



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

Genilson Rodrigues da Silva

**Efeito do Maxadilan na célula endotelial:
papel na permeabilidade vascular**

Rio de Janeiro

2016

Genilson Rodrigues da Silva

Efeito do Maxadilan na célula endotelial: papel na permeabilidade vascular

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

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

Coorientadora: Dra. Vany Nascimento da Silva

Rio de Janeiro

2016

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

S586 Silva, Genilson Rodrigues da.
Efeito do Maxadilán na célula endotelial: papel na permeabilidade vascular / Genilson Rodrigues da Silva. – 2016.
67 f.

Orientadora: Thereza Christina Barja-Fidalgo.
Coorientadora: Vany Nascimento da Silva.
Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Vasodilatadores - Teses. 2. Células endoteliais - Teses. 3. Caderinas. 4. Inflamação - Teses. I. Fidalgo, Barja Thereza Christina. II. Silva, Vany Nascimento da. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 615.711

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

Assinatura

Data

Genilson Rodrigues da Silva

Efeito do Maxadilan na célula endotelial: papel na permeabilidade vascular

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

Aprovada em 2 de fevereiro de 2016.

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

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Coorientadora: Dra. Vany Nascimento da Silva

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Nils Erik Svensjö

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Edward Helal Neto

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Tatiana de Almeida Simão

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus em primeiro lugar, por mais esta conquista.

À Prof^a. Dr^a. Thereza Christina Barja-Fidalgo por ter me dado a oportunidade de trabalhar e desenvolver este projeto em seu laboratório, além de toda a paciência e atenção.

À Dr^a Vany Nascimento pela sua paciência e ensinamentos dados a mim, algumas vezes me tratando como filho. Muito obrigado pela ajuda e sua amizade.

Aos meus pais, sempre estiverem ao meu lado me dando apoio e incentivando para que eu não desistisse dos meus sonhos.

A minha esposa, que meu deu força e me acalmou nos momentos de nervosismo, sem ela não conseguiria nada. Muito obrigado. Amo-te muito.

Aos meus irmãos que amo muito.

Aos meus avôs que morram no meu coração, onde estiver estará sempre olhando por mim. Sinto a falta de vocês.

Ao amigo Rafael, pela paciência e ajuda ao revisar minha dissertação.

Aos amigos do laboratório, Edward, João, Amêndola, Mariana, Roberta, Simone, Cristiane, Renata, Taís, Natália, Hayandra, Mauro, Thaís, Clara, Daniel, Isadora, Agatha pela ajuda e pelos ensinamentos técnicos e teóricos.

A amiga Mariele, pela ajuda nos experimentos de permeabilidade endotelial. Muito obrigado

A Gabriele, pela ajuda técnica que são indispensáveis para o bom andamento do laboratório.

Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito.

Chico Xavier

RESUMO

SILVA, Genilson Rodrigues da. **Efeito do Maxadilan na célula endotelial**: papel na permeabilidade vascular. 2016. 67f. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Estudos recentes mostraram que na saliva do principal vetor da leishmaniose, o flebótomo *Lutzomyia longipalpis*, encontram-se componentes vasoativos, como o peptídeo maxadilan (MAX), um potente vasodilatador que contribui para infectividade de várias espécies de *Leishmania*. Os efeitos vasoativo e pró-inflamatório do MAX são mediados por sua ligação altamente seletiva ao receptor pituitário tipo 1 (PAC1). Trabalho recente do nosso grupo destacou a ação pró-inflamatória do MAX, mostrando que esse peptídeo induz aumento da permeabilidade vascular *in vivo* e ativação de leucócitos em vênulas pós-capilares. Contudo, não há na literatura relatos sobre os efeitos diretos do MAX em células endoteliais, bem como estudos sobre os mecanismos moleculares que modulariam estas ações. O presente estudo visa investigar os efeitos do MAX sobre as células endoteliais. Utilizando um modelo experimental no qual as células da microvasculatura humana (HMEC-1) foram incubadas ou não com MAX, vimos que o peptídeo foi capaz de levar aumento da permeabilidade endotelial de maneira dependente do receptor PAC1. Além disso, o peptídeo foi capaz de promover a fosforilação e dispersão de VE-caderina, induzindo sua internalização e consequente translocação de β -catenina para o núcleo. O MAX promoveu reorganização do citoesqueleto de actina, fosforilação da proteína FAK no resíduo 397 e sua associação com actina, além da redistribuição de paxilina e sua colocalização com actina no ponto de adesão focal. MAX induz a translocação de Src para membrana, bem como sua colocalização e associação com VE-caderina nas junções aderentes. Finalmente, vimos que a inibição farmacológica da proteína Src reduz o efeito de MAX no aumento na permeabilidade endotelial. Em conjunto, nossos dados sugerem que os eventos inflamatórios induzidos pelo MAX envolvem o rompimento da barreira endotelial após sua interação como receptor PAC1. Uma melhor compreensão dos efeitos do peptídeo sobre o endotélio pode conduzir ao desenvolvimento de estratégias mais específicas para o tratamento da leishmaniose. Além disso, o MAX pode se tornar uma nova ferramenta para o estudo da biologia da célula endotelial.

Palavras-chave: Maxadilan. Permeabilidade. VE-caderina. Células endoteliais.

ABSTRACT

SILVA, Genilson Rodrigues da. **Effect of Maxadilan in endothelial cell: role in vascular permeability.** 2016. 67f. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Recently, it was demonstrated that saliva of *Lutzomyia longipalpis*, main vector of leishmaniasis, presents vasoactive components such as Maxadilan (MAX), a potent vasodilator that contributes to Leishmania infectivity. The vasoactive and pro-inflammatory effects of maxadilan are mediated by its highly selective pituitary receptor type 1 (PAC1). Recent work from our group highlights the pro-inflammatory actions of maxadilan, showing that this peptide increases *in vivo* vascular permeability and leukocyte activation in post-capillary venules. However, the effects of MAX in endothelial cells, as well as the molecular mechanisms involved in these actions, are not well described. This study aims to investigate the effects of MAX on endothelial cells. First, human microvascular (HMEC-1) cells were incubated in the absence or presence of MAX and we demonstrated that this peptide is able to increase endothelial permeability in a PAC1-dependent manner. In addition, MAX was able to promote phosphorylation and dispersion of VE-cadherin, inducing its internalization and subsequent β -catenin nuclear translocation. Also, MAX promoted reorganization of the actin cytoskeleton, redistribution of paxillin and its colocalization with actin in the focal adhesion. Furthermore, MAX induces FAK phosphorylation at residue 397 and its association with actin. MAX induces Src translocation to the membrane and its association with VE-cadherin in the adherens junctions. Finally, Src inhibition reduces the effects of MAX on endothelial permeability. Together, our data suggest that the inflammatory events induced by MAX involve the disruption of the endothelial barrier after interaction with the PAC1 receptor. A better understanding of MAX effects on endothelium may lead to the development of more specific strategies for the leishmaniasis treatment and a new tool for the study of endothelial cell biology.

Keywords: Maxadilan. Permeability. VE-cadherin. Endothelial cell.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Organização estrutural das interações intracelulares da célula endotelial e das interações da matriz	17
Figura 2 –	Complexo adesivo da VE-caderina.....	22
Figura 3 –	<i>A quebra das junções da VE-caderina.....</i>	23
Figura 4 –	Processamento da VE-caderina pela via endocítica.....	25
Figura 5 –	Estrutura esquemática do Maxadilan	29
Figura 6 –	Vias de sinalização intracelular estimuladas pela ativação de receptores PAC 1 e VPAC.....	31
Figura 7 –	Maxadilan induz aumento da permeabilidade endotelial.....	42
Figura 8 –	Maxadilan induz aumento da permeabilidade endotelial via receptor PAC1.....	43
Figura 9 –	Maxadilan induz dispersão de VE-Caderina da membrane.....	44
Figura 10 –	Maxadilan induz fosforilação de VE-Caderina.....	45
Figura 11 –	Maxadilan induz internalização de VE-Caderina.....	46
Figura 12 –	Maxadilan induz a translocação de β -catenina para o núcleo.....	47
Figura 13 –	Maxadilan induz a reorganização do Citoesqueleto de Actina....	48
Figura 14 –	Maxadilan induz fosforilação de FAK e sua associação a actina	49
Figura 15 –	Maxadilan induz redistribuição de paxilina.....	50
Figura 16 -	Maxadilan induz aumento da permeabilidade endotelial via ativação de Src.....	51
Figura 17 -	Maxadilan induz recrutamento de Src para membrana.....	52
Figura 18 -	Efeito do Maxadilan sobre a permeabilidade celular e a reorganização do citoesqueleto de actina na célula endotelial....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	Albumina sérica bovina
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
ECL	Quimiluminescência ampliada
EGF	Fator de crescimento de hepatócitos
FAK	Quinase de adesão focal
FITC	Isotiocianeto fluoresceína
FRNK	FAK- não quinase
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
GTPases	Guanosinatrifosfatase
HGF	Fator de crescimento epidérmico
HMEC1	Linhagem celular de endotélio de microvasculatura humano
HUVEC	Células endoteliais de cultura primária de cordão umbilical humano
IgG	Imunoglobulina G
IL6	Interleucina 6
JAs	Junções aderentes
JAMs	Moléculas de adesão juncionais
JF	Junções firmes
MAX	Maxadilan
MCDB-131	MCDB 131 Medium
MLC	Cadeia leve de miosina
MLCK	Quinase da Cadeia leve de miosina
N-caderina	Caderina neuronal
NO	Oxido nítrico
PAC1	Receptor pituitário tipo 1
PACAP	Peptídeo ativador da adenilatociclase da pituitária
PAF	Fator ativador de plaquetas
PBS	Tampão fosfato de sódio
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PGE2	Prostaglandina

PKC	Proteína quinase C
PLC	Fosfolipase C
PTP-VE	Tirosina fosfatase da vasculatura endotelial
PVDF	Polivinilidenodifluorido
SDS	Dodecilssulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
T-PBS	Tampão fosfato de sódio Tween
TRP2	Triptofano amino terminal
PAK	Quinase de p-21 ativada
VE-caderina	Caderina do endotélio vascular
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
VEGF-R2	Receptor do Fator de crescimento do endotélio vascular

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	12
1	REVISÃO DA LITERATURA	13
1.1	Endotélio	13
1.2	Dinâmica do citoesqueleto de actina	14
1.3	Permeabilidade Endotelial	15
1.3.1	Caderinas.....	17
1.3.2	VE-caderina.....	20
1.3.3	<u>VE-caderina e a Barreira endotelial</u>	22
1.4	FAK	26
1.5	Paxilina	27
1.6	Src	27
1.7	Maxadilan	28
1.7.1	<u>PAC-1, o receptor do Maxadilan</u>	30
2	OBJETIVOS	33
2.1	Objetivo geral	33
2.2	Desenho experimental	33
3	MÉTODOS	34
3.1	Maxadilan	34
3.2	Cultura de células	34
3.3	Eletroforese e Westernblotting	36
3.4	Imunoprecipitação	36
3.5	Permeabilidade celular	37
3.6	Citoquímica	37
3.7	Imunocitoquímica	38
3.8	Internalização de VE-caderina	39
3.9	Análise estatística	39
4	RESULTADOS	40
4.1	Maxadilan induz aumento da permeabilidade endothelial	40
4.2	Maxadilan induz aumento da permeabilidade endotelial via receptor PAC1	42
4.3	Maxadilan induz dispersão de VE-Caderina	43

4.4	Maxadilan induz fosforilação de VE-Caderina.....	44
4.5	Maxadilan induz internalização de VE-Caderina.....	45
4.6	Maxadilan induz a translocação de β-catenina para o núcleo..	46
4.7	Maxadilan induz a reorganização do Citoesqueleto de Actina.	47
4.8	Maxadilan induz fosforilação de FAK e sua associação a actina.....	49
4.9	Maxadilan induz redistribuição de Paxilina.....	50
4.10	O aumento da permeabilidade endotelial induzida pelo Maxadilan é modulado pela ativação de Src.....	51
4.11	Maxadilan induz aumento da associação de Src/VE-Caderina.	52
5	DISCUSSÃO.....	53
	CONCLUSÃO.....	58
	REFERÊNCIAS.....	59

INTRODUÇÃO

Os insetos hematófagos expressam compostos vasoativos em suas glândulas salivares que servem para combater processos hemostáticos do hospedeiro quando o animal se alimenta de sangue (Lerner e col., 2007). Estudos recentes mostraram que na saliva do principal vetor da leishmaniose, o flebótomo *Lutzomyia longipalpis*, encontram-se componentes vasoativos, como o peptídeo maxadilan, um potente vasodilatador que contribui para infectividade de várias espécies de *Leishmania* (Lerner e col., 1991; Morris e col., 2001).

O maxadilan (MAX), isolado da glândula salivar do parasita, tem ação vasodilatadora cerca de 500 vezes mais potente que a do CGRP (peptídeo relacionado ao gene da calcitonina), o vasodilatador mais potente descrito até então (Lerner e col., 1991; Lerner e col., 2007). Os efeitos vasoativos e também pró-inflamatórios do maxadilan são mediados por sua ligação altamente seletiva ao receptor pituitário tipo 1 (PAC1) (Moro e Lerner, 1997; Svensjö e col., 2012). Apesar de não apresentar sequência homóloga ao PACAP (peptídeo ativador da adenilato ciclase da pituitária encontrado em mamíferos) a ligação do maxadilan a PAC1 ocorre no mesmo sítio de ligação do ligante endógeno (Timmerman e col., 2012).

Trabalho recente do nosso grupo destacou a ação pró-inflamatória do maxadilan, mostrando que esse peptídeo induz, *in vivo*, o aumento da permeabilidade vascular e ativação de leucócitos em vênulas pós capilares (Svensjö e col., 2012). Contudo, não há na literatura relatos sobre os efeitos diretos do maxadilan em células do endotélio vascular, bem como estudos sobre os mecanismos moleculares que modulariam estas ações.

Considerando o papel crucial do endotélio na homeostase vascular e na resposta inflamatória; o potente efeito do maxadilan sobre as funções vasculares; e a importância do sistema PAC-PACAP na modulação de diferentes eventos fisiológicos, é relevante a elucidação dos efeitos e dos mecanismos moleculares envolvidos nas ações vasoativas e imunomoduladoras do Maxadilan, em especial sobre as células endoteliais, com vistas também à possibilidade do desenvolvimento de novos fármacos vasoativos.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Endotélio

O endotélio vascular recobre a superfície interna dos vasos sanguíneos e linfáticos no organismo adulto atuando como uma barreira seletiva que controla a passagem de fluidos, macromoléculas e leucócitos do sangue para os tecidos (Timmerman e col., 2012). Durante muito tempo, foi considerado como uma camada inerte que recobre a parede dos vasos e auxilia no aporte de substâncias para o tecido. Esta visão mudou significativamente e atualmente ele é reconhecido como um tecido dinâmico e heterogêneo está também envolvido em diversos processos fisiológicos e patológicos, tendo papel crucial no processo inflamatório (Mierke, 2012). Por sua localização, é definido como o maior órgão sensorial, capaz de monitorar o funcionamento de várias partes do corpo humano, recebendo estímulos produzidos localmente ou pela própria corrente sanguínea (Bachetti e Morbidelli, 2000).

As células endoteliais são poligonais e seu eixo orienta-se na direção do fluxo sanguíneo. Usualmente, o núcleo destas células se projeta para dentro da luz capilar, seu citoplasma contém poucas organelas, representadas principalmente por um pequeno aparelho de Golgi, mitocôndrias e polirribossomos livres e algumas cisternas de retículo endoplasmático rugoso (Junqueira e Carneiro, 2008)

Evidências mostram que as células endoteliais apresentam-se fenotipicamente heterogêneas, podendo variar sua composição antigênica, propriedades metabólicas e respostas a fatores de crescimento, pois necessitam constantemente moldar-se às necessidades do tecido local, adaptando-se a diferentes microambientes. A heterogeneidade entre as espécies animais tem sido relatada, mas são também interessantes as diferenças observadas dentro das próprias espécies, onde as células endoteliais diferem dependendo do tamanho, função e localização do vaso, podendo mesmo variar dentro de segmentos discretos de um único ciclo da microcirculação (Rhodin, 1968; Graier e col., 1996; Quadri, 2012).

O endotélio está totalmente integrado ao seu ambiente e a relação íntima entre esse tecido e a circunvizinhança surge já na fase embrionária de formação dos vasos sanguíneos (Luz e col., 2003). A variação na organização do endotélio capilar em diversos sítios vasculares é devida as diversas funções exercidas por este tecido incluindo a regulação da permeabilidade endotelial (Timmerman e col., 2012).

1.2 Dinâmica do citoesqueleto de actina

O citoplasma das células eucarióticas é organizado espacialmente em uma rede de proteínas filamentosas conhecidas como citoesqueleto. Esta rede contém três tipos principais de filamentos: microtúbulos, filamentos de actina e filamentos intermediários, que se organizam em arranjos helicoidais a partir de subunidades que se autoassociam usando uma combinação de contatos protéicos. Em células vivas, os três tipos de filamentos do citoesqueleto sofrem remodelação constante por associação e dissociação de suas subunidades (Alberts, 2010).

As diferentes formas e funções das estruturas de filamentos do citoesqueleto nestas células dependem de um repertório versátil de proteínas acessórias, apresentando uma grande variedade de proteínas associadas. O tempo de associação e dissociação de filamentos pode estar tanto diminuído quanto aumentado por proteínas acessórias que se ligam a subunidades livres ou aos próprios filamentos (Alberts, 2010).

Em células eucarióticas, existem estruturas especializadas que são formados a partir de proteínas motoras responsáveis pelos movimentos destes filamentos. Além da contração muscular, o sistema actina-miosina possui outros tipos de movimentos nestas células, como por exemplo, a formação do citoesqueleto, o deslocamento de organelas citoplasmáticas e o movimento amebóide (Alberts, 2010).

A integridade da barreira endotelial é mantida pelo balanço entre as forças contrácteis de actino-miosina, da adesão célula-célula e pela força de ancoragem da célula na matriz extracelular (Dudek e Garcia, 2001; Kása e col., 2015). A rede complexa do citoesqueleto é essencial na regulação da barreira da célula endotelial

e o seu rompimento leva a formação de fendas entre as células e consequente aumento da permeabilidade vascular (Shasby, 1982; Verin, 2001; Kása e col., 2015).

Nas células endoteliais, em resposta a agonistas, como trombina ou o LPS bacteriano, por exemplo, diferentes vias de sinalizações intracelulares são ativadas - como as pequenas Rho GTPase, a proteína quinase C (PKC), proteína da família quinase Src e a quinase da MLC (MLCK) - levando a ativação de cascatas de fosforilação e aumentado cálcio intracelular. Estes eventos resultam na contração da actino-miosina, rearranjo do citoesqueleto de actina e ruptura nas junções intercelulares, levando ao aumento na permeabilidade endotelial (Kása e col., 2015).

1.3 Permeabilidade Endotelial

As alterações na função de barreira endotelial desempenham um importante papel na patogênese de muitos estados de doença, incluindo inflamação, cicatrização de feridas, edema, lesão pulmonar aguda, acidente vascular cerebral e câncer (Wójciak-Stothard e Ridley, 2002). A manutenção de barreira endotelial e a resposta da barreira quiescente a agentes vasoativos produzidos localmente, como a histamina, prostaglandinas, trombina e o VEGF é mediada principalmente pelas mudanças dinâmicas em junções aderentes (JAs) e aumento da tensão centrípeta criado pela contratilidade actomiosina (Feng e Col., 1999; Dejana, 2004).

A permeabilidade endotelial é regulada e coordenada pela ligação das células endoteliais através de estruturas de membrana chamadas de junções. São conhecidos três tipos principais de junções endoteliais: as junções firmes (JF), junções GAP ou comunicantes e as junções aderentes (JA) (fig 1), que são necessárias para formar uma barreira estável semipermeável, porém seletiva. Esta barreira controla a passagem de fluídos para o tecido subjacente, mas, concomitantemente, previne a passagem em excesso destes fluídos que levaria danos aos tecidos (Alexander, e col. 2014).

As junções firmes são compostas por claudina, ocludina e por moléculas de adesão juncionais (JAMs) constituindo cerca de 20% das proteínas de junção em células endoteliais. Elas são mais encontradas em artérias, comparada ao vaso e veias. Elas interagem com a ZO-1 no domínio citoplasmático se ligando ao

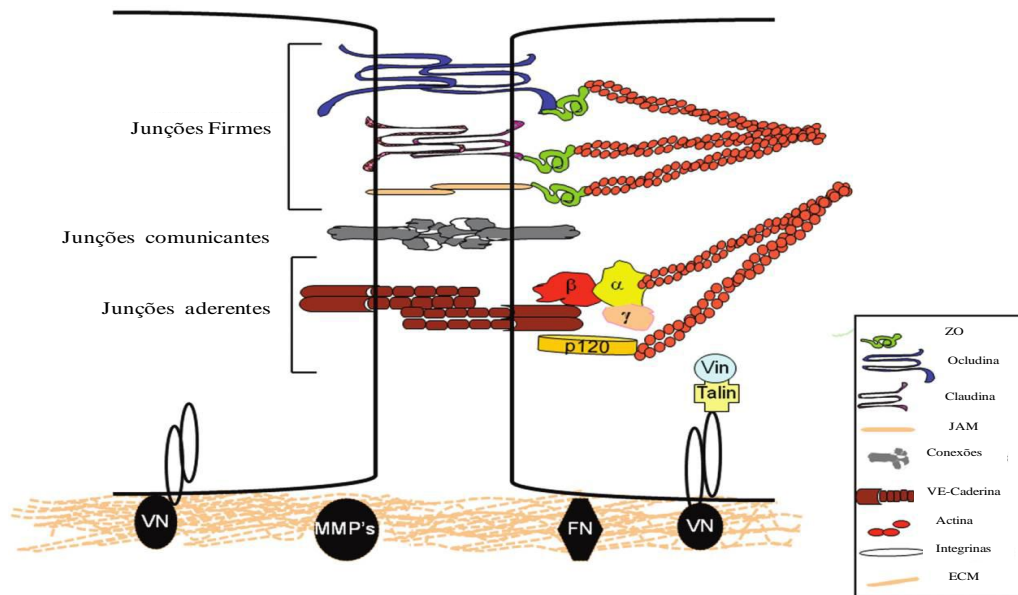
citoesqueleto de actina estabilizando assim, a função de barreira endotelial (Sukriti e col, 2014).

As junções GAP ou comunicantes são constituídas por um agrupamento de número variável de canais protéicos hidrofílicos, os conexons. Os conexons de uma célula se alinham com os conexons da célula adjacente, formando um canal aquoso contínuo que conecta os citoplasmas das células em contato. O alinhamento dos conexons determina uma fenda uniforme de 2-4 nm entre as células em interação, daí o nome junção tipo GAP (GAP, em português, significa fenda) (Sukriti e col., 2014).

As junções aderentes exercem um papel importante na regulação da função barreira endotelial, caracterizado por domínio extracelular, que estabelece interações homofílicas entre as células vizinhas e a porção citoplasmática, cuja extremidade associa-se com vasta gama de proteínas intracelulares (Sukriti e col, 2014). As junções aderentes são compostas por proteínas da família de adesão de caderinas. As células endoteliais expressam níveis relativamente elevados de dois tipos de caderinas: uma caderina específica nas células chamada de caderina do endotélio vascular (VE-caderina) e caderina neuronal (N-caderina), que está também presente em outros tipos de células como as neuronais e as do músculo liso. São encontrados outros tipos de caderinas não-específicas nas células, como T-caderina e P-caderina, são expressas em diferentes tipos de células endoteliais (Dejana, 2008).

Durante um processo inflamatório, a permeabilidade microvascular aumenta seletivamente em vênulas pós-capilares, onde as junções aderentes e a principal tipo de moléculas de adesão entre as células (Orsenigo e col, 2013).

Figura 1 - Organização estrutural das interações intracelulares da célula endotelial e das interações da matriz



Fonte: Adaptado de Sukriti, 2014.

1.3.1 Caderinas

As caderinas pertencem à família das glicoproteínas possuindo domínio extracelular, que é responsável de promover interações célula-célula e um domínio transmembrana, e um domínio citoplasmático que frequentemente está ligado ao citoesqueleto (Takeichi, 1988; Takeichi, 1995; Shapiro e col., 2007;). Além do papel crucial nas interações célula-célula estabelecendo adesão íntima entre as células, as caderinas também induzem diversas vias de sinalização intracelular, podendo regular vários eventos, como migração, proliferação celular e na permeabilidade (Niessen & Gottardi, 2008).

As caderinas pertencem a uma superfamília de moléculas de adesão dependentes de cálcio, sendo dividida em seis subfamílias: caderinas clássicas do tipo I e do tipo II, caderinas desmossomais, caderinas transmembrana de sete passagens, grandes caderinas e protocaderinas (Stemmler, 2008). As caderinas clássicas possuem função de adesão bem definida e são importantes na sinalização, as não clássicas incluem proteínas com funções de adesão, funções nas

sinalizações, na regulação do crescimento epitelial e a polaridade celular (Bruce e col., 2010).

Diversas funções especializadas do endotélio requerem uma efetiva capacidade de comunicação entre as células endoteliais e as células da parede vascular (Polacek e col., 1997; Cooper, 2007). A maioria das células possui dois diferentes mecanismos de comunicação intercelular. A comunicação mediada por fatores de crescimento ou por hormônios é uma delas e, neste caso, as células não precisam ter contato direto. No segundo mecanismo, para que haja a comunicação intercelular, as células precisam estar em contato direto umas com as outras, sendo essa adesão, em parte, devida a ação coesiva de membros da família das caderinas (Junqueira e Carneiro, 2004).

As células são mantidas juntas por ligações dependentes de cálcio formadas entre os domínios extracelulares de moléculas de caderina que transpõe o espaço entre células vizinhas.

Tabela 1 - Alguns membros da superfamília das caderinas clássicas

Nome	Principal localização	Associação com Junção	Fenótipo quando inativado em camundongos.
Caderinas Clássicas			
Caderina-E	Muitos epitélios	Junções aderentes	Morte em estágio de blastocistos; embriões não fazem compactação.
Caderina-N	Neurônios, coração, músculo esquelético, lente e fibroblastos	Junções aderentes e sinapses químicas.	Embriões morrem por defeitos cardíacos.
Caderina-P	Placenta, epiderme e	Junções	Desenvolvimento

	epitélio da mama.	aderentes.	anormal da glândula mamária.
Caderina-VE	Células endoteliais.	Junções aderentes	Desenvolvimento vascular anormal (apoptose de células endoteliais)

Fonte: Bruce Alberts, 2010.

Tabela 2 - Alguns membros da superfamília das caderinas não-clássicas

Nome	Principal localização	Associação com Junção	Fenótipo quando inativado em camundongos.
Caderinas Não-clássicas			
Desmocolina	Pele	Desmossomos	Bolhas na pele
Desmogleína	Pele	Desmossomos	Doença de bolhas na pele devido à perda da adesão célula-célula dos queratinócitos
Caderina-T	Neurônios, músculo e coração	Nenhuma	Desconhecido
Caderina 23	Ouvido interno e outros epitélios	Ligação entre os estereocílios e as células pilosas sensoriais	Surdez

Fat (em <i>Drosophila</i>)	Epitélio e sistema nervoso central	Junção sinalizadora (polaridade planar celular)	Discos marginais aumentados e tumores, rompimento da polaridade planar celular
Fat 1 (em mamíferos)	Vários epitélios e sistema nervoso central	Fenda do diafragma no glomérulo renal e outras junções celulares	Perda da fenda do diafragma; mal formação do prosencéfalo e dos olhos
Protocaderinas α , β , γ	Neurônios	Sinapses químicas e outras membranas não-sinápticas	Degeneração neuronal
Flamingo	Epitélio sensorial e outros	Junção célula-célula	Rompimento da polaridade planar celular e defeitos no tubo neural

Fonte: Bruce Alberts, 2010.

A principal caderina expressa nas células endoteliais é a VE-caderina promovendo uma adesão seletiva entre as células (Karp, 2005; Cooper, 2007).

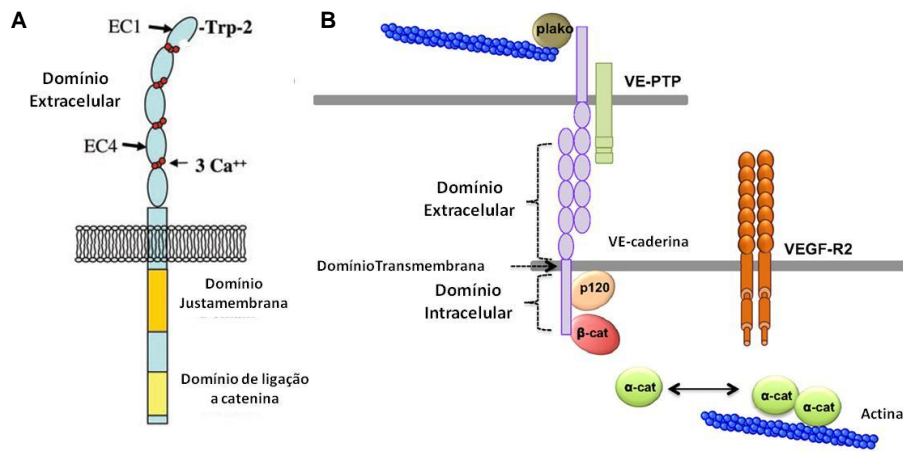
1.3.2 A VE-caderina

A VE-caderina é uma molécula de adesão celular dependente de cálcio que pertence a super-família das caderinas clássicas participando das interações célula-célula. É expressa exclusivamente no endotélio, podendo ser utilizada como um marcador de células endoteliais (Gory e col., 1999; Prandini, e col., 2005). A VE-

caderina é formada por um domínio extracelular, um domínio transmembrana e um domínio intracelular. O domínio extracelular medeia interações homofílicas e a adesão entre células adjacentes e é composto de 5 “motifs” do tipo EC (typical extracellular cadherin domains) que formam uma estrutura rígida, estabilizada por íons de cálcio (Fig.2a). Já seu domínio transmembrana participa de um agrupamento lateral e, o seu domínio citoplasmático interage com proteínas acessórias, as cateninas, que ligam a VE-caderina ao citoesqueleto de actina, mantendo a integridade das junções (Dejana, 2004; Broman e col., 2006; Huveneers e col., 2012). A função adesiva das caderinas requer sua associação através da porção C-terminal com proteínas citoplasmáticas: as cateninas. As caderinas ligam-se diretamente à β -catenina (alternativamente à placoglobina) e a p-120. A placoglobina e a β -catenina podem se ligar à α -catenina, uma proteína de ligação à actina (Corada e col., 2010; Timmerman e col., 2012; Paolinelli e col., 2013). Acredita-se que o complexo VE-caderina- β -catenina controla dinamicamente as junções endoteliais regulando a passagem de leucócitos, embora não se saiba muito sobre o papel da β -catenina durante o processo de migração transendotelial. Contudo, é sabido que a β -catenina também participa da cascata de sinalização de *wnt* e funciona como um fator de transcrição nuclear, exercendo efeitos mais amplos sobre a expressão gênica e na plasticidade vascular (Xiao e col., 2003; Xiao e col., 2005; Nanes e col., 2012).

Outro parceiro intracelular da VE-caderina é a p-120-catenina. Esta interage com a VE-caderina no seu domínio justamembranar, regulando a expressão, o tráfico e a estabilidade de VE-caderina na membrana plasmática. Quando ocorrem falhas nessa interação, a VE-caderina sofre degradação, indicando o papel fundamental da p120-catenina na manutenção da estabilidade da VE-caderina. Adicionalmente, a placoglobina, também conhecida como γ -catenina, pode interagir diretamente com a VE-caderina permitindo a ligação à VE-PTP (proteína tirosina fosfatase do endotélio vascular) (Fig 2B) (Nottebaum e col., 2008). Além desta, outras proteínas fosfatases como a SHP2, PP2, DEP1 e a PTP1B participam diretamente da estabilização da VE-caderina, pois mantêm sua associação com as cateninas em um estado desfosforilado, reforçando a adesão célula-célula (Gavard, 2014).

Figura 2 - Complexo adesivo da VE-caderina



Legenda: A) Representação da tipo I/II da caderina com 5 caderinas repetidas no domínio extracelular. Trp2 (triptofano amino terminal); EC (caderina) (adaptado de Kowalczyk e cols., 2004). B) A VE-caderina medeia a adesão entre as células endoteliais de forma dependente de cálcio.

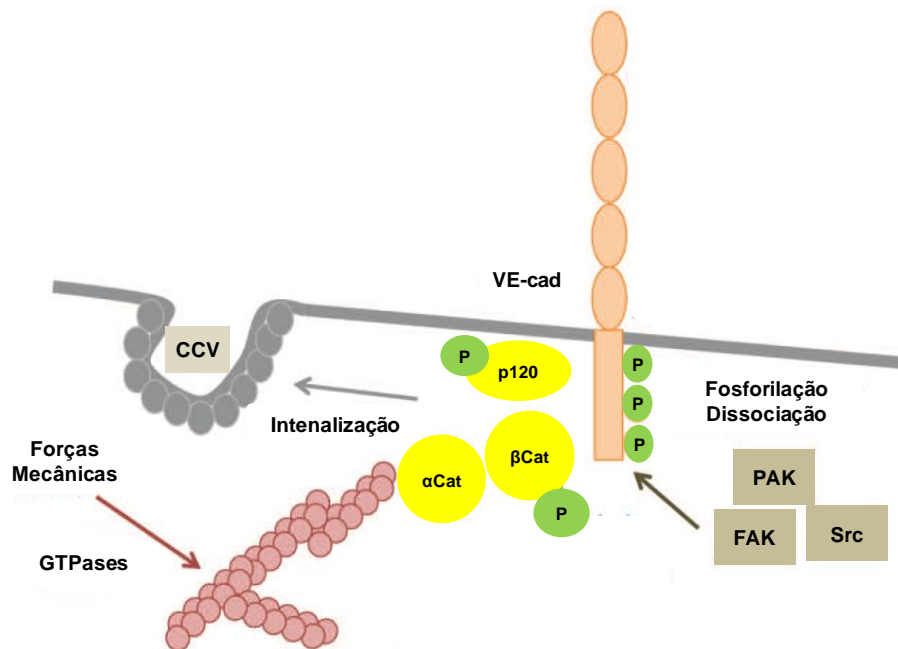
Nota: A VE-caderina é constituída de um domínio extracelular, que permite uma interação homofílica. O domínio transmembrana participa de um agrupamento lateral e o domínio intracelular da VE-caderina se liga a p120-catenina (p120) e β-catenina (β-cat), responsáveis pela retenção da VE-caderina na membrana. O citoesqueleto de actina está ligado à VE-caderina através da α-catenina (α-cat) ou placoglobina (plako). Além disso, VE-caderina pode ligar-se o VEGF-R2 (receptor do fator de crescimento endotelial vascular -2) e VE-PTP (proteína tirosina fosfatase do endotélio vascular).

Fonte: Adaptado de Gavard e cols., 2014.

1.3.3 VE-caderina e a Barreira endotelial

A VE-caderina é fundamental para a integridade vascular e, por conseguinte, alvo de um grande número de eventos de sinalização que podem provocar ruptura da barreira endotelial e aumento da permeabilidade vascular (Fig. 3).

Figura 3 - A quebra das junções da VE-caderina



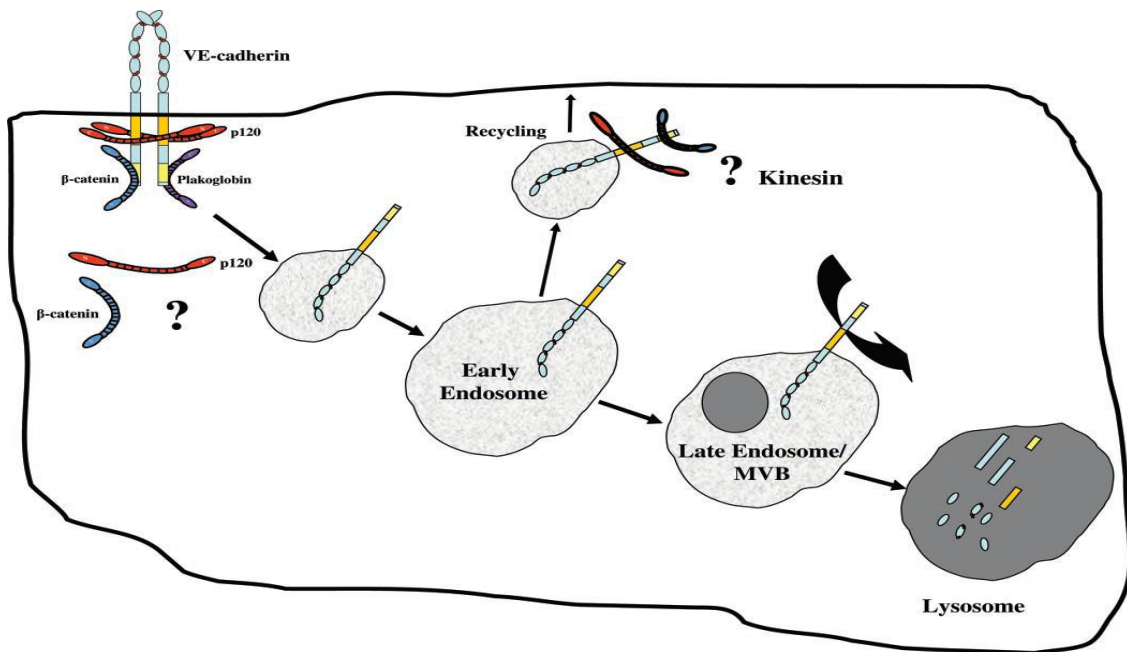
Legenda: Três rotas principais modulam a desmontagem da VE-caderina e a permeabilidade vascular: **(1)** fosforilação da cauda da VE-caderina (VE-cad) e das cateninas. Pelo menos, PAK (quinase de p21 ativada), Src, e FAK (quinase de adesão focal) catalisam a fosforilação de VE-caderina. Esta modificação pode levar a dissociação de VE-caderina / catenina; **(2)** A internalização por vesículas revestidas de clatrina (CCV), o que depende p120-catenina (cat) e da fosforilação de VE-cad; **(3)** Forças mecânicas e tensão exercida sobre a adesão celular, através do citoesqueleto de actina e Rho GTPases; P é para a fosforilação.

A estabilização do complexo VE-caderina/catenina diminui a permeabilidade vascular e o extravasamento de leucócitos (Schulte e col., 2011). Por outro lado, o domínio citoplasmático da VE-caderina contém sítios para fosforilação em resíduos de tirosina (Y142, Y645, Y658, Y685, Y731, Y733) e um sítio para fosforilação em resíduos de serina (S665) que estão envolvidos com a integridade da barreira (Potter e col., 2005; Turowski e col., 2008; Orsenigo e col., 2012). Alguns agentes, como o Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e a histamina, aumentam a fosforilação da VE-caderina e de cateninas associadas, resultando na perda da ligação de VE-caderina/catenina. A proteína tirosina quinase Src, presente nas junções, contribui para a fosforilação da VE-caderina e cateninas levando a desmontagem das AJ (Gavard e Gutkind, 2006; Gavard e Gutkind, 2008; Lampugnani e col., 2010). Em contraste, outros estudos mostram que a fosforilação direta da VE-caderina pela Src parece ser insuficiente para conduzir a abertura da

barreira endotelial, mesmo quando a sua atividade estiver aumentada (Adam e col., 2010; Orsenigo e col., 2012). As proteínas Src e FAK (quinase de adesão focal, descritas logo abaixo) emergem como interventoras importantes na desorganização da barreira e elevação de permeabilidade mediada por VE-caderina (Zhao e col., 2010; Chen e col., 2012). Recentemente, Jean e colaboradores mostraram que o domínio FERM da FAK se liga a VE-caderina e fosforila a β -catenina em tirosina (Y142) facilitando a dissociação do complexo VE-caderina/ β -catenina e a perda da junção entre as células endoteliais (Jean e col., 2014).

A disponibilidade de VE-caderina na membrana plasmática é fundamental na regulação da adesão célula-célula e na função barreira endotelial (Le Guelte e col., 2011; Gaengel e col., 2012; Orsenigo e col., 2012). A VE-caderina na membrana plasmática está associada a β -catenina e p120. Os níveis de VE-caderina presentes na célula são controlados pelos níveis de p-120. A quebra da interação da p120-catenina com a VE-caderina leva a internalização da VE-caderina e a sua separação da β -catenina durante a endocitose. A VE-caderina é uma molécula de adesão altamente dinâmica, cujo tráfico endossomal é realizado através de vesículas revestidas por clatrina. Após a internalização, a cauda da VE-caderina é clivada, removendo o domínio de ligação da β -catenina. Este evento de clivagem deve ser o destino para a degradação da caderina (Gavard e Gutkind, 2006; Hebda e col., 2013)(Figura 4). Este mecanismo leva a perda da junção célula-célula, modulando o comportamento endotelial, na migração celular, angiogênese e permeabilidade (Gavard e Gutkind, 2006; Nanes e col., 2012; Li e col., 2012).

Figura 4 - Processamento da VE-caderina pela via endocítica



Legenda: A VE-caderina na membrana plasmática está associada a β -catenina e p120. A quebra dessa ligação leva a internalização da VE-caderina e a sua separação da β -catenina durante a endocitose e conseqüente degradação envolvendo lisossomo e possivelmente também o proteossomo (não mostrado). Este evento de clivagem deve ser o destino para a degradação da caderina. MVB, corpos multivesiculares.

Fonte: Adaptado de Gavard e cols., 2014.

A fosforilação em resíduos de serina e/ou tirosina induzida por estímulos como trombina, VEGF e quimiocinas, pode levar à internalização da VE-caderina o que favorece o aumento da permeabilidade vascular, (Gavard e Gutkind, 2006; Gavard e col., 2008; Le Guelte e col., 2012; Yoshioka e col., 2012; Orsenigo e col., 2012). O processo de internalização da VE-caderina e sua entrada nas vesículas revestidas por clatrina é finamente modulado através de transdução de sinal intracelular envolvendo, a ativação da via da *PI3K-Akte* a ativação da Src (Gavard e col., 2008; Yoshioka e col., 2012). A internalização da VE-caderina é estimulada através de sua fosforilação direta ou de moléculas associadas ou através de ativação de outras quinases como PAK (Gavard e Gutkind, 2006; Le Guelte e col., 2012; Orsenigo e col., 2012).

1.4 FAK

A FAK é uma proteína tirosina quinase de 120 Kda e tem como função a formação de ponto de adesão focal pela ligação a várias proteínas de adesão focal, como vinculina, talina e paxilina (Mehta, 2006). Possui um domínio catalítico central, flanqueado por um grande domínio C e N terminais. O domínio N-terminal FERM da FAK pode se ligar a integrinas e receptores de fator de crescimento. O domínio não catalítico no C-terminal, é também referido como FRNK (FAK- não quinase) (Schaller, 2001; Parsons, 2003; Schlaepfer e col., 2004). Até o momento, foram descritos cinco resíduos de tirosinas da FAK com importância nas adesões focais e amplificação da sinalização. O principal sítio de fosforilação de tirosina é a Tyr-397 localizada no domínio quinase, que sofre fosforilação rápida em resposta a ativação de integrinas (Parsons, 2003). A FAK regula as interações célula-matriz dependente de integrina, modula as alterações na dinâmica do citoesqueleto de actina durante a adesão celular e a ativação de vias de sinalização, que levam a proliferação e sobrevivência da célula (Schaller, 2010). Ela está associada a várias proteínas que desempenham um papel chave na montagem, interação com citoesqueleto e transdução de sinal.

Vários estudos têm mostrado a participação de FAK na função de barreira do endotélio, otimizando as junções endoteliais. Evidências mostram que a FAK liga-se a p120-catenina inibindo atividade de pequenas Rho GTPases, restringindo assim a contração endotelial, induzindo a formação das junções aderentes (Sukriti e col., 2014). Embora não esteja diretamente associada à caderina ou interaja diretamente com as proteínas de junção, a FAK tem um papel fundamental na transmissão de sinais para as proteínas juncionais, além dos seus efeitos diretos ou indiretos sobre a actina que, através de moléculas intermediárias, coordenam a adesão celular e a barreira endotelial (Quadri, 2012). Neste sentido a paxilina parece ser uma molécula importante nessas funções (Brown e Turner, 2004).

1.5 Paxilina

Paxilina, uma proteína de 68 kDa conservada do citoesqueleto. Foi uma das primeiras proteínas a serem detectadas em estudos sobre adesão celular. Já no início do processo de adesão a paxilina é rapidamente organizada, sugerindo um papel importante na montagem e na desmontagem de adesões focais em células eucarióticas, adesão célula/matriz, transdução de sinal e migração celular (Huang e col., 2003). Estes processos biológicos são regulados pela localização de paxilina na célula, ou pelas modificações pós-translacionais de paxilina, envolvendo interações proteína-proteína (Png e Tong, 2013). É uma proteína adaptadora que tem por função principal servir como ligação para coordenar, integrar e facilitar a sinalização celular, através de sua interação direta ou indireta com múltiplas sinalizações e proteínas estruturais (Deakin e Turner, 2008; Glenney e Zokas, 1989).

A paxilina possui vários sítios de fosforilação em tirosina, serina e treonina, que são indispensáveis para adesão celular. Estes sítios potenciais de fosforilação são alvos de várias quinases ativadas pela adesão e fatores de crescimento (Schaller e Parsons, 1995; Huang e col., 2003). A fosforilação de diferentes domínios de paxilina tem efeitos funcionais distintos e está associada com a formação de adesão focal e fibras de estresse de actina (Burrige e col., 1992; Png e Tong, 2013). Recentemente, Gawlak e colaboradores (2014) mostraram a participação da paxilina na permeabilidade endotelial via sinalização da família Rho e p-47 contribuindo a disfunção da barreira vascular.

1.6 Src

A Src pertence à família de proteínas tirosina quinase não-receptoras, envolvidas em diferentes vias de transdução de sinal, incluindo a transcrição gênica, que regulam a adesão, proliferação, diferenciação celular e angiogênese (Thomas e Brugge, 1997; Brown e Cooper, 1996; Schlessinger, 2000; Theus e col., 2006; Tang e col., 2007). Foi mostrado que a inibição da Src impede o aumento da permeabilidade endotelial induzida por VEGF em modelo de infarto do miocárdio em

ratos (Weis e col., 2004), como também atenua o aumento da permeabilidade na barreira hemato-encefálica induzida por isquemia cerebral transiente (Takenaga e col., 2009).

A participação de Src no aumento da permeabilidade vascular em resposta a trombina e histamina resultam na fosforilação de VE-Caderina em vários resíduos de tirosina, levando a internalização de VE-Caderina e consequente ruptura da barreira endotelial. Evidências mostram que mutações pontuais da VE-caderina nos resíduos de tirosina Y⁶⁵⁸ e Y⁶⁸⁵ - que são usualmente fosforilados pela Src após estimulação pela trombina ou histamina - impedem a internalização da caderina e bloqueia o aumento da permeabilidade vascular (Dejana e Orsenigo 2013).

1.7 Maxadilan

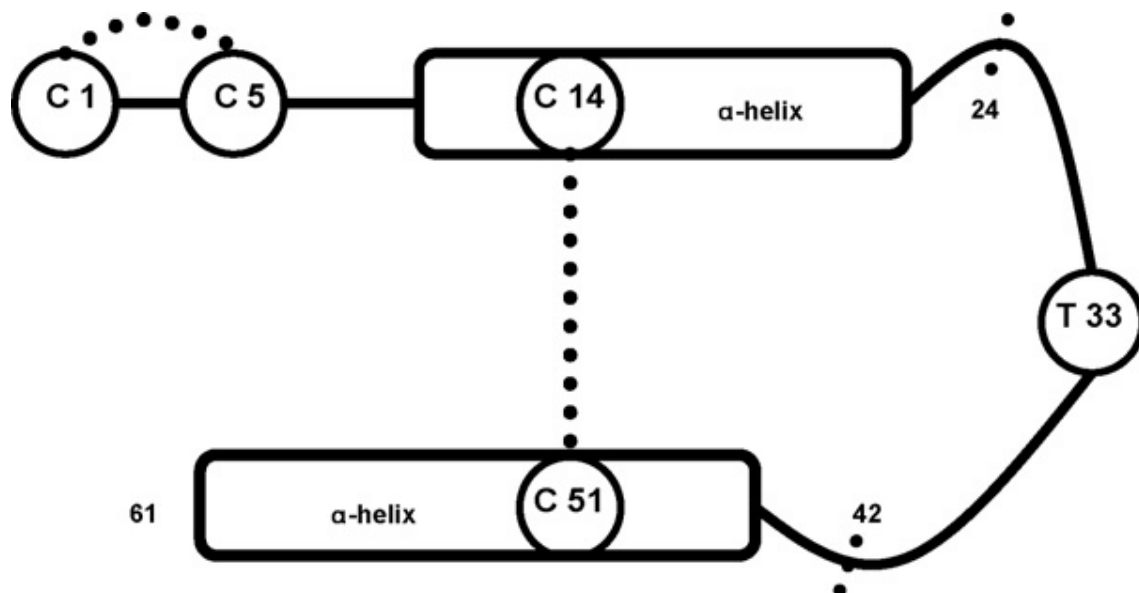
A saliva de insetos hematófagos, como flebotomíneos do vetor *Leishmania*, contém uma variedade de substâncias que auxiliam na obtenção de sangue, bem como na transmissão de patógenos, controlando a contração dos vasos e neutralizando a hemostasia do hospedeiro. Estas substâncias agem a partir da picada do flebotomíneo e levam ao aparecimento de uma vermelhidão ou eritema rápido no local, consequências diretas do processo de vasodilatação (Lerner e col., 1991, Lerner,2007). A alta potência destas substâncias sugere a possibilidade da sua utilização como agonista específico dos receptores do hospedeiro, como ferramentas no estudo da fisiologia dos processos vasculares e doenças hematológicas, e ainda, possivelmente, como novos agentes terapêuticos (Ribeiro, 1987; Lerner e col., 1991; Svensjö. e col., 2012). Contudo, uma limitação para os estudos e na potencial aplicação terapêutica destes componentes da glândula salivar se deve às pequenas quantidades presente na saliva do mosquito.

Em 1991, Lerner e colaboradores isolaram e caracterizaram, a partir da saliva do flebotomíneo vetor da *Leishmaniose*, o maxadilan (MAX), o mais potente peptídeo vasodilatador já descrito (Lerner e col., 1991; Lerner e col., 2007). Maxadilan é um peptídeo de 7,35 kDa, com ação vasodilatadora até 500 vezes mais forte que o CGRP (peptídeo relacionado ao gene da calcitonina), o peptídeo presente na glândula salivar de *Lutzomyia longipalpis* com propriedades

imunomodulatória descrito como o mais potente naquele momento (Aires e col., 2005; Lerner, 2007). Neste estudo, frações da saliva do mosquito foram injetadas na pele de coelho e a atividade do maxadilán foi diretamente relacionada a presença do eritema (Lerner, 2007). As propriedades vasodilatadoras do maxadilán mostraram ser independente do endotélio e, pelo menos em parte, mediada pelas alterações nos níveis da adenilato ciclase intracelular em células do músculo liso (Grevelink e col., 1995).

Maxadilán contém quatro resíduos de cisteína formando dois anéis de dissulfeto entre as cisteínas nas posições 1-5 e 14-51. A remoção do primeiro anel ou substituição da cisteína por alaninas não afetou sua atividade. Já a substituição no segundo anel por alanina, resultou em perda de atividade do maxadilán. Esta observação demonstrou a importância do segundo anel presente na estrutura do Maxadilán, para que esse peptídeo adquira uma conformação espacial necessária, para a ligação do maxadilán ao receptor PAC1 (Fig 5)(Lerner e col., 2007)

Figura 5 – Estrutura esquemática do Maxadilán



Legenda: As ligações dissulfeto estão presentes entre as cisteínas nas posições 1-5 e 14-51 e indicadas pelas linhas tracejadas. A integridade do anel entre 14 e 51 é necessária para a atividade. Eliminação dos resíduos entre as posições 24 e 42 resultaram no M65, um antagonista específico do receptor de PAC1(Lerner e col., 2007).

Vários efeitos imunomodulatórios são atribuídos ao maxadilan: inibição da produção de NO e TNF- α liberados pelos macrófagos; aumento da produção de IL-6, favorecendo o desenvolvimento de respostas Th2 e a infecção pelos flebotomíneos; aumento da produção de prostaglandina E2 (PGE2), diminuindo a inflamação e favorecendo a infecção (Titus e col., 2006).

1.7.1 PAC-1, o receptor do Maxadilan

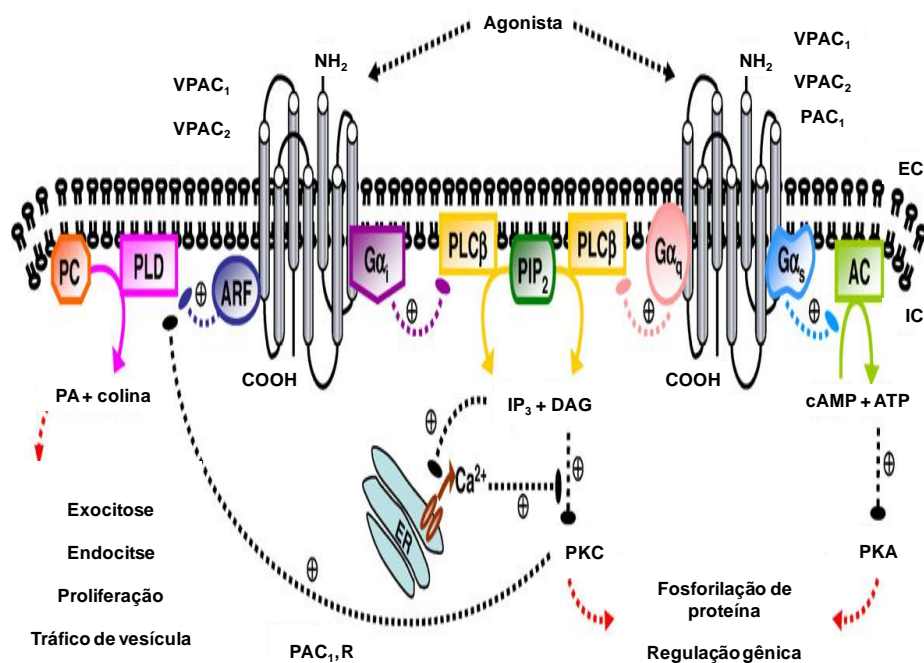
Alguns estudos mostraram que o maxadilan se liga a extratos da pituitária de cérebro humano e de rato, sugerindo que maxadilan pode ativar um dos receptores de neuropeptídeos vasoativos (Lerner, 2007). Os receptores para CGRP foram os candidatos iniciais, uma vez que seu efeito vasodilatador é comparável ao induzido pelo MAX, sem provocar edema ou eritema, e o CGRP e maxadilan apresentam sequências similares na região N-terminal. Em 1996, foi caracterizado o receptor específico do Maxadilan, denominado PAC1. Este estudo foi desenvolvido utilizando células COS pelo fato desta linhagem expressar três tipos de receptores PAC1 (Moro, 1997; Lerner, 2007). Posteriormente, este fato foi confirmado em 2002 com o estabelecimento de um ensaio funcional para a ativação do receptor de PAC1 em melanóforos, que são células estreladas em fibroblastos localizados no tecido conjuntivo, caracterizado pela presença de numerosos grânulos de melanina no citoplasma. (Lerner, 2007).

O PAC1 pertence à família de receptores associados à proteína Gs/q (GPCR), cujo agonista endógeno é o PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Peptide). O PACAP é um peptídeo pleiotrópico bioativo, primeiramente isolado de hipotálamo de ovinos (Miyata e col., 1989), que pertence à superfamília dos peptídeos secretina/glucagon/VIP. O PACAP está largamente distribuído no sistema central e periférico atuando como neurotransmissor, neuromodulador e fator neurotrópico, principalmente através de sua ligação a receptores GPCR tipo PAC1 e como menos afinidade a receptores VPAC (Lee e Seo, 2014). Endogenamente, o PACAP pode sofrer processamento proteolítico pós-tradução gerando polipeptídeos de diferentes tamanhos que podem apresentar diversas funções biológicas. Estes peptídeos foram mostrados participar na regulação hormonal; terem papel no

metabolismo lipídico; na prevenção contra danos neurológicos e cardíacos; na modulação da liberação de IL-6; aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias; na, angiogênese; e na e proliferação de células endoteliais (Castorina e col., 2010). O PACAP também tem sido mostrado modular o sistema endócrino, regulando a secreção de hormônio gonadotrófico (Köves e col., 2014), da secreção de insulina por células Beta pancreáticas e no metabolismo da glicose (Jamen e col., 2000).

A ativação de PAC1 pelo PACAP pode disparar diferentes vias de sinalização, dependendo do tipo celular (Fig.6). A ativação do GPCR via proteína Gs leva a ativação da adenilato ciclase, com aumento na concentração intracelular de AMPc e ativação da PKA e vias subsequentes. A ativação da proteína Gq, via PAC1 leva a ativação da via Fosfolipase C (PLC- γ)/ PKC, com produção de IP3 e DAG e consequente liberação da Ca⁺⁺ do retículo (Fig. 4)(Mercer e col., 2004; Braas, 1999; Mustafa e col., 2010). Trabalhos recentes mostram que o receptor PAC1 desempenha um papel central na modulação da proliferação, na diferenciação ou na sobrevivência celular durante seu desenvolvimento (Blechman e Levkowitz, 2013).

Figura 6 - Vias de sinalização intracelular estimuladas pela ativação de receptores PAC 1 e VPAC



O maxadilan não apresenta sequência homóloga ao PACAP, embora possa se ligar no mesmo sítio do receptor PAC1 e promover sua ativação com igual potência. Interessantemente, embora o maxadilan, assim como o PACAP, ative o receptor PAC1, diferentemente, não tem atividade em receptores VPAC1 e VPAC2 (Lerner, 2007).

Maxadilan e seu antagonista, M65, ao se ligarem especificamente ao receptor PAC1, tornaram-se ferramentas úteis em estudos *in vitro* auxiliando na identificação e evidenciando a função deste receptor. Sendo um ativador seletivo, permite investigar as funções endógenas do PACAP moduladas através desse receptor em vários tipos celulares, como neurônios, células gástricas, pâncreas (Gower e col., 2003; Mercer e col., 2004; Yamada e col., 2004; Lerner e col., 2007). Contudo, não há na literatura relatos sobre seus efeitos diretos em células endoteliais, bem como sobre os mecanismos moleculares que contribuem para o aumento da permeabilidade vascular e acúmulo de leucócitos observados *in vivo* após a picada do flebótomo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este estudo visa investigar os efeitos diretos do maxadilan sobre as células endoteliais, bem como analisar os mecanismos de sinalização intracelular envolvidos em suas ações.

2.2 Desenho experimental

Utilizando culturas de células endoteliais humanas, investigamos os efeitos do maxadilan sobre a permeabilidade endotelial e analisamos:

- a) participação da via de sinalização da VE-Caderina;
- b) alterações na dinâmica do citoesqueleto de Actina e o papel da paxilina;
- c) a participação da FAK;
- d) e a participação da via de sinalização da Src.

3 MÉTODOS

3.1 Maxadilan

O maxadilan utilizado neste trabalho foi doado pelo Dr Erik Svensjo (IBCCF/UFRJ). O peptídeo foi purificado a partir de glândulas salivares de fêmeas de *L. longipalpis* (Departamento de Entomologia, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil) com 3-5 dias de idade, conforme descrito anteriormente (Svensjo e col., 2008).

3.2 Cultura de células

Em nossos experimentos, utilizamos a HMEC-1, uma linhagem celular de endotélio de microvasculatura humana (Ades e col., 1992), obtida pelo Dr. Francisco Candal, Emory School of Medicine & CDC, Atlanta, GA (USA), doada pela Dra Verônica Morandi (UERJ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Em alguns ensaios, foram utilizadas HUVECs, células endoteliais obtidas da cultura primária de cordão umbilical humano (Jaffe e col., 1973), doada pela Dra Verônica Morandi (UERJ). O uso de cultura de células humanas primárias foi autorizado pelo comitê de ética da UERJ (CAAE: 0086.0.314.325-10)

As células HMEC1 foram cultivadas sobre gelatina 1%, utilizando meio de cultura MCDB-131 (Gibco Invitrogen Corporation) suplementado com 14,04 mM de NaHCO_3 , 15mM de HEPES, 0,560 mg/mL de penicilina, 100mg/mL de streptomina, 1 μg /mL de hidrocortisona, 10 μg /mL de EGF (Gibco Invitrogen Corporation), 2mM de L-glutamina e com 10% de FBS em pH 7,2. As células foram cultivadas em garrafas de cultura (Corning) e mantidas a 5% de CO_2 e temperatura constante de 37°C. O meio de cultura foi renovado ou as células foram repicadas, quando confluentes, a cada 2-3 dias. Para repicarmos a linhagem de HMEC1, foi utilizado inicialmente uma solução de Hank's EDTA (5 mM), desfazendo as ligações adesivas dependentes de cátions (Ca^{2+} e Mg^{2+}), facilitando, assim, a atuação subsequente da tripsina para

soltar esses tipos celulares do plástico. Para repicarmos a HUVEC, as células foram lavadas com uma solução de PBS (tampão fosfato de sódio, NaCl 3 M, NaH₂PO₄ 0,2M) e, posteriormente, adicionada a tripsina. Depois de serem descoladas do plástico da garrafa, as células foram centrifugadas a 1200 rpm durante 10 minutos e cultivadas em novas garrafas de cultura. Utilizamos o limite máximo de 10 passagens da célula HMEC1 e 3 passagens das células HUVEC.

3.3 Eletroforese e *Western blotting*

Para a determinação da expressão de FAK, FAK fosforilada (pFAK), VE-Caderina total e fosforilada (p-VE-Caderina), foi utilizada a técnica de *western blotting*, conforme descrita anteriormente por Nascimento-Silva V e col. (2007). As células HMEC1 (10⁶ células/poço) foram cultivadas em placas de 6 poços e incubadas ou não com maxadilan por diferentes períodos de tempo. Após as incubações, as células foram lisadas em tampão de lise RIPA (50 mM de Tris, pH 8, 150 mM de NaCl, 1% de Triton X-100, 0,1% de SDS, 5 mM de EDTA, 50 mM de NaF, 30 mM de NaH₂PO₄, 100 mM de Na₃VO₄, 1 mM de PMSF e coquetel de inibidores) por 30 minutos. O conteúdo de proteínas do extrato total foi determinado pelo método de BCA (ThermoScientific). As proteínas foram desnaturadas adicionando 20% do seu volume de tampão de amostra (Tris-HCl a 50 mM com pH 6,8, 1% de SDS, 10% de glicerol, 0,001% de azul de bromofenol e 5% de β-mercaptoetanol). Posteriormente, as amostras foram fervidas por 5 minutos. O volume dos extratos celulares correspondentes a 30 µg de proteína foram fracionados por eletroforese em gel desnaturante de poli(acrilamida) (SDS-PAGE). Após 90 minutos de eletroforese a 150 V e 25 mA, as proteínas do gel foram transferidas para membranas de PVDF (AmershamBiosciences) por eletrotransferência submersa (100V, Mini Trans-BlotCell- Bio-Rad), durante 1 hora. A eficiência da transferência foi avaliada pela coloração da membrana com o vermelho de *Ponceau*. Após a lavagem em água destilada para retirada do corante, a membrana foi incubada por 1 hora a temperatura ambiente sob agitação, seguida pela incubação *overnight* à 4°C com solução de bloqueio contendo BSA 5% e Tween-20 0,5% em PBS (T-PBS). Em seguida, as membranas foram incubadas

overnight sob agitação a 4°C com anticorpo primário anti-pFAK (1:1000), anti-FAK (fosforilada no resíduo 397) (1:1000), anti-VE-Caderina (1:1000), anti-Ve-Caderina (fosforilada no resíduo 6581:1000), anti-actina (1:1000) diluído em T-PBS contendo BSA 2%. Após a incubação, as membranas foram lavadas com T-PBS (3 vezes por 5 minutos) e incubadas sob agitação com anticorpo secundário anti-coelho e anti-cabra conjugados à biotina (diluídos 1:10000 em T-PBS) por 1 hora. As membranas foram lavadas (3 vezes por 5 minutos) e incubadas com streptavidina conjugada à peroxidase (1:10000), durante 1 hora, sob agitação. As membranas foram, então, lavadas e incubadas com solução de quimioluminescência (kit ECL Prime *Western Blotting Detection Reagent*- GE Healthcare). As bandas imunorreativas foram visualizadas por ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad). As imagens foram analisadas com o software ImageJ.

3.4 Imunoprecipitação

Analisamos a associação de FAK/Actina e VE-Caderina/Src através da técnica de imunoprecipitação, como descrito por Nascimento-Silva V e col. (2007). As células HMEC1 (10^6 células/poço) foram distribuídas em placas de 6 poços e mantidas a 37°C e 5% CO₂ durante 72 horas. Após a incubação, as células foram lisadas em tampão de lise (50 mM de Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM de NaCl, 1,5 mM de MgCl₂, 1,5 mM de EDTA, 1% de Triton X-100, 10% de glicerol, 10µg/mL de aprotinina, 10µg/mL de leupeptina, 2 µg/mL de pepstatina e 1 mM de PMSF) para a obtenção do extrato celular, que foi incubado *overnight* com anticorpo anti-FAK 1:200 (Santa Cruz) ou anti-VE-Caderina 1:200 (Santa Cruz) a 4°C. Logo após, o extrato foi imunoprecipitado com a proteína A/G agarose (20µL/amostra - Santa Cruz), durante 2 horas a 4°C, sob agitação. Após a incubação com a proteína A/G agarose, as células foram centrifugadas a uma velocidade de 13000rpm por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspense em 50µl de tampão de amostra (Tris-HCl a 50 mM com pH 6,8, 1% de SDS, 10% de glicerol, 0,001% de azul de bromofenol e 5% de β-mercaptoetanol) para a desnaturação protéica. Posteriormente, as amostras foram fervidas por 5 minutos. Os imunoprecipitados foram analisados por *Western Blotting*.

3.5 Permeabilidade celular

Os ensaios de permeabilidade foram realizados em câmaras de transwell (Becton Dickinson). Estas câmaras são constituídas de membranas de policarbonato na forma de insertos que são colocadas no interior de poços de placa de cultura de 24 poços. As membranas dos insertos apresentam porosidade de 0,4 μm . Primeiramente, as células HMEC-1 (4×10^4 células/inserto) foram cultivadas nos insertos que foram alocados nas placas de 24 poços. Estas células foram mantidas a 37°C e 5% de CO_2 durante 72 horas até atingirem 100% de confluência em meio MCDB-131 suplementado com 10% de FBS. As células foram privadas de soro por 1 hora e mantidas em meio HBSS (solução-tampão salina de Hank's) (0,137 M NaCl, 5,4 mM KCl, 0,25 μM NaHPO_4 , 0,44 mM KH_2PO_4 , 1,3 CaCl_2 , 1 mM MgSO_4 , 4,2 mM NaHCO_3). Após este período as células foram pré-tratadas ou não com os inibidores de Src (1 μM) e o antagonista do receptor PAC1 (M65, 160 nM) durante 15 minutos. Posteriormente, as células foram estimuladas ou não com maxadilan (25, 50 e 100 ng/ml) ou Angiotensina (100 nM), utilizada como controle positivo. Após a incubação, foi adicionado Dextran FITC (1mg/mL) diluído em meio HBSS, dentro dos insertos. Após 5 e 30 minutos, 20 μL foi retirado da solução do compartimento abaixo do inserto. A quantidade de fluorescência emitida pelo Dextran FITC foi monitorada pela excitação e emissão de ondas entre 485/530 nm em leitor de microplacas (Envision® - Perkin Elmer).

3.6 Citoquímica

As células HMEC1 (5×10^4 células/poço) foram distribuídas em placas de 24 poços sobre lamínulas de vidro e mantidas a 37°C e 5% CO_2 durante 24 horas para adesão. As células foram estimuladas ou não com maxadilan (50 ng/ml). Após o tratamento, as células foram fixadas com paraformaldeído (4% de sacarose), lavadas três vezes com PBS e permeabilizadas com Triton X-100 0,2% em PBS por 5 minutos. Após a lavagem com PBS, as células foram incubadas durante 2 horas com faloidina conjugada a rodamina (1:500, Sigma) para a marcação da actina

polimerizada (F-actina). Após esse período, as lamínulas foram lavadas com PBS e montadas sobre lâminas utilizando 5 μ L de DAPI *prolong* (Invitrogen) para a marcação nuclear. A distribuição de F-actina foi observada utilizando um microscópio de fluorescência invertido (Olympus IX71) em aumento de 60 e 100 vezes.

3.7 Imunocitoquímica

As células HMEC1 (5x10⁴ células/poço) foram distribuídas em placas de 24 poços sobre lamínulas de vidro e mantidas a 37°C e 5% CO₂ durante 24 horas para adesão. As células foram estimuladas ou não com maxadilan (50 ng/ml). Após o tratamento, as células foram fixadas com paraformaldeído com 4% de sacarose em PBS por 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, as lamínulas foram lavadas 3 vezes com PBS e permeabilizadas com Triton X-100 0,2% em PBS por 5 minutos. A seguir as células foram bloqueadas com PBS contendo 5% BSA durante 1 hora. Após este período, as células foram incubadas primeiramente com anticorpo primário *overnight* policlonal anti-VE-caderina (1:400). No dia seguinte, as lamínulas foram lavadas com PBS e posteriormente incubadas com anticorpo anti-IgG (cabra) conjugado a biotina (1:400) por 1 hora. Após lavagem com PBS as células foram incubadas por 1 hora com estreptavidina conjugada a Alexa fluor (555) (1:400). Após a marcação as células foram incubadas com anticorpo primário *overnight* policlonal anti-Src (1:400). No dia seguinte, as lamínulas foram lavadas com PBS e incubadas com anti-IgG (coelho) conjugado a biotina (1:400) por 1 hora. Após lavagem com PBS as células foram incubadas por 1 hora com estreptavidina conjugada a Alexa fluor (488) (1:400). Após esse período, as lamínulas foram lavadas com PBS e montadas sobre lâminas utilizando *prolong Gold antifade*. A distribuição da VE-caderina e Src foram observadas utilizando um microscópio de fluorescência invertido (Olympus IX71, Tokyo, Japão) em aumento de 630 vezes. As imagens foram então digitalizadas e processadas utilizando o software Adobe Photoshop.

3.8 Internalização de VE-Caderina

A internalização de VE-Caderina foi detectada através por *western blotting* e imunocitoquímica, como descrito por Rong Li e col. (2012). Resumidamente:

As células HMEC1 (10^6 células/poço) foram cultivadas em placa de 6 poços por 24 horas ou até atingirem confluência. Após incubação, as células foram destacadas com tripsina (0,1% de EDTA e 0,15% de tripsina) e centrifugadas. O *pellet* obtido foi então ressuspenso em tampão de lise RIPA, seguindo-se o protocolo de *western blotting*.

Para determinação da internalização de VE-Caderina pela técnica de imunocitoquímica, as células HMEC1 (5×10^4 células/poço) foram distribuídas em placas de 24 poços sobre lamínulas de vidro e mantidas a 37°C e 5% CO₂ durante 24 horas para adesão e confluência. Após esse período, as células foram incubadas com anti-VE-Caderina por 1 hora e em seguida incubadas ou não com MAX. Após a incubação, as lamínulas foram lavadas com PBS ácido por 30 minutos (pH 2,7) para remover a marcação da VE-Caderina extracelular da célula endotelial. Logo após, as células foram fixadas com paraformaldeído com 4% de sacarose em PBS por 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, as lamínulas foram lavadas 3 vezes com PBS e permeabilizadas com Triton X-100 0,2% em PBS por 5 minutos. A seguir as células foram bloqueadas com PBS contendo 5% BSA durante 1 hora. Após este período, as células foram incubadas com anticorpo anti-IgG (cabra) conjugado a biotina (1:400) por 1 hora. Após lavagem com PBS, as células foram incubadas por 1 hora com estreptavidina conjugada a Alexa fluor (555) (1:400). Após esse período, as lamínulas foram lavadas com PBS e montadas sobre lâminas utilizando prolong Gold antifade com DAPI. A internalização da VE-caderina foi observada utilizando um microscópio de fluorescência invertido (Olympus IX71, Tokyo, Japão) em aumento de 630 vezes. As imagens foram então digitalizadas e processadas utilizando o software Adobe Photoshop.

3.9 Análise estatística

Os resultados obtidos são expressos como média \pm desvio padrão da média. Os dados foram analisados por teste Anova e pós-teste de Bonferroni, com auxílio

do programa GraphPad Prism 5 para Windows. Foram consideradas diferenças significativas onde $P < 0.05$.

4 RESULTADOS

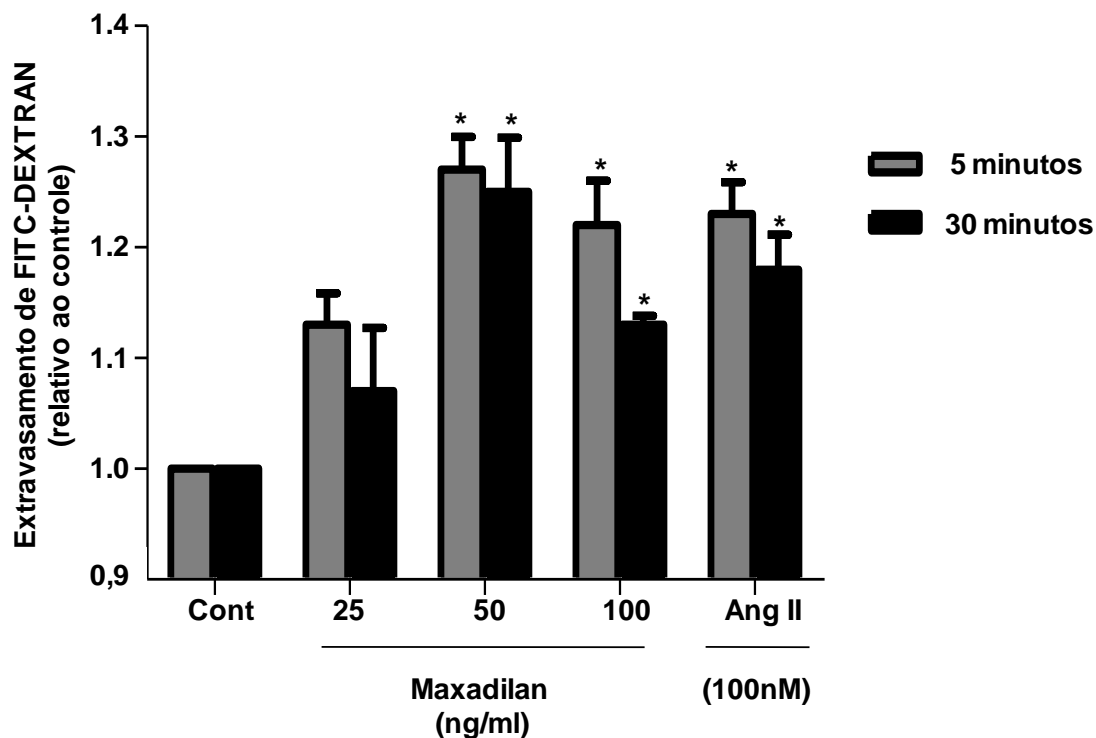
4.1 Maxadilan induz aumento da permeabilidade endotelial

A permeabilidade vascular é o evento chave no controle de várias patologias vasculares incluindo inflamação (Orsenigo e col., 2012). Como dito, Svensjö e col., (2012) mostraram que o maxadilan induz aumento da permeabilidade vascular em vênulas pós-capilares, in vivo.

Investigamos o efeito do maxadilan sobre a permeabilidade endotelial através do ensaio de permeabilidade ao dextran-FITC em monocamadas de HMEC-1 tratadas com diferentes concentrações do peptídeo em dois tempos: após 5 minutos e após 30 minutos de tratamento.

A figura 7 mostra que o maxadilan (25/ 50/ 100 ng/ml) induz após 5 minutos da estimulação, um significativo aumento da permeabilidade endotelial ao Dextran-FITC que é concentração dependente. O aumento do fluxo tem um pico na dose de 50 ng/ml, sendo comparável ao efeito da Angiotensina II (Ang II), mantendo-se estável na concentração de 100ng/ml. Não há diferença no fluxo do Dextran-FITC mensurado após 30 minutos, quando comparado com 5 minutos, sugerido que este efeito do maxadilan é máximo neste tempo.

Figura 7 - Maxadilan induz aumento da permeabilidade endotelial



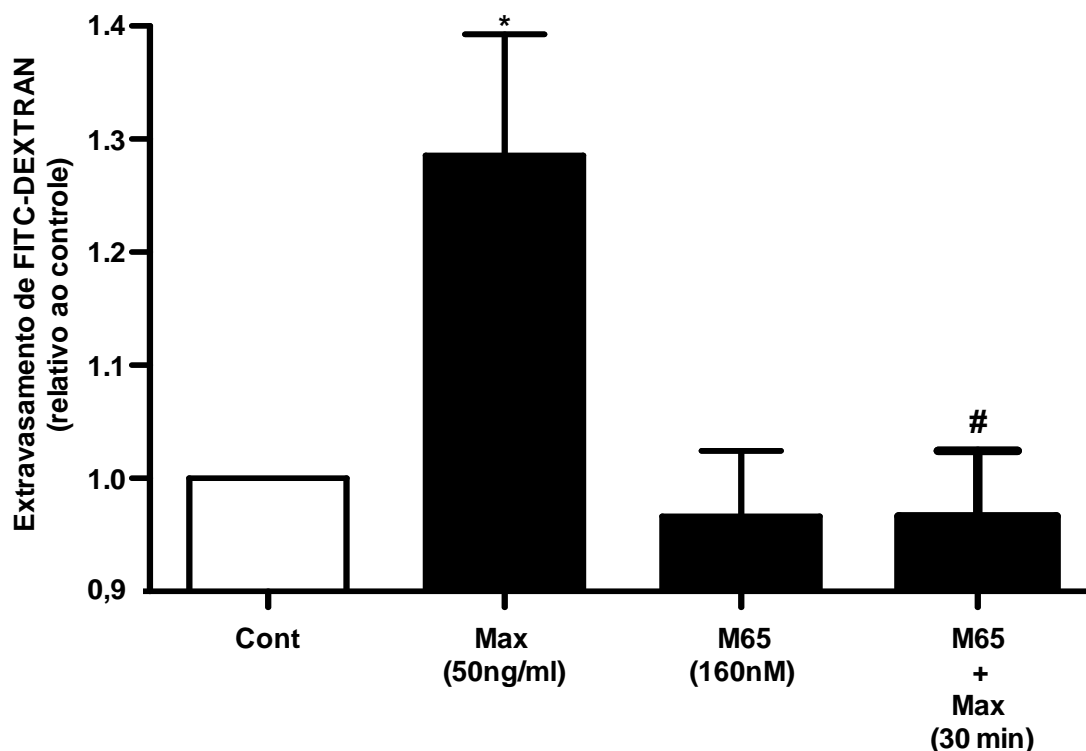
Legenda: HMEC foram incubadas na ausência ou presença de diferentes concentrações de maxadilan (25, 50, 100ng/ml) por 5 e 30 minutos. A permeabilidade está representada pela quantificação do acúmulo de fluorescência derivada da passagem de dextran-FITC pela camada de HMEC-1. A angiotensina II (ANGII) foi utilizada como controle positivo. Os dados são expressos como média \pm D.P. de 5 experimentos idênticos com resultados similares. * $p < 0,05$ quando comparado às células na ausência de maxadilan.

4.2 Maxadilan induz aumento da permeabilidade endotelial via receptor PAC1

Os efeitos vasoativos e pró-inflamatórios do maxadilansão mediados pela sua ligação específica ao PAC1 (Timmerman e col., 2012). A fim de investigar a participação do receptor PAC1 no efeito do maxadilan sobre o aumento da permeabilidade de HMEC-1, as células foram pré-tratadas com M65(160 nM), um antagonista específico do receptor PAC1, seguido pela incubação na ausência ou presença de maxadilan (50 ng/ml). Conforme mostrado na figura 8, o inibidor bloqueou o efeito do maxadilan sobre o aumento da permeabilidade ao Dextran,

sugerindo que este efeito é dependente da ativação do receptor PAC1 pelo maxadilan.

Figura 8 - Maxadilan induz aumento da permeabilidade endotelial via receptor PAC1



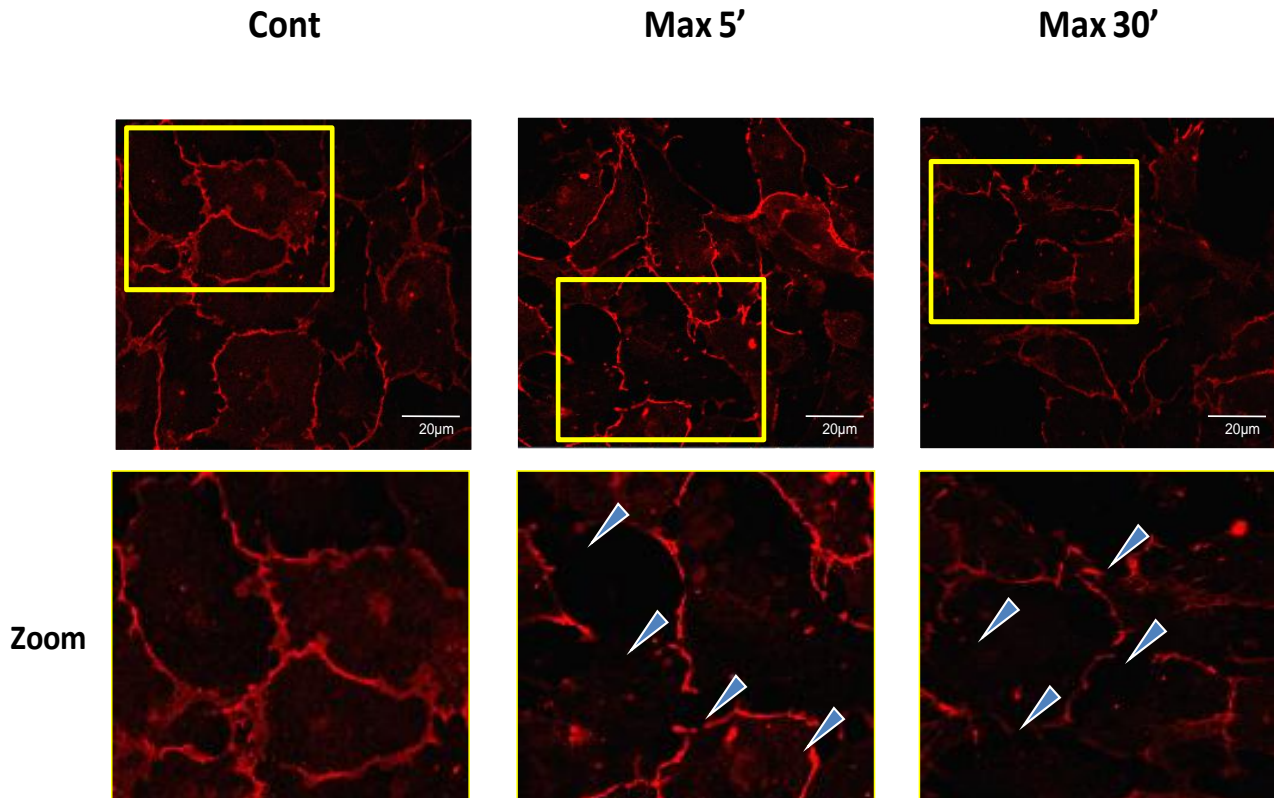
Legenda: As células HMEC foram pré-tratadas (15 min) com M65 (160 nM), um antagonista do receptor PAC-1 e imediatamente depois incubadas na ausência ou presença de maxadilan (50ng/ml) por 30 minutos. A permeabilidade foi quantificada pelo acúmulo de fluorescência derivada da passagem de dextran-FITC pela camada de HMEC-1. Os dados são expressos como média \pm D.P. de 5 experimentos idênticos com resultados similares. * $p < 0,05$ quando comparado às células na ausência de maxadilan; # $p < 0,05$ quando comparado com as células tratadas com maxadilan.

4.3 Maxadilan induz dispersão de VE-Caderina

A VE-Caderina é a principal molécula presente nas junções aderentes que medeia o contato célula-célula tendo um papel fundamental na permeabilidade vascular (Potter e col., 2005). A dispersão de VE-Caderina foi avaliada por imunocitoquímica em HMEC-1 cultivadas sobre as lamínulas e tratadas com maxadilan na concentração de 50 ng/ml por 5 a 30 minutos. A Figura 9 mostra que em contraste com o grupo não tratados que apresentavam VE-caderina distribuídas

na membrana, o tratamento com maxadilan promoveu dispersão da VE-Caderina da membrana a partir de 5 minutos que se mantém após 30 minutos de incubação com o peptídeo.

Figura 9 - Maxadilan induz dispersão de VE-Caderina da membrana



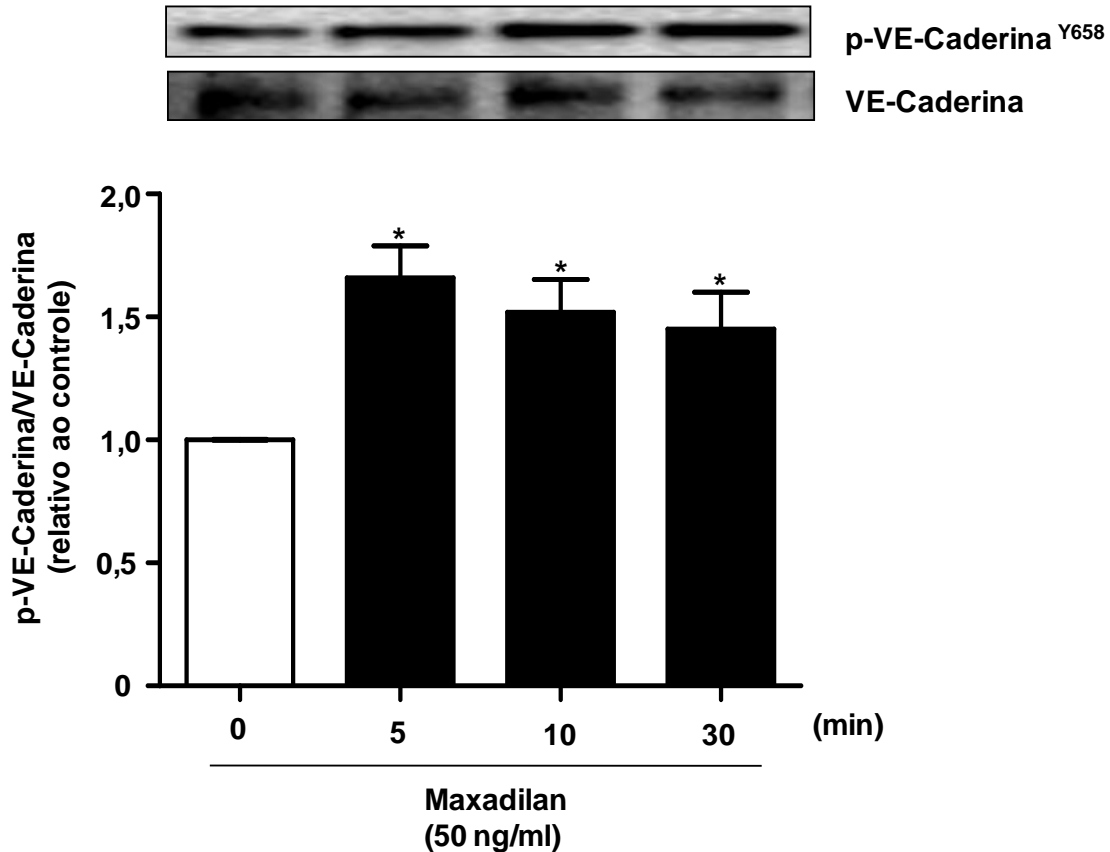
Legenda: Células HUVEC foram cultivadas em lamínulas foram tratadas com maxadilan (50ng/ml) por 5 e 30 minutos. As células foram fixadas, permeabilizadas e marcadas com anti-VE-Caderina e anticorpo secundário Alexia 555. As imagens foram adquiridas em aumento de 630 X e são representativas de 3 experimentos independentes. Setas indicam dispersão de VE-caderina da membrana.

4.4 Maxadilan induz fosforilação de VE-Caderina

A VE-Caderina é a principal molécula de junções aderentes presente nas células endoteliais e sua fosforilação em resíduos específicos de tirosina como Y658, está associada ao aumento da permeabilidade endotelial (Yukitatsu e col., 2013). Avaliamos por *western blots* se o maxadilan (50 ng/ml) induziria um aumento na fosforilação em Y658 em células HMEC-1. A Figura 10 mostra que o maxadilan

promoveu a fosforilação de VE-Caderina após 5 minutos de incubação, o que persistiu até 30 minutos após o tratamento.

Figura 10 - Maxadilan induz fosforilação de VE-Caderina



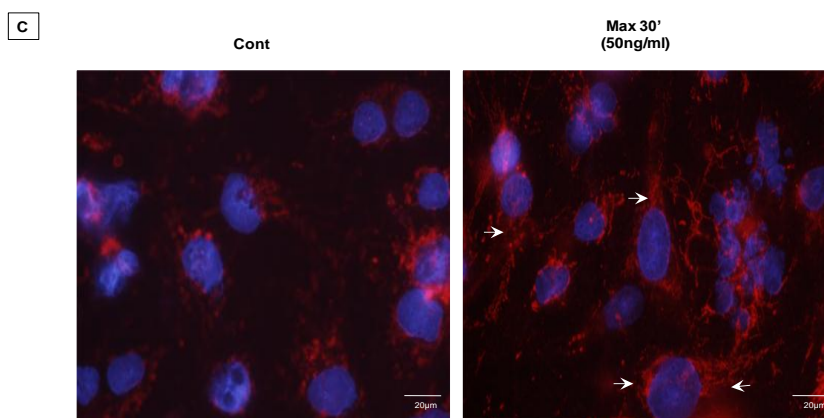
Legenda: HMEC foram cultivadas por diferentes períodos de tempo na ausência ou presença de maxadilan (50 ng/mL). A fosforilação de VE-Caderina foi analisada por *western blot* utilizando anticorpo anti-p-VE-Caderina. Os blots foram analisados por densitometria e a razão p-VE-Caderina/VE-Caderina foi determinada. Os dados são expressos como média \pm D.P. de 5 experimentos realizados independentes. * $p < 0,05$ quando comparado às células sem tratamento com maxadilan.

4.5 Maxadilan induz internalização de VE-Caderina

A internalização de VE-caderina é uma dos principais mecanismos moleculares pelos quais a permeabilidade vascular pode ser modulada em células endoteliais (Dejana, 2008). Para determinar o nível de internalização de VE-caderina induzida pelo maxadilan, após o tratamento com o peptídeo (50 ng/ml; 30 min), as HMEC-1 foram tratadas com tripsina a fim de remover a VE-caderina contida nas junções celulares, posteriormente analisada por *western blotting*, e também foi utilizado

tampão ácido que remove a marcação do anticorpo VE-caderina presente nas junções celulares e analisada por imunocitoquímica. Como mostra a figura 11-A, o maxadilán promoveu um aumento na internalização da VE-Caderina após 30 minutos de tratamento, em comparação ao controle. Essa internalização não foi consequência da degradação de VE-caderina, uma vez que não houve alteração na quantidade de VE-Caderina total (Figura 11-B). Confirmando esses resultados, podemos observar por ensaio de imunocitoquímica que incubação das células HMEC-1 com maxadilán levou a internalização de VE-Caderina, conforme apontado pelas setas na Figura 11-C.

Figura 11 - Maxadilán induz internalização de VE-Caderina



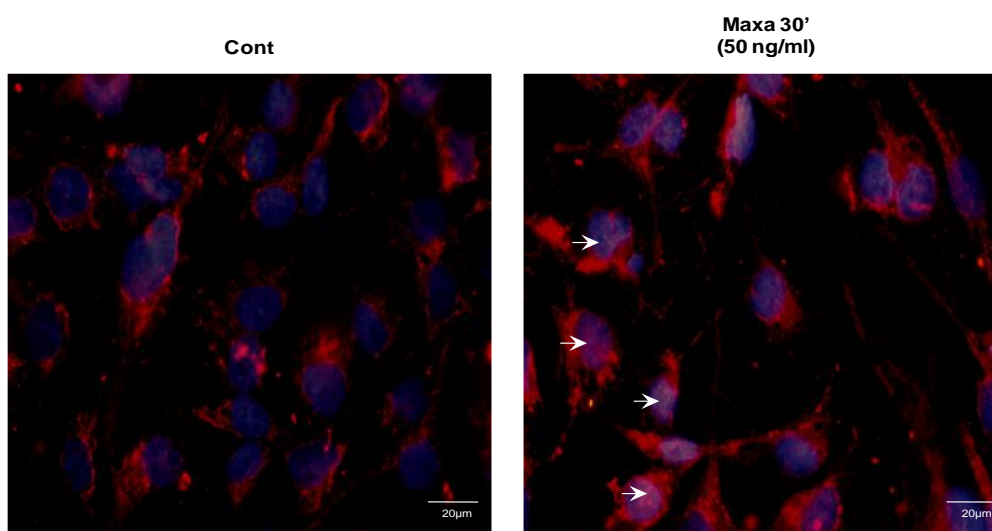
Legenda: HMEC foram incubadas na ausência ou presença de maxadilán (50ng/ml) por 30 minutos. Para investigar a internalização de VE-Caderina, as células foram descoladas com (A) ou sem (B) tratamento com tripsina e preparadas para o ensaio de *western blot* no qual foram utilizados anticorpos anti-VE-Caderina ou anti-Actina. Os blots foram analisados por densitometria e a razão VE-Caderina/Actina foi determinada e expressa em unidades arbitrárias. Os dados são expressos como média \pm D.P. de 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$ quando comparado às células sem tratamento com maxadilán. (C) As células foram marcadas com anti-VE-Caderina e realizada o tratamento com maxadilán (50ng/ml). Após o tratamento foi realizada a lavagem ácida para remover VE-Caderina da superfície celular. A VE-Caderina internalizada foi analisada por microscopia de fluorescência no aumento de 630x.

4.6 Maxadilán induz a translocação de β -catenina para o núcleo

A β -catenina desempenha um papel importante na célula endotelial como um dos principais componentes das junções aderentes célula-célula. Em células quiescentes, a β -catenina apresenta-se no citoplasma, em geral associada

o complexo VE-Caderina, podendo translocar para o núcleo em células ativadas (Timmerman, 2012). Em células tratadas com maxadilan (50 ng/ml) avaliamos a translocação da β -catenina para o núcleo através do ensaio de imunocitoquímica, utilizando anticorpo anti- β -catenina. Conforme mostrado na Figura 12, as células HMEC1 não tratadas apresentam a β -catenina dispersa pelo citoplasma. O tratamento com maxadilan promoveu um aumento da translocação de β -catenina para o núcleo após 30 minutos de incubação.

Figura 12 - Maxadilan induz a translocação de β -catenina para o núcleo



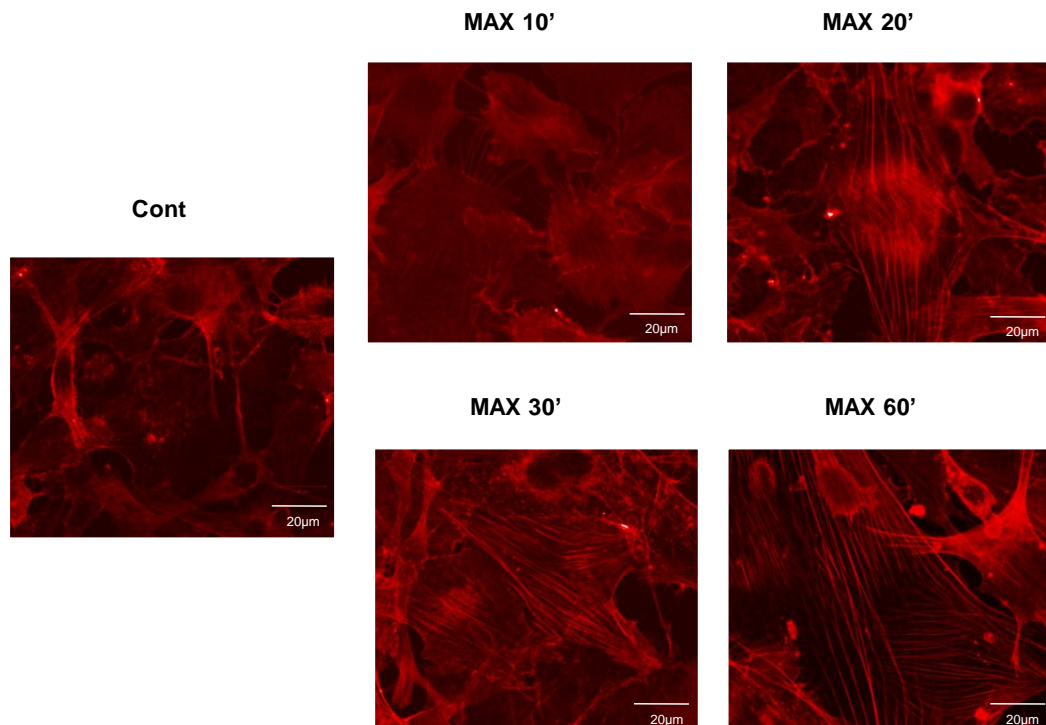
Legenda: Células HMEC1 foram incubadas na ausência ou na presença de maxadilan (50ng/ml) por 30 minutos. As células foram fixadas, permeabilizadas e marcadas com anti- β -catenina e anticorpo secundário Alexia 555. As imagens foram adquiridas no aumento de 630 X e são representativas de 3 experimentos independentes. Setas indicam a marcação nuclear de β -catenina.

4.7 Maxadilan induz a reorganização do Citoesqueleto de Actina

O citoesqueleto de actina desempenha um papel crucial em vários processos celulares como transporte intracelular, a migração e a citocinese. Estes processos exigem um comportamento altamente dinâmico do citoesqueleto que envolve a polimerização e despolimerização dos filamentos de actina (Foerster e col., 2014). Para avaliar o efeito do maxadilan sobre a organização do citoesqueleto de

actina, as células endoteliais foram incubadas com maxadilan (50 ng/ml) por diferentes períodos de tempo e a dinâmica da F-actina foi avaliada pela marcação com Faloidina conjugada a rodamina. Na figura 13, as células HMEC1 controle (Cont) se apresentam com uma forte marcação para F-actina na região cortical perimembranar. O tratamento com maxadilan (50ng/ml) induz, já a partir de 20 minutos, a formação de fibras de estresse ao longo do citosol que se mantém até 60 minutos após tratamento (Fig. 13).

Figura 13 - Maxadilan induz a reorganização do Citoesqueleto de Actina

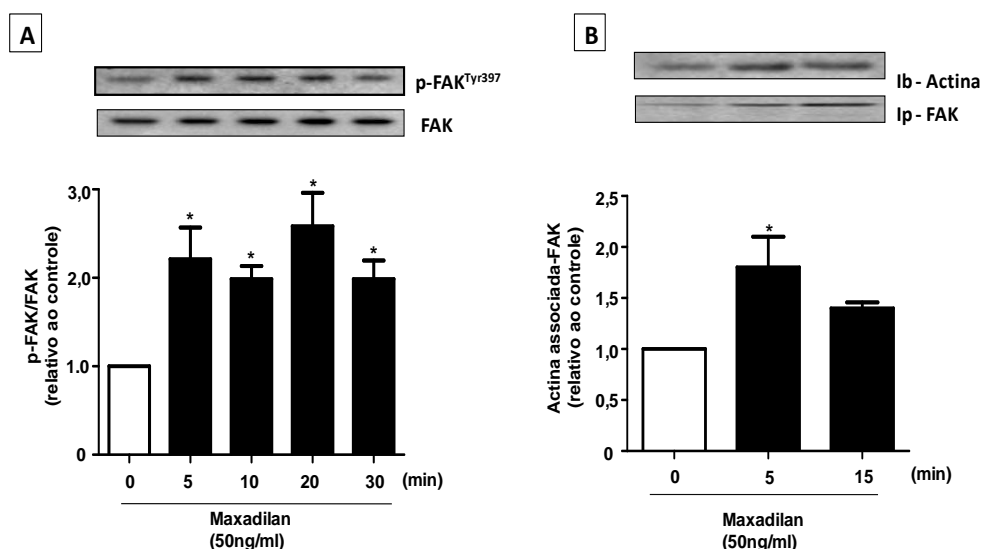


Legenda: As células HMEC1 foram incubadas com maxadilan (50ng/ml) por diferentes períodos de tempo. As células foram fixadas, permeabilizadas e marcadas para Faloidina-Rodamina. As imagens foram adquiridas no aumento de 630 X e são representativas de 3 experimentos independentes.

4.8 Maxadilan induz fosforilação de FAK e sua associação a actina

A FAK é recrutada nos estágios iniciais da formação de adesão focal, atuando como mediador da transdução mecânica, através da associação com o citoesqueleto e como mediador de vários sinais intracelulares (Kennely e col., 1991). Para investigar se o maxadilan induzia ativação de FAK e sua associação com o citoesqueleto de actina, as células endoteliais foram incubadas com o peptídeo (50 ng/ml) por diferentes períodos de tempo e os efeitos analisados por imunoblotting. A figura 14-A mostra que o maxadilan induziu um aumento da fosforilação de FAK em resíduos Y³⁹⁷ a partir de 5 minutos, mantendo-se até 30 minutos de tratamento. Observamos ainda que aos 5 minutos, a fosforilação da FAK ocorre em paralelo com o aumento da associação da FAK com F-actina (Fig. 14-B). No entanto, este efeito mostrou-se transiente, não sendo mais observado após 15 minutos de tratamento com maxadilan (Fig. 14-B).

Figura 14 - Maxadilan induz fosforilação de FAK e sua associação a actina

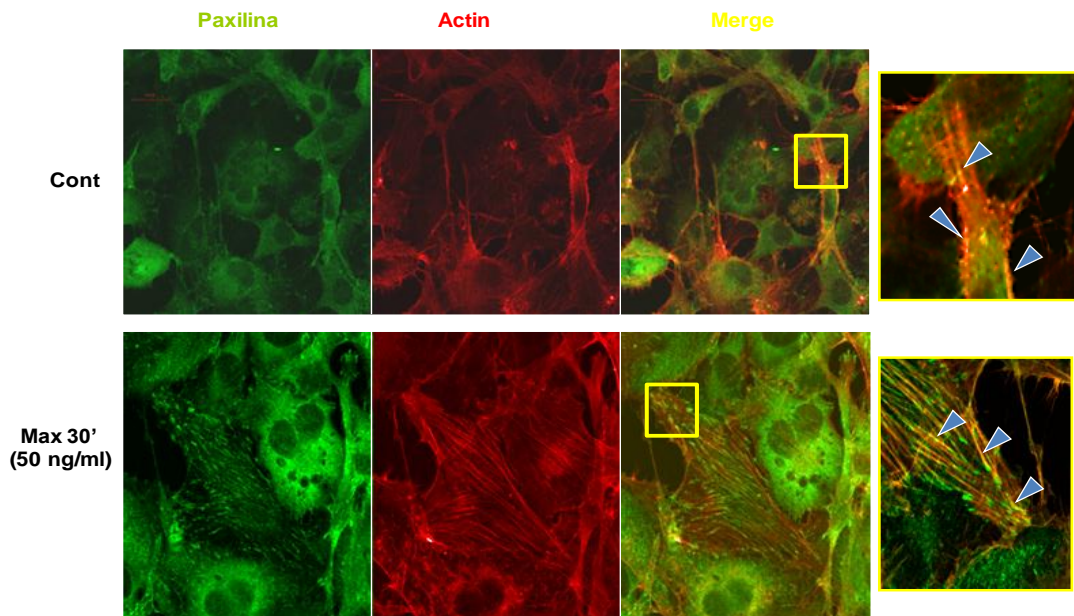


Legenda: Células HMEC1 foram cultivadas por diferentes períodos de tempo na ausência ou na presença de maxadilan (50ng/mL). A fosforilação de FAK foi analisada por ensaio de *western blot* utilizando anticorpo anti-p-FAK (Y³⁹⁷) e anti-FAK. Os blots foram analisados por densitometria e mostrados pela relação p-FAK/FAK. Os dados são expressos como média ± D.P. de 4 experimentos independentes. * p<0,05 quando comparado às células sem tratamento com maxadilan. (B) As células foram lisadas e imunoprecipitadas para FAK. Os blottings foram revelados para FAK (ip FAK:FAK) a para actina (ip FAK: Actina). A imagem é representativa e os gráficos representam a média ± D.P. de 3 experimentos independentes. P<0,05.

4.9 Maxadilan induz redistribuição de Paxilina

A paxilina é uma proteína adaptadora do citoesqueleto que está associada na adesão focal desempenhando papel chave na montagem, na interação com citoesqueleto e transdução de sinal (Brown e Turner, 2004). Investigamos o efeito do maxadilan (50 ng/ml) sobre a redistribuição de Paxilina em células endoteliais. A Figura 15 mostra que a paxilina encontra-se dispersa no citoplasma das células no controle, associada à actina cortical. Após o tratamento com maxadilan, a paxilina se redistribuiu, se associando a F-actina nas adesões focais e nas fibras de estresse.

Figura 15 - Maxadilan induz redistribuição de Paxilina

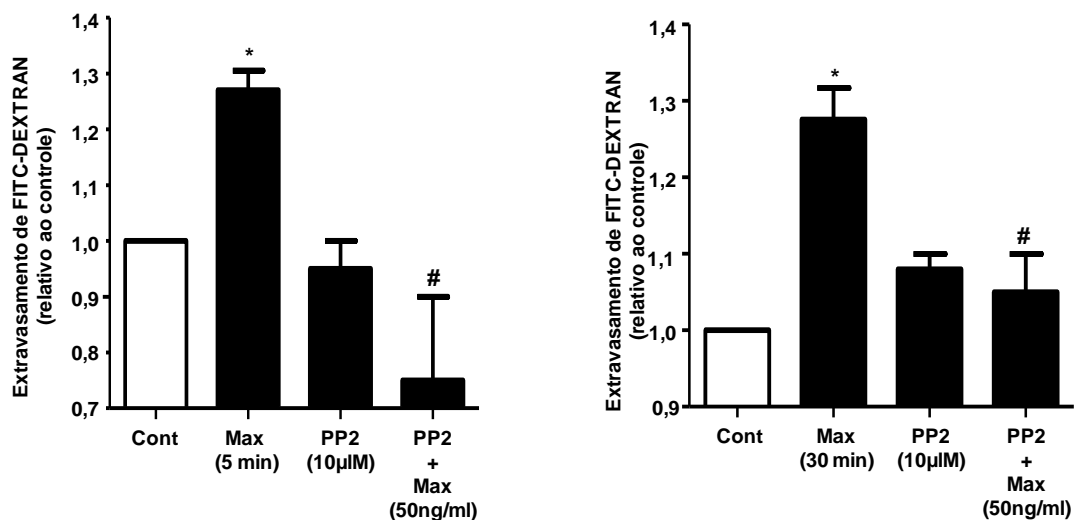


Legenda: As células HMEC1 foram incubadas na ausência ou presença de maxadilan (50ng/ml) por 30 minutos, fixadas, permeabilizadas e marcadas para F-Actina e Paxilina usando Faloidina-Rodamina ou e anti-Paxilina, com anticorpo secundário Alexia 488. As imagens foram adquiridas por microscopia de fluorescência no aumento de 630x. As imagens são representativas de 3 experimentos independentes. Setas indicam colocalização de paxilina com actina.

4.10 O aumento da permeabilidade endotelial induzida pelo Maxadilan é modulado pela ativação de Src

Dados da literatura mostram o envolvimento da família quinase Src na regulação da permeabilidade vascular (Adam e col., 2010). Para investigar o envolvimento de Src sobre a permeabilidade endotelial, as células HMEC-1 foram pré-incubadas com PP2, inibidor de Src e tratadas com maxadilan (50 ng/ml) por 5 e 30 minutos. A figura 16 mostra que o tratamento com o PP2 impediu o aumento da permeabilidade endotelial induzida pelo maxadilan em 5 e 30 minutos, confirmando a participação de Src no efeito de maxadilan sobre a permeabilidade endotelial.

Figura 16 - Maxadilan induz aumento da permeabilidade endotelial via ativação de Src

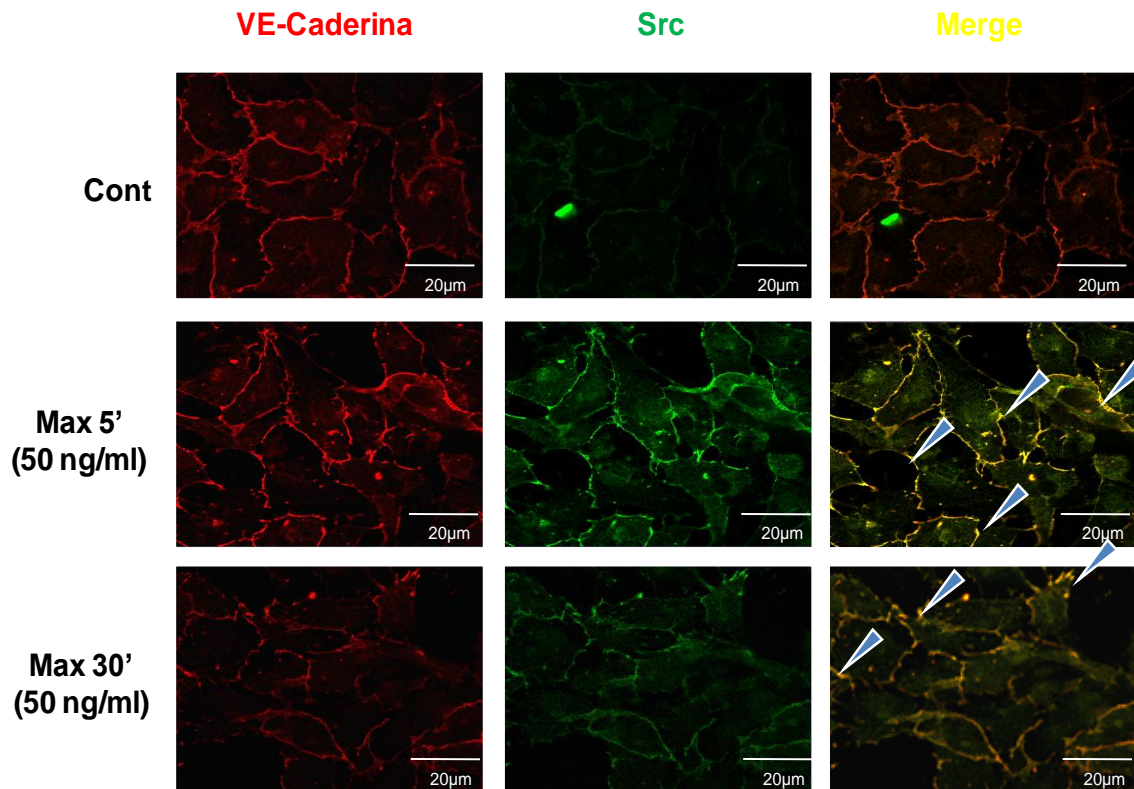


Legenda: Células HMEC1 foram incubadas na ausência ou presença de maxadilan (50ng/ml) por 5 e 30 minutos. As células foram pré-incubadas com inibidor de Src (PP2 10µM) por 15 minutos. A permeabilidade foi determinada pela quantificação da fluorescência decorrente da passagem de dextran-FITC pela camada celular. Os resultados estão expressos como porcentagem relativa ao controle. Os dados são expressos como média ± D.P. de 3 experimentos idênticos com resultados similares. * $p < 0,05$ quando comparado às células sem tratamento com MAX; # $p < 0,05$ quando comparado com as células tratadas com maxadilan.

4.11 Maxadilan induz aumento da associação de Src/VE-Caderina

Recentemente foi mostrado que agonistas como o VEGF podem induzir a translocação de Src para membrana celular levando à fosforilação de VE-caderina, o que contribui para o aumento da permeabilidade (Di Lorenzo e col.,2013). Como mostrado na Figura 17, o tratamento das células endoteliais com maxadilan (50 ng/ml) induz o recrutamento de Src para membrana celular após 5 e 30 minutos. Além disso, o maxadilan induziu a associação da Src à VE-Caderina (Fig.17; merge).

Figura 17 - Maxadilan induz recrutamento de Src para membrana



Legenda: Células HUVEC foram incubadas na ausência ou presença de maxadilan (50ng/ml) por 5 e 30 minutos, fixadas, permeabilizadas e marcadas com anticorpos anti-VE-caderina e anti-Src e anticorpo secundário Alexia 555 e 488 respectivamente. As imagens foram adquiridas através de microscopia de fluorescência usando aumento de 630 X. As imagens são representativas de 3 experimentos independentes.

5 DISCUSSÃO

Maxadilan é um peptídeo isolado a partir de lisados da glândula salivar do flebotomíneo *Lutzomya longipalpis*, vetor da leishmaniose, sendo um potente vasodilatador, exercendo funções vasoativas e pró-inflamatórias levando ao aumento da infectividade e auxiliando o inseto na obtenção de sangue, na transmissão de patógenos e neutralização da hemostasia (Lerner e col., 1991, 2007; Timmerman e col., 2012).

Durante a picada do mosquito, as células presentes no sítio de inoculação são expostas aos componentes da saliva do inseto, contribuindo para a infecção. Foi demonstrado que o maxadilan é capaz de exacerbar a infecção de *L. major* através da alteração do balanço Th1/Th2, favorecendo o desenvolvimento da resposta Th2 em macrófagos e em células dendríticas, levando ao aumento de IL-10, IL-6 e TGF- β e a diminuição das citocinas do Tipo I (IL-12p e TNF α) e NO (Brodie, e col., 2007; Wheat e col., 2008). Além disso, o maxadilan apresenta significativos efeitos hemodinâmicos, sendo capaz de causar dilatação das arteríolas e aumentar a permeabilidade vascular (Svensjö, e col., 2009). Estudo recente de nosso grupo demonstrou que maxadilan é capaz de ativar neutrófilos *in vivo* e *in vitro*, sendo um potente quimiotático para essas células. O acúmulo de leucócitos induzido pelo maxadilan envolve além da ativação de receptores PAC1, a co-ativação de receptores CXCR1/2 em neutrófilos, contribuindo também para o aumento do extravasamento de plasma *in vivo* (Svensjö, e col., 2012). Embora seu efeito como um potente vasodilatador esteja bem descrito, os efeitos diretos do maxadilan em células endoteliais e o papel do PAC1 e das vias de sinalização intracelular em suas ações ainda não foi explorado.

As células endoteliais têm um papel chave na regulação da barreira endotelial, controlando a passagem de fluidos, solutos, leucócitos entre a corrente sanguínea e o tecido lesado. Assim, as alterações em sua permeabilidade frente a diferentes estímulos pró-inflamatórios necessita ser altamente regulada (Timmerman e col., 2012). A perturbação da integridade da célula endotelial dispara cascatas de sinalização alterando a morfologia da membrana, a estrutura do citoesqueleto e a organização da matriz extracelular (Tesfamarian & DeFelice, 2007).

Foi demonstrado *in vivo* que maxadilan e o homogenato da glândula salivar do inseto podem promover o aumento da permeabilidade vascular em vênulas pós-capilares observados através de microscopia intravital (Svensjö e col., 2009). Nossos resultados mostram que, *in vitro*, maxadilan é capaz de aumentar a permeabilidade das células endoteliais. Esse efeito foi comparável ao da Ang II e também já foi observado com outros mediadores inflamatórios como a histamina, trombina, bradicinina e VEGF (Sukriti e col., 2014). A histamina aumenta a permeabilidade endotelial pelo aumento de cálcio intracelular e ativação de MLCK, além disso, medeia a fosforilação das proteínas de junções aderentes dependente da proteína Src. Já o VEGF aumenta a permeabilidade vascular através da ativação de diferentes vias de sinalização que incluem desde a ativação da via da PLC, que acarreta um aumento dos níveis de cálcio intracelular; a ativação RhoGTPase, com rearranjo do citoesqueleto; a ativação de Src que medeia a fosforilação e internalização das proteínas juncionais, além da sinalização via eNOS (Sukriti e col., 2014).

Os efeitos vasoativos e pró-inflamatórios do maxadilan são mediados pela sua ligação específica ao receptor pituitário tipo 1 (PAC1), um receptor acoplado a proteína G, o mesmo receptor do seu ligante endógeno, o peptídeo ativador da adenilato-ciclase da pituitária (PACAP), encontrado em mamíferos (Lerner, 2007). Observamos que o aumento da permeabilidade induzido por maxadilan é dependente da ligação do peptídeo a este receptor, já que o efeito foi bloqueado quando utilizamos o M65 - um recombinante mutante de maxadilan que é utilizado como um antagonista de alta afinidade do receptor PAC-1. Estes resultados estão em conformidade com o que foi demonstrado *in vivo*, onde foi observado que o aumento do extravasamento de plasma induzido pelo maxadilan e pelo homogenato da saliva do mosquito *L. longipalpis* dava pela ativação de PAC1 (Svensjö e col., 2009).

A permeabilidade vascular é regulada principalmente por alterações nas junções aderentes. Essas junções exercem um papel importante no controle da permeabilidade vascular e estão localizadas no contato célula-célula mediando a adesão das células e sinais intracelulares. A mais importante proteína juncional encontrada nas células endoteliais é a VE-Caderina que tem um papel central na iniciação e estabilização do contato célula-célula (Dejana e Orsenigo, 2013). A fosforilação de VE-Caderina em tirosina leva a alterações conformacionais ou até rompimento das junções intercelulares (Daniel e Reynolds, 1997; Timmerman, 2012).

A fosforilação dos componentes do complexo VE-Caderina-catenina se correlaciona com a perda da adesão célula-célula (Dvorak, e col., 1996; Turowski, e col., 2008; Van Buul, e col., 2009). Um dos primeiros trabalhos neste tema suporta a idéia que o nível de fosforilação da VE-Caderina está altamente ligado a confluência da célula endotelial, mas é diminuída quando as células estão em monocamada confluyente (Vestweber, 2008). Além disso, agentes que aumentam a permeabilidade, tais como histamina, PAF, TNF- α , trombina e VEGF aumentam a fosforilação de vários componentes do complexo caderina-catenina (Andriopoulou, e col., 1999; Angelini, e col., 2006; Esser, e col., 1998; Rabet, e col., 1996; Monaghan-Benson e Burridge, 2009).

Nossos resultados mostram que o maxadilan foi capaz de aumentar a fosforilação do resíduo tirosina 658 da VE-Caderina e a formação de fendas entre as células, decorrentes da dispersão da VE-caderina, com perda da ligação célula-célula. Dados da literatura indicam que o aumento da permeabilidade está associado com aumento dos níveis de fosforilação em tirosina da VE-Caderina e da β -catenina, com quebra da associação da VE-Caderina a β -catenina (Weis e col., 2004). Potter e colaboradores estudaram o papel de resíduos específicos de tirosina do complexo caderina e catenina (Potter, e col., 2005). Estes autores mostraram que os resíduos em tirosina 658 e 731 da VE-Caderina são fundamentais no controle da permeabilidade e que a substituição desses por glutamato resultou na perda da ligação de p120 e β -catenina, respectivamente. Além disso, foi visto em HUVEC que a substituição da tirosina por fenilalanina nos resíduos 658 ou 731 leva a redução da migração de leucócitos através da monocamada endotelial (Allingham e col., 2007), sugerimos que maxadilan, ao induzir a fosforilação no resíduo de tirosina 658, leva a quebra da ligação do complexo VE-Caderina-catenina, já que o resíduo 658 corresponde ao sítio de ligação da p120-catenina e desestabiliza a VE-Caderina, contribuindo para o aumento da permeabilidade.

A partir desses dados, nossos resultados sugerem que a fosforilação da Y658, leva a perda da associação da p-120 com a VE-caderina, desestabilizando-a e acarretando a quebra da ligação do complexo VE-caderina-catenina e a internalização da VE caderina e ruptura da ligação do contato célula-célula. Estes resultados são consistentes com estudos que mostram a internalização de VE-Caderina em células endoteliais incubadas com VEGF e vitronectina (Gavard e Gutkind, 2006; Li e col., 2012). Mostramos também que, reforçando a

desestabilização das junções aderentes, o maxadilán induz a translocação de β -catenina para o núcleo, sugerindo que a β -catenina pode atuar como um fator de transcrição para estimular a formação de mediadores pró-inflamatórios.

Dados da literatura destacam a associação estreita das caderinas com o citoesqueleto sendo essencial no contato célula-célula (Miyaguchi, 2000; Quadri, 2012). Observamos que maxadilán promoveu a reorganização do citoesqueleto de actina, com formação de fibras de estresse ao longo do citoplasma. É amplamente aceito que a integridade da barreira das células endoteliais é dependente da estrutura do citoesqueleto de actina. Vários agonistas como LPS, VEGF e trombina induzem o rearranjo do citoesqueleto, induzindo respostas contráteis e o rompimento do contato célula-célula que aumenta a permeabilidade endotelial (Kása, e col., 2015).

A FAK é uma proteína quinase que funciona como uma plataforma que integra os ambientes intra e extracelulares em vários eventos, como migração, proliferação e sobrevivência celular (Carlucci e col., 2008). A fosforilação de FAK e o consequente aumento de sua atividade tem sido demonstrado estar relacionado ao aumento da permeabilidade (Lee e col., 2007). Nossos resultados mostram que o maxadilán aumentou a fosforilação de FAK no resíduo de tirosina 397, fundamental para sua ativação, e a subsequente associação a actina. Além disso, mostramos que o maxadilán induziu redistribuição da Paxilina, que se localiza nos pontos de adesão focal e nas extremidades das fibras de estresse. Trabalhos anteriores mostraram que trombina induza ativação e colocalização da FAK e da paxilina em pontos de adesão focal na célula endotelial (Shikata e col., 2003), reforçando a importância da atividade de FAK e paxilina na função de barreira induzida por maxadilán.

A proteína Src atua sobre várias vias de sinalização envolvidas na regulação da adesão focal e permeabilidade microvascular, incluindo vias da MAPK, MLCK e β -catenina (Borecki, e col., 1997). Já é bem descrito que em monocamadas de células endoteliais, o bloqueio de Src inibe o aumento da permeabilidade causada por TNF, VEGF e H_2O_2 (Ronald, e col., 2008). Além disso, a inibição de Src por agentes farmacológicos (PP2) ou por ferramentas moleculares diminui a hiperpermeabilidade induzida por neutrófilos em vênulas coronarianas isoladas (Ronald, e col., 2008). Recentemente, foi mostrado que VEGF é capaz de induzir a translocação de Src para membrana, que se associa a VE-Caderina, aumentando a

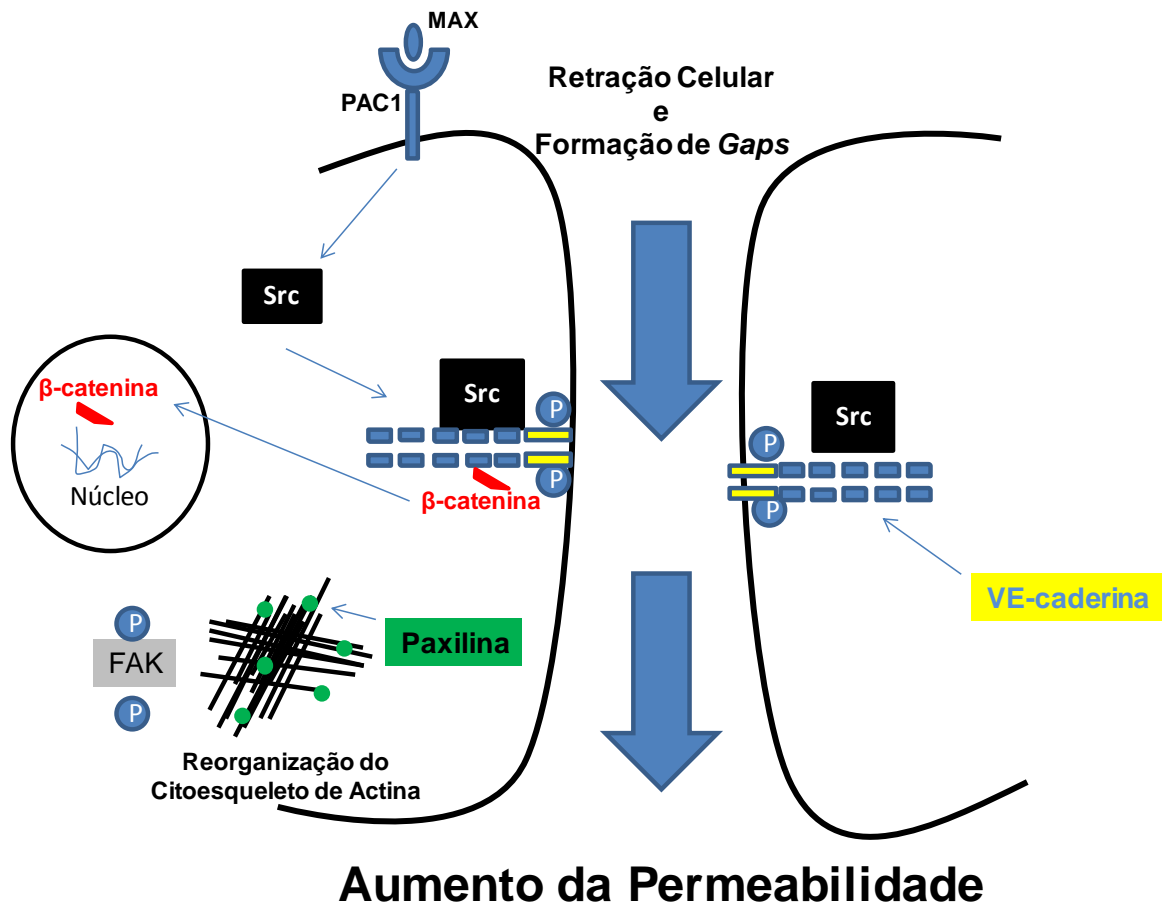
permeabilidade vascular (Di Lorenzo e col., 2014). Nossos resultados mostram que o aumento de permeabilidade induzido por maxadilan depende da participação de Src, já que esse efeito foi bloqueado quando utilizamos o antagonista competitivo dessa proteína, o PP2. Além disso, o maxadilan ativa a translocação de Src para a membrana e sua associação a VE-Caderina. Dessa forma, é possível que a Src, ao se associar a VE-Caderina, leve a sua fosforilação contribuindo para o aumento da permeabilidade endotelial. Contudo, o papel da Src ainda precisa ser melhor investigado.

Em conjunto, nossos dados sugerem que o maxadilan atuando em receptores PAC1 aumenta a permeabilidade endotelial a partir da modulação da VE-caderina e proteínas do citoesqueleto. Estes efeitos contribuiriam para o aumento da transmigração de leucócito, inflamação e também na infectividade pela *Leishmania*. Além disso, os resultados evidenciam o uso do maxadilan como uma nova ferramenta para estudos da biologia da célula endotelial e uma possível molécula líder para a busca de novos alvos terapêuticos.

CONCLUSÃO

O maxadilan atua diretamente na célula endotelial atuando sobre receptores PAC1, ativando mecanismos de sinalização celular que levarão ao rompimento da barreira endotelial, contribuindo para seus efeitos próinflamatórios in vivo. Uma melhor compreensão dos efeitos de maxadilan no endotélio pode conduzir ao desenvolvimento de estratégias terapêuticas para disfunções endoteliais.

Figura 18 - Efeito do Maxadilan sobre a permeabilidade celular e a reorganização do citoesqueleto de actina na célula endotelial



Legenda: Aligação do Maxadilan ao receptor PAC-1 leva à ativação de Src que se liga e fosforila a VE-caderina, ocorrendo a sua dissociação da β-catenina que transloca para o núcleo. O peptídeo ainda induz o rearranjo do citoesqueleto de actina, a redistribuição de paxilina e a fosforilação de FAK. Estes eventos disparados pelo Maxadilan são responsáveis pela ruptura da barreira endotelial e conseqüente aumento da permeabilidade celular.

REFERÊNCIAS

Adam AP, Sharenko AL, Pumiglia K, Vincent PA. Src-induced tyrosine phosphorylation of VE-cadherin is not sufficient to decrease barrier function of endothelial monolayers. *J Biol Chem*. 285:7045-7055. 2010.

Aires J M; Chociay M F; Nascimento M M. P; Figueiredo J F de C; Roselino A M F. Maxadilan (MAX) – Salivary protein of *Lutzomyia longipalpis*: Detection of antibodies anti-Maxadilan in American tegumentar leishmaniasis (ATL), and genetic and protein expression of Maxadilan in *Lutzomyia neivai*. *An Bras Dermatol*.80 (Supl 3): S333-8. 2005.

Alberts B e colaboradores. *Biologia Molecular da Célula*. 5^o ed. Ed. Artemed, 2010.

Allingham, M. J., van Buul, J. D. and Burridge, K. ICAM-1-mediated, Src- and Pyk2-dependent vascular endothelial cadherin tyrosine phosphorylation is required for leukocyte transendothelial migration. *J. Immunol*. 179, 4053-4064. 2007.

Andriopoulou P, Navarro P, Zanetti A, Lampugnani MG, Dejana E. Histamine induces tyrosine phosphorylation of endothelial cell-to-cell adherens junctions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*.2286–2297. 1999.

Angelini D J, Hyun S W, Grigoryev D N, et al. TNF-alpha increases tyrosine phosphorylation of vascular endothelial cadherin and opens the paracellular pathway through fyn activation in human lung endothelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. L1232–L1245. 2006.

Bachetti T e Morbidelli L. Endothelial cells in culture: a model for studying vascular functions. *Pharmacological Research*, Vol. 42, No. 1, 2000.

Blechman J, Levkowitz G. Alternative splicing of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor PAC1: Mechanisms of fine tuning of brain activity. *Front Endocrinol (Lausanne)* Vol.4, artigo: 55. 2013.

Borecki I B, Province M A, Ludwig E H, Ellison R C, Folsom A R, Heiss G, Lalouel J M, Higgins M, Rao D C. Associations of candidate loci angiotensinogen and angiotensin-converting enzyme with severe hypertension: The NHLBI Family Heart Study. *Ann Epidemiol*. 13-21. 1997

Braas K M, May V. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptides directly stimulate sympathetic neuron neuropeptide Y release through PAC(1) receptor isoform activation of specific intracellular signaling pathways. *J Biol Chem* 274:27702–27710. 1999.

Brodie T M, Smith M C, Morris R V, Titus R G: Immunomodulatory effects of the *Lutzomyia longipalpis* salivary gland protein maxadilan on mouse macrophages. *Infect Immun*. 75: 2359–2365. 2007

- Broman M T, Kouklis P, Gao X, Ramchandran R, Neamu R F, Minshall R D, Malik A B. Cdc42 regulates adherens junction stability and endothelial permeability by inducing alpha-catenin interaction with the vascular endothelial cadherin complex. *Circ Res.* 98:73-80. 2006.
- Brown M C, and Turner C E. Paxillin: Adapting to Change. *Physiol Rev* 84: 1315–1339, 2004.
- Brown M T, Cooper J A. Regulation, substrates and functions of src. *Biochim Biophys Acta* 1287:121–149. 1996.
- Burrige K, Turner CE, Romer LH. Tyrosine phosphorylation of paxillin and pp125FAK accompanies cell adhesion to extracellular matrix: a role in cytoskeletal assembly. *J Cell Biol.* 119:893-903. 1992;
- Carlucci A, Gedressi C, Lignitto L, Nezi L, Villa-Moruzzi E, Avvedimento E V, Gottesman M, Garbi C and Feliciello A. Protein-tyrosine Phosphatase PTPD1 Regulates Focal Adhesion Kinase Autophosphorylation and Cell Migration. *The journal of biological chemistry.* Vol: 283, no. 16, pp. 10919 –10929, 2008.
- Castorina A, Giunta S, Mazzone V, Cardile V, D'Agata V. Effects of PACAP and VIP on hyperglycemia-induced proliferation in murine microvascular endothelial cells. *Peptides* 31. 2276–2283. 2010.
- Chen XL, Nam JO, Jean C, Lawson C, Walsh CT, Goka E, Lim ST, Tomar A, Tancioni I, Uryu S, et al. VEGF-induced vascular permeability is mediated by FAK. *Dev Cell.* 22:146-57. 2012.
- Corada M, Nyqvist D, Orsenigo F, Caprini A, Giampietro C, Taketo MM, Iruela-Arispe ML, Adams RH, Dejana E. The Wnt/beta-catenin pathway modulates vascular remodeling and specification by upregulating Dll4/Notch signaling. *Dev Cell.* 15;18(6):938-49. 2010.
- Daniel J M, Reynolds A B. Tyrosine phosphorylation and cadherin/catenin function. *Bioessays.*883-91 1997.
- Deakin N O. and Turner C E. Paxillin comes of age. *Journal of Cell Science* 121, 2435-2444 2008
- Dejana E, Orsenigo F, and Lampugnani M G. The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *Journal of Cell Science.* 121(Pt 13):2115-22. 2008
- Dejana E, Orsenigo F. Endothelial adherens junctions at a glance. *J Cell Sci.* 126 (Pt 12): 2545-9. 2013.
- Dejana E. Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:261-70. 2004.

Di Lorenzo A, Lin M I, Murata T, Landskroner-Eiger S, Schleicher M, Kothiya M, Iwakiri Y, Yu J, Huang P L, and Sessa W C. eNOS-derived nitric oxide regulates endothelial barrier function through VE-cadherin and Rho GTPases. *Journal of Cell Science*. 126 (Pt 24): 5541-52. 2014.

Dudek S M, Garcia J G. Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability. *J Appl Physiol*; 91:1487-500. 2001

Dvorak A M, Kohn S, Morgan E S, Fox P, Nagy J A, Dvorak H F. The vesiculo-vacuolar organelle (VVO): a distinct endothelial cell structure that provides a transcellular pathway for macromolecular extravasation. *J Leukoc Biol*. 100–115. 1996.

Esser, S., Lampugnani, M. G., Corada, M., Dejana, E. and Risau, W. Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J. Cell Sci*. 111, 1853-1865. 1998.

Foerster F, Braig S, Moser C, Kubisch R, Busse J, Wagner E, Schmoeckel E, Mayr D, Schmitt S, Huettel S, Zischka H. Targeting the actin cytoskeleton: selective antitumor action via trapping PKC ϵ . *Cell Death Dis*. 5:e1398. 2014.

Gaengel K, Niaudet C, Hagikura K, Laviña B, Muhl L, Hofmann J J, Ebarasi L, Nyström S, Rymo S, Chen L L, et al. The sphingosine-1-phosphate receptor S1PR1 restricts sprouting angiogenesis by regulating the interplay between VE-cadherin and VEGFR2. *Dev Cell*. 23:587-99. 2012.

Gavard J, Gutkind J S. VE-cadherin and claudin-5: it takes two to tango. *Nat Cell Biol*. 10:883-5. 2008.

Gavard J, Gutkind JS. VEGF controls endothelial cell permeability by promoting the beta-arrestin dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nat Cell Biol*. 8:1223-34. 2006.

Gavard J, Patel V, Gutkind JS. Angiopoietin-1 prevents VEGF-induced endothelial permeability by sequestering Src through mDia. *Dev Cell*. 14:25-36. 2008.

Gavard J. Endothelial permeability and VE-cadherin: a wacky comradeship. *Cell Adhesion & Migration* 8:2, 158–164; 2014.

Gawlak G, Tian Y, O'Donnell J J III, Tian X, Birukova A A, and Birukov K G. Paxillin mediates stretch-induced Rho signaling and endothelial permeability via assembly of paxillin-p42/44MAPK-GEF-H1 complex. *The FASEB Journal*. 3249-60. 2014.

Glennay JR Jr and Zokas L. Novel tyrosine kinase substrates from Rous sarcoma virus-transformed cells are present in the membrane skeleton. *J Cell Biol* 108: 2401–2408, 1989.

Gory S, Vernet M, Laurent M, Dejana E, Dalmon J, Huber P. The vascular endothelial-cadherin promoter directs endothelial-specific expression in transgenic mice. *Blood*. 93:184-92. 1999.

- Gower Jr W R, Dietz J R, McCuen R W, Fabri P J, Lerner E A, Schubert M L. Regulation of atrial natriuretic peptide secretion by cholinergic and PACAP neurons of the gastric antrum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*; 284(1):G68-74. 2003.
- Graier W F, Simecek S, Kukovetz W R e Kostner G M. High-D-glucose-induced changes in endothelial Ca²⁺/EDRF signaling is due to generation of superoxide anions. *Diabetes*. Áustria, v. 45, 1386-95, 1996.
- Grevelink SA, Osborne J, Loscalzo J, Lerner EA. Vasorelaxant and second messenger effects of maxadilan. *J Pharmacol Exp Ther*. 272 (1): 33-7. 1995.
- Hebda J K, Leclair H M, Azzi S, Roussel C, Scott M G, Bidère N, Gavard J. The C-terminus region of β -arrestin1 modulates VE-cadherin expression and endothelial cell permeability. *Cell Commun Signal*. 11:37. 2013.
- Huang C, Rajfur Z, Borchers C, Schaller MD, Jacobson K. JNK phosphorylates paxillin and regulates cell migration. *Nature* 424:219- 23. 2003.
- Huveneers S, Oldenburg J, Spanjaard E, van der Krogt G, Grigoriev I, Akhmanova A, Rehmann H, de Rooij J. Vinculin associates with endothelial VE-cadherin junctions to control force-dependent remodeling. *J Cell Biol*. 196(5):641-52. 2012.
- Jamen F, Persson K, Bertrand G, Rodriguez-Henche N, Puech R, Bockaert J, Ahrén B, and Brabet P. PAC1 receptor-deficient mice display impaired insulinotropic response to glucose and reduced glucose tolerance. *J. Clin. Invest*.105:1307–1315. 2000.
- Jean C, Chen X L, Nam J O, Tancioni I, Uryu S, Lawson C, Ward K K, Walsh C T, Miller N L G, Ghassemian M, Turowski P, Dejana E, Weis S, Cheresh D A, and Schlaepfer D D. Inhibition of endothelial FAK activity prevents tumor metastasis by enhancing barrier function. *JCB*. vol. 204, no. 2, 247-263. 2014.
- Junqueira L C e Carneiro J. *Histologia Básica*. 11^a ed. Ed. Guanabara Koogan. 2008.
- Kása A, Csontos C, and Verin A D. Cytoskeletal mechanisms regulating vascular endothelial barrier function in response to acute lung injury. *Tissue Barriers*. 3 (1-2):e 974448. 2015
- KENNELLY, P.J., KREBS, E.G CONSENSUS. Sequences as Substrate Specificity Determinants for Protein Kinases and Protein Phosphatases. *J.Biol. Chem*, vol.266, p. 1555-1558. 1991.
- Köves K, Kántor O, Lakatos A, Szabó E, Kirilly E, Heinzlmann A, & Szabó F. Advent and Recent Advances in Research on the Role of Pituitary Adenylate Cyclase-activating Polypeptide (PACAP) in the Regulation of Gonadotropic Hormone Secretion of Female Rats. *J Mol Neurosci*. 54 (3): 494-511. 2014.
- Lampugnani M G, Orsenigo F, Rudini N, Maddaluno L, Boulday G, Chapon F, Dejana E. CCM1 regulates vascular-lumen organization by inducing endothelial polarity. *J Cell Sci*. 123:1073-80; 2010.

- Le Guelte A, Dwyer J, Gavard J. Jumping the barrier: VE-cadherin, VEGF and other angiogenic modifiers in cancer. *Biol Cell*. 103:593-605. 2011.
- Le Guelte A, Galan-Moya EM, Dwyer J, Treps L, Kettler G, Hebda JK, Dubois S, Auffray C, Chneiweiss H, Bidere N, et al. Semaphorin 3A elevates endothelial cell permeability through PP2A inactivation. *J Cell Sci*. 125:4137-46. 2012.
- Lee E H e Seo S R. Neuroprotective roles of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in neurodegenerative diseases. *BMB Reports*. 47(7): 369-375. 2014.
- Lee YH, Kayyali US, Sousa AM, Rajan T, Lechleider RJ, Day RM. Transforming growth factor-beta1 effects on endothelial monolayer permeability involve focal adhesion kinase/Src. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 37 (4): 485-93. 2007.
- Lerner E A, Luga A O, Reddy V B. MAX, a PAC1 receptor agonist from sand flies. *Peptides* 28, 1651-1654, 2007.
- Lerner E A, Ribeiro J M C, Nelson R J, and Lerner M R. Isolation of MAX, a Potent Vasodilatory Peptide from the Salivary Glands of the Sand Fly *Lutzomyia longipalpis*. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. Vol. 266, No. 17, pp. 11234-11236. 1991.
- Li R, Ren M, Chen N, Luo M, Zhang Z, et al. Vitronectin Increases Vascular Permeability by Promoting VE-Cadherin Internalization at Cell Junctions. *PLoS ONE*. 2012.
- Luz P L, Laurindo F R M e Chagas A C P. Endotélio e doenças cardiovasculares. 1ª ed. Ed. Atheneu. 2003.
- Mehta D, Malik A B. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol Rev* 2006.
- Mercer A, Ronnholm H, Holmberg J, Lundh H, Heidrich J, Zachrisson O, et al. PACAP promotes neural stem cell proliferation in adult mouse brain. *J Neurosci Res*. 2004.
- Mierke CT. Endothelial cell's biomechanical properties are regulated by invasive cancer cells. *Mol Biosyst*.1639-49. 2012
- Miyaguchi, K. Ultrastructure of the zonula adherens revealed by rapid-freeze deep-etching. *J. struct. Boil*. 132, 169-178. 2000.
- Miyata A, Arimura A, Dahl R R, Minamino N, Uehara A, Jiang L, Culler M D, and Coy D H. Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 1989.
- Monaghan-Benson E, Burridge K. The regulation of vascular endothelial growth factor-induced microvascular permeability requires Rac and reactive oxygen species. *J Biol Chem*. 25602–25611. 2009.

Moro O, Lerner E A. MAX, the Vasodilator from Sand Flies, Is a Specific Pituitary Adenylate Cyclase Activating Peptide Type I Receptor Agonist. Vol. 272, No. 2, Issue of January 10, pp. 966–970, 1997.

Morris R V, Shoemaker CB, David J R, Lanzaro G C, Titus R G. Sand fly maxadilan exacerbates infection with *Leishmania major* and vaccinating against it protects against *L. major* infection. *J. Immunol.* 167, 5226–5230. 2001

Mustafa T, Walsh J, Grimaldi M, and Eiden L E. PAC1 hop receptor activation facilitates cat-echolamine secretion selectively through 2-APB-sensitive Ca (2+) channels in PC12 cells. *Cell. Signal.* 22, 1420–1426. 2010.

Nanes B A, Chiasson-MacKenzie C, Lowery A M, Ishiyama N, Faundez V, Ikura M, Vincent P A, Kowalczyk A P. p120-catenin binding masks an endocytic signal conserved in classical cadherins. *J Cell Biol.* 199:365-80. 2012.

Nottebaum A F, Cagna G, Winderlich M, Gamp A C, Linnepe R, Polaschegg C, Filippova K, Lyck R, Engelhardt B, Kamenyeva O, et al. VE-PTP maintains the endothelial barrier via plakoglobin and becomes dissociated from VE-cadherin by leukocytes and by VEGF. *J Exp Med.* 205:2929- 45. 2008.

Orsenigo F, Giampietro C, Ferrari A, Corada M, Galaup A, Sigismund S, Ristagno G, Maddaluno L, Koh GY, Franco D, et al. Phosphorylation of VE-cadherin is modulated by haemodynamic forces and contributes to the regulation of vascular permeability in vivo. *Nat Commun.* 3:1208. 2012.

Paolinelli R, Corada M, Ferrarini L, Devraj K, Artus C, Czupalla CJ, Rudini N, Maddaluno L, Papa E, Engelhardt B, et al. Wnt activation of immortalized brain endothelial cells as a tool for generating a standardized model of the blood brain barrier in vitro. *PLoS One* 2013.

Parsons J T. Focal adhesion kinase: the first ten years. *J Cell Sci* 116, 1409–1416. 2003.

Png E, and Tong L. Transglutaminase-2 in cell adhesion: All roads lead to paxillin? *Cell Adhesion & Migration* 7:5, 412–417; 2013.

Potter M D, Barbero S, Cheresh D A. Tyrosine phosphorylation of VE-cadherin prevents binding of p120- and beta-catenin and maintains the cellular mesenchymal state. *J Biol Chem.* 280:31906-12. 2005.

Prandini M H, Dreher I, Bouillot S, Benkerri S, Moll T, Huber P. The human VE-cadherin promoter is subjected to organ-specific regulation and is activated in tumour angiogenesis. *Oncogene.* 24:2992- 3001. 2005.

Quadri S K. Cross talk between focal adhesion kinase and cadherins: Role in regulating endothelial barrier function. *Microvascular Research* 83. 3-11. 2012.

Rabiet M J, Plantier J L, Rival Y, Genoux Y, Lampugnani MG, Dejana E. Thrombin-induced increase in endothelial permeability is associated with changes in cell-to-cell junction organization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 488–496. 1996.

Rhodin J A G. Ultra structure of mammalian venous capillaries, venules, and small collecting veins. *Journal of Ultra structure Research.* New Haven, v. 25, p. 452-485, 1968.

Ribeiro, J. M. C. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. *AnnuRev Entomol.* 32: 463–478. 1987.

Ronald F. Tuma; Walter N. Duran; Klaus Ley. *Microcirculation. Handbook of Physiology.* Segunda edição. 2008.

Schaller M D. Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanisms and novel functions. *J Cell Sci* 123:1007–1013. 2010.

Schaller M D. Biochemical signals and biological responses elicited by the focal adhesion kinase. *Biochem Biophys Acta* 1540, 1–21. 2001.

Schaller, M. D. & Parsons, J. T. pp125FAK-dependent tyrosine phosphorylation of paxillin creates a high-affinity binding site for Crk. *Mol Cell Biol* 15. 1995.

Schlaepfer D D, Mitra S K & Ilic D Control of motile and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase. *Biochem Biophys Acta* 1692, 77–102. 2004.

Schlessinger J. New roles for Src kinases in control of cell survival and angiogenesis. *Cell* 100:293–296. 2000.

Schulte D, Küppers V, Dartsch N, Broermann A, Li H, Zarbock A, Kamenyeva O, Kiefer F, Khandoga A, Massberg S, et al. Stabilizing the VE-cadherin catenin complex blocks leukocyte extravasation and vascular permeability. *EMBO J.* 30:4157-70. 2011.

Shasby D M, Shasby S S, Sullivan J M, Peach M J. Role of endothelial cell cytoskeleton in control of endothelial permeability. *Circ Res* 1982;

Shikata, Y., Birukov, K. G., and Garcia, J. G. S1P induces FA remodeling in human pulmonary endothelial cells: role of Rac, GIT1, FAK and paxillin. *J. Appl. Physiol.* 94, 1193–1203. 2003.

Sukriti S, Tauseef M, Yazbeck P, Mehta D. Mechanisms regulating endothelial permeability. *Pulmonary Circulation*, Vol. 4, No. 4, pp. 535-551. 2014.

Svensjö E, Saraiva E M, Amendola R S, Barja-Fidalgo C, Bozza MT, Lerner E A, Teixeira M M, Scharfstein J. MAX, the *Lutzomyia longipalpis* vasodilator, drives plasma leakage via PAC1–CXCR1/2-pathway. *Articlehistory:* 2012.

Svensjö E, Saraiva E M, Bozza M T, Oliveira S M P, Lerner E A, Scharfstein J. Salivary Gland Homogenates of *Lutzomyia longipalpis* and Its Vasodilatory Peptide

Maxadilan Cause Plasma Leakage via PAC1 Receptor Activation. *Journal of Vascular Research*. 2009.

Takenaga Y, Takagi N, Murotomi K, Tanonaka K, Takeo S. Inhibition of src activity decreases tyrosine phosphorylation of occludin in brain capillaries and attenuates increase in permeability of the blood-brain barrier after transient focal cerebral ischemia. *J Cerebr Blood Flow Metab*. 2009.

Tang X, Feng Y, Ye K. Src-family tyrosine kinase fyn phosphorylates phosphatidylinositol 3-kinase enhanceractivating Akt, preventing its apoptotic cleavage and promoting cell survival. *Cell Death Differ* 14:368–377. 2007.

Tesfamariam B, DeFelice A F. Endothelial injury in the initiation and progression of vascular disorders. *Vascular Pharmacology*. 2007.

Theus M H, Wei L, Francis K, Yu S P. Critical roles of Src family tyrosine kinases in excitatory neuronal differentiation of cultured embryonic stem cells. *Exp Cell Res* 312:3096–3107. 2006.

Thomas S M, Brugge J S. Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13:513–609. 1997.

Timmerman I, Hoogenboezem M, Bennett A M, Geerts D, Hordijka P L, and van Buula J D. The tyrosine phosphatase SHP2 regulates recovery of endothelial adherens junctions through control of β -catenin phosphorylation. *MBoC*. 2012.

Titus R G, Bishop J V, Mejia J S. 2006. The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission. *Parasite Immunology*. 2006.

Turowski P, Martinelli R, Crawford R, Wateridge D, Papageorgiou AP, Lampugnani MG, Gamp AC, Vestweber D, Adamson P, Dejana E. Phosphorylation of vascular endothelial cadherin controls lymphocyte emigration. *J Cell Sci*. 121:29-37. 2008.

Van Buul JD, van Alphen FP, Hordijk PL. The presence of alpha-catenin in the VE-cadherin complex is required for efficient transendothelial migration of leukocytes. *Int J Biol Sci*. 695–705. 2009.

Verin A D, Birukova A, Wang P, Liu F, Becker P, Birukov K, Garcia J G. Microtubule disassembly increases endothelial cell barrier dysfunction: role of MLC phosphorylation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001.

Vestweber D. VE-cadherin: the major endothelial adhesion molecule controlling cellular junctions and blood vessel formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 223–232. 2008.

Weis S, Shintani S, Weber A, et al. Src blockade stabilizes a Flk/cadherin complex, reducing edema and tissue injury following myocardial infarction. *J Clin Invest*. 885–894. 2004

Wheat WH, Pauken KE, Morris RV, Titus RG: *Lutzomyia longipalpis* salivary peptide maxadilan alters murine dendritic cell expression of CD80/86, CCR7, and cytokine secretion and reprograms dendritic cell-mediated cytokine release from cultures containing allogeneic T cells. *J Immunol.* 180: 8286–8298. 2008.

Xiao K, Allison DF, Buckley KM, Kottke MD, Vincent PA, Faundez V, Kowalczyk AP. Cellular levels of p120 catenin function as a set point for cadherin expression levels in microvascular endothelial cells. *J Cell Biol.* 163:535-45; 2003.

Xiao K, Garner J, Buckley KM, Vincent PA, Chiasson CM, Dejana E, Faundez V, Kowalczyk AP. p120-Catenin regulates clathrin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Mol Biol Cell.* 16:5141-51. 2005.

Yamada H, Watanabe M, Yada T. Cytosolic Ca²⁺ responses to sub-picomolar and nanomolar PACAP in pancreatic betacells are mediated by VPAC2 and PAC1 receptors. *Regul Pept.* 2004.

Yoshioka K, Yoshida K, Cui H, Wakayama T, Takuwa N, Okamoto Y, Du W, Qi X, Asanuma K, Sugihara K, et al. Endothelial PI3K-C2 α , a class II PI3K, has an essential role in angiogenesis and vascular barrier function. *Nat Med.* 18:1560-9. 2012.

Yukitatsu Y; Hata M; Yamanegi K; Yamada N; Ohyama H; Nakasho K; Kojima Y; Oka H; Tsuzuki K. Decreased expression of VE-cadherin and claudin-5 and increased phosphorylation of VE-cadherin in vascular endothelium in nasal polyps. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013.

Zhao X, Peng X, Sun S, Park AY, Guan JL. Role of kinase-independent and -dependent functions of FAK in endothelial cell survival and barrier function during embryonic development. *J Cell Biol.* 2010.