantes e anti-proliferativas (Stocker e col., 1987; Stocker, 2004). O efeito potencializador da inibição do sistema HO se explica pela manutenção do efeito do heme, que permanece ativando as CMLV. Já quando o sistema permanece ativo o heme é metabolizado em até 12 h (dado não mostrado). As propriedades antioxidantes poderiam contra-regular o efeito do heme na geração de ERO, via NADPH oxidase. Já as propriedades anti-proliferativas explicariam diretamente o efeito do sistema HO modulando negativamente a proliferação. Entretanto, essas propriedades anti-proliferativas podem ocorrer tanto por mecanismos antioxidantes como pela capacidade dos metabólitos do heme de atuarem como inibidores de MAPKinasas em CMLV (Nakao e col., 2005; Ollinger e col., 2005; Hasan e Schafer, 2008). Além disso, os metabólitos do heme (Ollinger e col., 2005), assim como a inibição da HO-1 (Peyton e col., 2002), induzem uma parada na fase G0 do ciclo celular, evitando assim a proliferação da célula. Corroborando esses dados, observamos que quando a atividade da NADPH oxidase está inibida, a indução pelo heme da entrada do ciclo celular na fase G2 diminui, aumentando o estacionamento do ciclo celular em G0, provavelmente devido aos seus metabólitos (figura 22).

Neste estudo, nós não avaliamos a importância da HO-2, uma vez que o heme não foi capaz de alterar a expressão desta enzima. Entretanto, Bellner e col. (2009) observaram que ao silenciarem a expressão gênica de HO-2 ocorria uma indução da NADPH oxidase e, conseqüentemente, produção de ERO em células endoteliais. Além disso eles também observaram um aumento na translocação nuclear de NF κ B, provavelmente via ERO. Estes dados são consistentes com nosso trabalho, pois vimos que a inibição da HO-1 potencializa a produção de ERO. Além disso, mostramos que por trás desse efeito há um interessante sistema de contra-regulação, envolvendo todo um balanço redox na célula.

Por último, podemos propor que o efeito do heme é elegantemente regulado pela sua concentração e pelo balanço entre o complexo NADPH oxidase e o sistema HO. Observamos

que o heme na concentração de 10 μM foi capaz de induzir ambos os sistemas. Entretanto, no nosso modelo o efeito do heme 10 μM no complexo NADPH oxidase estaria predominando sobre o sistema HO, induzindo a proliferação das CMLV. Vale ressaltar que a concentração de heme e os dias de tratamento são cruciais para o balanço entre os sistemas NADPH oxidase e HO. Chang e col. (2008) viram que o tratamento crônico com heme a 5 μM durante 7-21 dias foi capaz de inibir a proliferação de CMLV, via HO-1. Além disso, o heme também reduziu a produção de ERO e esse efeito foi revertido quando o sistema HO foi inibido (SnPP), depois de 7 dias. E também Hyvelin e col. (2010) mostraram que o tratamento com heme (30 μM) foi capaz de ativar a HO-1 inibindo a estenose *in-stent* em ratos e coelhos após 28 dias. Com base no que estamos propondo em nosso trabalho, podemos sugerir que no trabalho de Chang e col. (2008) e Hyvelin e col. (2010) que o efeito do heme no sistema HO estaria prevalecendo sobre o complexo NADPH oxidase, culminando na inibição da proliferação de CMLV. Nós também podemos sugerir que a curta meia-vida do heme pode explicar o rápido efeito sobre a produção de ERO e um efeito tardio/prolongado pelo sistema HO (pelos metabólitos do heme).

Um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos no efeito do heme no complexo NADPH oxidase poderia levar ao desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento de doenças cardiovasculares. Assim, esperamos que a observação de eventos moleculares por trás destes processos leve ao desenvolvimento de intervenções mais eficientes para o tratamento da aterosclerose.

4.2 Discussão 2ª parte

A transativação de integrinas a partir de diferentes receptores é uma questão de extrema relevância biológica que, até o momento, foi pouco estudado. Neste trabalho objetivamos compreender os mecanismos pelos quais uma importante molécula ativadora de CMLV, Ang II, poderia transmitir seus sinais para o interior da célula e avaliar uma possível participação de integrinas nesse processo.

As integrinas são as principais moduladoras da adesão celular à matriz extra-celular e esta interação integrina-matriz é capaz de ativar as CMLV, induzindo diferentes efeitos. Dentre as integrinas presentes em CMLV se destacam integrina $\alpha1\beta1$, $\alpha5\beta1$ e a integrina

$\alpha v\beta 3$, pois além de serem abundantemente expressas também são capazes de modular importantes funções, como migração e proliferação. Menos expressas em CMLV estão as integrinas $\alpha v\beta 5$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$ e $\alpha 9\beta 1$. Estudos clínicos já foram realizados através da aplicação de stent revestido com anticorpo bloqueador da integrina $\alpha v\beta 3$ (abciximab) em pacientes com doenças coronarianas e foi mostrado que a incidência de restenose diminuiu significativamente em relação ao pacientes submetidos à aplicação de stent contendo somente heparina (Tamburino e col., 2002). Diferentes estudos tem mostrado que as integrinas não são ativadas somente quando encontram seu ligante, mas também podem ser ativadas através de um receptor acoplado à proteína G. Mediadores pró-inflamatórios ligantes de GPCR, abundantes na aterogênese, tem seus efeitos modulados por integrinas: IGF-1 e LTB4 tem seu efeito modulado pela integrina $\alpha v\beta 3$ (Castella e col., 2010; Moraes e col., 2010); e a AngII tem seu efeito modulado pelas integrinas $\alpha 1\beta 1$ e $\alpha 5\beta 1$ (Louis e col., 2007; Bunni e col., 2011).

Para avaliarmos o envolvimento de integrinas o efeito da AngII em CMLV, utilizamos como ferramentas desintegrinas para caracterizarmos o papel das diferentes integrinas. Desta maneira, detectamos que a desintegrina kistrina, uma potente bloqueadora da integrina $\alpha v\beta 3$ (Yee e col., 2000) foi capaz de inibir totalmente a migração das CMLV induzida pela Ang II, não sendo porém capaz de inibir seu efeito pró-proliferativo. Observamos também através do uso de desintegrinas, que a integrina $\alpha 4\beta 1$ (utilizamos como ferramenta a eristostatina) não participa do efeito da Ang II na migração e proliferação de CMLV. A integrina $\alpha 5\beta 1$ (utilizamos como ferramenta a equistatina) modula somente a proliferação de CMLV induzida por Ang II, corroborando os dados de Bunni e col. (2011). Alguns peptídeos sintéticos (contendo domínios RGD ou VGD, ligantes de integrinas) também foram utilizados, mas os resultados não foram satisfatórios, pois os peptídeos não bloquearam as integrinas, mas atuaram como agonistas promovendo a ativação de CMLV (dados não mostrados). Finalmente, demonstramos que a desintegrina Obtustatina, bloqueadora seletiva da integrina $\alpha 1\beta 1$, foi capaz de reverter o efeito da Ang II tanto na proliferação quanto na migração de CMLV (figuras 26 e 32), caracterizando um papel fundamental da integrina $\alpha 1\beta 1$ na modulação dos efeitos da Ang II sobre as CMLV. A obtustatina foi portanto escolhida para o desenvolvimento deste trabalho

Já é bem descrito na literatura que a Ang II é capaz de mediar suas funções através da produção de ERO via $PKC\alpha$, que é ativada rapidamente pela Ang II (Herrera e col., 2010). Neste trabalho não observamos que a integrina $\alpha 1\beta 1$ modula diretamente os efeitos Ang II

através da PKC α , no entanto podemos sugerir que isso ocorra. Vimos que tanto na fosforilação de FAK quanto na colocalização de actina-ILK, a inibição de PKC α levou a resultados semelhantes aos observados com a Obtustatina ao bloquear a integrina $\alpha 1\beta 1$ (figuras 27 e 28). Além disso, vimos que a Obtustatina foi capaz de inibir a produção de ERO em CMLV estimuladas com Ang II (figura 29), sugerindo que a integrina $\alpha 1\beta 1$ poderia ativar PKC α que por sua vez induziria a produção de ERO. Por fim, nossos resultados mostram que a integrina $\alpha 1\beta 1$ foi capaz de modular importantes funções de CMLV ativadas pela Ang II, tais como a migração e proliferação, indicando a importância desta integrina como possível alvo farmacológico para o tratamento de doenças cardiovasculares.

Além da importância da integrina $\alpha 1\beta 1$ na modulação do efeito da Ang II em CMLV, também averiguamos a importância da ILK na sinalização intracelular associada a esse receptor de adesão. A ILK é bem descrita por possuir propriedades de proteína adaptadora e também de tirosina quinase (Brakebusch e Fässler, 2003; Wickström e col., 2010). Recentemente foi visto que a migração de HUVEC pode ser induzida através da sinalização pela ILK (Zhang e col., 2011) e Esfandiarei e col (2010) mostraram que o PDGF é capaz de induzir a migração e promove o rearranjo do citoesqueleto de actina de CMLV através da ILK. Vale ressaltar que até o momento nenhum trabalho foi capaz de mostrar se a ILK seria a ligação entre um GPCR e integrina, ou seja, GPCR ativa ILK, que por sua vez ativa integrina; ou se a ILK é somente ativada por integrinas. Ou até mesmo as duas hipóteses podem ser válidas.

Shen e col. (2011) tentaram elucidar o real papel da ILK através da criação de camundongos “knockouts” para ILK em CMLV, entretanto os animais não sobreviveram, pois tiveram seu desenvolvimento vascular totalmente comprometido. Estes dados estão em conformidade com um estudo anterior, que mostrou que a ILK é essencial para a formação da vasculatura (Kogata e col., 2009).

Neste trabalho hipotetizamos que a ILK tenha um papel como proteína adaptadora em momentos iniciais de ativação da CMLV, estando associada à FAK. No momento em que a FAK vai sendo fosforilada a ILK se dissocia da FAK e atua como proteína quinase, podendo fosforilar diretamente AKT no resíduo serina 473 (Wickström e col., 2010) e induzir diretamente a degradação de p21. Embora não possamos inativar a ILK devido à falta de um inibidor farmacológico, podemos inferir que a ILK esteja envolvida nos efeitos modulados pela integrina $\alpha 1\beta 1$, pois a partir do momento de sua dissociação com a FAK (figura 31), aos 30 min, começamos a observar a fosforilação de AKT (figura 32.A). Outro dado que

corroborar nossa hipótese é a degradação de p21, observado após 24 h de tratamento (figura 32.B). Em suma, a ideia proposta por nosso estudo é que a ILK em momentos iniciais atua como uma proteína adaptadora, estando associada à FAK e contribuindo para a formação inicial de pontos de adesão focal. A posteriori, a ILK se dissocia da FAK e ainda presente nas extremidades da célula (associada à actina) desenvolve sua atividade de tirosina quinase, ativando diretamente AKT, degradando p21 e podendo inibir GSK3 (não visto neste trabalho).

Em desacordo com nosso trabalho e demais outros estudos, Ho e col. (2008) mostraram que após a indução de lesão endotelial em camundongos ocorreu uma diminuição na expressão de ILK em CMLV o que ocorreu paralelamente à migração e proliferação destas células, sugerindo que a ILK regula negativamente essas funções em CMLV. A princípio este é o único dado conflitante ao restante da literatura, entretanto, vale ressaltar que talvez no modelo utilizado pelos autores a ativação de CMLV não tenha sido modulada pela ILK.

Neste trabalho mostramos que a Ang II é capaz de aumentar a expressão de ILK em CMLV através da integrina $\alpha 1\beta 1$ e também mostramos que esta integrina é capaz de modular os efeitos da Ang II sobre a dinâmica da ILK (colocalização com actina e desassociação da FAK). Finalmente, sugerimos que a ILK, através da integrina $\alpha 1\beta 1$, pode modular os efeitos da Ang II em CMLV sobre a ativação de AKT e degradação de p21.

5 CONCLUSÃO

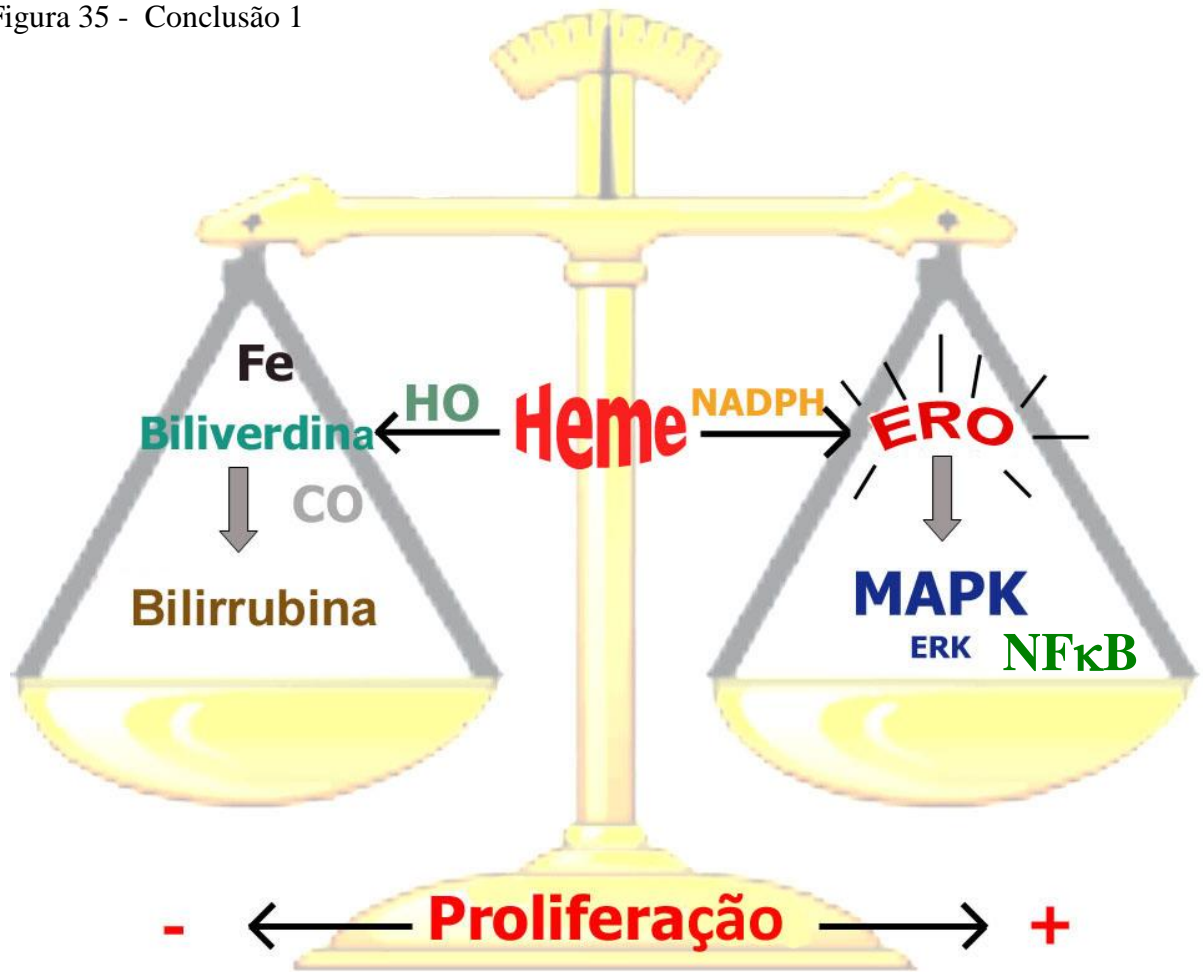
5.1 Conclusão 1ª parte

Este trabalho mostrou de modo consistente que o heme é capaz de induzir importantes funções em CMLV. Esses efeitos são modulados positivamente pela geração de ERO via NADPH oxidase, o que por sua vez é capaz de ativar vias de sinalização redox-sensíveis, culminando na ativação de CMLV. Por outro lado, este efeito é elegantemente contra-regulado pelo sistema HO, que é capaz de degradar o heme, gerando metabólitos que podem atuar de forma antioxidante e anti-proliferativa. Portanto, o balanço entre os sistemas NADPH oxidase e HO é que vai modular o efeito do heme em CMLV. A figura 35 ilustra o efeito dual do heme.

5.2 Conclusão 2ª parte

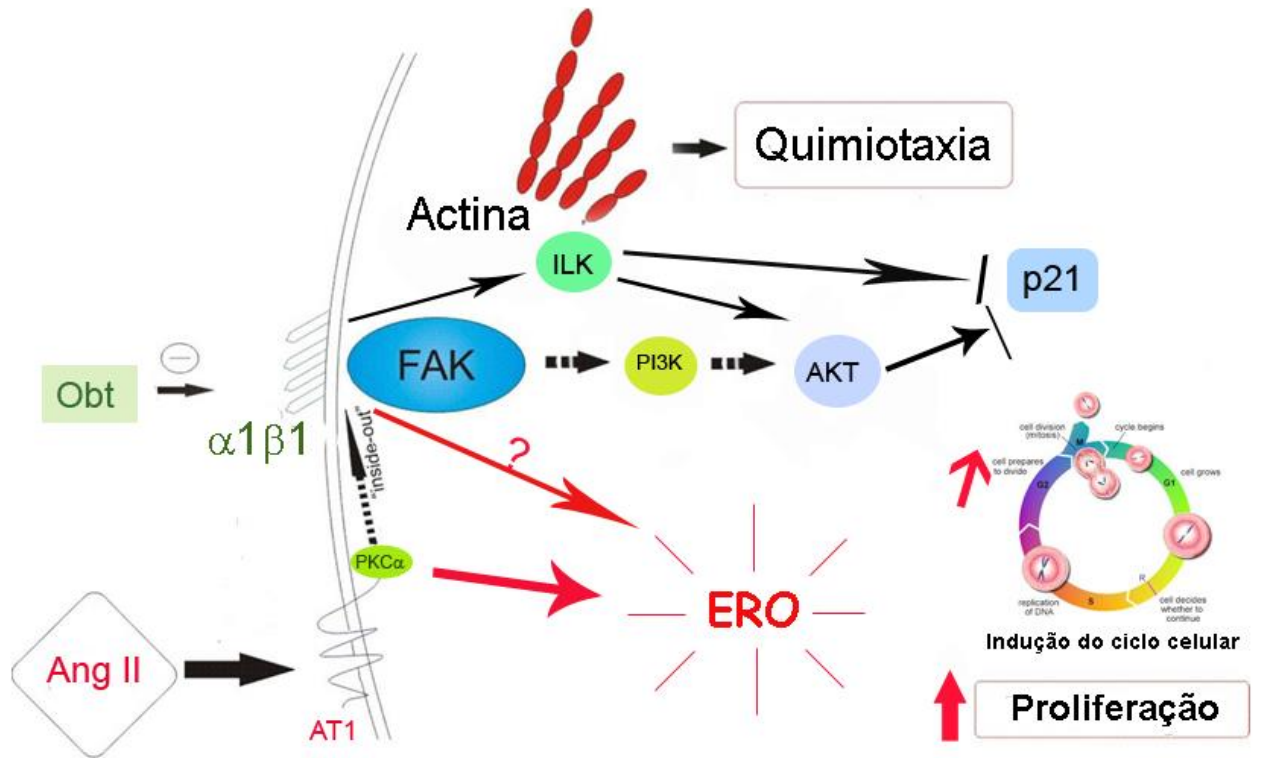
Neste estudo vimos que a Ang II induz importantes funções em CMLV através da integrina $\alpha 1\beta 1$. Esses dados apontam a integrina $\alpha 1\beta 1$ como importante integrina moduladora dos efeitos de um receptor acoplado à proteína G, AT1. Também observamos que a integrina $\alpha 1\beta 1$ é capaz de modular a expressão da ILK e sugerimos que seu envolvimento no efeito da Ang II em CMLV seja modulado pela ILK. Esses dados apontam a ILK como outra importante proteína que pode ser utilizada como alvo terapêutico em doenças cardiovasculares, uma vez que sua atividade pode ser modulada em comum por diferentes integrinas. Esquematizando a proposta de nosso estudo temos a figura 36.

Figura 35 - Conclusão 1



Legenda: Efeito contra-regulatório entre o sistema NADPH oxidase e HO, ativados pelo heme.

Figura 36 - Conclusão 2



Legenda: Modulação pela integrina $\alpha 1\beta 1$ do efeito da Ang II em CMLV.

REFERÊNCIAS

- Adler V., Yin Z., Tew K.D., Ronai Z. Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. *Oncogene*. 1999 18:6104-11.
- Amersi F., Buelow R., Kato H., Ke B., Coito A.J., Shen X.D, et al. Upregulation of heme oxygenase-1 protects genetically fat Zucker rat livers from ischemia/reperfusion injury. *J. Clin. Invest*. 1999 104:1631-9.
- Arruda M.A., Barcellos-de-Souza P., Sampaio A.L., Rossi A.G., Graça-Souza A.V., Barja-Fidalgo C. NADPH oxidase-derived ROS: key modulators of heme-induced mitochondrial stability in human neutrophils. *Exp. Cell. Res*. 2006 nov 15;312(19):3939-48.
- Aviram M., Rosenblat M., Etzioni A., Levy R. Activation of NADPH oxidase required for macrophage-mediated oxidation of low-density lipoprotein. *Metabolism*. 1996 Sep;45(9):1069-79.
- Balla G., Jacob H.S., Eaton J.W., Belcher J.D., Vercellotti G.M. Hemin: a possible physiological mediator of low density lipoprotein oxidation and endothelial injury. *Arterioscler Thromb*. 1991 Nov-Dec;11(6):1700-1711.
- Bellner L., Martinelli L., Halilovic A., Patil K., Puri N., Dunn M.W., Regan R.F. e col.. Heme oxygenase-2 deletion causes endothelial cell activation marked by oxidative stress, inflammation, and angiogenesis. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. Dec 2009 331(3):925-932.
- Belcher J.D., Bryant C.J., Nguyen J., Bowlin P.R., Kielbik M.C., Bischof J.C., Hebbel R.P. e col.. Transgenic sickle mice have vascular inflammation. *Blood* 2003 201:3953-3959.
- Bornfeldt K., Raines E.W., Nakano T., Graves L.M., Krebs E., Ross R.. Insulin-like Growth Factor-I and Platelet-derived Growth Factor-BB Induce Directed Migration of Human Arterial Smooth Muscle Cells via Signaling Pathways That Are Distinct from Those of Proliferation. *J. Clin. Invest*. 1994 93:1266-1274.
- Bradford M.M.. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 1976 72, 248-254.
- Brakebusch C., Fässler R. The integrin-actin connection, an eternal love affair. *EMBO J*. 2003 May 15;22(10):2324-33.
- Brouard S., Otterbein L.E., Anrather J., Tobiasch E., Bach F.M., Choi A.M., Soares M.P. Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. *J. Exp. Med*. 2000 192:1015-1026.
- Brouard S., Berberat P.O., Tobiasch E., Seldon M.P., Bach F.H., Soares M.P. Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide requires the activation of transcription factor NF-kappa B to protect endothelial cells from tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem*. 2002 277:17950-17961.
- Burgering B.M. e Coffey P.J. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature*. 1995 17;376(6541):599-602.

- Campbell I.D. e Humphries M.J. Integrin structure, activation, and interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011 Mar 1;3(3).
- Cadenas E.. Biochemistry of oxygen toxicity. *Ann. Rev. Biochem.* 1989 58:79-110.
- Cave A.. Selective targeting of NADPH oxidase for cardiovascular protection. *Curr Opin Pharmacol.* 2009 Apr;9(2):208-213.
- Cecchetti A., Rocchiccioli S., Boccardi C., Citti L.. Vascular smooth-muscle-cell activation: proteomics point of view. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2011 288:43-99.
- Chang T., Wu L., Wang R.. Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation by chronic hemin treatment. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2008 Sep;295(3):H999-H1007.
- Chen H.C. e Guan J.L.. Association of focal adhesion kinase with its potential substrate phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994 91, 10148-10152.
- Cheng T. O.. Hippocrates and cardiology. *American Heart Journal* 2001 141:173-83.
- Clark E.A. e Brugge J.S.. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science.* 1995 Apr 14;268(5208):233-9.
- Davenpeck K.L., Marcinkiewicz C., Niculescu D.W.R., Shi Y., Martin J.L., Zalewski A.. Regional Differences in Integrin Expression Role of $\alpha 5\beta 1$ in Regulating Smooth Muscle Cell Functions. *Circ Res.* 2001 88:352-358.
- Diet F., Pratt R.E., Berry G.J., Momose N., Gibbons G.H., Dzau V.J.. Increased accumulation of tissue ACE in human atherosclerotic coronary artery disease. *Circulation.* 1996 1996;94:2756 –2767.
- Dubey R.F. e Jackson E.K., Luscher T.F.. Nitric Oxide Inhibits Angiotensin II-induced Migration of Rat Aortic Smooth Muscle Cell - Role of Cyclic-Nucleotides and Angiotensin1 Receptors. *J. Clin. Invest.* 1995. 96:141-149.
- Dworakowski R., Anilkumar N., Zhang M., Shah A.M.. Redox signalling involving NADPH oxidase-derived reactive oxygen species. *Biochem Soc Trans.* 2006 34:960-964.
- Egidius H.J., Heerkens, Ashley S., Izzard, Anthony M.. Heagerty Integrins, Vascular Remodeling, and Hypertension. *Hypertension.* 2007 49;1-4.
- Esfandiarei M., Yazdi S.A., Gray V., Dedhar S., van Breemen C.. Integrin-linked kinase functions as a downstream signal of platelet-derived growth factor to regulate actin polymerization and vascular smooth muscle cell migration. *BMC Cell Biol.* 2010 Feb 23;11:16.
- Fadeel B. e Kagan V.E.. Apoptosis and macrophage clearance of neutrophils: regulation by reactive oxygen species. *Redox. Rep.* 2003 8(3):143-150.

Figueiredo R.T., Fernandez P.L., Mourao-Sa D.S., Porto B.N., Dutra F.F., Alves L.S., Oliveira M.F. e col.. Characterization of heme as activator of Toll-like receptor 4. *J Biol Chem.* 2007 Jul 13;282(28):20221-9.

Flinder L.I., Timofeeva O.A., Rosseland C.M., Wierød L., Huitfeldt H.S., Skarpen E.. EGF-induced ERK-activation downstream of FAK requires rac1-NADPH oxidase. *J Cell Physiol.* 2011 Sep;226(9):2267-78.

Fruman D.A. e Cantley L.C.. Phosphoinositide 3-kinase in immunological systems. *Semin Immunol.* 2002 14(1):7-18.

Fuchs A., Dagher M.C., Vignai P.V.. Mapping of the domain of interaction of p40phox with both p47phox and p67phox, of the neutrophil oxidase complex using the two-hybrid system. *J. Biol. Chem.* 1995 270 (11): 5695-5697.

Garg U.C. e Hassid A.. Nitric-oxide generating vasodilators and 8-Bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular SMCs. *J. Clin. Invest.* 1989 83:1774-1777.

Gofman J.W.. Blood lipoproteins and atherosclerosis. *J Clin Invest.* 1950 29(6):815-6.

Gonçalves M.S., Queiroz I.L., Cardoso S.A., Zanetti A., Strapazoni A.C., Adorno E., Albuquerque A. e col.. Interleukin 8 as a vaso-occlusive marker in Brazilian patients with sickle cell disease. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2001 34:1309-1313.

Gould R.J., Polokoff M.A., Friedman P.A., Huang T-F., Holt J.C., Cook J.J., Niewiarowski S.. Disintegrins: A family of integrin inhibitory proteins from viper venom. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1990 195, 168-171.

Graça-Souza A.V., Arruda M.A., de Freitas M.S., Barja-Fidalgo C., Oliveira P.L.. Neutrophil activation by heme: implications for inflammatory processes. *Blood Jun* 2002 1;99(11):4160-4165.

Graf K., Xi X.P., Yang D., Fleck E., Hsueh W.A., Law R.E.. Mitogen-activated protein kinase activation is involved in platelet-derived growth factor-directed migration by vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1997 Jan;29(1 Pt 2):334-339.

Griendling K. K., Sorescu D., Ushio-Fukai M.. NAD(P)H Oxidase : Role in Cardiovascular Biology and Disease. *Circulation Research* 2000 86;494-501.

Haddad J.J.. Redox and oxygen-sensitive transcription factors in the regulation of oxidant-mediated lung injury: role for nuclear factor-kappaB. *Crit. Care.* 2002 Dec;6(6):481-490.

Halliwell B. e Gutteridge J.M.C.. *Free Radicals in Biology and Medicine* 4th Edition. Oxford University Press. 2007.

Hansson G. K. e Libby P.. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nature Reviews Immunology* 2006 6, 508-519.

Hasan R.N. e Schafer A.I.. Hemin upregulates Egr-1 expression in vascular smooth muscle cells via reactive oxygen species ERK-1/2-Elk-1 and NF-kappaB. *Circ. Res.* 2008 Jan 4;102(1):42-50.

Hauck C.R., Hsia D.A., Schlaepfer D.D.. Focal adhesion kinase facilitates platelet-derived growth factor-BB-stimulated ERK2 activation required for chemotaxis migration of vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 2000 29;275(52):41092-9.

Heller E.A., Liu E., Tager A.M., Sinha S., Roberts J.D., Koehn S.L., Libby P., Aikawa E.R., Chen J.Q., Huang P., Freeman M.W., Moore K.J., Luster A.D., Gerszten R.E.. Inhibition of atherosclerosis in BLT1-deficient mice reveals a role for LTB4 and BLT1 in smooth muscle cell recruitment. *Circulation* 2005 26;112(4):578-86.

Herrera M., Silva G.B., Garvin J.L. Angiotensin II stimulates thick ascending limb superoxide production via protein kinase C(α)-dependent NADPH oxidase activation. *J Biol Chem.* 2010 Jul 9;285(28):21323-8.

Ho B., Hou G., Pickering J.G., Hannigan G., Langille B.L., Bendeck M.P. Integrin-linked kinase in the vascular smooth muscle cell response to injury. *Am J Pathol.* 2008 Jul;173(1):278-88.

Hu Y., Cheng L., Hochleitner B.W., Xu Q. Activation of mitogen-activated protein kinases (ERK/JNK) and AP-1 transcription factor in rat carotid arteries after balloon injury. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997 Nov;17(11):2808-2816.

Hynes R.O.. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* 1992 3;69(1):11-25.

Jones J.I., Prevette T., Gockerman A., Clemmons D.R.. Ligand occupancy of the alpha-V-beta3 integrin is necessary for smooth muscle cells to migrate in response to insulin-like growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 19;93(6):2482-7.

Jorgensen E., Kelbaek H., Helqvist S., Jensen G.V., Saunamaki K., Kastrup J., Havndrup O. e col.. Predictors of coronary in-stent restenosis: importance of angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and treatment with angiotensin-converting enzyme inhibitors. *J Am Coll Cardiol.* 2001 1;38(5):1434-9.

Kawakami N., Takemasa H., Yamaguchi T., Hayakawa T., Shimohama S., Fujimoto S.. Indication for a protein kinase C-independent pathway for NADPH activation in human neutrophil. *Arch. Biochem. Biophys.* 1998 349 (1):89-94.

Keele K.D.. News, Notes and Queries, XXIII International Congress of the History of Medicine, London 1972 304-308.

Kim C. e Dinauer M.C.. Rac2 is an essential regulator of neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activation in response to specific signaling pathways. *J. Immunol.* 2001 166(2):1223-1232.

Kogata N., Tribe R.M., Fässler R., Way M., Adams R.H.. Integrin-linked kinase controls vascular wall formation by negatively regulating Rho/ROCK-mediated vascular smooth muscle cell contraction. *Genes Dev.* 2009 Oct 1;23(19):2278-83.

Kranzhofer R., Schmidt J., Pfeiffer C.A.H., Hagl S., Libby P., Kubler W.. Angiotensin Induces Inflammatory Activation of Human Vascular Smooth Muscle Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999 19:1623-1629.

Ley K., Miller Y.I., Hedrick C.C.. Monocyte and macrophage dynamics during atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011 Jul;31(7):1506-16.

Libby P.. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002 19-6;420(6917):868-74.

Libby P.. Inflammatory markers are useful risk assessment tools. *Am J Manag Care* 2003 Aug;Suppl:6-7.

Libby P., Okamoto Y., Rocha V.Z., Folco E.. Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice. *Circ J.* 2010 Feb;74(2):213-20.

Majack R.A.. Beta-type transforming growth factor specifies organizational behavior in vascular smooth muscle cell cultures. *J Cell Biol.* 1987 Jul;105(1):465-71.

Martin K.R. e Barret J.C.. Reactive oxygen species as double-edged swords in cellular processes: low-dose cell signaling versus high-dose toxicity. *Human Exp. Toxicol.* 2002 21(2):71-75.

Melley D.D., Evans T.W., Quinlan G.J.. Redox regulation of neutrophil apoptosis and the systemic inflammatory response syndrome. *Clin. Sci.* 2005 108(5): 413-424.

Moraes J.A., Assreuy J., Canneti C., Barja-Fidalgo C.. Effect of LTB4 on Smooth Muscle Cell functions. *Atherosclerosis.* 2010 Oct;212(2):406-13.

Miller W.L. e Burnett Jr. J.C.. Blood vessel physiology and pathophysiology. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 1990 16: 251-260.

Miller Y.I., Shaklai N.. Kinetics of hemin distribution in plasma reveals its role in lipoprotein oxidation. *Biochim Biophys Acta.* 1999 Jul 7;1454(2):153-164.

Moreton J.R.. Atherosclerosis and Alimentary Hyperlipemia. *Science* 1947 29;106(2748):190-191.

Munro J.M. e Cotran R.S.. The pathogenesis of atherosclerosis: atherogenesis and inflammation. *Lab Invest.* 1988 58:249 –261.

Nakao A., Murase N., Ho C., Toyokawa H., Billiar T.R., Kanno S.. Biliverdin administration prevents the formation of intimal hyperplasia induced by vascular injury. *Circulation* 2005 Jul 26;112(4):587-591.

Olgun A., Akman S., Erbil M.K.. The role of RBC destruction in vascular regions with high turbulence on atherosclerosis. *Med Hypotheses* 2004 63(2):283-284.

- Ollinger R., Bilban M., Erat A., Froio A., McDaid J., Tyagi S., Csizmadia E. e col.. Bilirubin: a natural inhibitor of vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation* 2005 Aug 16;112(7):1030-1039.
- Ollinger R., Yamashita K., Bilban M., Erat A., Kogler P., Thomas M., Csizmadia E. e col.. Bilirubin and biliverdin treatment of atherosclerotic diseases. *Cell Cycle*. 2007 Jan 1;6(1):39-43.
- Otterbein L.E. e Choi A.M.. Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. *Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol.* 2000 279:L1029-L1037.
- Paravicini T.M., Touyz R.M.. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care*. 2008 Feb;31 Suppl 2:S170-180.
- Patel D.N., King C.A., Bailey S.R., Holt J.W., Venkatachalam K., Agrawal A., Valente A.J. e col.. Interleukin-17 stimulates C-reactive protein expression in hepatocytes and smooth muscle cells via p38 MAPK and ERK1/2-dependent NF-kappaB and C/EBPbeta activation. *J Biol Chem*. 2007 14;282(37):27229-38.
- Peterson S.J., Frishman W.H., Abraham N.G.. Targeting heme oxygenase: therapeutic implications for diseases of the cardiovascular system. *Cardiol. Rev.* 2009 May-Jun;17(3):99-111.
- Peyton K.J., Reyna S.V., Chapman G.B., Ensenat D., Liu X.M., Wang H., Schafer A.I., Durante W.. Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide is an autocrine inhibitor of vascular smooth muscle cell growth. *Blood* 2002 Jun 15;99(12):4443-4448.
- Porto B.N., Alves L.S., Fernández P.L., Dutra T.P., Figueiredo R.T., Graça-Souza A.V., Bozza M.T.. Heme induces neutrophil migration and reactive oxygen species generation through signaling pathways characteristic of chemotactic receptors. *J Biol Chem*. 2007 Aug 17;282(33):24430-6.
- Quinn M.T., Parthasarathy S., Fong L.G., Steinberg D.. Oxidatively modified low density lipoproteins: A potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987 Vol. 84, pp. 2995-2998.
- Ravaux L., Denoyelle C., Monne C., Limon I., Raymondjean M., El Hadri K.. Inhibition of interleukin-1beta-induced group IIA secretory phospholipase A2 expression by peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in rat vascular smooth muscle cells: cooperation between PPARbeta and the proto-oncogene BCL-6. *Mol Cell Biol*. 2007 27(23):8374-87.
- Reiske H.R., Kao S.C., Cary L.A., Guan J.L., Lai J.F., Chen H.C.. Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase in focal adhesion kinase-promoted cell migration. *J Biol Chem*. 1999 30;274(18):12361-6.
- Ross R. e Glomset J.A.. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science* 1973 29;180(93):1332-9.

Ryter S.W. e Tyrrel R.M.. The heme synthesis and degradation pathways: Role in oxidant sensitivity. *Free Rad. Biol. Med.* 2000 28:289-309.

Saini H. K., Xu Y.J., Arneja A.S., Tappia P.S., Dhalla N.S.. Pharmacological basis of different targets for the treatment of atherosclerosis. *J. Cell. Mol. Med.* 2005 Vol 9, No 4, pp. 818-839.

Sato K., Balla J., Otterbein L., Smith R.N., Brouard S., Lin Y., Csizmadia E. e col.. Carbon monoxide generated by heme-oxygenase 1 suppresses the rejection of mouse-to-rat cardiac transplants. *Journal of Immunol.* 2001 166:4185-4194.

Schönbeck U., Gerdes N., Varo N., Reynolds R.S., Horton D.B., Bavendiek U., Robbie L. e col.. Oxidized low-density lipoprotein augments and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors limit CD40 and CD40L expression in human vascular cells. *Circulation.* 2002 Dec 3;106(23):2888-93.

Schwartz M.A., Schaller M.D., Ginsberg M.H.. Integrins: emerging paradigms of signal transduction. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1995 11:549-99

Shen D., Li J., Lepore J.J., Anderson T.J., Sinha S., Lin A.Y., Cheng L. e col.. Aortic aneurysm generation in mice with targeted deletion of integrin-linked kinase in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1011 Sep 2;109(6):616-28.

Simionatto C.S., Cabal R., Jones R.L., Galbraith R.A. Thrombophlebitis and disturbed hemostasis following administration of intravenous hematin in normal volunteers. *Am. J. Med.* 1988 85:538-540.

Smith A. e Morgan W.T.. Hemopexin-mediated heme uptake by liver. Characterization of the interaction of heme-hemopexin with isolated rabbit liver plasma membranes. *J. Biol. Chem.* 1984 259:12049-12053.

Solovey A.A., Solovey A.N., Harkness J., Hebbel R.P.. Modulation of endothelial cell activation in sickle cell disease: a pilot study. *Blood* 2001 97:1937-1941.

Stocker R.. Antioxidant activities of bile pigments. *Antioxid. Redox Signal.* 2004 Oct;6(5):841-849.

Stocker R., Yamamoto Y., McDonagh A.F., Glazer A.N., Ames B.N.. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 1987 Feb 27;235(4792):1043-1046.

Streuli C.H. e Akhtar N.. Signal co-operation between integrins and other receptor systems. *Biochem J.* 200 Mar 15;418(3):491-506.

Sundaram M.V.. RTK/Ras/MAPK signaling. *WormBook* 2006 Feb 11:1-19.

Tappel A.L.. Unsaturates lipide oxidation catalysed by hematin compounds. *J. Biol. Chem.* 1955 217:721-733.

van der Vliet A., O'Neill C.A., Halliwell B., Cross C.E., Kaur H.. Aromatic hydroxylation and nitration of phenylalanine and tyrosine by peroxynitrite. Evidence for hydroxyl radical production from peroxynitrite. *FEBS Lett.* 1994 339(1-2):89-92.

Varadarajulu J., Laser M., Hupp M., Wu R., Hauck C.R.. Targeting of $\alpha(v)$ integrins interferes with FAK activation and smooth muscle cell migration and invasion. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 331(2):404-12.

Wagener F.A., Volk H.D., Willis D., Abraham N.G., Soares M.P., Adema G.J., Figdor C.G.. Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation. *Pharmacol. Rev.* 2003 55:551-571.

Wang Z. e Newman W.H.. Smooth muscle cell migration stimulated by interleukin 6 is associated with cytoskeletal reorganization. *J Surg Res.* 2003 15;111(2):261-6.

Watanabe T., Yasue A., Fujihara S., Tanaka E.. Periostin regulates MMP-2 expression via the $\alpha v \beta 3$ integrin/ERK pathway in human periodontal ligament cells. *Arch Oral Biol.* 2011 Aug 30.

Weber C., Zerneck A., Libby P.. The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models. *Nat Rev Immunol.* 2008 802-815.

Wickström S.A., Lange A., Montanez E., Fässler R.. The ILK/PINCH/parvin complex: the kinase is dead, long live the pseudokinase! *EMBO J.* 2010 Jan 20;29(2):281-91.

Willoughby D.A., Moore A.R., Colville-Nash P.R., Gilroy D.. Resolution of inflammation. *Int. J. Immunopharmacol.* 2000 22:1131-1135.

Yee K.O., Ikari Y., Bodary S., Schwartz S.M.. Kistrin inhibits human smooth muscle cell interaction with fibrin. *Thromb Res.* 2000 Jan 15;97(2):39-50.

Zhang H., Han Y., Tao J., Liu S., Yan C., Li S.. Cellular repressor of E1A-stimulated genes regulates vascular endothelial cell migration by The ILK/AKT/mTOR/VEGF(165) signaling pathway. *Exp Cell Res.* 2011 Sep 9.

APÊNDICE - Heme modulates smooth muscle cell functions via NADPH oxidase: a counter-regulatory role for heme oxygenase system

Atherosclerosis. 2012 Oct;224(2):394-400. Heme modulates smooth muscle cell functions via NADPH oxidase: a counter-regulatory role for heme oxygenase system

HEME MODULATES SMOOTH MUSCLE CELL FUNCTIONS VIA NADPH OXIDASE:
A COUNTER-REGULATORY ROLE FOR HEME OXYGENASE SYSTEM

Moraes JA

Running title: HEME MODULATES SMOOTH MUSCLE CELL FUNCTIONS

João Alfredo Moraes¹; Pedro Barcellos-de-Souza¹, Genílson Rodrigues¹, Vany Nascimento-Silva¹, Simone Vargas¹, Jamil Assreuy²; Maria Augusta Arruda^{1,3}; Christina Barja-Fidalgo¹

1 Departamento de Farmacologia – Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ- Rio de Janeiro – RJ – Brazil

2 Departamento de Farmacologia – Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC – Florianópolis – SC – Brazil

3 Vice-Diretoria de Ensino, Pesquisa e Inovação – Farmanguinhos, FIOCRUZ

HEME MODULATES SMOOTH MUSCLE CELL FUNCTIONS

Corresponding author:

Christina Barja-Fidalgo – Departamento de Farmacologia, Instituto de Biologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Av. 28 de Setembro 87 fds, Rio de Janeiro, RJ , 20550-030, Brazil.

Tel: +55(21)2587-6398

Fax: +55(21)2587-6398

E-mail: barja-fidalgo@uerj.br

Word count of body: 5102

Word count of abstract: 195

Total number of figures: 6

Abstract

Accumulation of vascular smooth muscle cells (VSMC) in response to inflammatory stimuli is a key event in atherogenesis, which commonly occurs in sinuous vessels with turbulent blood flow what leads to hemolysis and consequent free heme accumulation, a known pro-oxidant and proinflammatory molecule.

Objective: In this work, we investigated the effects of free heme on VSMC, and the molecular mechanisms underlying this process.

Methods and Results: Free heme induces a concentration-dependent migration and proliferation of VSMC which depends on the production of reactive oxygen species (ROS) derived from NADPH oxidase (NADPHox) activity. Additionally, heme activates redox-sensitive proliferation-related signaling routes, such as Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) and NF κ B, and induces heme oxygenase-1 (HO-1) expression. NADPHox-dependent proliferative effect of heme seems to be endogenously modulated by HO since the pretreatment of VSMC with HO inhibitors potentiates heme-induced proliferation and, in parallel, increases ROS production. These effects were no longer observed in the presence of heme metabolites, CO and biliverdin.

Conclusion: The data indicate that VSMC activation induced by heme is endogenously modulated by a critical counter-regulatory crosstalk between NADPHox and HO systems.

Key words: Heme, NADPH oxidase, Heme Oxygenase, redox-sensitive signaling, smooth muscle cell.

Introduction

Cardiovascular diseases represent the major cause of mortality and morbidity in western countries. Among these conditions, atherosclerosis is the most prominent one. The first step in atherogenesis is the vascular inflammation, which is characterized by oxidized LDL infiltration and foam cell formation. This process is accompanied by endothelial cell lesion, extracellular matrix exposure, platelets aggregation, adhesion of leukocytes and, mainly, by vascular smooth muscle cell (VSMC) accumulation [1, 2]. The VSMC dysfunction is characterized by an exacerbation of cell migration and proliferation, events which are amplified through the release of inflammatory mediators [3 – 9]. VSMC dysfunction has been implicated in the pathogenesis not only of atherosclerosis, but also of other cardiovascular pathological situations, such as restenosis. The VSMC exacerbated activation is a key event in the fibrous cap formation (atherosclerosis) or in the neointima formation (restenosis). Notably, these cardiovascular diseases occur mainly in sinuous vessels, and are associated with turbulent blood flow, which may lead to hemolysis and consequent release of free heme [10]. Our group has characterized heme as a strong pro-inflammatory molecule, whose effects are mediated mainly by ROS derived from NADPHox complex activation [11 - 13]. On the one hand, an increased ROS production (oxidative stress) has been implicated in various pathologies, including cardiovascular disorders [14, 15]. On the other hand, ROS production can also lead to the activation of redox-sensitive signaling pathways that influence many physiological processes [16].

Besides its ability in activating the NADPHox system, heme is also able to induce the HO system, which is responsible for its metabolization into carbon monoxide (CO), iron, biliverdin (which is converted to bilirubin by biliverdin reductase). This system is comprised of the constitutive isoform, HO-2, and by the inducible isoform, HO-1 [17]. HO-2 constitutively metabolizes endogenous heme and evidences have shown that its deletion increases ROS accumulation [18]. HO-1 is a stress-responsive enzyme, whose induction by free heme and other stimuli, such as pro-inflammatory molecules, increases the rate of free heme catabolism. HO by-products, due to their anti-oxidant properties, can act as cytoprotective agents [19 – 21].

In this scenario, free heme emerges as a putative molecule able to activate key molecular mechanisms in vascular cells that contribute to several cardiovascular disorders. In this work we aimed to elucidate the putative role of free heme in VSMC functions and the mechanisms underlying its effects.

Methods

Reagents

Angiotensin II (Ang II), diphenyleneiodonium (DPI), HEPES, trypsin, EDTA, bovine serum albumin (BSA), PMSF, benzamidine, leupeptin, soybean trypsin inhibitor and Tricarbonyldichlororuthenium (II) dimer (CO donor) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO USA). Dihydrorhodamine 123 (DHR) and 5-(and-6)- chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl-ester (CM-H₂DCFDA) were obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA USA). Heme, Tin protoporphyrin IX (SnPP), Zinc protoporphyrin IX (ZnPP IX) Biliverdin and Bilirubin were purchased from Porphyrin Products (Logan, UT USA). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) and fetal calf serum (FCS) were from GIBCO-BRL (Carlsbad, CA USA). All antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA USA). Enhanced chemiluminescence (ECL) system was obtained from Pierce Biotechnology (Rockford, IL USA).

Cell Culture

A7r5 vascular smooth muscle cells obtained of rat thoracic aorta were originally from the American Type Culture Collection (Rockville, MD USA). The cells were cultured in DMEM medium containing 10% FCS, 50 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin, and incubated at 37°C in a 5% CO₂ air atmosphere. The cells were dissociated with 0.1%/0.01% trypsin/EDTA and then seeded into new culture flasks for a maximum of twelve passages.

Cell Migration

Aliquots of 50 µL of A7r5 cells suspension containing 2×10^6 mL in DMEM were seeded in 48 wells modified Boyden chamber with a polycarbonate membrane with 10 µm pores (Neuroprobe, Inc.; Gaithersburg, MD USA). Some samples were preincubated with antioxidant or specific inhibitors for 30 min before addition to the upper chamber (50 µL). Heme (10 µM) or Ang II (100 nM) were added to the lower chamber (27 µL). After 4 h in the incubator, cells that had migrated to the lower membrane surface were fixated and stained by Giemsa. Cells adherent to the bottom face of the membranes were counted by optical microscopy (400x magnification). In each well, five randomly chosen visual fields were blindly counted, and the mean value was used as a measure of VSMC migration. In each experiment twelve wells containing medium alone were used in the lower chamber as a negative control.

Cell proliferation

10^3 cells were seeded in 96 wells plate for 6 h in DMEM medium containing 10% FCS. After this period the cells were washed three times with PBS and the medium was changed to DMEM containing 1% FCS. On the next day, the medium was replaced by DMEM containing 1% FCS and when indicated, some groups were pretreated with different inhibitors for 30 min and then incubated with heme for 48 h. Thymidine [H^3] was added to all wells 24 h before the end of incubation. After incubation the cells were washed two times with PBS and treated with TCA 10% for 20 min. Cells were then washed two times with PBS and lysated with NaOH 0,2 N. The cellular content was transferred to a dense filter and dried at room temperature overnight. Radioactivity content was assessed in counts per minute (CPM) and results were expressed in fold increase to control.

ROS production

CM-H₂DCFDA assay

5×10^3 cells were seeded in 96 wells plate overnight in DMEM medium containing 10% FCS. The cells were washed three times with PBS and the medium was replaced by DMEM containing 1% FCS for 1 h. After this time the cells were incubated for 30 min with CM-H₂DCFDA (10 μ M). Then the cells were washed with PBS and, when indicated, some groups were pretreated with different inhibitors for 30 min and treated with heme (10 μ M) for different times.

Intracellular ROS levels were measured in VSMC by the CM-H₂DCFDA. This method is based on the oxidation of non-fluorescent CM-H₂DCFDA resulting in the formation of the fluorescent compound 2',7'-dichlorofluorescein (DCF). The fluorescence generated by DCF (DCF-fluorescence) is proportional to the rate of CM-H₂DCFDA oxidation, which is in turn an indicative of the cellular oxidizing activity and intracellular ROS levels. Fluorescence was monitored for different times at excitation and emission wavelengths of 485 nm and 530 nm, respectively, in the Victor X Multilabel plate reader (PerkinElmer, Waltham, MA USA).

Dihydrorhodamine 123 assay

Measurement of ROS generation by DHR - Intracellular ROS production by VSMC cells was measured by oxidation of DHR to rhodamine by ROS. Briefly, VSMC were seeded on 24-well plates at a density of 10^4 cells/well and, after overnight incubation, the medium was replaced by serum-free medium containing DHR (final concentration 50 μ M) and, when indicated, some groups were pretreated with different inhibitors for 30 min and treated with heme (10 μ M) for 1 h. Cells were then washed with phosphate-buffered saline (PBS) before

examination under an Olympus IX71 inverted microscope (Tokyo, Japan) equipped for fluorescence.

Immunocytochemistry

VSMC were plated (8×10^4 cells) on glass coverslips overnight in DMEM containing 10% FCS. The cells were washed three times with PBS and the medium was replaced by serum-free medium. Some groups received pretreatment for 30 min, and then stimulated with Heme ($10 \mu\text{M}$) for an additional 1 h. The monolayers were washed twice with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde / 4% sucrose in PBS for 20 min, and incubated for 30 min with 5% BSA in PBS for non-specific protein blocking. VSMC were then incubated with polyclonal rabbit anti-NF κ B antibody (1:200) overnight at 4°C. Subsequently, the cells were washed three times with PBS and incubated with FITC-conjugated anti-rabbit IgG (1:200) for 1 h at room temperature. Then, VSMC were washed three times with PBS and incubated for 5 minutes with DAPI (1:1000) at room temperature. Coverslips were mounted on a slide with the use of a 20 mM N-propylgalate and 80% glycerol solution in PBS before examination under a microscope (model BX40 Olympus, Tokyo, Japan) equipped for epifluorescence.

Cellular Extract

VSMC were cultured (10^6 cells) on 24 well microtiter plates with DMEM 10% FCS for 24 h. Then the cells were washed with PBS and incubated with serum-free DMEM for 1 h. Groups that received pretreatment were incubated for 30 min, after which the cells were incubated for different times with Heme ($10 \mu\text{M}$). VSMC were lysed in lysis buffer (50 mM HEPES, pH 6.4, 1 mM MgCl_2 , 10 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNase, 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Rnase, 1 mM PMSF, 1 mM benzamidine, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptin and 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ soybean trypsin inhibitor).

Western blot analysis

Total protein content in the cell extracts was determined by the Bradford method [22], except on immunoprecipitates samples. Cell lysates were denatured in sample buffer (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 1% SDS, 5% 2-ME, 10% glycerol, and 0.001% bromophenol blue) and heated in boiling water for 3 min. Samples (50 μg total protein) were resolved by 12% SDS-PAGE and proteins transferred to polyvinylidenedifluoride membranes. Molecular weight standards were run in parallel. Membranes were blocked with Tween-PBS (PBS, 0.01% Tween 20; T-PBS) containing 2% BSA and probed with primary antibody (1:1000) overnight at 4°C. The membranes were rinsed with T-PBS and incubated for 1 h at room temperature with biotin-conjugated secondary antibody (1:10000), followed by incubation with HRP-conjugated streptavidin (1:10000). Immunoreactive proteins were visualized by the ECL

detection. The bands were quantified by densitometry with the use of Photoshop software (Adobe Systems, San Jose, CA).

Statistical analysis

Statistical significance was assessed by one-way ANOVA, followed by Bonferroni's t-test, and $P < 0.05$ was taken as statistically significant. ROS assay (CM-H₂-DCFDA) was analysed by two-way ANOVA, followed by t-student test in each point.

Results

Heme induces VSMC migration and proliferation via NADPHox

Firstly we investigated heme effects on the two mainly VSMC functions usually altered in cardiovascular diseases: migration and proliferation [1, 2]. As can be observed in Figure 1, heme has a potent chemotactic activity for VSMC (Fig. 1A), and is also a potent inducer of VSMC proliferation (Fig.1B). For both functions the effect of heme peaked at 10 μ M, a concentration that can be found during hemolytic episodes. Heme shows effects similar to Ang II for migration, but was more potent than it in inducing VSMC proliferation. Heme effects were shown to be redox-sensitive, since the antioxidant TroloxTM (100 μ M) abrogated heme-induced VSMC migration and proliferation (Figs.1C, 1D).

Accordingly, Figure 2A shows that heme (10 μ M) induces a strong ROS production after 1 h of incubation with VSMC. Corroborating recent studies that showed heme as an inductor of ROS generation via NADPHox in neutrophils [13] and in VSMC [23], the pretreatment of cells with DPI (10 μ M), a NADPHox inhibitor, abrogated heme-induced ROS production in A7r5 VSMC (Fig. 2A). Moreover, DPI strongly inhibited heme-induced VSMC migration (Fig. 2B) and almost blunted the proliferative capability of heme-treated VSMC that reached levels below the controls. (Fig. 2C), indicating that heme effects on VSMC migration and proliferation are modulated by NADPHox.

Heme activates redox-sensitive signaling pathways

Among the redox-sensitive molecules, ERK-2, a member of MAPK family, is of crucial importance to VSMC proliferation and migration [24, 25]. In VSMC pretreated with the ERK-2 inhibitor PD98059 (10 μ M), migration induced by heme was partially inhibited (Fig. 3A) and heme proliferative effect on VSMC was impaired (Fig. 3B). Supporting the data, heme induced ERK-2 phosphorylation in VSMC (Fig. 3C), an effect that was inhibited in cells pre-treated with DPI (Fig. 3C).

NF κ B is another redox-sensitive pathway and a possible target of ERK-2 pathway [26]. NF κ B activity can be evaluated by its translocation to nucleus, where this factor promotes gene transcription. The effect of heme on NF κ B activation was detected 1 h after VSMC stimulation and, similar to ERK-2 phosphorylation, was strongly inhibited by DPI, as was evaluated by immunocytochemistry (NF κ B nuclear translocation densitometry at Fig. 3D and images at Fig. suppl. 1A) and western blotting (Fig. suppl. 1B). We also observed that heme effect on NF κ B activation is MAPK dependent, once PD98059 inhibited NF κ B translocation induced by heme (Fig. 3D and images at Fig. suppl. 1A). The data suggest that NADPHox

activation by heme mediates the activation of redox-sensitive signaling pathways involved in VSMC migration and proliferation.

Heme induces Heme Oxygenase-1 in A7r5 cells.

Heme is endogenously metabolized by HO system, generating carbon monoxide (CO), iron and biliverdin, which can be converted to bilirubin under catalytic activity of biliverdin reductase. In VSMC challenged with heme for 24 h there was no change in the expression of constitutive HO-2 (Fig. 4B). On the other hand, heme induced HO-1 expression in VSMC (Fig. 4A).

Heme Oxygenase activity down-modulates the heme effect

In order to investigate the role of HO system on heme effects, VSMC were treated with the HO pan inhibitor, tin protoporphyrin IX (SnPP- 3 μ M) or with the selective HO-1 inhibitor, zinc protoporphyrin IX (ZnPP- 10 μ M). Figure 5 shows that the inhibition of HO activity by both, SnPP (Fig. 5A) or ZnPP (Fig. 5B), potentiates the effect of heme on VSMC proliferation. Additionally, it was observed that inhibition of HO-1 by ZnPP induced a further increase in heme-induced ROS production (Fig. 5C), suggesting that activation of HO system attenuates the NADPHox-dependent activation of VSMC induced by heme.

Heme metabolites counter-regulate the heme effect

To investigate a possible counter-regulatory effect of HO metabolites on heme-induced proliferation, VSMC were treated with biliverdin (10 μ M), bilirubin (10 μ M) and/ or CO (10 μ M) (Fig. 6A). The metabolites had no effect on the basal neither in heme-induced VSMC proliferation. However, the potentiating effect of HO inhibitors on heme-induced proliferation was impaired when the VSMC were treated with heme metabolites (Fig. 6A). Furthermore, when both systems, NADPHox and HO, were blocked, the effect of heme on VSMC proliferation was abrogated (Fig. 6B). The same was observed when the cells were treated with the antioxidant TroloxTM and SnPP (Fig. 6B), suggesting that the by-products of both systems may act together to modulate heme effect on VSMC.

Discussion

In some regions of vasculature, the increase of the blood turbulence promotes the destruction of fragile or old red blood cells within the vascular compartment, allowing hemoglobin to escape in plasma. Although hemoglobin rapidly binds to serum proteins like haptoglobin, during extensive hemolysis the amount of cell-free hemoglobin exceeds the binding capacities of those hemoglobin-scavenging mechanisms, resulting in intravascular free heme release and accumulation [10].

It has been well demonstrated that heme acts as a double-edged sword. In physiological conditions, as a prosthetic group of hemoproteins, heme is critically important for various biological processes. However, the free heme, released from hemoproteins by oxidative stimuli is pro-oxidant and enhances oxidative stress and inflammation [11, 27]. Recent studies have shown that free heme acts as a danger signal which can induce pro-inflammatory proteins, ROS and redox-sensitive molecules in cultured cardiac resident cells [28]. ROS produced in the vasculature contribute to the pathogenesis of cardiovascular disease states and a critical source of ROS is the vascular NADPHox. The upregulation of this enzyme brings about the oxidative stress underlying atherosclerosis and NADPHox activity has been highlighted as a potential target for pharmacological interventions in cardiovascular diseases [14, 15, 29]. Furthermore, evidences have shown that heme is a potent inductor of LDL oxidation [30, 31] and may contribute to atherogenesis.

It is well known that heme is able to induce NADPHox in different cell types [13, 23]. In this work we demonstrate that heme directly activates VSMC, promoting cell proliferation and migration, suggesting a key role of this molecule in vascular dysfunction observed during hemolytic episodes. These effects of heme are dependent on its pro-oxidant properties, producing ROS through the activation of the NADPHox system, and heme-induced ROS generation triggers redox-sensitive signaling pathways, such as ERK-2 and NF κ B, that are involved in VSMC proliferation. We also investigated a possible heme effect on others MAPK and we observed that heme had no effect on p38 and JNK phosphorylation (Fig. suppl. 2),

HO-1 system acts as potent antioxidant, protecting the vasculature, mainly attenuating the inflammatory response in the vessel wall [32]. Although biliverdin and CO generated by heme metabolism can be toxic at very high concentrations, recent evidence indicates that they are not toxic at physiological concentrations in normal cells, and may have important anti-oxidant and anti-inflammatory properties [21]. Supporting this idea, our data suggest that the induction of HO-1 by heme is a key factor in the defense mechanism, and plays a fundamental role against oxidative processes mediated by heme.

In our experimental model, the challenge of VSMC with heme induces HO-1, without affecting the HO-2 expression. The inhibition of HO activity with a pan-inhibitor SnPP, or with ZnPP, an HO-1 selective inhibitor, potentiates the proliferative effect of heme on VSMC. This effect seems to be a consequence of an increase in heme bioavailability (Fig. suppl. 3), which leads to increasing ROS production, and an impairment in the generation of HO-derived antioxidant products. Accordingly, the addition of CO/ biliverdin and bilirubin

impairs the potentiation of HO-inhibitors on heme proliferative effect. Heme metabolites, due to their antioxidant properties [33, 34], are described to inhibit MAPK pathway in VSMC [23, 35, 36], which confers an important anti-proliferative role for these molecules. Furthermore, heme metabolites [36, 37] were described to induce cell cycle arrest in G0 phase. Corroborating the data, we have also observed (Fig. suppl. 4) that when NADPHox activity was inhibited, heme induces cell cycle arrest in G0 phase, probably via heme metabolites. On the other hand, the inhibition of HO accelerates G2 phase induction by heme (Fig. suppl. 4), supporting an anti-proliferative effect of hemeoxygenase by-products.

A balance between the activity of NADPHox and HO systems modulating different cell functions has been frequently reported. HO-1 induction has potent protective actions against ROS-induced oxidative damage both *in vitro* and *in vivo* [21, 38]. A recent report has demonstrated a link between ROS-generated from NADPHox and HO-1 activation during mesenteric arteries remodeling [39]. Additionally, Bellner & colleagues [18] observed that HO-2 deletion induced NADPHox activation, ROS increase and NFκB activation in endothelial cells.

Interestingly, in our experimental model, heme (10 μM) effect on NADPHox overcomes HO system activity, culminating on VSMC proliferation. Our data contrast with others by Chang and colleagues demonstrating that the treatment of VSMC with heme at 5 μM for 7-21 days inhibited proliferation, via HO-1[40]. On the same direction, Hyvelin et al., showed *in vivo* that HO-1 induced by heme (30 uM – plasma concentration), prevented the in-stent stenosis in rat or rabbit after 28 days [41]. So, we hypothesized that the prolonged treatment with heme promotes a long lasting upregulation of HO system, which overcomes NADPHox activation, leading to inhibition of VSMC proliferation. Additionally, the short half-life of heme (Fig. suppl. 3) may explains the rapid effect on NADPHox and the longtime of the anti-proliferative effect by HO system (HO-1 and by heme metabolites).

Consistently, we showed that heme proliferative effect on VSMC is elegantly regulated through the balance between the activity of NADPHox complex and HO system. Then, heme-induced proliferation of VSMC is endogenously counter-regulated by the HO system, particularly HO-1, which diminishes heme bioavailability as well as generates antioxidant/anti-proliferative metabolites (Fig. suppl. 5). A better knowledge of the underlying mechanisms involved in heme effects on NADPHox and HO systems may lead to the development of new strategies for the treatment of vascular disorders.

Acknowledgements

We would like to thank Renata Tureta for laboratory assistance and Monica Antunes for technical assistance. We also want to express our gratitude to Mr. Andrew W. Bullock for kindly revising this manuscript.

Sources of Funding

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ). Arruda MA is a L'Oréal-UNESCO-ABC For Women In Science National Fellowship – 2008 awardee.

Disclosures

The authors declare no conflict of interest.

References

- [1] Quinn MT, Parthasarathy S, Fong LG, Steinberg D. Oxidatively modified low density lipoproteins: A potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 May;84(9):2995-2998.
- [2] Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002 Dec 19-6;420(6917):868-874.
- [3] Munro JM, Cotran RS. The pathogenesis of atherosclerosis: atherogenesis and inflammation. *Lab Invest*. 1988 Mar;58(3):249-261.
- [4] Miller YI, Smith A, Morgan WT, Shaklai N. Role of hemopexin in protection of low-density lipoprotein against hemoglobin-induced oxidation. *Biochemistry*. 1996 Oct 8;35(40):13112-13117.
- [5] Scott-Burden T, Vanhoutte PM. Regulation of smooth muscle cell growth by endothelium-derived factors. *Tex Heart Inst J*. 1994;21(1):91-7.
- [6] Saini HK, Xu YJ, Arneja AS, Tappia PS, Dhalla NS. Pharmacological basis of different targets for the treatment of atherosclerosis. *J. Cell. Mol. Med*. 2005 Oct-Dec;9(4): 818-839.
- [7] Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nature Reviews Immunology*. 2006 Jul;6(7): 508-519.
- [8] Doran AC, Meller N, McNamara CA. Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008 May;28(5):812-9.
- [9] Moraes J, Assreuy J, Canetti C, Barja-Fidalgo C. Leukotriene B4 mediates vascular smooth muscle cell migration through $\alpha_v\beta_3$ integrin transactivation. *Atherosclerosis*. 2010 Oct;212(2):406-13.
- [10] Olgun A, Akman S, Erbil MK. The role of RBC destruction in vascular regions with high turbulence on atherosclerosis. *Med Hypotheses*. 2004;63(2):283-284.
- [11] Graça-Souza AV, Arruda MA, de Freitas MS, Barja-Fidalgo C, Oliveira PL. Neutrophil activation by heme: implications for inflammatory processes. *Blood*. 2002 Jun 1;99(11):4160-4165.
- [12] Arruda MA, Rossi AG, de Freitas MS, Barja-Fidalgo C, Graça-Souza AV. Heme inhibits human neutrophil apoptosis: involvement of phosphoinositide 3-kinase, MAPK, and NF-kappaB. *J. Immunol*. 2004 Aug;173(3):2023-30.
- [13] Arruda MA, Barcellos-de-Souza P, Sampaio AL, Rossi AG, Graça-Souza AV, Barja-Fidalgo C. NADPH oxidase-derived ROS: key modulators of heme-induced mitochondrial stability in human neutrophils. *Exp Cell Res*. 2006 Nov;15;312(19):3939-3948.
- [14] Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H Oxidase : Role in Cardiovascular Biology and Disease. *Circulation Research*. 2000 Mar 17;86(5):494-501.
- [15] Paravicini TM, Touyz RM. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care*. 2008 Feb;31 Suppl 2:S170-180.
- [16] Pourova J, Kottova M, Voprsalova M, Pour M. Reactive oxygen and nitrogen species in normal physiological processes. *Acta Physiol (Oxf)*. 2010 Jan;198(1):15-35.

- [17] Peterson SJ, Frishman WH, Abraham NG. Targeting heme oxygenase: therapeutic implications for diseases of the cardiovascular system. *Cardiol Rev.* 2009 May-Jun;17(3):99-111.
- [18] Bellner L, Martinelli L, Halilovic A, Patil K, Puri N, Dunn MW, Regan RF, Schwartzman ML. Heme oxygenase-2 deletion causes endothelial cell activation marked by oxidative stress, inflammation, and angiogenesis. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009 Dec;331(3):925-932.
- [19] Stanford SJ, Walters MJ, Hislop AA, Haworth SG, Evans TW, Mann BE, Motterlini R, Mitchell JA. Heme oxygenase is expressed in human pulmonary artery smooth muscle where carbon monoxide has an anti-proliferative role. *Eur J Pharmacol.* 2003 Jul 25;473(2-3):135-41.
- [20] Idriss NK, Blann AD, Lip GY. Hemoxygenase-1 in cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol.* 2008 Sep16; 52(12):971-978.
- [21] Gozzelino R, Jeney V, Soares MP. Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2010;50:323-54.
- [22] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-254.
- [23] Hasan RN, Schafer AI. Hemin upregulates Egr-1 expression in vascular smooth muscle cells via reactive oxygen species ERK-1/2-Elk-1 and NF-kappaB. *Circ Res.* 2008 Jan 4;102(1):42-50.
- [24] Graf K, Xi XP, Yang D, Fleck E, Hsueh WA, Law RE. Mitogen-activated protein kinase activation is involved in platelet-derived growth factor-directed migration by vascular smooth muscle cells. *Hypertension.* 1997 Jan;29(1 Pt 2):334-339.
- [25] Hu Y, Cheng L, Hochleitner BW, Xu Q. Activation of mitogen-activated protein kinases (ERK/JNK) and AP-1 transcription factor in rat carotid arteries after balloon injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997 Nov;17(11):2808-2816.
- [26] Haddad JJ. Redox and oxygen-sensitive transcription factors in the regulation of oxidant-mediated lung injury: role for nuclear factor-kappaB. *Crit Care.* 2002 Dec;6(6):481-490.
- [27] Wagener FA, Volk HD, Willis D, Abraham NG, Soares MP, Adema GJ, Fidgor CG. Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation. *Pharmacol Rev.* 2003 Sep;55(3):551-71.
- [28] Hao K, Hanawa H, Ding L, Ota Y, Yoshida K, Toba K, Ogura M, Ito H, Kodama M, Aizawa Y. Free heme is a danger signal inducing expression of proinflammatory proteins in cultured cells derived from normal rat hearts. *Mol Immunol.* 2011 May;48(9-10):1191-202.
- [29] Cave A. Selective targeting of NADPH oxidase for cardiovascular protection. *Curr Opin Pharmacol.* 2009 Apr;9(2):208-13.
- [30] Balla G, Jacob HS, Eaton JW, Belcher JD, Vercellotti GM. Hemin: a possible physiological mediator of low density lipoprotein oxidation and endothelial injury. *Arterioscler Thromb.* 1991 Nov-Dec;11(6):1700-1711.
- [31] Miller YI, Shaklai N. Kinetics of hemin distribution in plasma reveals its role in lipoprotein oxidation. *Biochim Biophys Acta.* 1999 Jul 7;1454(2):153-164.

- [32] Kim YM, Pae HO, Park JE, Lee YC, Woo JM, Kim NH, Choi YK, Lee BS, Kim SR, Chung HT. Heme oxygenase in the regulation of vascular biology: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 2011 Jan 1;14(1):137-67.
- [33] Stocker R. Antioxidant activities of bile pigments. *Antioxid Redox Signal*. 2004 Oct;6(5):841-849.
- [34] Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science*. 1987 Feb 27;235(4792):1043-1046.
- [35] Nakao A, Murase N, Ho C, Toyokawa H, Billiar TR, Kanno S. Biliverdin administration prevents the formation of intimal hyperplasia induced by vascular injury. *Circulation*. 2005 Jul 26;112(4):587-591.
- [36] Ollinger R, Bilban M, Erat A, Froio A, McDaid J, Tyagi S, Csizmadia E, Graça-Souza AV, Liloia A, Soares MP, Otterbein LE, Usheva A, Yamashita K, Bach FH. Bilirubin: a natural inhibitor of vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation*. 2005 Aug 16;112(7):1030-1039.
- [37] Peyton KJ, Reyna SV, Chapman GB, Ensenat D, Liu XM, Wang H, Schafer AI, Durante W. Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide is an autocrine inhibitor of vascular smooth muscle cell growth. *Blood*. 2002 Jun;99(12):4443-4448.
- [38] Zhang M, Zhang BH, Chen L, An W. Overexpression of heme oxygenase-1 protects smooth muscle cells against oxidative injury and inhibits cell proliferation. *Cell Res*. 2002;12:123-132.
- [39] Freidja ML, Toutain B, Caillon A, Desquiere V, Lambert D, Loufrani L, Procaccio V, Henrion D. Heme oxygenase 1 is differentially involved in blood flow-dependent arterial remodeling: role of inflammation, oxidative stress, and nitric oxide. *Hypertension*. 2011 Aug;58(2):225-31.
- [40] Chang T, Wu L, Wang R. Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation by chronic heme treatment. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008 Sep;295(3):H999-H1007.
- [41] Hyvelin JM, Maurel B, Uzbekov R, Motterlini R, Lermusiaux P. Heme prevents intimal stenosis in rat and rabbit models by inducing heme-oxygenase-1. *J Vasc Surg*. 2010 Feb;51(2):417-28.

Figure legends

Figure 1. A. Cultured VSMC were placed in modified Boyden chamber and chemotaxis was assessed to Heme (3 -30 μ M) and when indicated (C.) cells were pretreated with TroloxTM

(100 μ M). **B.** Cultured VSMC were incubated with or without Heme (3-30 μ M) for 48h at 37°C and when indicated (**D.**) were pretreated with the antioxidant TroloxTM (100 μ M). The results are representative from three at least five different experiments. Data are means \pm SD (* $p < 0.05$ vs untreated VSMC; # $p < 0.05$ vs VSMC that treated with Heme 10 μ M).

Figure 2. A. Cultured VSMC were incubated with or Heme (10 μ M) for 1 hour at 37°C and when indicated cells were pre-treated with DPI (10 μ M). ROS production was assessed by immunofluorescence studies monitoring the intracellular oxidation of dihydrorhodamine 123 (DHR) to rhodamine. The results are representative from four experiments. **B.** Cultured VSMC were placed in modified Boyden chamber and chemotaxis was assessed to Heme (10 μ M) and when indicated, cells were pretreated with the NAPHox inhibitor DPI (10 μ M). **C.** Cultured VSMC were incubated with or without Heme (10 μ M) for 48h at 37°C and when indicated were pretreated with DPI (10 μ M). Cell proliferation was determined using the thymidine incorporation assay. The results are representative of three to five independent experiments. Data are means \pm SD (* $p < 0.05$ vs untreated VSMC; # $p < 0.05$ vs VSMC treated with Heme 10 μ M).

Figure 3. A. Cultured VSMC were placed in modified Boyden chamber and chemotaxis was assessed to Heme (10 μ M) and when indicated, cells were pretreated with the ERK inhibitor PD98059. **B.** Cultured VSMC were incubated with or without Heme (10 μ M) for 48h at 37°C and when indicated were pretreated with PD98059 (10 μ M). **C.** Cultured VSMC were incubated with or without Heme (10 μ M) for different times at 37°C and when indicated, cells were pretreated with DPI (10 μ M). Whole-cell lysates were immunoblotted with anti-pERK polyclonal (upper inset) and with anti-ERK-2 polyclonal antibody (lower inset). **D.** VSMC were cultured on glass coverslips overnight. Cells were incubated with Heme (10 μ M) for 1 hour at 37°C. The cells were stained with anti-NF κ B antibody (immunocytochemistry assay) and when indicated cells were pretreated with DPI (10 μ M) or PD98059 (10 μ M). Cells were imaged in fluorescence microscopy and the the bars represent the NF κ B nuclear translocation densitometry obtained by ImageJTM. The results are representative from three different experiments. The results are representative of three to five independent experiments. Data are means \pm SD (* $p < 0.05$ vs untreated SMC; # $p < 0.05$ vs VSMC treated with Heme 10 μ M).

Figure 4. Cultured VSMC were incubated with or without Heme (10 μ M) for 24h at 37°C and when indicated. **A.** Whole-cell lysates were immunoblotted with anti-HO-1 polyclonal (upper inset) and with anti-actin polyclonal antibody (lower inset). **B.** Whole-cell lysates were immunoblotted with anti-HO-2 polyclonal (upper inset) and with anti-actin polyclonal

antibody (lower inset). The results are representative of three independent experiments. Data are means \pm SD (* $p < 0.05$ vs untreated SMC).

Figure 5.A. Cultured VSMC were incubated with Heme (10 μ M) for 48h at 37°C and when indicated were pretreated with the antioxidant SnPP (3 μ M, **A.**) or with ZnPP (10 μ M; **B.**). Cell proliferation was determined using the thymidine incorporation assay. **C.** Cultured VSMC were incubated with CM-H₂DCFDA probe for different times at 37°C with Heme (10 μ M) and/or ZnPP (10 μ M) and/or DPI(10 μ M). After each time, the fluorescence (DCF 10 μ M) was analyzed in Victor fluorometer. The results are representative of three to five independent experiments. Data are means \pm SD (* $p < 0.05$ vs untreated VSMC; # $p < 0.05$ vs VSMC treated with Heme 10 μ M).

Figure 6.A. Cultured VSMC were incubated with Heme (10 μ M) for 48h at 37°C and when indicated were pretreated with carbon monoxide or biliverdin (10 μ M) + bilirubin (10 μ M) + carbon monoxide donor (tricarbonyldichlororuthenium(II) dimer 10 μ M) or SnPP (3 μ M). **B.** Cultured VSMC were incubated with Heme (10 μ M) for 48h at 37°C and when indicated were pretreated with SnPP (3 μ M), DPI (10 μ M) or TroloxTM (100 μ M). The results are representative of three to five independent experiments. Data are means \pm SD (* $p < 0.05$ vs untreated VSMC; # $p < 0.05$ vs VSMC treated with Heme 10 μ M; and & $p < 0.05$ vs VSMC incubated with Heme + SnPP).