

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



Identificação de proteínas alvo do H_2O_2 nas células endoteliais

Rita Sofia Estrela Tenente

Mestrado em Bioquímica
Área de especialização em Bioquímica Médica

2011

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



Identificação de proteínas alvo do H_2O_2 nas células endoteliais

Rita Sofia Estrela Tenente

Tese de mestrado orientada por:

Doutora Carla Real Afonso

Mestrado em Bioquímica

Área de especialização em Bioquímica Médica

2011

Agradecimentos

Quero agradecer a todas as pessoas que directa ou indirectamente contribuíram para a realização deste trabalho:

À minha orientadora, Doutora Carla Real Afonso, por me ter acolhido no seu grupo, pela oportunidade que me deu em realizar este trabalho no seu laboratório, pela disponibilidade e confiança demonstrada e por todas as discussões que possibilitaram a evolução deste trabalho. Obrigada.

Quero também agradecer a todos os membros do meu grupo, grupo de Bioquímica dos Oxidantes e Antioxidantes, que me acompanharam, auxiliaram e aconselharam ao longo deste trabalho. Em particular aos meus colegas de bancada pela amizade e pelo ambiente de boa-disposição e diversão que ajudaram os dias mais difíceis a passar. Era difícil ter encontrado grupo mais unido. Um especial agradecimento à Joana Pinto, que foi inestimável para a minha introdução ao mundo laboratorial.

Quero também agradecer ao grupo de Enzimologia cuja colaboração foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho, nomeadamente ao Doutor Carlos Cordeiro, ao Doutor Ricardo Gomes e à Ana Cristina Silva. E em particular ao Doutor Gonçalo Conde da Costa pelos conselhos e disponibilidade demonstrada.

À Professora Doutora Margarida Amaral pelo acesso ao *software* de análise dos géis 2-D, fundamental para a realização do meu trabalho.

E por fim, mas não menos importantes, à minha família e aos meus amigos pelo amor, apoio e paciência que me dispensaram. Por sempre terem acreditado em mim e fazerem-me acreditar que nada é impossível! Em particular à minha mãe, por tudo. Obrigada.

Resumo

As espécies reactivas de oxigénio (ERO) estão normalmente associadas ao stress oxidativo, levando à senescência e à morte celular. Contudo, nos últimos anos tem-se vindo a revelar um papel determinante destas espécies na regulação de funções fundamentais para as células, quando presentes em baixas concentrações. O H_2O_2 é um dos sinalizadores mais importantes das ERO, e nas células endoteliais (CE) está associado a processos de migração, proliferação e sobrevivência, eventos críticos para a angiogénese. A regulação de vias de sinalização pelo H_2O_2 está associada a modificações de oxidação nos resíduos de cisteínas reactivos de proteínas.

Com o objectivo de identificar proteínas alvo do H_2O_2 em CE, procedeu-se ao estudo do proteoma das cisteínas sensíveis à oxidação quando expostas a concentrações sub-letais de H_2O_2 , pelo método de titulação de H_2O_2 em estado estacionário. Extractos proteicos totais obtidos a partir de CE foram separados por electroforese bidimensional e analisados quanto à variação na oxidação e na expressão de proteínas. Neste trabalho identificaram-se três proteínas que apresentam um aumento de oxidação significativo, a ciclooxygenase 2, a proteína *zinc finger* 646 e a proteína 40S ribossomal SA e duas com aumento de expressão, a peroxiredoxina 1 e a *ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase* 24. Uma vez que a activação da via de sinalização do VEGF induz a produção de H_2O_2 , analisou-se também o proteoma das cisteínas reactivas após tratamento das CE com este factor de crescimento.

As células endoteliais são componentes chave de várias doenças que se caracterizam pela disfunção do processo angiogénico, como o cancro, diabetes e doenças isquémicas. A descoberta de proteínas responsáveis pela regulação endotelial cuja função é modulada pelo H_2O_2 , pode revelar novos alvos para o desenvolvimento de terapias mais eficientes.

Palavras chave: H_2O_2 , cisteínas reactivas, células endoteliais, angiogénese, proteómica

Abstract

Reactive oxygen species (ROS) are usually associated with cytotoxic and mutagenic effects ultimately leading to cell death and senescence. However, it has been shown in the last few years that ROS have a main role in the regulation of essential cell functions when present at low levels. H_2O_2 is well established as a signaling molecule among ROS, and in endothelial cells (EC) is responsible for the regulation of cellular migration, proliferation and survival, which are critical events for the angiogenic process. H_2O_2 is able to modulate protein function by the oxidation of particular cysteine residues.

This work aimed to identify H_2O_2 target proteins in EC by the analysis of the reactive thiol proteome after the exposure to sub-lethal concentrations of H_2O_2 using the steady state titration method. Variations in oxidation and protein expression were determined after analysis of total protein extracts in bidimensional electrophoresis. The results have shown increased oxidation of cyclooxygenase 2, zinc finger protein 646 and 40S ribosomal SA protein and increased expression of other two proteins, peroxiredoxin 1 and ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 24. Since the activation of VEGF signaling pathway induces H_2O_2 production, it was also analyzed the reactive thiol proteome of EC after treatment with this growth factor.

In conclusion, EC are key players in many pathologies characterized by angiogenic dysfunction, such as, cancer, diabetes and ischemic diseases. The discovery of proteins involved in the endothelial cell regulation which function is modulated by H_2O_2 , might reveal new targets for the development of more efficient therapies.

Keywords: H_2O_2 , reactive cysteines, endothelial cells, angiogenesis, proteomics

Lista de Abreviaturas e Nomenclatura

ERO – Espécies Reactivas de oxigénio

H₂O₂ – Peróxido de hidrogénio

O₂^{•-} - Radical anião superóxido

HO[•] - Radical hidróxilo

SOD – Superóxido dismutase

ecSOD – Superóxido dismutase extracelular

GPx – Glutathione peroxidase

PDRX1 – Peroxiredoxina 1

Nox – NADPH oxidase

ERN – Espécies Reactivas de Nitrogénio

PTP – Fosfatases de tirosina

CE - Células endoteliais

NOS – Sintase do óxido nítrico

eNOS - Sintase do óxido nítrico endotelial

iNOS – do inglês, *Inducible NO synthase*

VEGF - Factor de crescimento vascular endotelial

PKC – Proteína cinase C

20-HETE - Ácido 20-hidroieicosatetraenoico

COX-2 – Ciclooxygenase 2

MMP - Metaloproteinases da matriz

HIF-1 – do inglês, *Hypoxia-Inducible Factor-1*

ACN – Acetonitrilo

TFA - Ácido trifluoracético

RSSA – Proteína 40S ribossomal SA

ZN646 – Proteína *zinc finger* 646

UBP24 – do inglês, *Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 24*

TPM4 – do inglês, *Tropomyosin alpha-4 chain*

TCAL4 – do inglês, *Transcription elongation factor A protein-like 4*

ATD3B – do inglês, *ATPase family AAA domain-containing protein 3B*

ENOB - Beta-enolase

BRSK1 – do inglês, *BRSK1 Serine/threonine-protein kinase*

B4DVY2 – do inglês, *cDNA FLJ54184, highly similar to Tropomyosin alpha-4 chain*

B4DF70 – do inglês, *cDNA FLJ60461, highly similar to Peroxiredoxin-2*

CDN1B – do inglês, *Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B*

CYC – do inglês, *Citocrome c*

ALDOB – do inglês, *Fructose-bisphosphate aldolase B*

GSTA1 – do inglês, *Glutathione S-transferase A1*

MYH13 – do inglês, *Myosin-13*

MYH3 – do inglês, *Myosin-3*

PP12C – do inglês, *Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12C*

TPM3 – do inglês, *Tropomyosin alpha-3 chain*

TBB2C – do inglês, *Tubulin beta-2C chain*

ZFP82 – do inglês, *Zinc finger protein 82 homolog*

Índice

Agradecimentos.....	I
Resumo	II
Abstract.....	III
Lista de Abreviaturas e Nomenclatura.....	IV
Índice de Figuras.....	X
Índice de Quadros.....	XI
Capítulo I – Introdução	1
Parte I – Sinalização pelo H_2O_2	2
1. Espécies reactivas de oxigénio - ERO	2
2. Peróxido de Hidrogénio – H_2O_2	3
3. Sinalização redox	4
4. Titulação de H_2O_2 em estado estacionário	8
Parte II – Sinalização mediada pelo H_2O_2 em células endoteliais	10
1. H_2O_2 em células endoteliais	10
1.1. NADPH oxidases	10
2. Regulação da angiogénese pelo H_2O_2	11
2.1. Angiogénese	11
2.2. Regulação do processo angiogénico pelo H_2O_2	13
2.3. Envolvimento do H_2O_2 em doenças associadas à angiogénese patológica	15
2.3.1. H_2O_2 e o cancro	15
Capítulo II – Objectivos	17
Capítulo III – Materiais e Métodos	19
Parte I – Materiais e equipamento	20
1. Materiais	20
2. Equipamento	20
Parte II – Métodos	22

1. Cultura celular	22
2. Caracterização das HUVEC - imunofluorescência	22
3. Ensaio de consumo celular H_2O_2 e de titulação de H_2O_2 em estado estacionário	23
3.1. Condições de cultura celular para os ensaios	23
3.2. Curva de calibração	24
3.3. Determinação da concentração de H_2O_2	24
3.4. Ensaio de consumo celular de H_2O_2	24
3.4.1 Ensaio de consumo de H_2O_2 para vários meios de cultura	25
3.5. Ensaio de titulação de H_2O_2 em estado estacionário	25
3.5.1. Actividade do enzima glucose oxidase	26
3.5.2. Ensaio de viabilidade celular - MTT	26
4. Ensaio de estimulação com VEGF	27
5. Extração e alquilação de proteínas com BODIPY-IAM	27
5.1. Optimização do processo de alquilação com BODIPY-IAM	28
6. Determinação da concentração proteica	29
7. Electroforese bidimensional de proteínas em condições desnaturantes	30
7.1. Preparação das amostras – Precipitação de proteínas	30
7.2. 1ª Dimensão – Focagem isoelectrica	31
7.3. 2ª Dimensão – Electroforese SDS-PAGE	32
7.4. Aquisição da imagem de fluorescência	32
7.5. Coloração com nitrato de prata	33
7.6. Análise dos géis bidimensionais com o <i>software</i> ImageMaster	33
8. Identificação de proteínas por MS/MS pela técnica de <i>Peptide Mass Fingerprint</i>	35
8.1. Digestão <i>in gel</i> das proteínas	35
8.2. Aplicação das proteínas digeridas na placa de MALDI	36
8.3. Aquisição de espectros de massa	36
8.4. Identificação de proteínas por <i>Peptide Mass Fingerprint</i>	36
9. Análise estatística	37

Capítulo IV – Resultados	38
1. Caracterização do consumo celular de H ₂ O ₂ das linhas HUVEC e HMEC-1	39
1.1. Linha HMEC-1	39
1.2. Linha HUVEC	40
1.2.1. Microscopia de imunofluorescência	40
1.2.2 Constante de velocidade de consumo de H ₂ O ₂ das HUVEC.....	41
2. Optimização do ensaio de titulação do H ₂ O ₂ em estado estacionário	42
2.1. Determinação da constante de velocidade do consumo de H ₂ O ₂ para diferentes tipos de meio	43
2.2. Actividade do enzima glucose oxidase	43
2.3. Determinação da viabilidade celular ao H ₂ O ₂	44
3. Detecção e identificação de proteínas que contêm cisteínas sensíveis ao H ₂ O ₂	45
3.1. Optimização do processo de marcação com BODIPY-IAM	46
3.2. Análise dos géis 2-D – H ₂ O ₂	48
3.2.1 Normalização das proteínas pelo volume total	50
3.2.2 Aumento da oxidação de proteínas sensíveis ao H ₂ O ₂	51
3.2.3 Variação na expressão de proteínas sensíveis ao H ₂ O ₂	53
3.3. Análise dos géis 2-D relativos ao tratamento com VEGF	53
Capítulo V – Discussão	57
1. Consumos celulares de H ₂ O ₂ variam com o tipo de células endoteliais e com o substrato	58
2. Concentrações sub-letais de H ₂ O ₂ nas HUVEC	59
3. Identificação de proteínas que contêm cisteínas sensíveis ao H ₂ O ₂	60
3.1. Ciclooxygenase 2.....	62
3.2. Proteína 40S ribossomal SA	63
3.3. Proteína <i>zinc finger</i> 646.....	64
4. Proteínas diferencialmente expressas pelo H ₂ O ₂	64
4.1. Peroxiredoxina 1	66
4.2. <i>Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase</i> 24	66

5. Identificação de proteínas que contêm cisteínas sensíveis ao H ₂ O ₂ após tratamento com VEGF	67
6. Limitações do método	67
Capítulo VI – Considerações Finais e Perspectivas.....	69
Bibliografia	72
Anexo.....	81

Índice de Figuras

Figura I.1 – Regulação de processos fisiológicos pelo H_2O_2 de um modo dependente da sua concentração.	2
Figura I.2 – Vias metabólicas da produção e catabolismo do H_2O_2	4
Figura I.3 – Modificações oxidativas nos resíduos de cisteínas de proteínas.	6
Figura I.4 – A sinalização mediada pelo H_2O_2 apresenta vários níveis de regulação.	8
Figura I.5 – Formação de novos vasos a partir do processo angiogénico.	12
Figura I.6 – Papel das ERO na sinalização do VEGF e de vias associadas à angiogénese.	14
Figura II.1 – Exemplificação da aplicação da amostra e da fita no sarcófago próprio para a focagem isoeléctrica.	31
Figura IV.1 – Representação das constantes de velocidade de consumo de H_2O_2 em HMEC-1.	40
Figura IV.2 – Análise por microscopia de fluorescência da VE-caderina e do CD31 em HUVEC.	41
Figura IV.3 – Representação das constantes de velocidade de consumo de H_2O_2 em HUVEC.	42
Figura IV.4 – Representação da viabilidade celular das HUVEC após exposição a um estado estacionário de H_2O_2 de 3 horas.	45
Figura IV.5 – Reacção entre o BODIPY-IAM e o anião tiolato de um resíduo de cisteína.	47
Figura IV.6 – Imagem de fluorescência obtida para o gel 1-D SDS-PAGE, para diferentes concentrações de BODIPY-IAM e diferente processamento das amostras.	48
Figura IV.7 – Imagens representativas dos dois tipos de imagem obtida para um gel 2-D PAGE do extracto proteico total das HUVEC.	49
Figura IV.8 - Representação do volume total de proteínas nas imagens de fluorescência e de coloração por nitrato de prata.	50
Figura IV.9 - Proteínas identificadas que apresentam uma diminuição da fluorescência.	51
Figura IV.10 – Representação de proteínas que apresentam variação significativa na oxidação.	52
Figura IV.11 – Representação de proteínas que apresentam variação na quantidade de proteína total.	53
Figura IV.12 – Representação da variação da fluorescência e da quantidade de proteína total para as proteínas identificadas nos géis 2-D, relativos ao tratamento com VEGF.	55

Índice de Quadros

Quadro IV.1 – Constantes de velocidade de consumo de H_2O_2 para as linhas HUVEC e HMEC-1	42
Quadro IV.2 – Constantes de velocidade de consumo de H_2O_2 para os diferentes tipos de meio	43
Quadro V.1 – Principais características das proteínas que apresentam uma modificação oxidativa significativa após exposição ao H_2O_2	61
Quadro V.2 – Principais características das proteínas que apresentam uma modificação oxidativa significativa após exposição ao H_2O_2	65

Capítulo I - Introdução

Parte I – Sinalização pelo H_2O_2

1. Espécies reactivas de oxigénio - ERO

As espécies reactivas de oxigénio (ERO) – peróxido de hidrogénio (H_2O_2), radical anião superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidróxilo (HO^{\bullet}), oxigénio singleto (1O_2), hidroperóxidos orgânicos (ROOH), entre outras – são geralmente consideradas produtos tóxicos consequentes da vida aeróbia que rapidamente são eliminadas de forma a manter a homeostase celular. Caso a célula não tenha capacidade de controlar a produção destas espécies gera-se um estado de stress oxidativo, em que as ERO podem causar danos irreversíveis em biomoléculas, provocando a apoptose celular e contribuindo para o processo de envelhecimento e de desenvolvimento de diversas patologias, como o cancro, diabetes, doenças neurológicas e cardiovasculares (Finkel *et al.*, 2007; Gonzalez-Fraguela *et al.*, 2005; Tang & Zhang, 2000).

Contudo, estudos realizados nos últimos anos têm revelado uma nova faceta das ERO, em que, sob concentrações fisiológicas, estas espécies têm um papel regulador de processos vitais das células, como a proliferação e o desenvolvimento (ver figura I.1) (Rhee, 1999; Stone & Suping Yang, 2006). Para concentrações mais elevadas as células sofrem mecanismos de regulação e adaptam-se ao aumento de ERO. Porém, para concentrações consideradas tóxicas para as células estas entram em apoptose ou necrose.

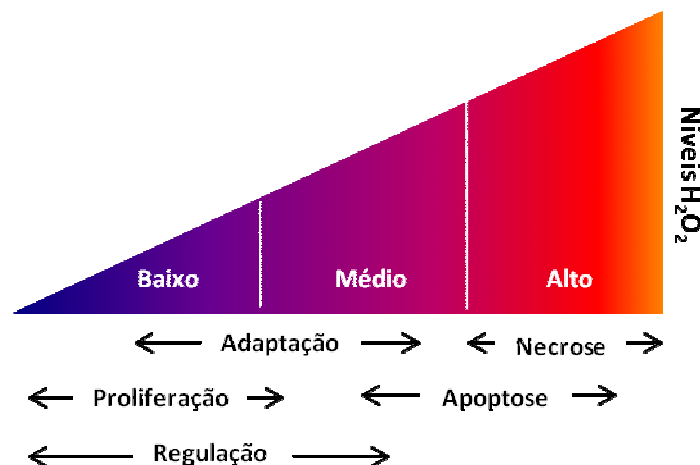


Figura I.1 – Regulação de processos fisiológicos pelo H_2O_2 de um modo dependente da sua concentração. Observa-se que para baixas concentrações o H_2O_2 tem um papel regulador e estimula a proliferação celular. Para concentrações não fisiológicas o H_2O_2 desencadeia a morte celular. (adaptado de Antunes & Cadenas, 2001)

Em células saudáveis tem-se observado que existe uma estimulação da produção controlada destas espécies e o seu envolvimento em mecanismos conhecidos fundamentais para vários processos fisiológicos, revelando deste modo um papel essencial das ERO como segundos mensageiros em vias de sinalização (Forman, 2008). A transdução de sinal regulada pelas ERO – sinalização redox - é nos dias que correm uma área de investigação emergente.

2. Peróxido de Hidrogénio – H_2O_2

O H_2O_2 é a ERO com maior tempo de meia vida ($t_{1/2} = 10^{-5}$ s), sendo deste modo a espécie mais abundante nas células (estima-se que a concentração *in vivo* seja na ordem de grandeza 10^{-7} M) (Evans & Halliwell, 1999). O facto de esta espécie ser relativamente estável e de não apresentar carga confere-lhe a capacidade de percorrer distâncias consideráveis e de difundir-se entre membranas criando gradientes de H_2O_2 (Antunes & Cadenas, 2000). Para além da difusão entre membranas dados recentes sugerem a possibilidade da travessia realizar-se também ao nível de canais membranares, como as aquaporinas (Miller *et al.*, 2010).

A produção e o metabolismo do H_2O_2 encontram-se representados na figura I.2. Esta espécie tem, na sua maioria, origem na dismutação do $O_2^{\bullet-}$, processo que pode ocorrer espontaneamente ou ser catalisado pelo enzima superóxido dismutase (SOD) (Juarez *et al.*, 2008). Uma das principais fontes do $O_2^{\bullet-}$, e consequentemente do H_2O_2 , são a cadeia transportadora de electrões ao nível do mitocôndrio e os enzimas da membrana celular NADPH oxidases (Nox), os quais respondem a estímulos externos (Bartosz, 2009). A eliminação do H_2O_2 dá-se através dos mecanismos de defesa antioxidantes celulares, sendo a catalase e a glutatióno peroxidase (GPx) os principais responsáveis pelo consumo do H_2O_2 (Evans & B Halliwell, 1999). O H_2O_2 , pode dar também origem a várias outras espécies de ERO e de ERN (espécies reactivas de nitrogénio).

O H_2O_2 , dentro das ERO, é um oxidante fraco, sendo relativamente inerte para a maioria das biomoléculas. Contudo, o H_2O_2 é capaz de oxidar resíduos de cisteína em proteínas, as quais podem voltar a ficar reduzidas rapidamente por vários redutores celulares (Kim *et al.*, 2000). Todas estas propriedades permitem que o H_2O_2 desempenhe a função de mediador da sinalização, sendo o mais importante sinalizador das ERO.

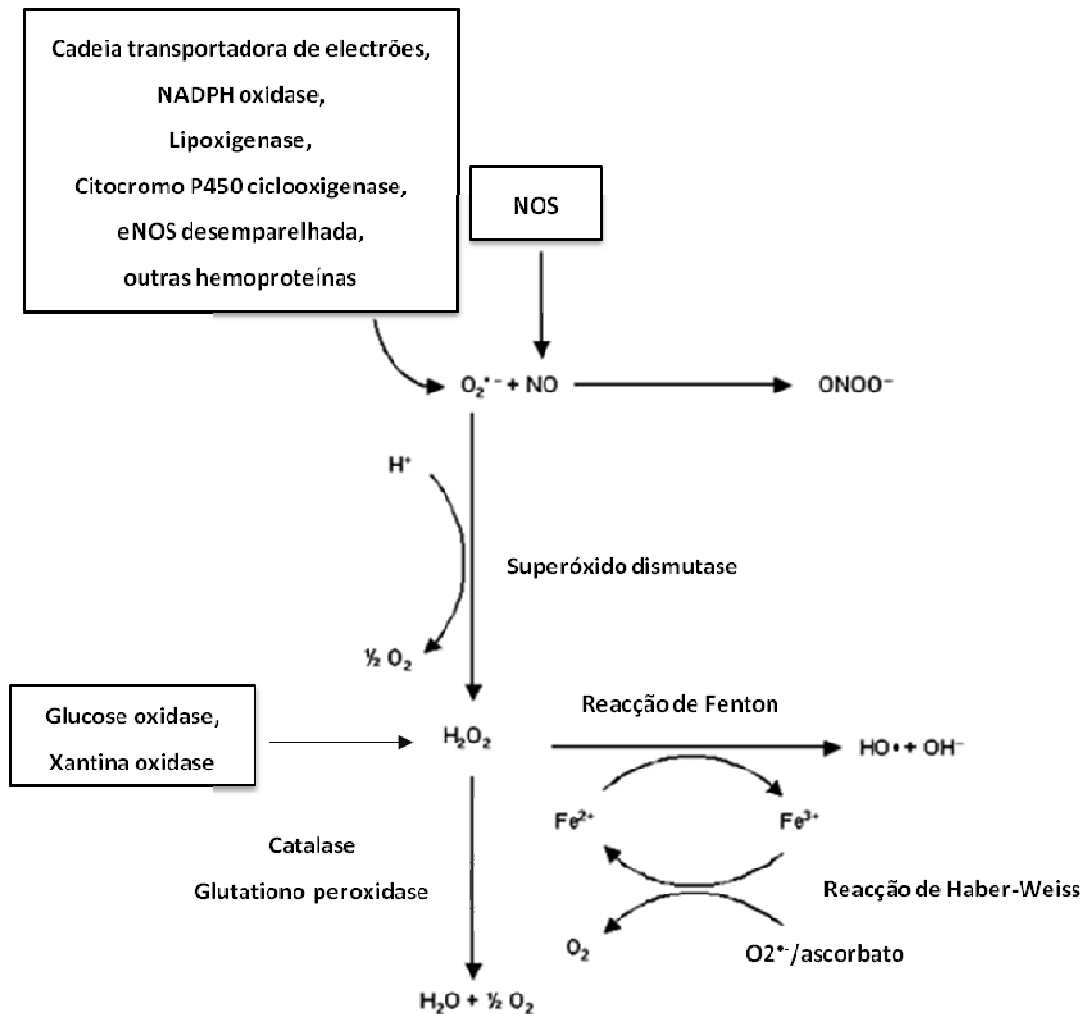


Figura I.2 – Vias metabólicas da produção e catabolismo do H_2O_2 . O oxigénio (O_2) ao sofrer redução dá origem ao anião superóxido ($\text{O}_2^{\bullet -}$). O $\text{O}_2^{\bullet -}$ formado é rapidamente degradado pelo superóxido dismutase produzindo peróxido de hidrogénio (H_2O_2). O H_2O_2 é também formado directamente a partir do O_2 pelos enzimas glucose oxidase e xantina oxidase. Este pode ser eliminado pela catalase e pelo glutatióno peroxidase ou sofrer reacção de Fenton dando origem ao anião hidroxilo (HO^{\bullet}). O óxido nítrico formado pela NO sintase (NOS) pode ser rapidamente eliminado por reacção com o $\text{O}_2^{\bullet -}$. (adaptado de Meeteren *et al.*, 2005)

3. Sinalização redox

A regulação das vias fisiológicas dá-se por excelência por modificações pós-traducionais de fosforilação e desfosforilação. Contudo, tem-se vindo a demonstrar que a regulação por oxidação e redução é igualmente importante. Tendo-se observado que existe regulação cruzada entre estes dois mecanismos moleculares, isto é, o estado redox da célula influencia a fosforilação, e vice-versa (Barry Halliwell, 2006). Mais especificamente, as ERO têm maior tendência em inibir a desfosforilação de

proteínas do que em estimular directamente a fosforilação, sendo os fosfatases um dos alvos das ERO (Rhee, 2006).

Nas proteínas, os grupos sulfidrilo (R-SH) da cadeia lateral das cisteínas são particularmente sensíveis ao estado redox em que se encontra a célula (Paulsen & Carroll, 2010a). Estes são um dos alvos centrais das ERO, nomeadamente do H_2O_2 , podendo encontrarem-se em vários estados de oxidação (Stone & Suping Yang, 2006). A oxidação do grupo sulfidrilo origina um ácido sulfénico (R-SOH), o qual é precursor para outros produtos oxidados, como os ácidos sulfínicos (R-SO₂H) ou sulfónicos (R-SO₃H) cuja oxidação é irreversível (ver figura I.3). A oxidação de cisteínas pode dar também origem a ligações dissulfidos (R-SS-R), nomeadamente com outra cisteína da própria proteína, entre proteínas ou com o glutathione. Estas modificações nas cisteínas são de particular interesse, uma vez que sabe-se que estas podem desempenhar um papel importante em regular a actividade de uma série de enzimas e de moléculas sinalizadoras (Landar *et al.*, 2006).

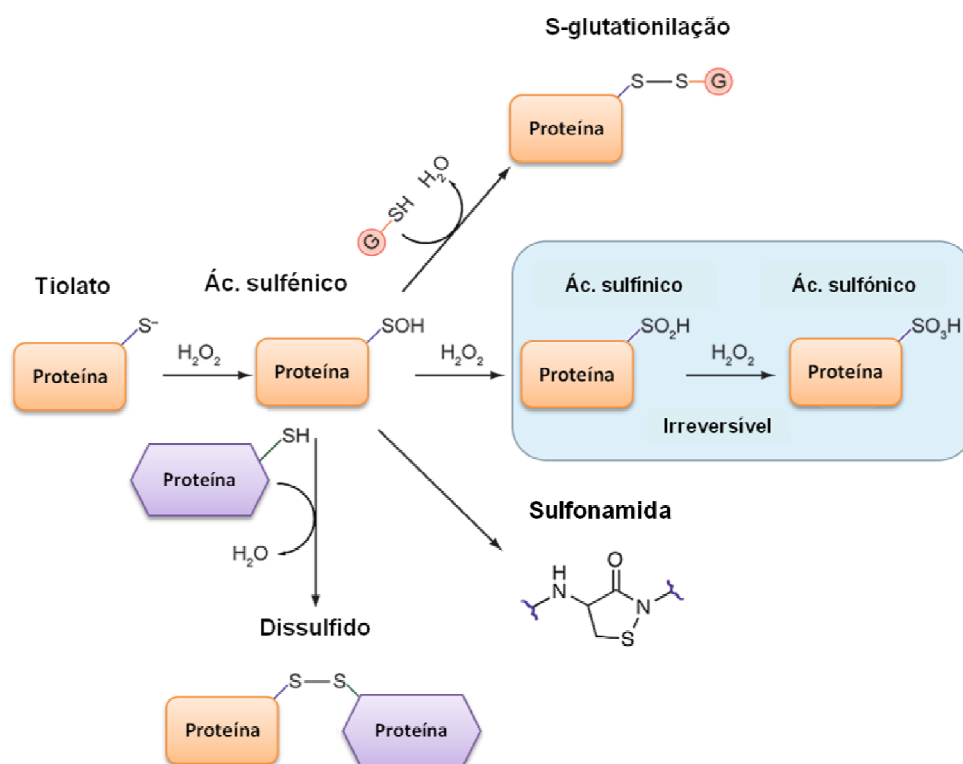


Figura I.3 – Modificações oxidativas nos resíduos de cisteínas de proteínas. Cisteínas com um baixo pK_a encontram-se na forma de anião tiolato e ao reagirem com o H_2O_2 dão origem a um ácido sulfénico. O ácido sulfénico pode sofrer uma segunda reacção de oxidação e dar origem a ácido sulfinico e sulfónico, os quais são irreversíveis. O ácido sulfénico pode também reagir com uma segunda cisteína da mesma proteína ou com outra proteína produzindo uma ligação dissulfido. Alternativamente, o ácido sulfénico pode reagir com a molécula de glutatona (G-SH) criando uma ligação dissulfido especial, conhecida como S-glutationilação. Se não se encontrarem cisteínas ou glutatona na vizinhança, o ácido sulfénico pode reagir com a amida de um resíduo próximo e dar origem a uma sulfonamida. (adaptado de Paulsen & Carroll, 2010b)

O facto de os grupos sulfidrílo das cisteínas não apresentarem todos a mesma susceptibilidade em serem oxidados confere a selectividade necessária para a sinalização pelo H_2O_2 (Paulsen & Carroll, 2010b). Quando o grupo apresenta-se no estado reduzido ($R-S^-$), anião tiolato, tem maior facilidade em ser oxidado pelo H_2O_2 do que quando se encontra na forma protonada ($R-SH$) (Kim *et al.*, 2000). Deste modo o valor do pK_a do grupo sulfidrílo define a reactividade para com o H_2O_2 . Nas proteínas, o pK_a dos resíduos de cisteína são influenciados pelo ambiente e estrutura local que os envolve. Tipicamente, um resíduo de cisteína apresenta um pK_a de 8, contudo se na proximidade existirem resíduos polares ou positivamente carregados dá-se uma estabilização do anião tiolato por interacções electro-estáticas, causando uma diminuição do valor do pK_a (até 3,5), considerando-se um resíduo de cisteína reactivo (Landar *et al.*, 2006).

Para além das cisteínas, outros resíduos de aminoácidos são possíveis de oxidar, como a lisina, arginina, prolina e histidina, contudo já mais num contexto de stress oxidativo do que sinalização específica (Berlett & Stadtman, 1997).

O número de alvos celulares que sofrem oxidação reversível pelo H_2O_2 tem aumentado rapidamente e abrange uma série de diferentes processos biológicos (Paulsen & Carroll, 2010b). Algumas dessas proteínas são fosfatases de tirosina, como a PTEN e a PT1B; cinases, nomeadamente, a ASK1; assim como factores de transcrição, como o AP-1 e o Nrf-2.

Para além das diferentes reactividades das cisteínas, a sinalização mediada pelo H_2O_2 apresenta outras formas de garantir a sua selectividade e especificidade. Tem-se vindo a descobrir que esta sinalização apresenta vários níveis de regulação que permitem que após um estímulo para a produção de H_2O_2 surjam gradientes de H_2O_2 localizados por inibição de peroxiredoxinas, ver exemplo da figura I.4 (Dickinson & C. J. Chang, 2011; Mishina *et al.*, 2011).

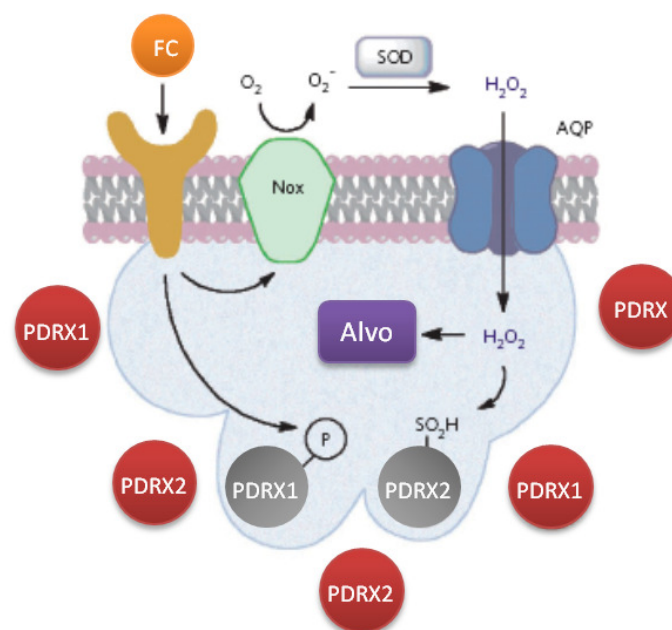


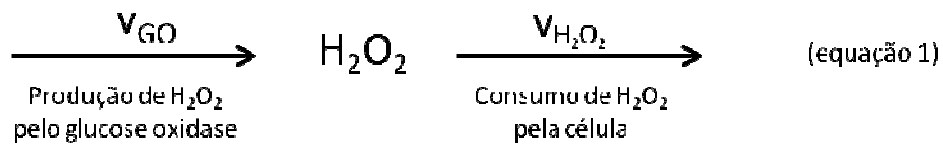
Figura I.4 – A sinalização mediada pelo H_2O_2 apresenta vários níveis de regulação. A activação de receptores de membrana por ligação de factores de crescimento (FC) ou outros ligandos leva ao aumento de produção de $O_2^{\bullet-}$, o qual é rapidamente convertido pela SOD extracelular a H_2O_2 . O H_2O_2 pode passar rapidamente a membrana por difusão passiva ou por aquaporinas (AQP). A activação do receptor de membrana provoca também a fosforilação da peroxiredoxina 1 (PDRX1) e consequente desactivação, diminuindo a capacidade antioxidante da célula junto à membrana. Tal leva a um aumento da concentração de H_2O_2 localizado, podendo inactivar a peroxiredoxina 2 (PDRX2) por hiper-oxidação. Estes vários pontos de regulação podem trabalhar em conjunto de modo a promover um aumento momentâneo da concentração de H_2O_2 e possibilitar a oxidação de alvos específicos. (adaptado de Dickinson & Chang, 2011)

O aumento do stress oxidativo é um dos factores chave no desenvolvimento e progressão de várias doenças. Um dos efeitos da produção excessiva de ERO é a hiper-oxidação de cisteínas reactivas, o que causa alterações persistentes e anormais da função das proteínas alvo e consequentemente a desregulação das vias em que estas proteínas participam (Paulsen & Carroll, 2010b).

4. Titulação de H_2O_2 em estado estacionário

Devido ao papel dualista do H_2O_2 na regulação dos processos celulares é de extrema importância assegurar que os ensaios realizados no estudo dos eventos sinalizadores do H_2O_2 sob concentrações fisiológicas sejam efectuados sob condições controladas.

Um dos métodos desenvolvidos neste sentido por Antunes e Cadenas (2001) é o método da titulação do H_2O_2 em estado estacionário. Este método utiliza as propriedades do enzima glucose oxidase (GO) em oxidar a glucose (que se encontra em excesso no meio) na presença de O_2 para fornecer H_2O_2 ao meio extracelular de uma forma controlada. No início deste ensaio dá-se a adição de H_2O_2 , à concentração pretendida, simultaneamente com o glucose oxidase nas unidades apropriadas às células. O glucose oxidase vai produzir H_2O_2 à mesma velocidade (v_{GO}) com que os enzimas intracelulares consomem o H_2O_2 ($v_{\text{H}_2\text{O}_2}$, reacção de 1ª ordem) (ver equação 1). Deste modo, até ao fim do período de incubação a concentração do H_2O_2 é mantida constante.



Uma das vantagens de se poder manter a concentração de H_2O_2 constante ao longo do tempo possibilita a utilização de concentrações de H_2O_2 relativamente baixas, a um nível sub-letal, sem que as células o consumam em poucos minutos. Outro aspecto chave deste método consiste na possibilidade de se inferir a real concentração do H_2O_2 extracelular ao longo do ensaio por medição num eléctrodo de oxigénio. Adicionalmente, outra grande vantagem é que este método pode ser calibrado em cada ensaio, podendo-se ajustar a quantidade de glucose oxidase adicionada de modo a igualar pequenas diferenças que se possam observar no consumo das células. Deste modo, a titulação do H_2O_2 em estado estacionário reproduz a exposição celular ao H_2O_2 extracelular *in vivo*. Tal pode ser particularmente relevante no estudo de processos biológicos sujeitos a uma complexa regulação pelas concentrações de H_2O_2 , como é o caso deste trabalho.

Parte II – Sinalização mediada pelo H_2O_2 em células endoteliais

1. H_2O_2 em células endoteliais

Nos últimos anos tem-se vindo a descobrir que o H_2O_2 desempenha um papel fundamental na modelação da função das células endoteliais (CE) (Cai, 2005). O H_2O_2 está envolvido não só em processos que regulam a funcionalidade das CE, mas também do processo angiogénico e da estabilização da rede vascular. Assim, alguns dos processos em que o H_2O_2 está envolvido são a regulação da proliferação, sobrevivência e apoptose das CE; a regulação da migração celular e da permeabilidade vascular por reorganização do citoesqueleto (Dudek & Garcia, 2001); a regulação da vasodilatação dependente do endotélio por mecanismos dependentes e independentes do NO^* ; e a regulação das respostas inflamatórias endoteliais.

No caso da regulação da proliferação e apoptose das CE, estudos revelam que as ERO têm a capacidade de estimular ambos os processos sendo o factor determinante a concentração das ERO. Sob baixas concentrações, o H_2O_2 estimula o crescimento e proliferação contudo para concentrações elevadas observa-se a morte celular endotelial (Cai, 2005; Zanett *et al.*, 2002).

Para além do seu papel fisiológico, o H_2O_2 está também envolvido em diversas doenças associadas às CE. O aumento do stress oxidativo é um dos factores chave no desenvolvimento e progressão de várias doenças vasculares associadas à disfunção da função vasodilatadora dependente do endotélio e ao aumento da activação endotelial, como a arteriosclerose, a hipertensão, processos inflamatórios crónicos e a lesão pulmonar aguda (Dworakowski *et al.*, 2008). Nos capítulos seguintes pretende-se apresentar alguns dos mecanismos em que o H_2O_2 está envolvido na modelação da função endotelial e também a contribuição do H_2O_2 para algumas das patologias associadas às CE.

1.1. NADPH oxidases

Para continuar a discussão sobre a regulação do H_2O_2 nas CE é necessário falar da família de enzimas Nox. Estes enzimas são os principais responsáveis pela produção das ERO tanto em células fagocíticas como não-fagocíticas, não sendo excepção para o caso das CE (Babior, 2000). Nas CE as isoformas mais relevantes, e que apresentam maior expressão, são a Nox1, Nox2, Nox4, e Nox5 (Ushio-Fukai & Urao, 2009). Estas isoformas têm como característica a produção contínua de $O_2^{\bullet-}$ a baixas concentrações ao contrário das Nox das células fagocíticas. Uma fracção maioritária do $O_2^{\bullet-}$ formado é rapidamente convertida a H_2O_2 pelo SOD extracelular (ecSOD).

As Nox podem ser estimuladas por diversos factores, nomeadamente factores de crescimento (factor de crescimento vascular endotelial, VEGF; angiopoietina-1, Ang1; factor de crescimento derivado das plaquetas, PDGF, factor de crescimento epidérmico, EGF; e insulina), citocinas (factor tumoral de necrose e factor de crescimento de transformação), agonistas acoplados a proteínas G (angiotensina II e trombina) ou hipóxia (Dworakowski *et. al*, 2008). As Nox apresentam uma regulação complexa, quer a nível extracelular como intracelular, o que permite manter a concentração das ERO em níveis fisiológicos.

2. Regulação da angiogénese pelo H_2O_2

2.1. Angiogénese

O sistema vascular consiste numa elaborada rede hierárquica de vasos que permitem a circulação do sangue oxigenado e de substratos essenciais entre tecidos e órgãos vitais. A angiogénese, processo que consiste na formação de novos vasos a partir de vasos pré-existentes, é o principal processo responsável pela formação da rede vascular durante o desenvolvimento e crescimento. Contudo, este é um processo raro em adultos, realizando-se apenas em resposta a estímulos específicos.

A angiogénese ocorre por proliferação, migração e formação do tubo capilar de células endoteliais (Ren *et al.* 2002). Em vasos estáveis as CE encontram-se inactivas, apresentando um fenótipo quiescente. Este fenótipo é mantido até sinais pró-angiogénicos se sobreporem aos sinais anti-angiogénicos e induzirem uma alteração no comportamento das CE (ver figura I.5). O primeiro passo na formação do novo vaso consiste na remoção dos pericitos que revestem o vaso. Ao serem activadas, as células perdem os seus contactos célula-a-célula por activação de proteases extracelulares, como as metaloproteinases da matriz (MMP), e passam a apresentar um carácter invasivo e de motilidade, iniciando-se o processo da formação de novos vasos. Contudo, é de referir que nem todas as CE que são estimuladas dão origem a novos vasos, apenas uma pequena fracção é capaz de o fazer.

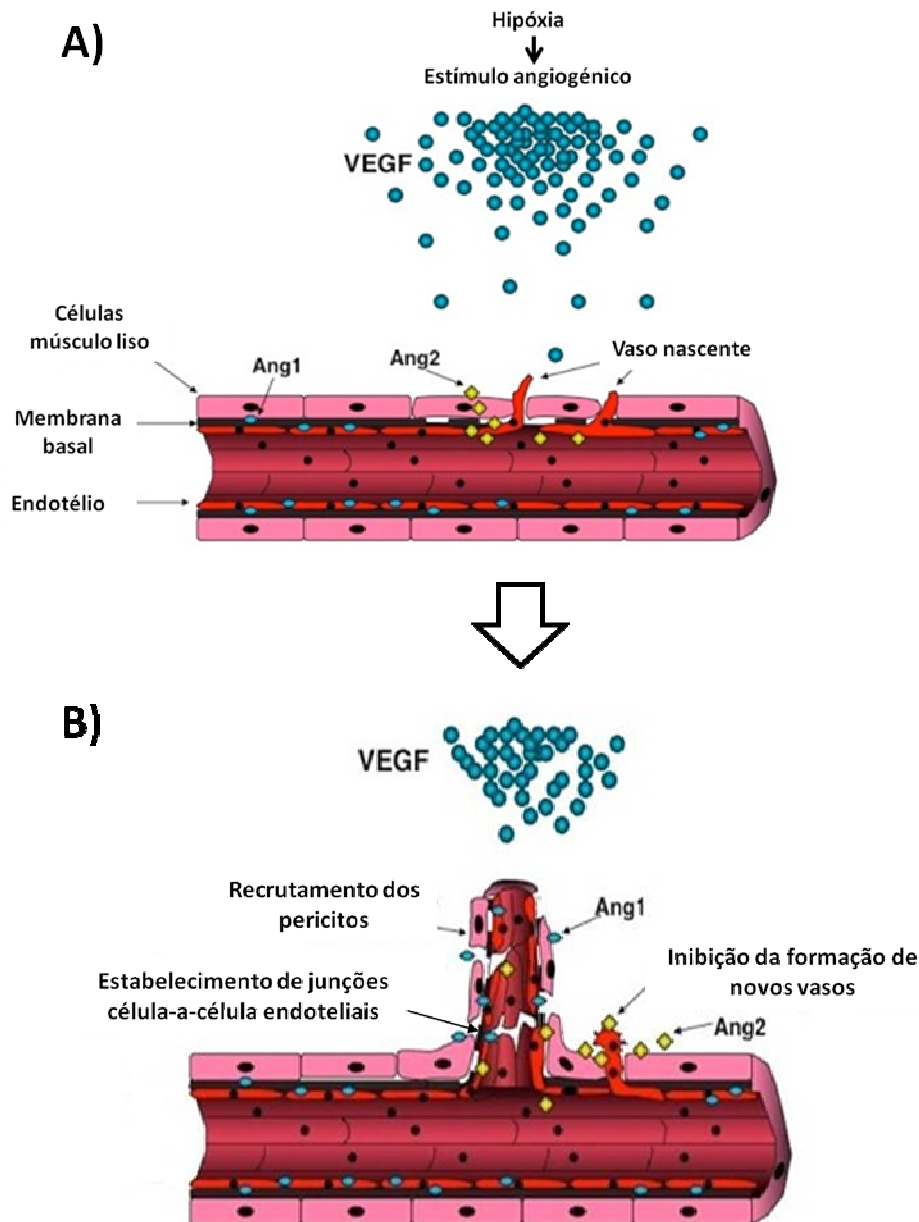


Figura I.5 – Formação de novos vasos a partir do processo angiogénico. A) Situações de hipóxia dão início à formação de novos vasos ao induzirem a expressão de VEGF. O VEGF desencadeia uma série de mecanismos, como a activação das CE, a desagregação dos pericitos e a degradação da membrana basal, que em conjunto conduzem à formação do novo vaso. As angiopoietinas 1 e 2 (Ang1 e Ang2, respectivamente) desempenham um papel importante na manutenção e remodelação vascular. O VEGF é um potente agente quimiotático para as CE, causando a migração das CE em direcção ao gradiente de VEGF formado. O VEGF estimula também a proliferação das CE, promovendo a elongação do vaso. B) A maturação do novo vaso dá-se por recrutamento dos pericitos e de células do músculo liso, os quais têm a função de estabilizar o vaso recém-formado. Adicionalmente, a criação de ligações célula-a-célula entre as CE e a formação da membrana basal também promovem a estabilização do vaso.

(imagem adaptada de http://web.me.com/chriskontos/Kontos_Lab/Home.html)

Por ser um processo altamente complexo, que engloba vários passos, a angiogénese apresenta uma coordenação e um controlo altamente finos. Devido à importância da angiogénese, desequilíbrios neste processo podem contribuir para diversas patologias (Martin *et al.*, 2003; Nussenbaum & Herman, 2010; Zachary & Morgan, 2011). É de referir que, em contraste com o bom funcionamento e a estrutura bem ordenada dos vasos normais, os vasos criados na angiogénese patológica já não apresentam tais propriedades (Dvorak, 2003; Ren *et al.*, 2002). Deste modo a angiogénese tornou-se um alvo terapêutico bastante aliciente e que tem gerado um grande volume de estudos, sendo fundamental compreender melhor os mecanismos envolvidos neste processo.

2.2. Regulação do processo angiogénico pelo H_2O_2

Estudos têm revelado que um dos mecanismos de promoção da angiogénese dá-se por estimulação da produção de ERO. Tem-se observado que o aumento da concentração de ERO, associado às Nox, promove a proliferação, a migração, a reorganização do citoesqueleto e a morfogénese tubular das CE (Cai, 2005). Adicionalmente, estudos que inibiram a produção de ERO revelaram uma diminuição do processo angiogénico.

Alguns dos factores que estão envolvidos nesta estimulação são factores pró-angiogénicos já conhecidos como o VEGF, a Ang1, a leptina, o ácido 20-HETE (produto do citocromo P450), a angiotensina II, a reoxigenação após situação de hipóxia ou a adesão de leucócitos polimorfonucleares activados às CE (Frey *et al.*, 2009). Por sua vez, as ERO produzidas, nomeadamente o H_2O_2 , activam diversas vias de sinalização ao oxidarem as cisteínas reactivas de proteínas específicas. Algumas dessas proteínas incluem cinases, fosfatases e factores de transcrição sensíveis ao estado redox celular, como o caso do Ap1, da PKC, do NF- κ B, das Ets, e do HIF-1. Os quais, por sua vez, desencadeiam a indução de genes que também promovem a angiogénese como o VEGF, as MMP e a cicloxigenase 2 (COX-2).

Considerando o caso do VEGF, o qual é considerado o principal promotor da angiogénese e é produzido em resposta a situações de hipóxia. Estudos revelaram que um dos mecanismos pelo qual este factor induz o processo angiogénico é pela estimulação da produção de ERO, via activação das Nox (ver figura I.6) (Ushio-Fukai *et al.*, 2002; Łuczak *et al.*, 2004). Um dos alvos do H_2O_2 são os fosfatases de tirosina (PTP), que sofrem inibição pela oxidação de cisteínas reactivas essenciais para a sua actividade catalítica. A inibição das PTP facilita a autofosforilação do receptor tirosina cinase do VEGF (VEGFR-2) e consequente sinalização ao permitir uma extensão da duração da resposta celular após activação do receptor. Adicionalmente, observou-se que o H_2O_2 induz a expressão do VEGF e do

seu receptor VEGFR-2, existindo deste modo um mecanismo de *feedback* positivo entre o VEGF e o H_2O_2 .

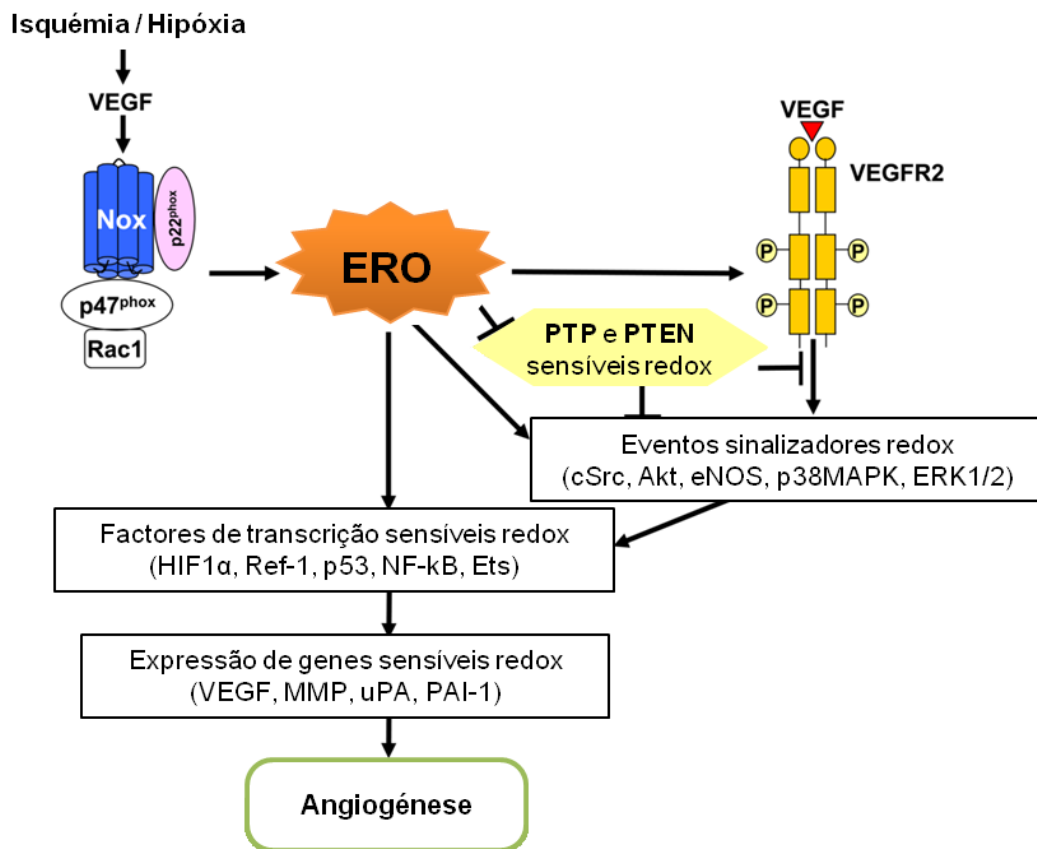


Figura I.6 – Papel das ERO na sinalização do VEGF e de vias associadas à angiogénese. Situações de isquémia ou hipóxia estimulam a indução do VEGF, o qual por sua vez estimula as Nox dando-se a produção de ERO. As ERO inibem as fosfatases de tirosina, PTP e PTEN, por oxidação, o que eventualmente facilita a autofosforilação do receptor VEGFR2 após ligação do VEGF. A activação do VEGFR2 desencadeia uma cascata de sinalização associada à angiogénese. Para além da activação do VEGFR2, as ERO podem induzir outras vias de sinalização sensíveis à oxidação que estão associadas ao processo angiogénico. (adaptado de Ushio-Fukai & Nakamura, 2009)

Para além do VEGFR-2, o H_2O_2 potencia a activação de outros receptores tirosina cinase que respondem a factores angiogénicos (Miller *et. al*, 2009).

Outro papel interessante que o H_2O_2 desempenha na angiogénese está relacionado com a activação das MMP, as quais são essenciais para a iniciação do processo angiogénico (Miller *et al.*, 2009). A activação das MMP está dependente da quebra da ligação Cys-S-Zn²⁺ no centro activo do enzima. Esta pode ocorrer por vários processos, sendo um deles a oxidação do resíduo de cisteína pelo H_2O_2 .

(Cook-Mills, 2006). Adicionalmente, o H_2O_2 pode estimular a activação proteolítica das MMP ao induzir a expressão de proteinases como a urocinase ou a MMP-1 (Yasuda *et al.*, 1999). Como já referido, o H_2O_2 estimula ainda a expressão das MMP via activação das Nox.

2.3. Envolvimento do H_2O_2 em doenças associadas à angiogénese patológica

Dada a importância da angiogénese desequilíbrios neste processo contribuem para diversas patologias. Sabe-se que um aumento da activação da angiogénese está intrinsecamente ligado ao cancro, observando-se que a estimulação da angiogénese pelas células cancerígenas promove a vascularização do tumor e consequente crescimento, assim como o desenvolvimento de metástases (Folkman, 1971; Malonne *et al.*, 1999; Bergers & Benjamin, 2003). Por outro lado, observa-se que a diminuição da angiogénese é um factor limitante na recuperação de tecidos na doença isquémica cardíaca (Marti & Risau, 1999). No caso da diabetes, anormalidades no processo angiogénico podem ser implicadas nesta doença (Martin *et al.*, 2003). Observando-se que para o mesmo indivíduo pode ocorrer disfunções na angiogénese tanto excessivas como limitantes.

Devido ao papel desempenhado pelas ERO na modulação de processos essenciais para as CE, estas espécies contribuem para várias doenças associadas à angiogénese patológica (Cai, 2005).

2.3.1. H_2O_2 e o cancro

Devido ao papel que a angiogénese desempenha na malignidade dos tumores, a inibição deste processo é uma das abordagens terapêuticas que tem suscitado vastos estudos e que se tem desenvolvido nos últimos anos. De modo a melhorar a eficácia destes tratamentos e a encontrar novos alvos torna-se essencial compreender melhor os mecanismos que regulam este processo. No caso particular das ERO, sabe-se que estas contribuem para a angiogénese e mitogénese das células tumorais (Ushio-Fukai & Nakamura, 2009), tornando deste modo as ERO e os mecanismos envolvidos em potenciais alvos terapêuticos e que vários estudos têm despoletado.

Especificamente, tem-se observado que nas células tumorais as ERO estão presentes em concentrações superiores ao normal (Szatrowski & Nathan, 1991). Um dos motivos para este aumento deve-se à desregulação a nível da actividade e expressão dos produtores e dos reguladores que estimulam a produção de ERO (Ushio-Fukai & Nakamura, 2009). Outro factor que contribui para o aumento das ERO deve-se ao facto dos tumores não vascularizados a partir de um determinado tamanho apresentarem maiores níveis de hipóxia, o que estimula a produção de ROS nas células.

Nesta situação, para o tumor continuar a crescer é necessário que este estabeleça uma rede de vasos de forma a satisfazer as suas necessidades por oxigénio e nutrientes.

Assim como na angiogénese fisiológica, o VEGF continua a ser um dos principais factores envolvido na angiogénese tumoral (Bergers & Benjamin, 2003). Estudos revelaram que o VEGF e o seu receptor VEGFR-2 encontram-se aumentados em vários tipos de células tumorais, tendo demonstrado que no cancro da mama e do cólon humano este aumento está associado a um aumento da vascularização tumoral (Nussenbaum & Herman, 2010). O aumento da produção de VEGF e VEGFR-2 dá-se em resposta à situação de hipóxia que ocorre no interior do tumor, tendo como via de activação principal o HIF-1 (Nussenbaum & Herman, 2010). O HIF-1 é um factor de transcrição que induz a expressão de vários genes envolvidos no processo tumoral, que contribuem para o carácter proliferativo, invasivo e angiogénico das células. O H_2O_2 , via Nox, é um dos factores que estimulam o HIF-1 em condições de normóxia e hipóxia nas CE. (Kietzmann & Görlach, 2005).

Adicionalmente, Arbiser *et al.* (2002) observaram que a Nox-1 num contexto tumoral promove o aumento da expressão do VEGF em células tumorais e endoteliais e que o seu receptor VEGFR-2 encontra-se aumentado nas CE. Confirmaram ainda que a indução do VEGF pela Nox-1 se devia à produção de H_2O_2 ao observarem que em células transfectadas com catalase a indução de VEGF era inibida. Também observaram que a Nox-1 estimula a actividade das MMP, o que em conjunto com os resultados anteriores sugere que a sinalização do H_2O_2 contribui para a fase inicial da angiogénese tumoral.

Devido ao papel desempenhado pelas Nox, estas são uns dos potenciais alvos terapêuticos no tratamento do cancro. Recentemente, estudos realizados por Garrido-Urbani *et al.* (2011) demonstraram que a inibição específica da Nox-1 *in vivo* causa uma diminuição da angiogénese e do crescimento do tumor.

Capítulo II – Objetivos

As espécies reactivas de oxigénio (ERO) são responsáveis por promoverem modificações oxidativas em várias biomoléculas, nomeadamente nas proteínas, ao reagirem com os resíduos de cisteínas reactivos. A produção excessiva ou desregulada destas espécies conduz ao efeito de stress oxidativo, o qual está implicado na morte celular e no processo de envelhecimento. Contudo, estudos recentes revelam que estas espécies não actuam apenas como agentes tóxicos para as células, tendo-se observado que, para concentrações não-tóxicas, as ERO estão envolvidas na regulação de diversas funções celulares.

Em particular nas células endoteliais o H_2O_2 , o principal sinalizador das ERO, a concentrações fisiológicas, desempenha um papel fundamental na modelação destas células, estando envolvido no processo angiogénico e de estabilização da rede vascular. Para além do seu papel fisiológico, o H_2O_2 está também envolvido em diversas doenças associadas às EC, como o caso de processos inflamatórios crónicos e angiogénese patológica, sendo determinante o seu papel na evolução do cancro.

Várias proteínas sensíveis ao H_2O_2 já foram identificadas e nos últimos anos o número de processos em que o H_2O_2 participa tem vindo a crescer. Contudo, os trabalhos existentes muitas vezes não utilizam concentrações consideradas não-tóxicas para as células, não sendo possível inferir quanto à validade desses resultados.

Este trabalho teve como objectivo principal caracterizar as proteínas reguladas pelo H_2O_2 sob concentrações fisiológicas.

Mais especificamente neste trabalho:

- I. Caracterizou-se as linhas celulares HUVEC e HMEC-1 quanto catabolismo do H_2O_2 ;
- II. Implementou-se as condições ideais para a exposição das células HUVEC a concentrações não tóxicas de H_2O_2 a partir do método de titulação de H_2O_2 em estado estacionário;
- III. Procedeu-se à avaliação do proteoma de cisteínas sensíveis ao H_2O_2 recorrendo a electroforese bidimensional, de modo a identificar proteínas com alteração dos níveis de oxidação quando expostas a VEGF e a concentrações não-tóxicas de H_2O_2 ;
- IV. Avaliou-se a expressão diferencial de proteínas mediada pelo H_2O_2 a partir do estudo do proteoma total.

Capítulo III - Materiais e Métodos

Parte I – Materiais e equipamento

1. Materiais

O meio de cultura RPMI-1640, o soro fetal de bovino (FBS), a glutamina, a tripsina e os antibióticos penicilina e estreptomicina provieram todos da HyClone®, Thermo scientific. O meio de cultura EBM-2 e o EGM-2 SingleQuot Kit Suppl. & Growth Factors provieram da Lonza. O meio de cultura MCDB-131 e DMEM com Glutamax vieram da GIBCO™, Invitrogen. O peróxido de hidrogénio, o metanol, o ácido acético glacial, o etanol, a acetona, o NaCl, a glicina, o paraformaldeído, o formaldeído e o nitrato de prata foram obtidos na Merck. O glucose oxidase (*Aspergillus Níger*, EC. 1.1.3.4), a catalase (fígado de bovino, EC. 1.11.1.6), o MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), o dimetilsulfóxido (DMSO), o Tris-Base, o ditioneitol (DTT), os inibidores de proteases, a albumina do soro bovino para a quantificação proteica (BSA), 6-diamidino-2-fenilindole (DAPI), a acrilamida, o reagente de Bradford, o MES, os marcadores de massa molecular fluorescentes (F3526), a gelatina tipo B, a hidrocortisona, a heparina, o DABCO, o CHAPS, o tiosulfato de sódio, o NH_4HCO_3 , o Titron X-100, o β -mercaptoetanol, o ácido trifluoracético (TFA) e o CHCA foram adquiridos à Sigma. O Coomassie G-250 provém da Bio-Rad e a agarose da Cambrex. A ureia, o IPG buffer pH 3-11 não linear, as fitas de pH 3-11 não linear (13 cm) e o PlusOne Dry Strip Cover Fluid foram adquiridos à GE Healthcare. O BODIPY FL C1-IA [*N*-(4,4-difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-yl)methyl] iodoacetamide], o VEGF e o EGF foram adquiridos à Invitrogen. O glicerol e a iodoacetamida vieram da Fluka. O colagénio do tipo I de rato veio da Cultrex®, Trevigen. Os anticorpos primários anti-VE-caderina de cabra, anti-CD31 de murganho e anti-SMA de murganho provieram da R and D systems. O anticorpo secundário anti-murganho-FITC foi adquirido à BD Pharmingen™ e o anti-cabra-Alexa564 à Molecular Probes, Invitrogen. A BSA para a imunofluorescência e o meio de montagem MOWIOL 4-88 foram obtidos na Calbiochem®. O N,N,N,N-Tetrametiletilenodiamina (TEMED), o persulfato de amónio (PSA) e a tripsina para a digestão de proteínas foram adquiridos à PROMEGA.

2. Equipamento

As linhas celulares foram manuseadas na câmara de fluxo laminar vertical Danlaf VFRS 1206 e mantidas na estufa de atmosfera húmida com 5% CO_2 Snijders CO190TC-20.

As imagens de imunofluorescência foram obtidas num microscópio de fluorescência Olympus BX60.

Utilizou-se o espectrofotómetro Camspec M350 Double Beam para as medidas espectrofotométricas de H₂O₂ e o leitor de microplacas Tecan Sunrise acoplado ao *software* RdrOle4 para as medidas espectrofotométricas dos ensaios de viabilidade celular e quantificação de proteínas.

A determinação da concentração do H₂O₂ foi realizada num eléctrodo de oxigénio (Hansatech Instruments) acoplado ao *software* Oxygraph.

Para a obtenção dos extractos proteicos utilizaram-se as centrífugas refrigeradas Sigma 202 Mk e 4k10 e o banho sonicador Bandelin Sonorex Tk52.

A electroforese 1-D em gel desnaturante SDS-PAGE foi realizada nos aparelhos de mini-gel BIORAD Mini-Protean utilizando uma fonte de tensão Bio Rad PAC200. Na electroforese 2-D para a 1ª dimensão utilizou-se o sistema de focagem isoeléctrica Ettan™ IPGphor™ Isoelectric Focusing System e para a 2ª dimensão utilizou-se o sistema vertical Hoefer SE 600 (Hoefer), utilizando a fonte EPS 3500 Electrophoresis Power Supply (Pharmacia Amersham). O *software* utilizado na análise dos géis foi o ImageMaster™ 2D Platinum v5.0, desenvolvido pelo Swiss Institute of Bioinformatics em colaboração com o GeneBio™ e a Amersham Biosciences.

Para a aquisição de imagem dos géis 2-D utilizou-se o Typhoon 9210 (GE Healthcare) para as imagens de fluorescência e o ImageScanner (Amersham Biosciences) para as imagens do padrão total de proteínas.

Para a identificação de proteínas por espectrometria de massa recorreu-se a um MALDI-TOF-TOF 4800 Plus (Applied Biosystems), utilizando a placa ABI 4800 MALDI TOFTOF. Os *softwares* utilizados nesta análise foram o 4000 Series Explorer v3.0 RC1 (Applied Biosystems) e o Data Explorer 4.5 (Applied Biosystems).

Parte II - Métodos

1. Cultura celular

A linha celular primária endotelial isolada da veia do cordão umbilical humano, HUVEC, foi cultivada no meio adequado para o crescimento de células endoteliais EBM-2 (*Endothelial cell Basal Medium-2*), suplementado com 5% de soro fetal bovino inativado (FBS), e de factores que asseguram o crescimento endotelial, hEGF, VEGF, hFGF-B, R3-IGF-1, ácido ascórbico, heparina, hidro cortisona, gentamicina e anfotericina-B (GA-1000) (que constituem o *EGM-2 SingleQuot Kit Suppl. & Growth Factor*) (Ballmoos *et al.*, 2010). As células foram cultivadas em placas de 90 mm e frascos de 75 cm³ contendo um revestimento prévio de gelatina a 0,2% (m/v). Tratando-se de uma linha primária, as HUVEC foram utilizadas em todas as experiências no máximo até à passagem 10.

A linha celular endotelial da microvasculatura humana, HMEC-1 (Ades *et al.*, 1992), foi cultivada no meio MCDB131, suplementado com 10% FBS, 2 mM L-glutamina, 1 µg/mL de hidro cortisona, e 10 ng/mL EGF (Tamura *et al.*, 2002). As células foram cultivadas em placas de 90 mm e frascos de 75 cm³, com e sem revestimento de gelatina a 0,2% (m/v) dependendo das experiências efectuadas.

As linhas celulares foram cultivadas e passadas tendo em conta a sua confluência, de forma a garantir um crescimento exponencial e em monocamada aderente. As células foram mantidas numa estufa a 37°C, com uma atmosfera húmida contendo 5% CO₂.

2. Caracterização das HUVEC - imunofluorescência

De modo a confirmar o correcto isolamento das HUVEC procedeu-se a um ensaio de imunofluorescência utilizando marcadores específicos para esta linha celular. As proteínas testadas foram dois receptores de membrana específicos de células endoteliais, a VE-caderina (do inglês, *vascular-endothelial cadherin*) e o CD31, tendo-se utilizado os anticorpos primários anti-VE-caderina de cabra e anti-CD31 de murganho; a anti-actina do músculo liso (SMA, do inglês *smooth muscle actin*) foi usada como controlo negativo, utilizando-se o anticorpo primário anti-SMA de murganho (Larrivé & Karsan, 2005).

As células HUVEC foram cultivadas em lamelas de vidro em placas de 24 poços, contendo um revestimento prévio de gelatina. Quando as células atingiram um estado confluyente, o meio foi removido e lavado com o tampão de fosfato salino pH 7,2 (PBS: 1,5 mM KH₂PO₄, 155 mM NaCl e 2,7

mM Na_2HPO_4). De seguida, procedeu-se à fixação das células utilizando-se paraformaldeído (PFA) a 4% (m/v), com um período de incubação de 1 h a 4°C. Findo esse período, lavou-se repetidamente com PBS, sendo reservadas em PBS a 4°C até serem utilizadas.

Para as lamelas a testar a SMA foi necessário proceder à permeabilização das células com a adição de Triton X-100 a 0,5% (v/v) durante 15 min. De seguida, procedeu-se ao bloqueio com uma solução de PBS e albumina de soro bovino (BSA) a 3%. Os anticorpos primários foram diluídos em solução de bloqueio (anti-VE-caderina 1:200; anti-CD31 1:50; anti-actina 1:200), ficando a incubar durante a noite a 4°C.

As lamelas foram lavadas com PBS por períodos de 5 min. O passo seguinte consistiu na incubação com os anticorpos secundários (anti-murganho-FITC e anti-cabra-Alexa564), previamente diluídos 1:500 em PBS, durante 1 h à temperatura ambiente. De seguida, procedeu-se à lavagem com PBS por períodos de 5 min. De forma a proceder-se à marcação dos núcleos as células foram incubadas com DAPI (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) durante 1 min. Procedeu-se novamente à lavagem com PBS durante 5 min, por 3 vezes. Por fim, montou-se as lamelas em lâminas vidro sobre uma gota do meio de montagem - MOWIOL 4-88 suplementado com 2,5% (m/v) de DABCO, tendo-se observado num microscópio de fluorescência. As imagens foram posteriormente compostas com o *software* Photoshop.

3. Ensaios de consumo celular de H_2O_2 e de titulação de H_2O_2 em estado estacionário

Para estes ensaios a concentração de H_2O_2 foi determinada recorrendo-se a um eléctrodo de oxigénio (Antunes & Cadenas, 2000). Esta determinação tem por base a mediação do oxigénio produzido após adição de catalase.

3.1. Condições de cultura celular para os ensaios

Para os ensaios de estado estacionário e consumos celulares de H_2O_2 , na véspera do dia dos ensaios, procedeu-se à passagem e à contagem das células, sendo $1,2 \times 10^6$ células cultivadas em placas de 90 mm, com revestimento de gelatina (caso contrário será devidamente assinalado) e nos respectivos meios de cultura. No caso dos ensaios de estado estacionário seguidos de ensaio de viabilidade celular as HUVEC foram cultivadas em placas de 12 poços com revestimento de gelatina, sendo 1×10^5 células cultivadas por poço. No dia dos ensaios, uma hora antes de dar início aos mesmos, substituiu-se o meio celular por meio de cultura RPMI-1640, suplementado com 2 mM de L-glutamina e

antibióticos (100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina), previamente aquecido a 37°C, de forma a permitir que as células se adaptassem ao novo meio.

3.2. Curva de calibração

Para cada dia de ensaio, efectuou-se uma curva de calibração de soluções de H₂O₂ de concentrações conhecidas, dentro do intervalo de molaridade que se pretendia medir. As soluções foram produzidas a partir de uma solução de aproximadamente 9 mM de H₂O₂, cuja real concentração foi aferida medindo-se a absorvência do H₂O₂ a 240 nm ($\epsilon = 43,4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Quando o eléctrodo apresentava uma linha de base constante ao longo do tempo, a curva de calibração foi concebida por medição do sinal obtido no eléctrodo de oxigénio para cada solução com a adição de catalase (10 µL a 1 mg/mL).

3.3. Determinação da concentração de H₂O₂

A concentração do H₂O₂ no meio de cultura dos ensaios foi determinada pela adição de catalase (10 µL a 1 mg/mL) a alíquotas de meio de ensaio (1 mL), medindo-se o oxigénio produzido no eléctrodo de oxigénio (Antunes & Cadenas, 2000). Por interpolação da curva de calibração determinou-se a concentração de H₂O₂.

3.4. Ensaio de consumo celular de H₂O₂

A determinação da constante de consumo de H₂O₂ em células intactas foi realizada através de ensaios de *bolus adiction* (Antunes & Cadenas, 2000). Estes ensaios consistem na adição de uma concentração conhecida de H₂O₂, 100 µM, no início do ensaio. O consumo de H₂O₂ foi acompanhado ao longo do tempo por medição da concentração de H₂O₂ presente em alíquotas do meio de ensaio, no eléctrodo de oxigénio.

Considerando o consumo de H₂O₂ uma reacção de primeira ordem tem-se a equação 2:

$$-\frac{d[H_2O_2]}{dt} = k[H_2O_2] \quad (\text{equação 2})$$

A constante de velocidade de consumo, k (min⁻¹), pode ser determinada por integração da equação (2):

$$\ln[H_2O_2]_f = -kt + \ln[H_2O_2] \quad (\text{equação 3})$$

Contudo, é necessário ter em consideração que ao retirar alíquotas de 1 mL ao longo do tempo a relação densidade celular/quantidade de H_2O_2 foi alterada, sendo necessário corrigir a constante de velocidade e as concentrações de H_2O_2 medidas tendo em conta a alteração do volume de meio ao longo do ensaio.

Deste modo, a constante de consumo de H_2O_2 corresponde ao declive da recta ajustada aos pontos experimentais da representação gráfica de $\ln [H_2O_2]_{\text{corrigido}}$ vs. tempo (min).

3.4.1. Ensaio do consumo de H_2O_2 para vários meios de cultura

O método empregue nestes ensaios é semelhante ao dos ensaios de consumos celulares. Nestes ensaios testaram-se vários meios de cultura: EBM-2 completo, EBM-2 sem aditivos, MCDB-131 sem aditivos, DMEM com Glutamax e RPMI-1640 suplementado. Antes de dar início ao ensaio incubou-se 12 mL de meio, numa placa de 90 mm, na estufa a 37°C de modo a reproduzir as condições dos ensaios de consumo celular e estado estacionário de H_2O_2 . O ensaio teve início com a adição de 100 μM de H_2O_2 , seguido de medições ao longo do tempo da concentração do H_2O_2 no eléctrodo de oxigénio. Os cálculos efectuados para a determinação da constante de velocidade dos diferentes tipos de meio são idênticos aos cálculos dos ensaios de consumo celular.

3.5. Ensaio de titulação de H_2O_2 em estado estacionário

Como já referido, neste projecto pretendeu-se estudar o efeito do H_2O_2 , em concentrações fisiológicas, nas células endoteliais. Para tal recorreu-se ao método da titulação do H_2O_2 em estado estacionário descrito por Antunes & Cadenas, 2000. Este método tem a grande vantagem de manter constante ao longo do tempo concentrações baixas de H_2O_2 .

Como descrito na introdução, o ensaio tem início com a adição das unidades apropriadas do enzima glucose oxidase (ver secção 3.4.1. Actividade do enzima glucose oxidase) em simultâneo com a de H_2O_2 , na concentração pretendida, ao meio de ensaio. O enzima glucose oxidase presente no meio tem como função repor o H_2O_2 a uma velocidade semelhante à que o H_2O_2 é consumido pelos enzimas intracelulares. Tal, permite a manutenção da concentração de H_2O_2 constante ao longo do tempo. No fim do tempo pretendido para a exposição das células ao H_2O_2 , neste caso 15 min, a concentração do H_2O_2 foi verificada no final do ensaio por medição no eléctrodo de oxigénio. O

grupo controlo consistiu em células cultivadas e tratadas nas mesmas condições, com a excepção da aplicação do estado estacionário de H_2O_2 .

De forma a parar o ensaio, o meio foi removido e lavado duas vezes com PBS a 4°C. De seguida, removeu-se o PBS e congelaram-se as células rapidamente em azoto líquido, sendo conservadas a -80°C (Kim *et al.*, 2000; Rogers *et al.*, 2006)

3.5.1. Actividade do enzima glucose oxidase

De forma a determinar as unidades de glucose oxidase (GO) apropriadas para a manutenção do estado estacionário foi necessário fazer-se um estudo da actividade do enzima (F Antunes & E Cadenas, 2000).

Para o ensaio de actividade recriou-se as condições do estado estacionário, incubando 10 mL de meio RPMI-1640 suplementado numa placa de 90 mm na estufa a 37°C. O ensaio teve início com a adição de 50 µL de GO a 1,060 U/mL ao meio. O aumento da concentração de H_2O_2 foi acompanhado ao longo do tempo, com a medição do H_2O_2 a intervalos de 5 min no eléctrodo de oxigénio.

Assumindo a produção de H_2O_2 como uma reacção de primeira ordem, foi possível determinar a actividade do glucose oxidase (em µM/min), a qual corresponde ao declive da recta ajustada aos pontos experimentais da representação gráfica da $[H_2O_2]$ (µM) vs. tempo (min). A actividade específica do enzima (em µmol/min/µL de GO) foi calculada tendo em conta os volumes do ensaio.

3.5.2. Ensaio de viabilidade celular – MTT

Recorreu-se a ensaios de viabilidade celular para definir a gama de concentrações sub-letais de H_2O_2 nas células endoteliais, considerando-se como as concentrações de H_2O_2 a partir das quais as células apresentavam uma viabilidade celular igual ou superior a 80%. Esta informação permitiu depois seleccionar a concentração de H_2O_2 pretendida para os ensaios de estado estacionário.

A viabilidade celular foi determinada utilizando o ensaio de MTT, o qual apenas na presença de células metabolicamente activas sofre redução por desidrogenases, produzindo cristais insolúveis de formazano, intensamente coloridos, no interior das células. Deste modo, por quantificação da redução metabólica do MTT detecta-se exclusivamente as células que se encontram viáveis.

De forma a estudar as concentrações sub-letais de H_2O_2 nas HUVEC, começou-se por aplicar um ensaio de estado estacionário a várias concentrações de H_2O_2 durante 3 h. Ao fim das 3 h, as concentrações de H_2O_2 foram aferidas por medição no eléctrodo de oxigénio. No caso das concentrações de H_2O_2 medidas serem as pretendidas para o estado estacionário, o meio celular foi removido e lavado por duas vezes com PBS.

O ensaio de viabilidade, adaptado de McGahon *et al.*, (1995), é iniciado, de seguida, com a adição de uma solução de MTT a 0,5 mg/mL em meio completo das HUVEC (EBM-2 suplementado), por um período de incubação de 2 h na estufa (em atmosfera húmida com 5% CO_2 e a 37°C). Ao fim das 2 h o meio foi removido e substituído por DMSO, com o objectivo de promover a solubilização dos cristais de formazano formados. Seguiu-se um período de incubação de 50 min à temperatura ambiente, com agitação. Por fim, leu-se a absorvência do produto da reacção a 570 nm, usando como referência 630 nm, num leitor de microplacas. A absorvência obtida é directamente proporcional ao número de células vivas.

4. Ensaio de estimulação com VEGF

Com o objectivo de estudar e comparar as proteínas oxidadas pelo VEGF, nos momentos iniciais, procedeu-se à estimulação das HUVEC pelo VEGF.

Na véspera do dia do ensaio cerca de $1,2 \times 10^6$ de HUVEC foram cultivadas em placas de 90 mm com revestimento de gelatina em meio de cultura completo. No mesmo dia, depois de as células terem aderido devidamente, o meio foi substituído por meio de cultura sem FBS, ficando a incubar durante a noite. No dia do ensaio, procedeu-se à substituição do meio por meio EBM-2 não complementado por um período de incubação de 3 horas e 30 minutos.

O ensaio consistiu na adição de VEGF a uma concentração final de 20 ng/mL e de heparina a 5 U/mL. As células foram incubadas por um período de 10 min na estufa a 37°C. Terminado o tempo de incubação o meio foi removido e procedeu-se à lavagem com PBS. De seguida, removeu-se o PBS e as células foram congeladas em azoto líquido, sendo conservadas a -80°C.

5. Extração e alquilação de proteínas com BODIPY-IAM

A manipulação de amostras cujo objectivo é caracterizar e quantificar os resíduos de cisteína oxidados tem de ser executada tendo em atenção alguns cuidados de modo a prevenir que ocorram

reações de oxidação ou troca de ligações persulfureto de proteínas durante o processamento das amostras, as quais poderiam mascarar os resultados. Para tal implementaram-se algumas medidas: 1) congelamento das células em azoto líquido findo os ensaios de estado estacionário de H_2O_2 e de estimulação com VEGF; 2) o processo de alquilação dos resíduos de cisteína reduzidos foi realizado em simultâneo com o processo de lise e extracção proteica; 3) remoção do oxigénio ao tampão de lise. O processo de lise e alquilação foi adaptado de Kim *et al.*, 2000.

O tampão de lise utilizado consistiu no tampão 50 mM MES-NaOH (ácido 2-morfolinoetanosulfónico) pH 6,5, 100 mM de NaCl, Triton X-100 a 1% (v/v), aprotinina (1 mg/mL), leupeptina (1 mg/mL), e 10 mM 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride hydrochloride. Porém, antes de se adicionar o Triton X-100 e os inibidores de proteases, ao tampão de lise foi removido o oxigénio ao gasear o tampão com azoto durante 1h. De seguida, adicionou-se os restantes componentes do tampão incluído o agente alquilante BODIPY FL C1-IA (simplificando, BODIPY-IAM) na concentração de 50 μ M (ver secção 4.1. Optimização do processo de alquilação com BODIPY-IAM) e colocou-se em gelo.

O processo de lise e alquilação iniciou-se com a adição de 1,5 mL de tampão de lise às células congeladas. Recorrendo a um raspador, as células foram raspadas e recolhidas para tubos *ependorf*. De seguida, procedeu-se à sonicação das células por 5 períodos de 2 min com intervalos de 30 s num banho sonicator. Sucedeu-se um período de incubação de 15 min à temperatura ambiente. De forma a terminar a reacção de alquilação ao fim dos 15 min de incubação adicionou-se β -mercaptoetanol para uma concentração final de 20 mM. As amostras foram centrifugadas a 10 000 g durante 12 min a 4°C, o *pellet* resultante foi desprezado e o sobrenadante foi colocado em gelo aguardando pela quantificação proteica.

De referir que foi necessário proteger as amostras da luz ao longo do processo devido à presença do fluoróforo BODIPY FL associado ao agente alquilante iodoacetamida (IAM).

5.1. Optimização do processo de alquilação com BODIPY-IAM

A concentração de BODIPY-IAM a utilizar no processo de alquilação foi avaliada ao testar-se 3 concentrações diferentes: 25, 50 e 100 μ M, concentrações utilizadas e recomendadas na literatura (Hill *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2000).

A precipitação de proteínas foi outro parâmetro a testar, pois é um processo com grandes vantagens para a electroforese bidimensional. O objectivo foi avaliar se a precipitação de proteínas com acetona interferia com a fluorescência do BODIPY-IAM.

Para o BODIPY-IAM, uma solução stock a 10 mM foi preparada em DMSO, sendo conservada a -20°C protegida da luz. Resumidamente, o teste consistiu em aplicar o processo de lise e extracção explicado anteriormente para as diferentes concentrações de BODIPY-IAM a testar. Aos extractos proteicos obtidos dividiu-se as amostras em volumes iguais e a uma das fracções procedeu-se à precipitação das proteínas por adição de acetona (ver secção 7.1. Preparação das amostras - Precipitação de proteínas). As amostras foram conservadas a -20°C durante a noite, e no dia seguinte foram preparadas para serem aplicadas numa electroforese SDS-PAGE em condições desnaturantes (Bjerrum, 1986). A todos os extractos foi adicionado tampão de *loading* (0,08 M Tris-HCl pH 6,8, SDS 1% (m/v), glicerol 5% (v/v); β -mercaptoetanol 5% (v/v)), procedendo-se de seguida à aplicação das amostras num gel de poliacrilamida (8% resolvente, 5% concentração) e à corrida deste. A imagem de fluorescência do gel foi adquirida no Typhoon 9210 (ver secção 6.4. Aquisição da imagem de fluorescência) e analisada no software ImageMaster™ 2D Platinum v5.0. Por fim, para se detectar as proteínas totais o gel foi corado com Azul de Coomassie (água 50%, metanol 40% (v/v), ácido acético glacial 10% (v/v), Coomassie G-250 2% (m/v)), sendo o excesso de corante retirado com uma solução descorante forte (metanol 50% (v/v); ácido acético 10% (v/v)).

6. Determinação da concentração proteica

A quantificação dos extractos proteicos foi realizada com base no método de Bradford, utilizando como referência a BSA.

Resumidamente, recorrendo a soluções de concentração conhecida de BSA (entre 0,1-1,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) foi possível efectuar uma curva de calibração. A uma placa de 96 poços adicionou-se, por poço, 5 μL de extracto proteico ou solução de BSA e 250 μL de reagente de Bradford, em triplicados, ficando a incubar durante 30 min com agitação. Como branco utilizou-se 5 μL de água destilada e 250 μL de reagente de Bradford. Findo o tempo de incubação, a absorvência foi medida a 595 nm num leitor de microplacas.

7. Electroforese bidimensional de proteínas em condições desnaturantes

A electroforese bidimensional de proteínas é um método bastante usado e reconhecido para o estudo do proteoma (Garfin, 2003). Este método consiste na separação das proteínas em dois passos com base em duas propriedades independentes. O primeiro passo – dimensão consiste na focagem isoeléctrica (IEF, do inglês *IsoElectric Focusing*), na qual as proteínas são separadas em função do seu ponto isoeléctrico (pI). No segundo passo - dimensão as proteínas são separadas de acordo com o seu peso molecular (Mr) através de uma electroforese SDS-PAGE. Tanto Deste modo, no gel resultante obtém-se uma distribuição do proteoma, correspondendo idealmente cada ponto proteico (*spot*) a uma única espécie proteica.

7.1. Preparação das amostras – Precipitação de proteínas

A preparação das proteínas para aplicação em electroforese bidimensional é um passo essencial para assegurar bons resultados. O objectivo é que no final deste processo as proteínas se encontrem completamente solubilizadas, desagregadas, desnaturadas e reduzidas.

A precipitação de proteínas é uma técnica bastante utilizada para concentrar proteínas e remover substâncias indesejadas que possam interferir com a electroforese bidimensional, como o caso de sais e ácidos nucleicos. Neste projecto utilizou-se a acetona como agente precipitante.

Depois de quantificados os extractos proteicos, procedeu-se à precipitação de aproximadamente 500 µg de proteínas por amostra com a adição de acetona, numa proporção de 4 partes acetona 1 parte amostra. Após precipitação durante a noite (ou por um período máximo de 48 h) a -20°C, as amostras foram centrifugadas a 12 000 rpm durante 12 min a 4°C, o sobrenadante resultante foi desprezado e o *pellet* seco à temperatura ambiente.

O *pellet* foi solubilizado com uma solução de re-hidratação (8 M Ureia, 2% (m/v) CHAPS, 1% (v/v) IPG *buffer*, 1% (m/v) DTT) apropriada para a prática da primeira dimensão. A solubilização das amostras foi alcançada por agitação a 500 rpm durante um período mínimo de 2 horas. Por fim, as amostras foram centrifugadas a 10 000 rpm durante 5 min à temperatura ambiente.

É de realçar que o uso do fluoróforo BOBIPY-FL impediu a utilização de azul de bromofenol, o qual é geralmente utilizado para acompanhar as corridas da 1ª e 2ª dimensão. Tal deveu-se à possibilidade de ocorrer *quenching*.

7.2. 1ª Dimensão – Focagem isoelectrica

A focagem isoelectrica tem como ponto fundamental o estabelecimento de um gradiente de pH, o qual é proporcionado por géis de poliacrilamida que contêm um gradiente de pH imobilizado (*Immobiline DryStrip gels*), neste caso utilizaram-se fitas com um intervalo de pH de 3 a 11, não linear, de 13 cm. Na presença do gradiente de pH e sobre a influência de um campo eléctrico as proteínas migram para a posição em que a sua carga global é zero.

O *loading* da amostra nas fitas foi realizado pelo método da re-hidratação, o qual tem várias vantagens, sendo uma delas permitir o *loading* de grandes quantidades de proteína. O sobrenadante, resultante da centrifugação das amostras, foi uniformemente aplicado nos sarcófagos, e de seguida, colocaram-se as fitas sobre a amostra, com o cuidado de evitar bolhas (ver figura II.1). De forma a impedir a desidratação das fitas e a otimizar o processo da focagem adicionou-se uma solução de óleos minerais purificados (PlusOne Dry Strip Cover Fluid).



Figura II.1 – Exemplificação da aplicação da amostra e da fita no sarcófago próprio para a focagem isoelectrica. a) Aplicação da amostra no sarcófago; b) e c) Posicionamento da fita, com a face do gel voltada para baixo, sobre a amostra. (adaptado de *2-D Electrophoresis. Principles and Methods.*, 2004)

Os sarcófagos foram posicionados equidistantemente no sistema de focagem isoelectrica. O programa da focagem isoelectrica consistiu nas seguintes etapas:

- 1) 12 h, 30 V;
- 2) 4 h, 500 V;
- 3) Grad 1 h, até 1000 V;
- 4) Grad 2 h 30 min, até 1000 V;

5) 8000 V, até 4400 V/h.

No final, retiraram-se as fitas dos sarcófagos e caso a 2ª dimensão não ocorresse de imediato foram conservadas a -20°C.

7.3. 2ª Dimensão – Electroforese SDS-PAGE

Após a focagem isoeléctrica é necessário equilibrar as fitas, tendo como objectivo preservar as proteínas desnaturadas e desagregadas. Este processo consiste em dois passos que utilizam uma solução mãe de equilíbrio (6 M Ureia, 75 mM Tris-HCl pH 8,8, 30% (v/v) glicerol, 2% (v/v) SDS). O primeiro passo consistiu na adição da solução mãe complementada com DTT a 1% (m/v) às fitas, seguido de um período de incubação de 15 min, com agitação, à temperatura ambiente. A solução foi descartada, e adicionou-se a solução mãe complementada com iodoacetamida 2,5% (m/v), repetindo-se a incubação com as condições anteriores.

De seguida, aplicaram-se as fitas nos géis de poliacrilamida SDS-PAGE de 12% (v/v) [acrilamida:bisacrilamida; 37,5:1% (m/m)] e com 1,0 mm de espessura. A aplicação de marcadores de peso molecular fluorescentes num dos cantos do gel facilitou o acompanhamento da corrida e a análise posterior dos géis. De modo a melhorar o contacto entre a fita e o gel cobriu-se com uma solução de agarose 0,5% (m/v) (em água destilada e tampão de corrida), previamente aquecida. O tampão de corrida utilizado foi o Tris-Gly pH=9,8 (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0,1% SDS). A segunda dimensão foi realizada num sistema vertical, utilizando uma fonte com uma corrente definida de 25 mA por gel e tendo a voltagem como factor não limitante. A temperatura da corrida foi controlada ao utilizar-se um sistema de refrigeração a 10°C.

7.4. Aquisição da imagem de fluorescência

Devido à utilização de BODIPY-IAM foi importante ter em atenção que a corrida da 2ª dimensão fosse completa, de forma a garantir que o BODIPY-IAM livre, que não tivesse sido eliminado no processo de precipitação, não interferisse na imagem de fluorescência.

Terminada a 2ª dimensão, a imagem de fluorescência dos géis foi adquirida num Typhoon 9210, utilizando 532 nm como comprimento de excitação e o filtro de emissão 526 SP. A aquisição da imagem teve como parâmetros: 600-700 PMT e 50 µM pixel.

7.5. Coloração com nitrato de prata

O proteoma total foi depois detectado recorrendo à coloração com nitrato de prata, uma coloração mais sensível que a realizada com Azul de Comassie.

O primeiro passo consistiu na fixação das proteínas, ao incubar o gel com uma solução de 45% metanol e 5% de ácido acético, durante um período mínimo de 30 min, à temperatura ambiente. De seguida, o gel foi incubado durante 30 minutos com agitação numa solução de metanol 30%. Após o tempo de incubação procedeu-se à lavagem do gel duas vezes em água bidestilada durante 30 min com agitação. Seguiu-se a incubação com uma solução de sensibilização de tiosulfato de sódio 0,02% (m/v), em água MiliQ, durante 1-3 min com agitação. Fizeram-se duas lavagens rápidas de cerca 1 min em água bidestilada, e adicionou-se a solução de coloração de nitrato de prata 0,1% (m/v), em água MiliQ, a 4°C. Seguiu-se um período de incubação de 30 min com agitação realizado a 4°C. Efectuaram-se novamente duas lavagens rápidas com água bidestilada, após as quais o gel foi incubado na solução de revelação (carbonato de sódio 2% (m/v), formaldeído 0,04% (v/v) em água MiliQ). A revelação foi parada após o aparecimento do sinal ao remover a solução de revelação e ao adicionar uma solução *stop* de 5% ácido acético glacial em água MiliQ. A solução de ácido acético foi substituída por 2 vezes por uma nova ao fim de períodos de 10 min, sendo a última incubação de 1 h. Por fim, os géis foram lavados e conservados em água bidestilada a 4°C.

Os géis foram digitalizados no ImageScanner, utilizando o filtro azul e com uma resolução de 600 dpi. As imagens adquiridas consistem no padrão de proteínas totais.

7.6. Análise dos géis bidimensionais com o software ImageMaster

As imagens de fluorescência e as imagens do padrão das proteínas totais foram analisadas utilizando um software de análise de imagens de géis 2D o ImageMaster™ 2D Platinum v5.0. Os géis obtidos dividem-se em dois grupos: grupo controlo e grupo experimental correspondente a amostras provenientes do estado estacionário de H₂O₂ ou da estimulação pelo VEGF (simplificando: grupo experimental). É de relembrar que para o mesmo gel existem duas imagens, a da fluorescência e a do padrão de proteínas totais, e conseqüentemente existem dois tipos de variações possíveis de observar, a da fluorescência (que corresponde à oxidação das proteínas) e a da variação da quantidade de proteína total, respectivamente.

O processo de análise tem uma sequência de vários passos. Considerando uma experiência, é necessário:

- 1) Tratar as imagens obtidas, o que implica a detecção automática de todos os *spots* de proteínas (*spots*), sendo essencial posteriormente proceder à edição e correcção manual dos *spots* identificados.
- 2) Fazer a correspondência dos *spots* idênticos, ou seja, a mesma espécie proteica, entre o grupo controlo e o grupo experimental dentro do mesmo tipo de imagem.
- 3) Identificar as variações de fluorescência entre os *spots* do grupo controlo e do grupo experimental, ou seja, as variações de oxidação dos grupos tióis entre as mesmas espécies proteicas.
- 4) Fazer a correspondência dos *spots* que apresentam variação de oxidação nas imagens de fluorescência com os *spots* das imagens do padrão das proteínas totais, para o mesmo gel. Pois existe uma grande diferença entre o padrão observado nas imagens de fluorescência face às imagens do padrão das proteínas totais.
- 5) Avaliar se existe variação na expressão de proteínas nas imagens do padrão das proteínas totais, por comparação entre o controlo e o experimental.
- 6) Comparar as variações observadas dentro de uma experiência com as restantes experiências independentes (n=3).

Analisando em pormenor os passos, é de referir que no passo 1) o volume individual de cada *spot* foi normalizado pelo volume total dos *spots* para cada imagem. 2) O processo de *correspondência* é automático, sendo apenas necessário anteriormente atribuir algumas correspondências manualmente para facilitar o processo. No passo 3) a análise da variação da fluorescência consistiu na comparação do volume normalizado do mesmo *spot* entre as imagens de fluorescência de géis de grupos diferentes dentro da mesma experiência. É de notar que a o aumento da oxidação numa proteína provoca a diminuição da fluorescência dessa proteína/*spot*, consequentemente apresentando um volume menor. Considerou-se que houve variação na fluorescência quando a variação foi igual ou superior a 35%. O passo 4) é efectuado manualmente pois o processo de correspondência automático não apresenta resultados satisfatórios, devido à grande diferença nos

padrões de proteínas entre a fluorescência e as proteínas totais. O processo de análise do passo 5) é semelhante ao passo 3), com a devida diferença ao tipo de imagens tratadas. É de referir, que tanto para o passo 5) como para o passo 3) apenas se analisaram as proteínas apresentavam correspondência em ambos géis. Considerou-se que existiu variação na quantidade de uma dada proteína quando a variação foi igual ou superior a 35%. Relativamente ao passo 6), os géis que apresentavam uma má resolução ou anomalias no processo de separação foram descartados.

8. Identificação de proteínas por MS/MS pela técnica de *Peptide Mass Fingerprint*

8.1. Digestão *in gel* das proteínas

As proteínas em que se observou variação na oxidação ou na sua expressão foram aquelas que se pretenderam identificar por espectrometria de massa recorrendo a uma estratégia de *bottom-up*. Esta é uma estratégia comum em proteómica, pois permite identificar e caracterizar proteínas que sofreram digestão proteolítica previamente à análise por espectrometria de massa.

O primeiro passo consistiu em extrair/picar do gel as proteínas de interesse, utilizando-se uma ponta de 1 mL cortada. A partir do momento da extracção das proteínas a manipulação destas passou a ser efectuada com extremo cuidado, sendo os passos seguintes efectuados numa câmara em condições controladas de forma a evitar contaminações.

Após a extracção, as proteínas foram lavadas com água MiliQ durante 15 min com agitação. De seguida, foram incubadas com acetonitrilo (ACN) a 50% durante outro período de 15 min com agitação. O processo anterior foi repetido com ACN a 100%, tendo como objectivo a desidratação das porções de gel. Findo o período de incubação, removeu-se o ACN e caso não se pretendesse continuar com o processo as amostras foram congeladas a -20°C.

O passo seguinte consistiu na digestão *in gel* das proteínas por re-hidratação com tampão de digestão (50 mM NH_4HCO_3 e tripsina a 6,7 ng/ μL), seguido de incubação em gelo durante 30 a 45 min. O excesso de tampão que não foi re-absorvido foi removido e substituído por uma solução de 50 mM NH_4HCO_3 . A digestão ocorreu durante a noite a 37°C. Por fim, os sobrenadantes contendo as proteínas digeridas foram conservados a -20°C.

8.2. Aplicação das proteínas digeridas na placa de MALDI

O primeiro passo consiste em concentrar e purificar a amostra, de modo a remover sais e outros possíveis contaminantes. Para tal, recorreu-se a colunas de cromatografia de fase reversa do tipo C8. A preparação destas foi realizada manualmente, consistindo na activação da resina com ACN a 50%, seguida de equilíbrio e conservação da coluna com uma solução de ácido trifluoracético (TFA) a 0,1%, podendo ser conservadas a 4°C.

O passo seguinte consistiu na aplicação da amostra de péptidos na coluna. Efectuou-se uma lavagem com TFA a 0,1%, e por fim, os péptidos foram eluídos directamente para a placa de MALDI com a solução de matriz (10 µg/µL de CHCA em 50% ACN com 0,1% TFA).

8.3. Aquisição de espectros de massa

As proteínas digeridas foram analisadas por tandem MS utilizando um MALDI-TOF-TOF 4800 Plus, sendo efectuadas pelo Dr. Ricardo Gomes do ITQB. Para esta análise utilizou-se CID (do inglês, *Collision Induced Dissociation*) com 1 kV de energia de colisão e 1×10^6 torr de pressão de ar. Para cada espectro de MS/MS recolheram-se 2000 *laser shots*, utilizando uma intensidade de laser fixa a 4000 V. Os *softwares* utilizados nesta análise foram o 4000 Series Explorer v3.0 RC1 e o Data Explorer 4.5.

8.4. Identificação de proteínas por Peptide Mass Fingerprint

A identificação das proteínas analisadas foi efectuada recorrendo à técnica de *Peptide Mass Fingerprint* (PMF). Esta técnica tem como premissa que cada proteína é constituída por uma série única de péptidos e que portanto tem um conjunto único de massas de péptidos. A identificação é conseguida por comparação das massas obtidas para os péptidos com as massas teóricas previstas por bases de dados. Nesta análise utilizaram-se bases de dados como a MSDB¹ (base de dados de sequências proteicas não idênticas) e a UniProtKB/SwissProt² (base de dados de sequências não redundantes de proteínas). Considerou-se um erro máximo de 5 ppm.

¹ <http://csc-fserve.hh.med.ic.ac.uk/msdb.html>

² <http://www.uniprot.org>

9. *Análise estatística*

Os resultados apresentados correspondem à média \pm desvio padrão de n experiências independentes. A comparação de resultados entre dois grupos distintos foi realizada através do teste t –Student, valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Capítulo IV - Resultados

1. Caracterização do consumo celular de H_2O_2 das linhas HUVEC e HMEC-1

De forma a determinar se a origem das células endoteliais ou as suas condições de cultura influenciam a capacidade de degradação de H_2O_2 , determinou-se a velocidade de consumo celular de H_2O_2 das linhas HUVEC (linha de células primárias) e HMEC-1 (linha celular imortalizada). A constante de velocidade de consumo celular de H_2O_2 foi determinada através de medições ao longo do tempo da concentração de H_2O_2 após a adição de 100 μM H_2O_2 , recorrendo a um eléctrodo de oxigénio, segundo o método descrito por Antunes & Cadenas, (2000).

1.1. Linha HMEC-1

Para as HMEC-1 o consumo de H_2O_2 foi determinado em células cultivadas na ausência de revestimento, como recomendado para esta linha, e na presença de revestimento de gelatina (0,2% (m/v)), utilizada na cultura de HUVEC. A gelatina utilizada consiste numa mistura de proteínas solúveis de elevadas massas moleculares presentes no colagénio.

A constante de velocidade de consumo de H_2O_2 determinada em células HMEC-1 foi de 0,0591 \pm 0,0186 min^{-1} , na ausência de revestimento, e de 0,0188 \pm 0,0006 min^{-1} , na presença de revestimento de gelatina (ver figura IV.1 e quadro IV.1). Os valores apresentados correspondem à média e ao respectivo desvio padrão para 3 experiências independentes.

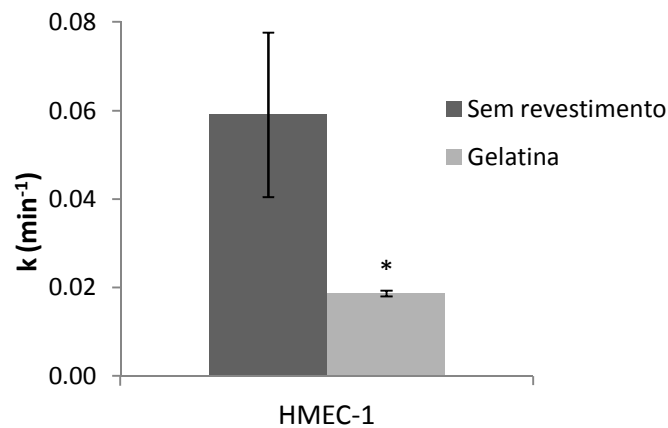


Figura IV.1 – Representação das constantes de velocidade de consumo de H₂O₂ em HMEC-1. A figura corresponde à representação gráfica das constantes de velocidade de consumo celular de H₂O₂ determinadas em HMEC-1 intactas na ausência ou presença de um revestimento de gelatina. Estes resultados são representativos de três experiências independentes (n = 3), respectiva média e desvio padrão. Análise estatística efectuada a partir do *t*-test: * $p < 0,05$ ($p = 0,0182$ versus Revestimento de gelatina).

1.2. Linha HUVEC

1.2.1. Microscopia de imunofluorescência

Procedeu-se à caracterização das HUVEC por ensaios de imunofluorescência de modo a confirmar o correcto isolamento desta linha celular. Para este ensaio escolheram-se dois marcadores de EC, a VE-caderina (VE-CAD) e o CD31, também conhecido por PECAM-1. Para excluir uma possível contaminação por células do músculo liso, utilizou-se uma proteína exclusiva para este tecido, a SMA (do inglês, *Smooth Muscle Actin*), servindo deste modo de controlo negativo.

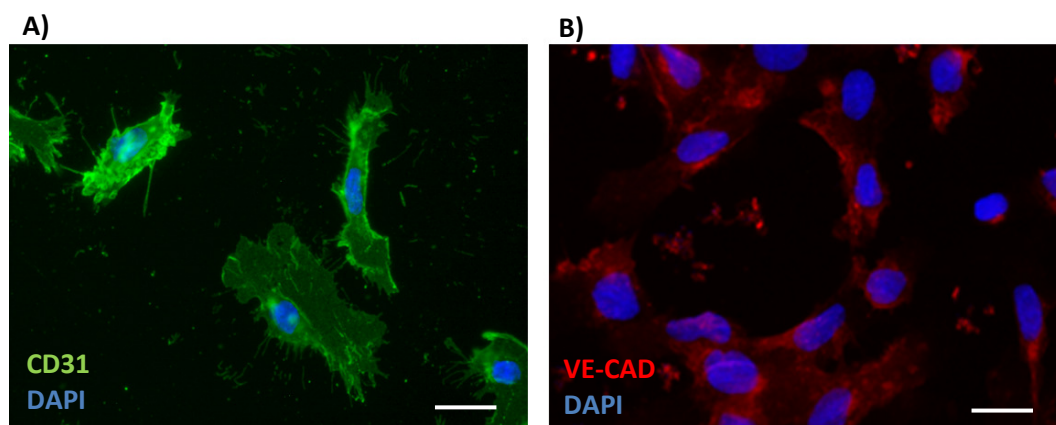


Figura IV.2 – Análise por microscopia de fluorescência da VE-caderina e do CD31 em HUVEC. Imagens sobrepostas de DAPI e: A) Anti-CD31; B) Anti-VE-CAD.

Nas imagens de fluorescência, tanto para o anti-VE-caderina como para o anti-CD31, observa-se que todas as células são positivas, o que indica que o isolamento foi bem conseguido. O ensaio realizado com o anti-SMA não revelou a presença de células positivas, excluindo a hipótese de uma contaminação por células do músculo liso. Com estes resultados confirmou-se o correcto isolamento das HUVEC.

1.2.2. Constante de velocidade de consumo de H_2O_2 das HUVEC

No caso das células HUVEC foi comparada a constante de velocidade de consumo de H_2O_2 de células cultivadas em gelatina (0,2% (m/v)), revestimento recomendado para estas células, e em colagénio tipo I (0,15% (m/v)). Ao contrário das HMEC-1 não se determinou a constante de consumo na ausência de revestimento pois tal procedimento não permite o cultivo desta linha celular em boas condições de sobrevivência (Smeets *et al.*, 1992).

A constante de velocidade de consumo de H_2O_2 determinada em células HUVEC foi de $0,0280 \pm 0,0034 \text{ min}^{-1}$, na presença de revestimento de gelatina, e de $0,0259 \pm 0,0048 \text{ min}^{-1}$, na presença de revestimento de colagénio do tipo I (ver figura IV.3 e quadro IV.1). Os valores apresentados correspondem à média e ao respectivo desvio padrão para 3 experiências independentes.

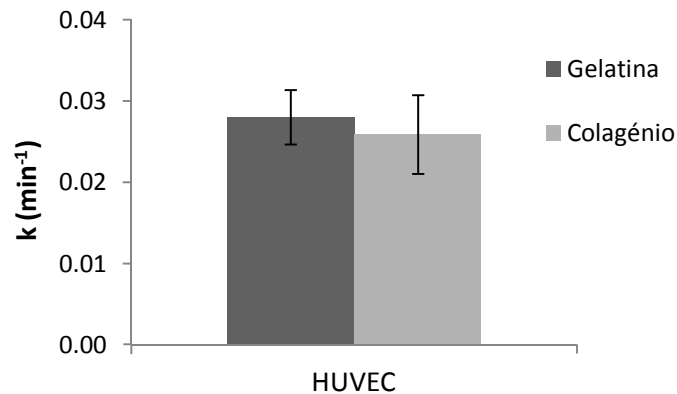


Figura IV.3 – Representação das constantes de velocidade de consumo de H₂O₂ em HUVEC. A figura corresponde à representação gráfica das constantes de velocidade de consumo celular de H₂O₂ determinadas em HUVEC intactas na presença de um revestimento de gelatina ou de colagénio. Estes resultados são representativos de três experiências independentes (n = 3), respectiva média e desvio padrão.

Quadro IV.1 – Constantes de velocidade de consumo de H₂O₂ para as linhas HUVEC e HMEC-1. No quadro encontram-se sumarizadas as constantes de velocidade de consumo de H₂O₂ determinadas para as diferentes linhas celulares, HUVEC e HMEC-1, quando cultivadas em diferentes tipos de revestimento, sem, com gelatina, e com colagénio do tipo I. Estes resultados são representativos de três experiências independentes (n = 3), respectiva média e desvio padrão. Análise estatística efectuada a partir do *t*-test: * *p* < 0,05 [(*¹ *p* = 0,0214 versus HUVEC) (*² *p* = 0,0182 versus Revestimento de gelatina)].

Constante de velocidade de consumo de H ₂ O ₂ , k (min ⁻¹)			
	Sem revestimento	Revestimento de gelatina	Revestimento de colagénio
HUVEC	-	0,0280 ± 0,0034	0,0259 ± 0,0048
HMEC-1	0,0591 ± 0,0186* ²	0,0188 ± 0,0006* ¹	-

2. Optimização do ensaio de titulação do H₂O₂ em estado estacionário

Tendo o objectivo de estudar o efeito do H₂O₂ em concentração fisiológicas nas células endoteliais, optou-se pela utilização do método de titulação do H₂O₂ em estado estacionário, o qual permite a manutenção da concentração de H₂O₂ constante ao longo do tempo. Este método exigiu a calibração de vários parâmetros que serão descritos nas secções seguintes.

2.1. Determinação da constante de velocidade do consumo de H_2O_2 para diferentes tipos de meio

Um dos passos de optimização consistiu no estudo do consumo de H_2O_2 por diferentes tipos de meio, tendo o objectivo de seleccionar o meio ideal para realização dos ensaios de estado estacionário de H_2O_2 . Neste caso, pretende-se um meio que apresente um consumo mínimo de H_2O_2 de modo a que não interferira com o método. Como se pode ver no quadro IV.2, os diferentes meios apresentam consumos bastante distintos. O meio celular das HUVEC, EBM-2, apresenta uma elevada constante de velocidade do consumo de H_2O_2 e por esse motivo não pode ser utilizado durante os ensaios de estado estacionário. Como o RPMI é o meio que apresenta menor consumo de H_2O_2 foi o meio seleccionado para os ensaios de estado estacionário.

Quadro IV.2 – Constantes de velocidade de consumo de H_2O_2 para os diferentes tipos de meio. Os meios testados foram o EBM-2 complementado (EBM-2 + 5% FBS), EBM-2, MCDB-131; RPMI e DMEM.

Meio	Constante de velocidade de consumo de H_2O_2, k (min⁻¹)
EBM-2 + 5% FBS	0,151
EBM-2	0,200
MCDB-131	0,185
RPMI	0,002
DMEM	0,789

2.2. Actividade do enzima glucose oxidase

No ensaio de titulação de H_2O_2 em estado estacionário o enzima glucose oxidase tem como função repor o H_2O_2 no meio a uma velocidade idêntica à que o H_2O_2 é consumido pelos enzimas intracelulares. Um dos passos de optimização para este ensaio consistiu na

determinação da actividade do glucose oxidase, o que possibilitou calcular uma estimativa da quantidade de glucose oxidase (GO) a utilizar de forma a manter a concentração do H_2O_2 constante ao longo do ensaio.

Assumindo que a produção de H_2O_2 por este enzima é uma reacção de primeira ordem, determinou-se que a actividade específica do glucose oxidase é de $1,95 \times 10^{-4} \mu\text{mol}/\text{min}/\mu\text{L}$ de GO.

Deste modo, de acordo com a equação 4, conhecendo a actividade específica do glucose oxidase (Act.GO em $\mu\text{mol}/\text{min}/\mu\text{L}$ de GO), a constante de velocidade de consumo de H_2O_2 pelas células (k em min^{-1}) (ver Capítulo IV - 1.2.2. Constante de velocidade de consumo das HUVEC) e a concentração de H_2O_2 pretendida para o estado estacionário ($[H_2O_2]_{ss}$ em μM) foi possível determinar o volume de glucose oxidase (em μL) apropriado para a manutenção do estado estacionário.

$$Vol.GO = \frac{k \times [H_2O_2]_{ss} \times Vol.ensaio}{Act.GO} \quad (\text{equação 4})$$

É de referir que na realização dos ensaios de estado estacionário, a quantidade de GO a adicionar foi sempre testada através de um ensaio prévio de forma a ajustar a quantidade ideal de GO, uma vez que o consumo de H_2O_2 pelas células varia ligeiramente.

2.3. Determinação da viabilidade celular ao H_2O_2

Um dos passos fundamentais na optimização do ensaio de estado estacionário de H_2O_2 consiste em definir a gama de concentrações de H_2O_2 que são consideradas sub-letais nas HUVEC. Para tal, testou-se a sobrevivência celular com MTT depois de expor as células a um ensaio de estado estacionário de 3 horas para diferentes concentrações de H_2O_2 . A escolha das concentrações de H_2O_2 a testar teve por base o conhecimento das concentrações sub-letais determinadas para outros tipos de linhas celulares seguindo o mesmo método (Carvalho, 2010; Oliveira-Marques, Marinho, Cyrne, & Fernando Antunes, 2009). Apurou-se assim que para o intervalo de 8-14 μM de H_2O_2 a sobrevivência das HUVEC é de $77,8\% \pm 4,6\%$, e que para o intervalo de 18-21 μM de H_2O_2 é de $64,9\% \pm 13,3\%$, relativamente ao controlo (ver figura IV.4).

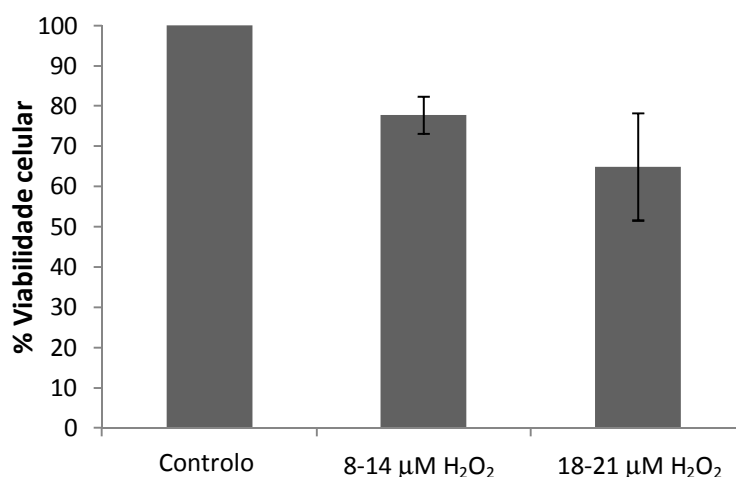


Figura IV.4 – Representação da viabilidade celular das HUVEC após exposição a um estado estacionário de H₂O₂ de 3 horas. A viabilidade das HUVEC foi inferida por ensaio de MTT, após as HUVEC terem sido submetidas a um estado de estacionário de 3 horas para diferentes concentrações de H₂O₂. Estes resultados são representativos de três experiências independentes (n = 3), respectiva média e desvio padrão.

Considerando uma sobrevivência de aproximadamente 80% das células, e tendo em conta as limitações técnicas relativamente à sensibilidade do eléctrodo de oxigénio e ao facto de serem usados tempos de exposição ao H₂O₂ mais curtos (15min), o intervalo de 8-14 µM de H₂O₂ foi o intervalo de valores usados e considerados sub-letais para as HUVEC.

3. Detecção e identificação de proteínas que contêm cisteínas sensíveis ao H₂O₂

De modo a detectar e identificar proteínas sensíveis a modificações pós-traducionais por oxidação procedeu-se à análise de extractos proteicos totais das HUVEC em duas condições: 1) exposição ao H₂O₂ em estado estacionário para concentrações sub-letais durante 15 minutos; 2) incubação com VEGF durante 10 minutos. O tempo relativamente curto dos ensaios teve como objectivo a detecção dos eventos iniciais sinalizadores do H₂O₂ e do VEGF.

A avaliação do proteoma das cisteínas sensíveis à oxidação foi efectuada por marcação das proteínas com um agente alquilante de grupos sulfidrilo, a iodoacetamida, associado ao fluoróforo BODIPY FL (simplificando, BODIPY-IAM). As amostras previamente marcadas foram analisadas por electroforese bidimensional. A electroforese bidimensional é uma das técnicas mais utilizadas no estudo do proteoma devido ao seu elevado poder de resolução. Centenas

de proteínas são resolvidas num único gel 2-D PAGE, onde idealmente cada ponto proteico (*spot*) corresponde a uma proteína única. Esta técnica é particularmente útil para analisar a expressão diferencial de proteínas entre grupos com diferentes tratamentos.

Para a realização da 1ª dimensão dos géis 2-D (focagem isoeléctrica) utilizaram-se fitas com um gradiente de pH 3-11 não linear, de 13 cm. Este intervalo de pH permitiu realizar uma análise do proteoma global das proteínas, pois abrange praticamente toda a gama do pH. O facto de o gradiente não ser linear deve-se ao facto de a maioria das proteínas apresentarem pontos isoeléctricos próximos da neutralidade. Deste modo, para evitar o empacotamento e consequente má resolução destas proteínas, as fitas utilizadas apresentam um gradiente de pH mais largo para estes valores de pH.

3.1. Optimização do processo de marcação com BODIPY-IAM

Na avaliação do proteoma sensível à oxidação vários factores têm que ser analisados e ponderados. Uma das principais preocupações na manipulação de amostras cujo objectivo é caracterizar e quantificar os resíduos de cisteína oxidados é que ocorram reacções de oxidação de proteínas durante o processamento das amostras, as quais poderiam mascarar os resultados. Como já referido no Capítulo III - Materiais e métodos, implementou-se algumas medidas para impedir esta situação, sendo a mais importante a realização da marcação das proteínas com BODIPY-IAM durante a lise proteica. O procedimento foi desenvolvido tendo por base os seguintes artigos: Kim *et. al* (2000) e Hill *et al.* (2009).

A escolha do uso de um fluoróforo associado ao agente alquilante iodoacetamida, ao invés da tradicional biotina, tem como grande vantagem não ser necessário recorrer a um Western blot para obter a imagem do proteoma de cisteínas reactivas. Neste caso basta utilizar as propriedades de excitação/emissão do fluoróforo para obter essa imagem. Outra vantagem está relacionada com o elevado nível de sensibilidade que as técnicas de fluorescência actualmente oferecem, sendo possível detectar proteínas menos abundantes.

Um factor que foi necessário estudar foi o pH a utilizar no tampão de lise e marcação. O agente alquilante BODIPY-IAM tem uma maior reactividade para o anião tiolato (Cys-S⁻) do que para a forma protonada (Cys-SH), e nenhuma para as formas oxidadas (Cys-SOH, Cys-SS-Cys, entre outras) (ver figura IV.5). Como já referido na introdução, as cisteínas reactivas ao H₂O₂ são aquelas que apresentam um valor de pK_a baixo quando comparadas à maioria das cisteínas

($pK_a = 8$), por esse motivo a pH de 6,5 o BODIPY-IAM vai reagir preferencialmente com as cisteínas reactivas. Desta forma a utilização de um pH baixo permite aferir preferencialmente quanto às cisteínas reactivas e evitar o problema de haver excesso de marcação caso todas as cisteínas não oxidadas do proteoma fossem marcadas, o que poderia mascarar eventuais variações na oxidação como visto por Kim *et al.*, (2000).

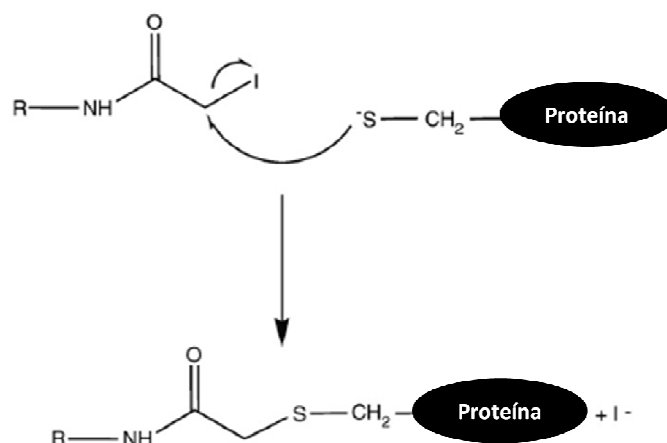


Figura IV.5 – Reacção entre o BODIPY-IAM e o anião tiolato de um resíduo de cisteína. O anião tiolato reage com a iodoacetamida numa reacção do tipo S_N2 . A reacção dá origem a uma ligação tioéster, a qual é irreversível. Na estrutura, R corresponde ao fluoróforo BODIPY FL. (adaptado de Hill *et al.*, 2009)

Um dos passos de optimização consistiu em determinar se a precipitação de proteínas por acetona interferiria com a fluorescência do BODIPY-IAM. A precipitação de proteínas é um dos passos mais utilizados na preparação das amostras a aplicar nos géis 2-D, pois permite eliminar contaminantes presentes no tampão de lise que interferem com o método de separação. Tal foi inferido pela realização de um gel 1-D em que se testaram amostras precipitadas e não precipitadas. Adicionalmente, testou-se várias concentrações de BODIPY-IAM (25, 50 e 100 μM) de modo a seleccionar a concentração ideal para o processo de marcação de proteínas.

A partir da análise do gel obtido concluiu-se que a acetona não interfere na fluorescência do BODIPY-IAM, não se tendo observado diferenças significativas entre a fracção precipitada e a não precipitada. Observou-se também que a precipitação com acetona tem a vantagem de eliminar o reagente BODIPY-IAM livre que não foi incorporado nas amostras e que impede a visualização das proteínas (ver figura IV.6). A concentração de BODIPY-IAM mais adequada para o processo de marcação dos extractos proteicos totais das HUVEC foi a de 50 μM , uma

vez que marca mais eficientemente as proteínas do que a concentração de 25 μM e não parece ter vantagem relativamente aos 100 μM .

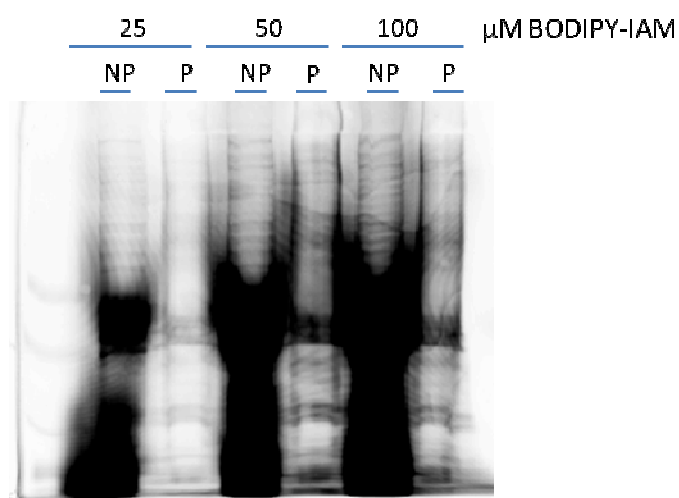


Figura IV.6 – Imagem de fluorescência obtida para o gel 1-D SDS-PAGE, para diferentes concentrações de BODIPY-IAM e diferente processamento das amostras. O gel representado corresponde a um extracto proteico total de HUVEC previamente marcado com BODIPY-IAM para três concentrações diferentes: 25, 50 e 100 μM . Por cada dois poços encontra-se a marcação de BODIPY-IAM à mesma concentração, sendo a diferença na preparação da amostra com precipitação ou não de proteínas com acetona. Legenda: NP – amostra não precipitada; P – amostra precipitada com acetona.

3.2. Análise dos géis 2-D - H_2O_2

A análise dos géis obtidos permitiu inferir quanto a dois tipos distintos de resultados: variação na oxidação das proteínas e variação na expressão das proteínas. Assim, para o mesmo gel existem duas imagens, a da fluorescência, correspondente à oxidação, e a do padrão de proteínas totais que corresponde à coloração por nitrato de prata.

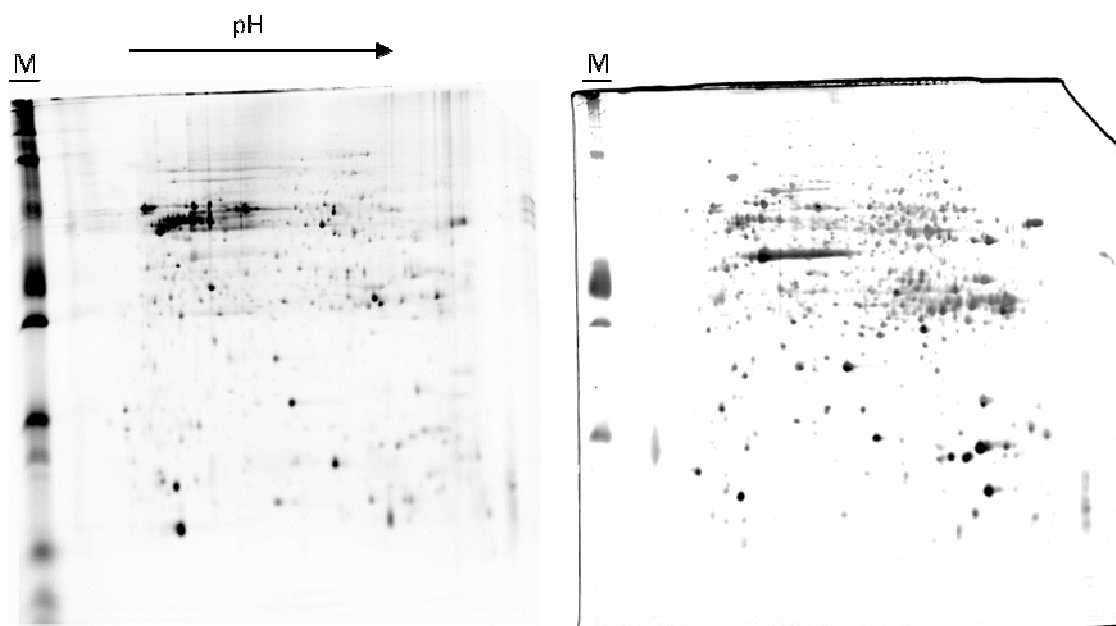


Figura IV.7 – Imagens representativas dos dois tipos de imagem obtida para um gel 2-D PAGE do extracto proteico total das HUVEC. As imagens apresentadas correspondem a um único gel, obtido para o extracto proteico total das HUVEC (500 µg proteína). A) Imagem resultante da excitação do fluoróforo BODIPY-IAM, representativa do padrão do proteoma de cisteínas reactivas; B) Imagem resultante da coloração com nitrato de prata, representativa do proteoma de proteínas totais. Primeira dimensão: IEF fita com pH 3-11 não linear, de 13 cm. Segunda dimensão: SDS-PAGE. Legenda: M – marcadores de massa moleculares fluorescentes; Seta – representação do sentido crescente do gradiente de pH.

Comparando os dois tipos de imagem obtidos para o mesmo gel, ou seja, mesma amostra, observa-se que estas apresentam um padrão de proteínas bastante distinto (ver figura IV.7). Tal diferença deve-se ao facto de as imagens de fluorescência corresponderem apenas ao proteoma representativo das cisteínas reactivas, logo proteínas que não possuam cisteínas (cerca de 11% das proteínas totais, (Tyagarajan *et al.*, 2003)) ou cujas cisteínas não são reactivas no pH usado não se encontram representadas nestas imagens. Também é preciso ter em consideração que o volume dos pontos proteicos observado para cada proteína com este tipo de marcação não é proporcional à quantidade de proteína, pois é influenciado pelo número de resíduos de cisteínas reactivas presentes nas proteínas. Deste modo, proteínas com mais do que um resíduo de cisteína reactivo encontram-se mais representadas, enquanto proteínas que apresentam cisteínas não reactivas têm uma marcação reduzida e portanto encontram-se menos representadas.

3.2.1. Normalização das proteínas pelo volume total

No tratamento de dados utilizou-se o volume total das proteínas, por gel, para normalizar os valores de cada *spot* (ponto proteico) individual. A normalização para cada proteína foi determinada segundo a equação 5, onde %Vol é o volume relativo da proteína (usado para quantificar e comparar entre géis), Vol_s é o volume do ponto proteico num gel contendo n pontos proteicos. A normalização dos dados consiste numa calibração interna que torna os dados independentes de variações experimentais entre géis, causadas por diferenças na quantidade total de proteína carregada nos géis ou na extensão da coloração. Para confirmar que esta normalização era válida, comparou-se o volume total dos *spots*, por gel, entre o grupo controlo e o grupo sujeito ao estado estacionário de H₂O₂ (simplificando: grupo experimental), dentro do mesmo tipo de imagem (ver figura IV.8). Analisando os gráficos representados na figura IV.8 conclui-se que não existe variação significativa no volume total dos *spots* entre grupo controlo e experimental, e portanto assume-se que a normalização efectuada é válida.

$$\%Vol = \frac{Vol}{\sum_{s=1}^n Vol_s} \times 100 \quad (\text{equação 5})$$

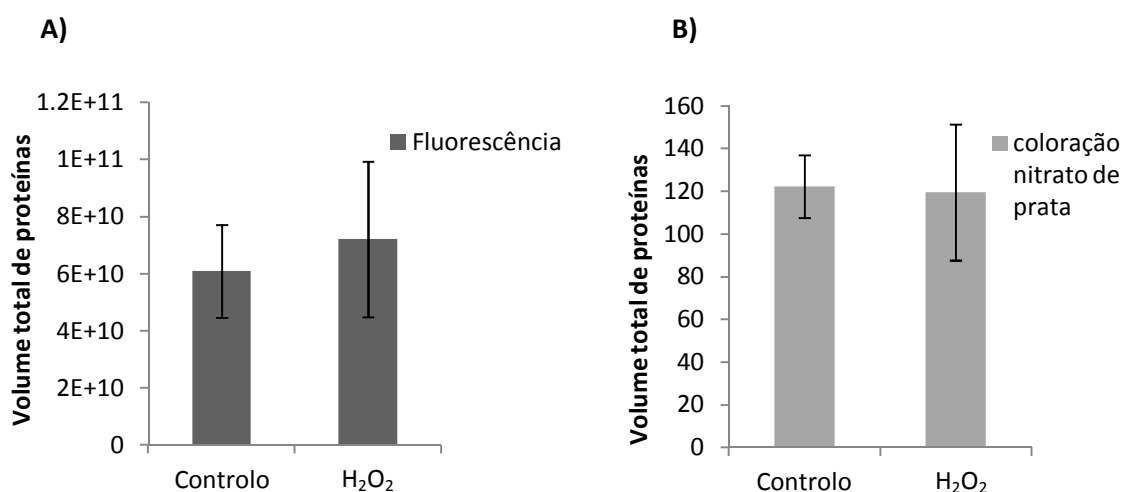


Figura IV.8 - Representação do volume total de proteínas nas imagens de fluorescência e de coloração por nitrato de prata. A) Volume total de proteínas referentes às imagens de fluorescência; B) Volume total de proteínas referentes às imagens de coloração com nitrato de prata. Estes resultados são representativos de quatro experiências independentes (n = 4), respectiva média e desvio padrão.

3.2.2. Aumento da oxidação de proteínas sensíveis ao H_2O_2

As imagens obtidas por fluorescência correspondem ao proteoma de cisteínas reactivas. Deste modo, proteínas que sofram oxidação apresentam uma diminuição na fluorescência pois as suas formas oxidadas não são alquiladas pelo BODIPY-IAM. Na análise destas imagens comparou-se o valor dos *spots* normalizados entre o gel experimental e o gel controlo respectivo. A partir de quatro experiências independentes analisou-se se as variações identificadas eram significativas no mínimo para três experiências independentes.

Para os géis 2-D obtidos identificaram-se 41 proteínas por *Peptide Mass Fingerprint* (PMF) (quadro com as proteínas identificadas em anexo). Na figura IV.9 estão representadas as proteínas identificadas que apresentam uma diminuição consistente da fluorescência do grupo exposto ao H_2O_2 relativamente ao grupo controlo. Estas proteínas são a *tropomyosin alpha-4 chain* (TPM4), a ciclooxygenase 2 (COX-2); *Transcription elongation factor A protein-like 4* (TCAL4); a proteína *zinc finger 646* (ZN646) e a proteína 40S ribossomal SA (RSSA).

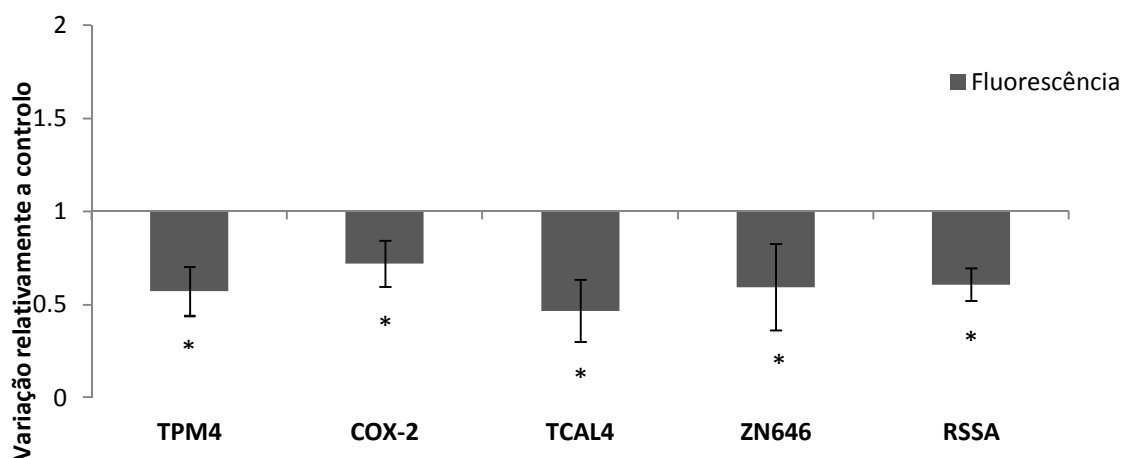


Figura IV.9 - Proteínas identificadas que apresentam uma diminuição da fluorescência. Estas proteínas são a *tropomyosin alpha-4 chain* (TPM4), a ciclooxygenase 2, COX-2); a *transcription elongation factor A protein-like 4* (TCAL4), a proteína *zinc finger 646* (ZN646) e a proteína 40S ribossomal SA (RSSA). Os valores apresentados correspondem à média das razões do volume relativo normalizado para cada proteína face ao respectivo controlo das imagens de fluorescência. Estes resultados são representativos de três experiências independentes (n = 3). Análise estatística efectuada a partir do *t-test*: * $p \leq 0,05$.

Contudo uma possível diminuição na oxidação da proteína pode ser atribuída a uma diminuição na quantidade da proteína. Por esse motivo, tornou-se também necessário

verificar se houve variação na expressão da proteína nas imagens relativas ao padrão de proteínas totais. Assim, foram apenas seleccionadas nesta fase do trabalho as proteínas que apresentavam um aumento na oxidação (diminuição da fluorescência) e que mantinham ou aumentavam a quantidade de proteína.

Das proteínas identificadas que apresentam diminuição da fluorescência observou-se que apenas três destas proteínas apresentam um aumento de oxidação significativo. Estas proteínas são a ciclooxigenase 2, a proteína *zinc finger* 646 e a proteína 40S ribossomal SA. Como se pode observar na figura IV.10 as três proteínas apresentam uma diminuição significativa da fluorescência relativamente ao grupo controlo e a sua expressão mantém-se inalterada ou ligeiramente aumentada. Como referido anteriormente, tal comportamento sugere que estas proteínas sofrem oxidação quando expostas a concentrações fisiológicas de H_2O_2 .

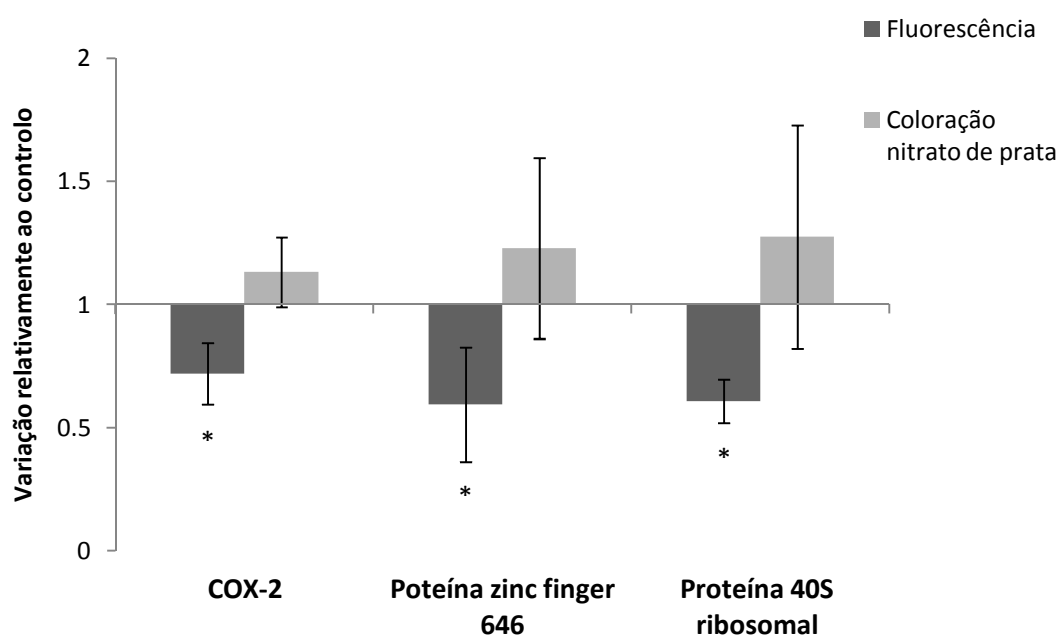


Figura IV.10 – Representação de proteínas que apresentam variação significativa na oxidação. No gráfico apresentam-se as variações da fluorescência e da quantidade de proteína total do grupo exposto ao estado estacionário de H_2O_2 relativamente ao grupo controlo. Os valores apresentados correspondem à média das razões do volume relativo normalizado para cada proteína face ao respectivo controlo para as imagens de fluorescência e às da coloração por nitrato de prata. Estes resultados são representativos de três experiências independentes ($n = 3$). Análise estatística efectuada a partir do *t-test*: * $p \leq 0,05$.

3.2.3. Variação na expressão de proteínas sensíveis ao H_2O_2

Paralelamente ao estudo da oxidação das proteínas também se averiguou quanto a uma possível expressão diferencial de proteínas quando expostas ao H_2O_2 . Esta análise foi efectuada para as imagens obtidas para o padrão de proteínas totais entre grupos diferentes. Na figura IV.11 encontram-se representadas as proteínas que apresentam variação na quantidade de proteína total no grupo experimental relativamente ao controlo. As proteínas peroxiredoxina 1 (PRDX1) e *ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 24* (UBP24) apresentam um aumento significativo na quantidade total de proteína.

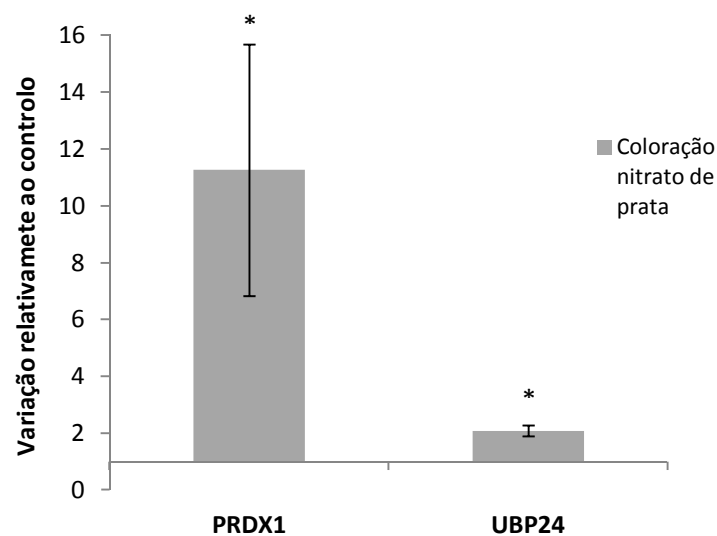


Figura IV.11 – Representação de proteínas que apresentam variação na quantidade de proteína total.

Os valores apresentados correspondem à média das razões do volume relativo normalizado para cada proteína face ao respectivo controlo, dos géis corados com nitrato de prata. Os resultados são representativos de três experiências independentes ($n = 3$).

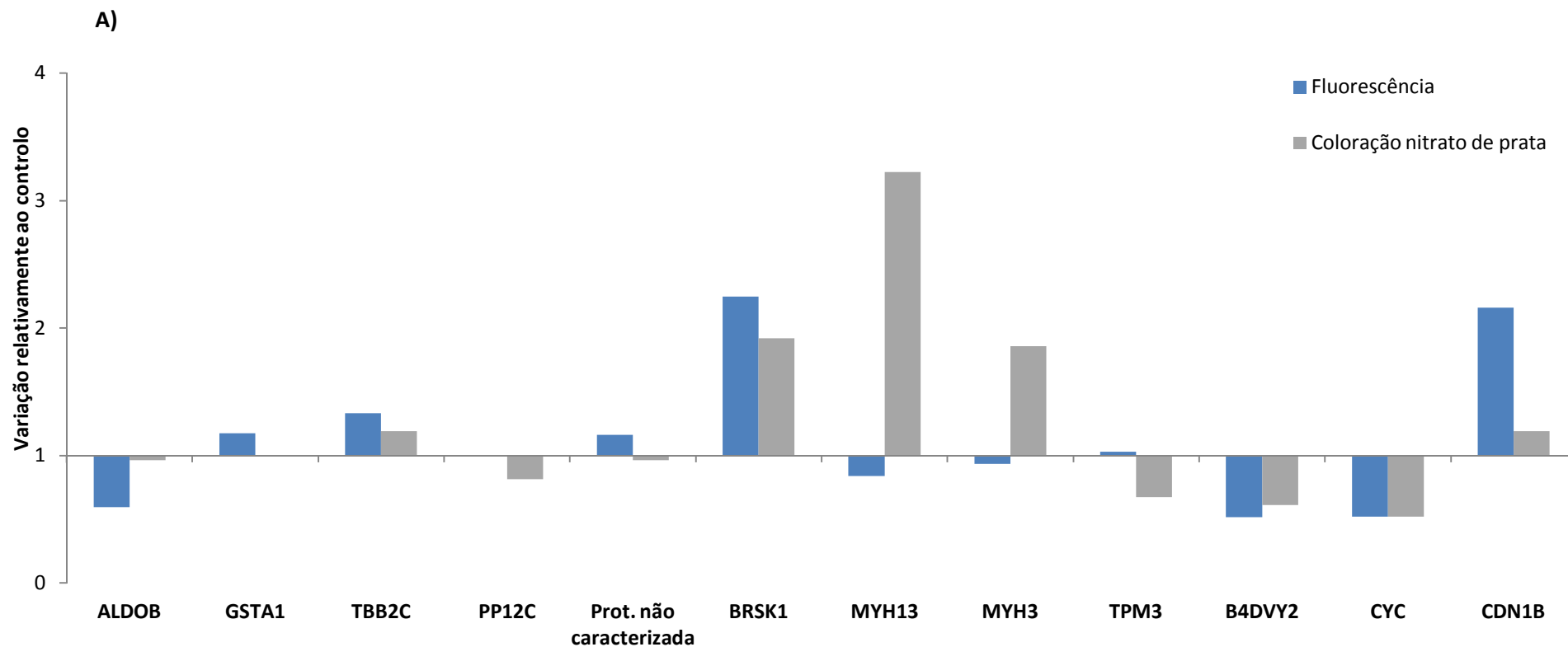
3.3. Análise dos géis 2-D relativos ao tratamento com VEGF

A activação da sinalização pelo VEGF é responsável pela activação simultânea de enzimas Nox, as quais produzem H_2O_2 essencial para esta sinalização (Rhee, 2006). Assim, revelou-se importante identificar proteínas que seriam oxidadas durante este processo de sinalização.

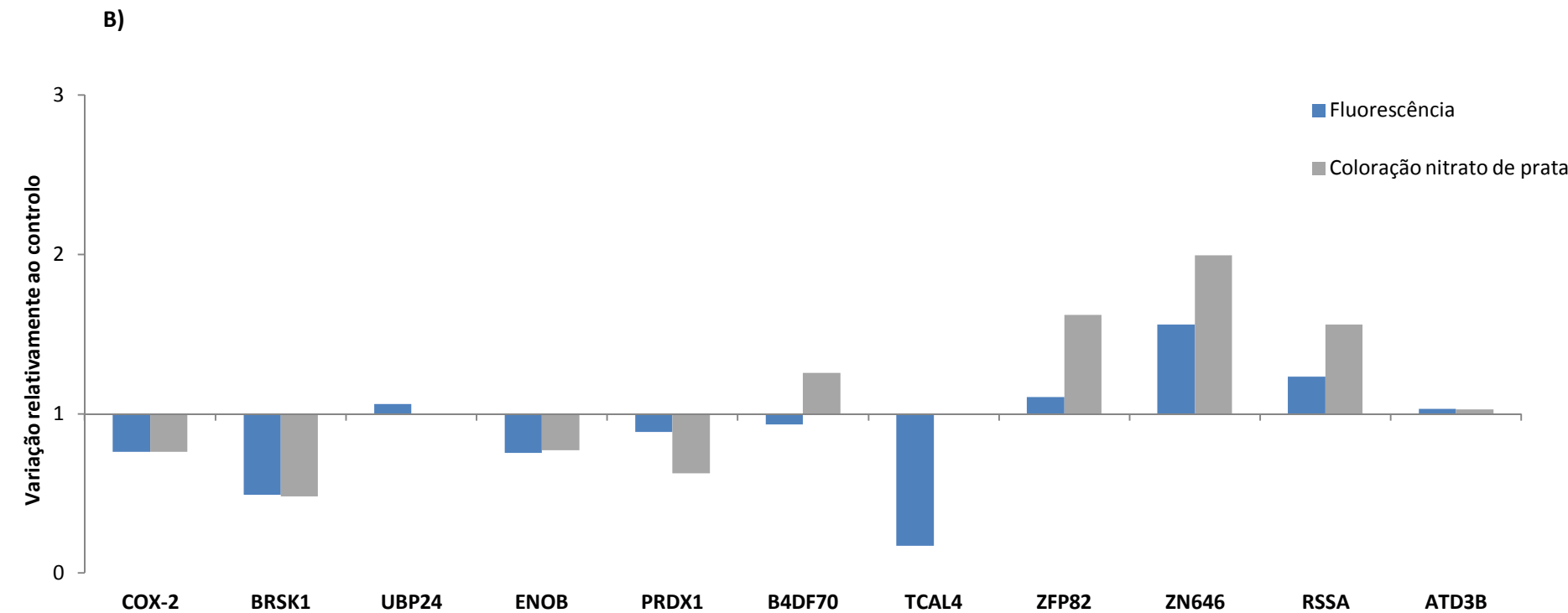
A análise dos géis 2-D obtidos após tratamento com VEGF segue a mesma linha de análise já apresentada para os géis 2-D referentes ao estado estacionário de H_2O_2 .

Os resultados apresentados relativamente ao tratamento com VEGF correspondem a dados preliminares uma vez que são apenas representativos de uma experiência independente. Na figura IV.12 estão representadas as variações da fluorescência e da quantidade total de proteínas que foram identificadas estes géis. A análise do gráfico indica que existe alguma variabilidade relativamente aos resultados da fluorescência para as proteínas identificadas.

Figura IV.12 – Representação da variação da fluorescência e da quantidade de proteína total para as proteínas identificadas nos géis 2-D, relativos ao tratamento com VEGF. Nas figuras A) e B) encontram-se repartidas as proteínas identificadas nos géis 2-D, relativos ao tratamento com VEGF. Os valores apresentados correspondem ao volume relativo normalizado para cada proteína face ao respectivo controlo. Os resultados são representativos de uma experiência independentes (n = 1).



Continuação da Figura IV.12 – Representação da variação da fluorescência e da quantidade de proteína total para as proteínas identificadas nos géis 2-D, relativos ao tratamento com VEGF.



Capítulo V – Discussão

1. Consumos celulares de H_2O_2 variam com o tipo de células endoteliais e com o substrato

De modo a caracterizar as linhas celulares HUVEC e HMEC-1 e a otimizar o ensaio de titulação de H_2O_2 em estado estacionário avaliou-se o consumo de H_2O_2 em células intactas e avaliou-se o efeito de diferentes substratos de cultura. Nos ensaios de consumo celular de H_2O_2 , a introdução de uma quantidade elevada de H_2O_2 no meio extracelular desencadeia a activação do sistema antioxidante das células. Este sistema constitui o principal mecanismo de defesa contra as ERO, tendo a função de eliminar o excesso de ERO produzido de modo a manter a homeostase celular. A eliminação do H_2O_2 nas HUVEC foi estudada por Sasaki *et al.* (1998), onde concluíram que o glutathione peroxidase é o principal responsável pela eliminação do H_2O_2 a concentrações fisiológicas (remove no mínimo 80% do H_2O_2) e que para concentrações mais elevadas de H_2O_2 o principal responsável é a catalase.

Comparando as constantes de velocidade entre HUVEC e HMEC-1 para o mesmo tipo de revestimento, a gelatina, observa-se que a constante de velocidade para as HUVEC é superior à das HMEC-1 (ver quadro IV.1). Estes resultados revelam que estas linhas celulares metabolizam o H_2O_2 a velocidades diferentes, sendo o metabolismo do H_2O_2 mais rápido nas HUVEC. Tal, sugere que a regulação e a actividade dos enzimas antioxidantes deverá ser diferente nestas duas linhas celulares.

Outro factor a considerar na análise das diferenças de consumo do H_2O_2 por estas duas linhas é o facto das HUVEC serem uma linha primária e as HMEC-1 uma linha imortalizada. Unger *et al.* (2002) fizeram um estudo comparativo do fenótipo de várias linhas endoteliais imortalizadas, HMEC-1 incluídas, com linhas primárias e observaram que existem diferenças significativas entre o fenótipo expresso por células imortalizadas e células primárias. Tendo observado que várias moléculas de adesão e citocinas que são características das CE não se encontram presentes nas linhas imortalizadas.

A utilização do revestimento (substrato) na cultura de células tem como objectivo promover e estabilizar o processo de adesão celular. Os resultados obtidos revelam que há uma diferença significativa no consumo de H_2O_2 nas HMEC-1 na presença ou ausência de um revestimento de gelatina (ver quadro IV.1), sendo o H_2O_2 catabolizado mais rapidamente na ausência de revestimento. Este resultado sugere que poderá estar a ocorrer uma regulação específica dos enzimas responsáveis pelo catabolismo do H_2O_2 mediada por determinados tipos de

receptores da matriz. Para testar esta hipótese seria interessante estudar o consumo de H_2O_2 utilizando inibidores específicos de receptores da matriz extracelular.

Relativamente às HUVEC, não se observou diferença significativa no consumo celular de H_2O_2 utilizando gelatina e colagénio tipo I como revestimento. Tal pode ser explicado por a gelatina ser constituída por uma mistura de proteínas solúveis de colagénio sendo desconhecida a percentagem de colagénio do tipo I que poderá estar presente neste revestimento. No sentido de continuar o estudo do efeito de diferentes tipos de matriz extracelular sobre o consumo de H_2O_2 nas HUVEC deve-se testar outros tipos de revestimento, como a fibronectina e a laminina.

No geral, estes resultados revelam que se deve ter uma maior ponderação ao seleccionar as condições de cultura a utilizar no estudo das ERO em células endoteliais, e também que se deve ter em consideração estes factores ao comparar e interpretar resultados em que as células apresentem técnicas de cultura distintas.

2. Concentrações sub-letais de H_2O_2 nas HUVEC

Uma vez que se pretendia estudar o efeito sinalizador do H_2O_2 nas HUVEC, foi necessário determinar quais as concentrações sub-letais de H_2O_2 , uma vez que estas se aproximam das concentrações fisiológicas destas células. Recorrendo a ensaios de viabilidade após estado estacionário de H_2O_2 determinou-se que para o intervalo 8-14 μM de H_2O_2 as células apresentam uma viabilidade celular de aproximadamente 80%, definindo-se este intervalo como óptimo para o estudo do papel sinalizador desta molécula.

Estudos anteriores para diferentes linhas celulares, utilizando o mesmo método, determinaram que na linha celular HeLa a concentração de 25 μM de H_2O_2 é sub-letal para um estado estacionário de 4 horas (Oliveira-Marques *et al.*, 2009), enquanto que na linha celular RPE-1 é de 10 μM para um estado estacionário de 2 horas e de 5 μM para um estado estacionário de 4 horas (Carvalho, 2010). Tendo em consideração que as HeLa são uma linha tumoral e que as RPE-1 e as HUVEC são linhas de células saudáveis estes resultados reforçam a hipótese de que as células tumorais apresentam uma maior resistência às ERO face a células saudáveis (Szatrowski & Nathan, 1991).

3. Identificação de proteínas que contêm cisteínas sensíveis ao H_2O_2

O objectivo principal deste trabalho consistiu na identificação de proteínas alvo do H_2O_2 em concentrações fisiológicas. Os métodos utilizados para este estudo foram cuidadosamente seleccionados de modo a que abrangessem o proteoma sensível ao H_2O_2 e desta forma possibilitassem o maior número de identificações possíveis.

Tendo o objectivo de estudar o efeito do H_2O_2 sob concentrações fisiológicas, um dos métodos fundamentais para a realização deste trabalho foi o ensaio de titulação de H_2O_2 em estado estacionário, o qual permite manter concentrações de H_2O_2 fisiológicas constantes ao longo do tempo (Antunes & Cadenas, 2001).

Recorrendo à electroforese bidimensional, uma das principais técnicas da proteómica, avaliou-se o proteoma sensível ao H_2O_2 nas HUVEC após marcação das proteínas contendo resíduos de cisteínas reactivos.

Neste estudo identificaram-se três proteínas que apresentam aumento da oxidação significativa após exposição a concentrações fisiológicas de H_2O_2 : a ciclooxigenase 2 (COX-2), a proteína *zinc finger* 646 (ZN646) e a proteína 40S ribossomal SA (RSSA). No quadro V.1 encontram-se algumas das características principais destas proteínas.

Quadro V.1 – Principais características das proteínas que apresentam uma modificação oxidativa significativa após exposição ao H₂O₂. Devido ao elevado tamanho da proteína *zinc finger* 646 não foi possível estimar o seu ponto isoelétrico (pI).

Proteína	Abreviatura	Função	Aminoácidos	Massa Molecular (kDa)	pI estimado	N.º cisteínas
Ciclooxigenase 2	COX-2	Produção de prostaglandinas a partir do ác. araquidónico. Desempenha papel importante no processo inflamatório.	604	69,0	7,03	13
Proteína <i>zinc finger</i> 646	ZN646	Regulação da transcrição.	1829	200,8	-	81
Proteína 40S ribossomal SA	RSSA	Receptor para as lamininas. Necessário para a formação do complexo 40S ribossomal.	295	32,9	4,59	2

3.1. *Ciclooxigenase 2*

A ciclooxigenase 2 (COX-2), também conhecida por prostaglandina G/H sintase 2, desempenha um papel chave na conversão do ácido araquidónico em prostaglandinas e eicosanóides (Morita, 2002). Este enzima possui actividade de ciclooxigenase e de peroxidase (Smith & Song, 2002) e situa-se maioritariamente na membrana nuclear (I Morita et al., 1995).

A COX-2 pode ser induzida por diversos estímulos, tendo sido identificados vários elementos reguladores na região 5' dos genes COX-2. Alguns desses elementos são locais de ligação ao NF- κ B, à Sp1, ao NF-IL-6 e à CRE (Tanabe & Tohnai, 2002). Vários factores de crescimento e citocinas, assim como situações de hipóxia e de stress mecânico, levam à activação destes factores de transcrição provocando um aumento da expressão da COX-2, nomeadamente nas HUVEC (Morita, 2002).

Kim, *et al* (2005) revelaram que a activação da COX-2 é desencadeada pelo sintase do óxido nítrico iNOS (do inglês, *Inducible NO synthase*). Este enzima promove a nitrosilação de um resíduo de cisteína específico (Cys256) pelo óxido nítrico (NO^{*}). No contexto dos resultados obtidos relativamente ao aumento da oxidação da COX-2 após estado estacionário de H₂O₂, poderá indicar que o H₂O₂ funciona como modelador da actividade deste enzima. No entanto sabe-se também que o H₂O₂ desempenha um papel na indução do iNOS (Zadeh *et al.*, 2000) e da COX-2 (Adderley & Fitzgerald, 1999; Lu & Wahl, 2005), o que sugere que o H₂O₂ poderá mediar a activação da COX-2 através de diferentes mecanismos.

A COX-2 desempenha um papel fundamental no processo inflamatório, sendo induzida por vários estímulos envolvidos na resposta inflamatória (Clària, 2003). Os inibidores para a COX-2, os NSAIDs (do inglês, *NonSteroidal Anti-Inflammatory Drugs*), são fármacos bastantes utilizados em situações de inflamação, febre e dor (Herdegen & Fauler, 2006). Na área do cancro, estudos recentes revelaram que a COX-2 pode ter um papel na formação de metástases ao contribuir para a inflamação sistémica (Fisher et al., 2011).

Vários estudos revelaram que a COX-2 desempenha um papel importante na angiogénese (Akarasereenont & Techatraisak, 2002; Wu *et al.*, 2006). O VEGF, o maior promotor da angiogénese, é um dos indutores da COX-2 (Tamura *et al.*, 2002). Adicionalmente, os produtos da COX-2, prostaglandinas, são factores pró-angiogénicos conhecidos, estando envolvidos na promoção do processo angiogénico e na permeabilidade vascular das células endoteliais (Tamura *et al.*, 2002). Sabe-se que a prostaglandina E2 (PGE₂) induz a expressão do VEGF (Pai

et al., 2001), revelando que existe um mecanismo de *feedback* positivo entre a COX-2 e o VEGF. Estudos realizados por Wu *et al.*, (2006) demonstraram esta relação ao observarem que a indução da proliferação pelo VEGF nas HUVEC encontra-se diminuída na presença de inibidores ou de siRNA da COX-2.

No contexto do H₂O₂, o facto de este estar implicado na activação da sinalização do VEGF e de o VEGF também regular a produção de H₂O₂ (Cai, 2005), revela que existem vários mecanismos pelo qual o H₂O₂ poderá modelar a COX-2.

Devido ao papel desempenhado pela COX-2 na angiogénese e à contribuição deste processo para a cancerigénese, a COX-2 passou a ser um alvo terapêutico para o tratamento do cancro.

3.2. Proteína 40S ribossomal SA

A proteína 40S ribossomal SA, também conhecida por *37 kDa laminin receptor precursor*, é a precursora da proteína *67 kDa laminin receptor*. Sabe-se que a proteína 40S ribossomal SA apresenta algumas das propriedades do *67 kDa laminin receptor*, contudo, o mecanismo preciso pelo qual se dá a conversão permanece desconhecido (Fatehullah *et al.*, 2009).

O *67 kDa laminin receptor* é um receptor presente na membrana plasmática e tem como ligando as lamininas, estando envolvido na regulação dos processos de adesão celular e de transdução de sinal após ligação ao ligando (Nelson *et al.*, 2008). Este receptor tem suscitado particular interesse devido ao seu envolvimento no processo de metastização no cancro (Ménard *et al.*, 1998; Nelson *et al.*, 2008).

Para além de precursora do receptor para as lamininas, a proteína 40S ribossomal SA é um dos componentes do complexo ribossomal (Nelson *et al.*, 2008). Adicionalmente, observou-se que no núcleo encontra-se fortemente associado às histonas H2A, H2B e H4, sendo o papel destas interações ainda desconhecido (Kinoshita *et al.*, 1998).

Não sendo conhecida a relação do H₂O₂ com esta proteína e tendo em consideração os vários processos em que a proteína 40S ribossomal SA está envolvida, torna-a um alvo de interesse no estudo da sinalização do H₂O₂.

3.3. Proteína zinc finger 646

A proteína *zinc finger* 646 é uma proteína pouco conhecida e reúne ainda pouca informação. Esta proteína foi identificada como pertencendo à família das *krueppel C2H2-type zinc-finger protein*, a qual está relacionada com a regulação da transcrição. No contexto do H_2O_2 , esta proteína poderá eventualmente desempenhar um papel na regulação dos genes sinalizados pelo H_2O_2 . Deste modo será interessante aprofundar o estudo relativamente a esta proteína.

4. Proteínas diferencialmente expressas pelo H_2O_2

Para além das proteínas modificadas por oxidação, este método permitiu também identificar proteínas que possuem uma expressão diferencial mediada pelo H_2O_2 em concentrações fisiológicas. Neste estudo identificaram-se duas proteínas com um aumento da expressão significativo quando expostas ao H_2O_2 , a peroxiredoxina 1 (PRDX1) e a *ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 24* (UBP24). No quadro V.2 encontram-se as principais características destas proteínas.

Quadro V.2 – Principais características das proteínas que apresentam uma modificação oxidativa significativa após exposição ao H₂O₂. Devido ao elevado tamanho da proteína *Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 24* não foi possível estimar o seu ponto isoelétrico (pI). * A função da proteína *Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 24* foi inferida por semelhança.

Proteína	Abreviatura	Função	Aminoácidos	Massa Molecular (kDa)	pI estimado	N.º cisteínas
Peroxiredoxina 1	PRDX1	Actividade de peroxidase. Regulação redox na célula.	199	22,1	8,23	4
<i>Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 24</i>	UBP24	Envolvida na via proteolítica dependente da ubiquitina. *	2620	294,4	-	53

4.1. Peroxiredoxina 1

A peroxiredoxina 1 é um enzima que catalisa a reacção da redução de peróxidos (ROOH) ao fornecer redutores equivalentes, provenientes do sistema das tioredoxinas. Desta forma, este enzima pertence ao sistema antioxidante da célula, sendo responsável pela eliminação do H_2O_2 , entre outros. Como referido na introdução (Capítulo I, secção 3. Sinalização redox), tem-se vindo a revelar que as peroxiredoxinas têm um papel fundamental na sinalização selectiva e específica do H_2O_2 em concentrações fisiológicas (Dickinson & C. J. Chang, 2011; Mishina *et al.*, 2011). Pensa-se que, sob um estímulo de produção de H_2O_2 , a PRDX1 é inibida localmente e permite um aumento da concentração de H_2O_2 localizada.

Para os géis 2-D PAGE obtidos, o facto de a peroxiredoxina ser pouco abundante nas HUVEC não tratadas e de ser altamente induzida pelo H_2O_2 (Bast *et al.*, 2002), justifica o facto de que não se tenha observado uma variação oxidativa significativa para esta proteína. Sabe-se que um aumento da concentração de H_2O_2 tem a capacidade de induzir a peroxiredoxina 1.

É de referir que a PRDX1 tem sido associada a várias funções celulares aparentemente não relacionadas com a sua actividade de peroxidase (Bast *et al.*, 2002).

Estudos revelaram que este enzima encontra-se aumentado em vários cancros, estando relacionado com a resistência a tratamentos terapêuticos pelas células cancerígenas (Kim *et al.*, 2008). Nomeadamente, no cancro da próstata observou-se que a PRDX1 contribui para a evasão à morte celular das células cancerígenas por activação do receptor de androgénio (S.-Y. Park *et al.*, 2007). Adicionalmente, observou-se que a PRDX1 regula o crescimento do tumor através da regulação da vasculatura do tumor dependente do *Toll-like receptor 4* (TLR4) e que ao inibir a PRDX1 ocorre uma diminuição da vasculatura tumoral (Riddell *et al.*, 2011). Tais observações têm suscitado um crescente interesse na PRDX1, sendo encarada como um eventual alvo terapêutico para o cancro.

4.2. Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 24

A proteína *ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 24*, apesar de já ter sido identificada a nível proteico, ainda não se encontra muito estudada. A sua função foi atribuída por semelhança de sequência, tendo-se determinado que deve estar envolvida na via proteolítica dependente da ubiquitina em conjunto com a subunidade 26S do proteossoma. Tendo em consideração os vários papéis desempenhados pelo H_2O_2 , é possível que esta proteína esteja envolvida em

mecanismos de degradação de proteínas que participem em vias de sinalização reguladas pelo H_2O_2 .

5. Identificação de proteínas que contêm cisteínas sensíveis ao H_2O_2 após tratamento com VEGF

Sabendo que existe um mecanismo de *feedback* positivo entre o VEGF e o H_2O_2 tornou-se interessante avaliar o proteoma de cisteínas sensíveis ao H_2O_2 após tratamento com VEGF. Nestes géis 2-D PAGE espera-se observar um aumento de oxidação de algumas proteínas associadas à sinalização mediada pelo H_2O_2 após estimulação com VEGF.

Tendo em consideração que estes dados são ainda preliminares, interessantemente observa-se que a proteína *transcription elongation factor A protein-like 4* (TCAL4) apresenta uma diminuição acentuada na fluorescência, resultado que já tinha sido observado para os géis 2-D obtidos para o estado estacionário de H_2O_2 . Tornando-a desta forma uma proteína promissora no processo de sinalização do H_2O_2 .

6. Limitações do método

Apesar dos resultados obtidos, este método mostrou algumas limitações que impediram a identificação de um maior número de proteínas oxidadas na presença de H_2O_2 . Assim, para as restantes proteínas em que também se observou diminuição da fluorescência significativa (*tropomyosin alpha-4 chain* e *transcription elongation factor A protein-like 4*) não se pode estabelecer uma ligação entre diminuição da fluorescência e aumento da oxidação. Tal deve-se ao facto destas proteínas serem pouco abundantes e por esse motivo não ter sido possível identificá-las nas imagens do padrão das proteínas totais em todas as experiências analisadas.

O número reduzido de proteínas identificadas que apresentam oxidação significativa deve-se em grande medida às limitações dos métodos empregues.

Uma das principais limitações deve-se ao insucesso obtido na identificação de várias proteínas em que se observou um aumento de oxidação. Neste projecto apenas 35% das proteínas analisadas por *Peptide Mass Fingerprint* foram identificadas. Tal é justificado pelo limite de sensibilidade que a técnica de espectrometria de massa apresenta, sendo a abundância da

proteína um factor decisivo para o sucesso da identificação por PMF. Deste modo, várias proteínas que poderiam revelar-se interessantes ficaram excluídas desta análise.

Outra limitação do método prende-se com o facto do agente alquilante apresentar algumas restrições na marcação de cisteínas reactivas que se encontrem no interior de proteínas muito volumosas, tornando-se inacessíveis ao agente alquilante. Algumas dessas proteínas conhecidas são os enzimas gliceraldeído fosfato desidrogenase (GAPDH) e a peroxiredoxina V, os quais possuem cisteínas sensíveis ao H_2O_2 mas não sofrem marcação pela iodoacetamida (Kim *et al.*, 2000).

Capítulo VI – Considerações

Finais e Perspectivas

O objectivo deste trabalho consistiu no estudo do efeito do H_2O_2 sob concentrações não-tóxicas nas células endoteliais. Sabendo que o H_2O_2 desempenha um papel sinalizador em vários processos vitais para as células endoteliais, nomeadamente na angiogénese, pretendeu-se avaliar a capacidade sinalizadora desta espécie utilizando um método que permitiu o estudo do proteoma reactivo ao H_2O_2 . Os resultados obtidos revelam que existem várias proteínas que sofrem modificação reactiva após exposição a concentrações consideradas não-tóxicas para as HUVEC. As três proteínas identificadas, a ciclooxigenase 2, a proteína *zinc finger* 646 e a proteína 40S ribossomal SA, desempenham papeis bastantes distintos nas células, o que vem confirmar que o H_2O_2 está envolvido na regulação de diferentes processos celulares a concentrações não-tóxicas. Adicionalmente, observou-se que as proteínas peroxiredoxina 1 e *ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase* 24 apresentam uma expressão diferencial mediada pelo H_2O_2 .

Para se poder determinar se mais proteínas encontram-se alteradas e de modo a melhorar os resultados obtidos deve-se aumentar o número de experiências independentes e desta forma aumentar o significado estatístico das variações observadas.

Também se pode empregar outras estratégias no estudo do proteoma por electroforese bidimensional, nomeadamente, a utilização de fitas com gradientes de pH mais estreitos e a utilização de diferentes tipos de abordagem na preparação das amostras, poderá contribuir para a obtenção de mais resultados.

A avaliação do proteoma sensível ao H_2O_2 quando estimulado pelo VEGF é outro estudo bastante interessante e que permitirá revelar novos mecanismos dependentes da activação do VEGF.

Tendo em conta os resultados conclui-se que este método é útil numa abordagem inicial ao estudo do efeito do H_2O_2 no proteoma reactivo. Porém, de forma a confirmar e complementar os resultados obtidos será necessário realizar técnicas alternativas que confirmem a oxidação das proteínas e a sua expressão e também estudos específicos de actividade de forma a compreender o envolvimento do H_2O_2 na regulação da função das proteínas.

Nos últimos anos o número de proteínas e de mecanismos que têm sido identificados como regulados pelo H_2O_2 numa situação fisiológica tem vindo a aumentar significativamente. Contudo, uma das críticas apontadas a muitos desses trabalhos advém de que os estudos efectuados não são realizados para concentrações fisiológicas de H_2O_2 ou da concentração

desta molécula não ser controlada. Tendo em consideração o papel dualista que o H_2O_2 e as outras ERO desempenham, estudos não controlados da concentração de H_2O_2 não permitem inferir quanto à validade desses resultados. Neste trabalho, este ponto fulcral no estudo do papel regulador do H_2O_2 foi considerado e a implementação do método da titulação do H_2O_2 em estado estacionário foi decisiva para o sucesso e a validação dos resultados obtidos.

Alterações nas funções vitais das células endoteliais estão envolvidas numa série de doenças, como o cancro, complicações da diabetes, arteriosclerose, enfarte do miocárdio, entre outras. Sendo o H_2O_2 um dos mediadores dos vários processos que se encontram alterados nestas doenças, é essencial compreender melhor os mecanismos empreendidos por esta molécula.

Bibliografia

- 2-D Electrophoresis. Principles and Methods.* (2004). *Electrophoresis*. Healthcare, G E.
- Adderley, S. R., & Fitzgerald, D. J. (1999). Oxidative damage of cardiomyocytes is limited by extracellular regulated kinases 1/2-mediated induction of cyclooxygenase-2. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(8), 5038-5046.
- Ades, E. W., Candal, F. J., Swerlick, R. A., George, V. G., Summers, S., Bosse, D. C., & Lawley, T. J. (1992). HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *The Journal of investigative dermatology*, 99(6), 683-690. Nature Publishing Group.
- Akarasereenont, P., & Techatraisak, K. (2002). The expression of COX-2 in VEGF-treated endothelial cells is mediated through protein tyrosine kinase. *Mediators of Inflammation*, 22, 17-22.
- Antunes, F, & Cadenas, E. (2000). Estimation of H₂O₂ gradients across biomembranes. *FEBS letters*, 475(2), 121-6.
- Antunes, Fernando, & Cadenas, Enrique. (2001). Cellular titration of apoptosis with steady state induce apoptosis through fenton chemistry independent of the cellular thiol state. *Science*, 30(9), 1008 -1018.
- Arbiser, J. L., Petros, J., Klafter, R., Govindajaran, B., McLaughlin, E. R., Brown, L. F., Cohen, C., et al. (2002). Reactive oxygen generated by Nox1 triggers the angiogenic switch. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(2), 715-720. The National Academy of Sciences.
- Babior, B. M. (2000). The NADPH oxidase of endothelial cells. *IUBMB Life*, 50(4-5), 267-269. Wiley Online Library.
- Bartosz, G. (2009). Reactive oxygen species: destroyers or messengers? *Biochemical Pharmacology*, 77(8), 1303-1315.
- Bast, A., Wolf, G., Oberbäumer, I., & Walther, R. (2002). Oxidative and nitrosative stress induces peroxiredoxins in pancreatic beta cells. *Diabetologia*, 45(6), 867-876.
- Bergers, G., & Benjamin, L. E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature Reviews Cancer*, 3(6), 401-410. Nature Publishing Group.
- Berlett, B. S., & Stadtman, E. R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(33), 20313-20316.

- Bjerrum, O. J. (1986). C. Buffer systems and transfer parameters for semidry electroblotting with a horizontal apparatus. In W. Chemie (Ed.), *Analytical electrophoresis* (pp. 315-317).
- Cai, H. (2005). Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences. *Cardiovascular research*, 68(1), 26-36.
- Carvalho, S. (2010). *Estudo da proteína humana centrossomal TBCCD1 em condições de stress oxidativo causadas por H2O2 em estado estacionário*. Tese de Mestrado em Bioquímica, Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências.
- Clària, J. (2003). Cyclooxygenase-2 biology. *Current pharmaceutical design*, 9(27), 2177-90.
- Cook-Mills, J. M. (2006). Hydrogen peroxide activation of endothelial cell-associated MMPs during VCAM-1-dependent leukocyte migration. *Cellular and molecular biology NoisyleGrand France*, 52(4), 8-16.
- Dickinson, B. C., & Chang, C. J. (2011). Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. *Nature Chemical Biology*, 7(8), 504-511. Nature Publishing
- Dudek, S. M., & Garcia, J. G. (2001). Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability. *Journal of Applied Physiology*, 91(4), 1487-1500. Am Physiological Soc.
- Dvorak, H. F. (2003). How tumors make bad blood vessels and stroma. *The American journal of pathology*, 162(6), 1747-57.
- Dworakowski, R., Alom-Ruiz, S. P., & Shah, A. M. (2008). NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in the regulation of endothelial phenotype. *Pharmacological reports PR*, 60(1), 21-28.
- Evans, P., & Halliwell, B. (1999). Free radicals and hearing. Cause, consequence, and criteria. *Annals Of The New York Academy Of Sciences*, 884, 19-40.
- Fatehullah, A., Doherty, C., Pivato, G., Allen, G., Devine, L., Nelson, J., & Timson, D. J. (2009). Interactions of the 67 kDa laminin receptor and its precursor with laminin. *Bioscience Reports*, 30(Pt 2), 73-79. Portland Press Ltd.
- Finkel, T., Serrano, M., & Blasco, M. A. (2007). The common biology of cancer and ageing. *Nature*, 448(7155), 767-774. Nature Publishing Group.
- Fisher, J. C., Gander, J. W., Haley, M. J., Hernandez, S. L., Huang, J., Chang, Y.-J., Johung, T. B., et al. (2011). Inhibition of cyclo-oxygenase 2 reduces tumor metastasis and inflammatory signaling during blockade of vascular endothelial growth factor. *Vascular cell*, 3(1), 22. BioMed Central Ltd.

- Folkman, J. (1971). Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. *New England Journal of Medicine*, 285(21), 1182–1186.
- Forman, H. J. (2008). Hydrogen Peroxide: The Good , The Bad , and The Ugly. (G. Valacchi & P. A. Davis, Eds.) *Transition*, 1-17. Springer.
- Frey, R. S., Fukai, M. U., & Malik, A. B. (2009). NADPH Oxidase-Dependent Signaling in Endothelial Cells□: Role in Physiology and Pathophysiology. *Vascular*, 11(4).
- Garfin, D. E. (2003). Two-dimensional gel electrophoresis: an overview. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 22(5), 263-272.
- Garrido-Urbani, S., Jemelin, S., Deffert, C., Carnesecchi, S., Basset, O., Szyndralewicz, C., Heitz, F., et al. (2011). Targeting vascular NADPH oxidase 1 blocks tumor angiogenesis through a PPARα mediated mechanism. *PloS one*, 6(2), e14665. doi:10.1371/journal.pone.0014665
- González-Fraguela, M. E., Castellano-Benítez, O., & González-Hoyuela, M. (2005). Oxidative stress in neurodegeneration. *Revista de Neurologia*, 28(5), 504-511. Wiley Online Library.
- Halliwell, Barry. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, 141, 312-322.
- Herdegen, T., & Fauler, J. (2006). Drug safety of NSAIDs and COX-2 inhibitors. *Medizinische Monatsschrift fur Pharmazeuten*, 29(4), 122-128.
- Hill, B. G., Reily, C., Oh, J.-Y., Johnson, M. S., & Landar, A. (2009). Methods for the determination and quantification of the reactive thiol proteome. *Free radical biology & medicine*, 47(6), 675-83. Elsevier Inc.
- Juarez, J. C., Manuia, M., Burnett, M. E., Betancourt, O., Boivin, B., Shaw, D. E., Tonks, N. K., et al. (2008). Superoxide dismutase 1 (SOD1) is essential for H2O2-mediated oxidation and inactivation of phosphatases in growth factor signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(20), 7147-52.
- Kietzmann, T., & Görlach, A. (2005). Reactive oxygen species in the control of hypoxia-inducible factor-mediated gene expression. *Seminars in cell developmental biology*, 16(4-5), 474-486.
- Kim, J. R., Yoon, H. W., Kwon, K. S., Lee, S. R., & Rhee, S. G. (2000). Identification of proteins containing cysteine residues that are sensitive to oxidation by hydrogen peroxide at neutral pH. *Analytical biochemistry*, 283(2), 214-21.

- Kim, J.-H., Bogner, P. N., Baek, S.-H., Ramnath, N., Liang, P., Kim, H.-R., Andrews, C., et al. (2008). Up-regulation of peroxiredoxin 1 in lung cancer and its implication as a prognostic and therapeutic target. *Clinical Cancer Research*, 14(8), 2326-2333.
- Kim, S. F., Huri, D. a, & Snyder, S. H. (2005). Inducible nitric oxide synthase binds, S-nitrosylates, and activates cyclooxygenase-2. *Science (New York, N.Y.)*, 310(5756), 1966-70.
- Kinoshita, K., Kaneda, Y., Sato, M., Saeki, Y., Wataya-Kaneda, M., & Hoffmann, A. (1998). LBP-p40 binds DNA tightly through associations with histones H2A, H2B, and H4. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 253(2), 277-282.
- Landar, A., Oh, J.-Y., Giles, N. M., Isom, A., Kirk, M., Barnes, S., & Darley-Usmar, V. M. (2006). A sensitive method for the quantitative measurement of protein thiol modification in response to oxidative stress. *Free radical biology & medicine*, 40(3), 459-68.
- Larrivée, B., & Karsan, A. (2005). Isolation and culture of primary endothelial cells. *Methods In Molecular Biology Clifton Nj*, 290, 315-329.
- Lu, Y., & Wahl, L. M. (2005). Oxidative Stress Augments the Production of Matrix Metalloproteinase-1, Cyclooxygenase-2, and Prostaglandin E2 through Enhancement of NF-kB Activity in Lipopolysaccharide-Activated Human Primary Monocytes. *Stress: The International Journal on the Biology of Stress*, 175, 5423-5429.
- Malonne, H., Langer, I., Kiss, R., & Atassi, G. (1999). Mechanisms of tumor angiogenesis and therapeutic implications: angiogenesis inhibitors. *Clinical experimental metastasis*, 17(1), 1-14.
- Marti, H. H., & Risau, W. (1999). Angiogenesis in ischemic disease. *Thrombosis and haemostasis*, 82 Suppl 1, 44-52.
- Martin, A., Komada, M. R., & Sane, D. C. (2003). Abnormal angiogenesis in diabetes mellitus. *Medicinal Research Reviews*, 23(2), 117-145.
- McGahon, A., Martin, S., Bissonnette, R., Mahboubi, A., Shi, Y., Mogil, R., Nishioka, W., et al. (1995). The end of the (cell) line: Methods for the study of apoptosis in vitro. *Methods in Cell Biology: Cell Death*, (46), 153-187.
- van Meeteren, M. E., Teunissen, C. E., Dijkstra, C. D., & van Tol, E. a F. (2005). Antioxidants and polyunsaturated fatty acids in multiple sclerosis. *European journal of clinical nutrition*, 59(12), 1347-61.

- Miller, E. W., Dickinson, B. C., & Chang, C. J. (2010). Aquaporin-3 mediates hydrogen peroxide uptake to regulate downstream intracellular signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(36), 15681-15686. National Academy of Sciences.
- Miller, T. W., Isenberg, J. S., & Roberts, D. D. (2009). Molecular regulation of tumor angiogenesis and perfusion via redox signaling. *Chemical reviews*, 109(7), 3099-124.
- Mishina, N. M., Tyurin-Kuzmin, P. A., Markvicheva, K. N., Vorotnikov, A. V., Tkachuk, V. A., Laketa, V., Schultz, C., et al. (2011). Does cellular hydrogen peroxide diffuse or act locally? *Antioxidants redox signaling*, 14(1), 1-7. MARY ANN LIEBERT INC.
- Morita, I, Schindler, M., Regier, M. K., Otto, J. C., Hori, T., DeWitt, D. L., & Smith, W L. (1995). Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and synthase-2. *Journal of Biological Chemistry*, 270(18), 10902-10908.
- Morita, Ikuo. (2002). Distinct functions of COX-1 and COX-2. *Prostaglandins & other lipid mediators*, 68-69, 165-75.
- Ménard, S., Tagliabue, E., & Colnaghi, M. I. (1998). The 67 kDa laminin receptor as a prognostic factor in human cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 52(1-3), 137-145.
- Nelson, J., McFerran, N. V., Pivato, G., Chambers, E., Doherty, C., Steele, D., & Timson, D. J. (2008). The 67 kDa laminin receptor: structure, function and role in disease. *Bioscience Reports*, 28(1), 33-48.
- Nussenbaum, F., & Herman, I. M. (2010). Tumor angiogenesis: insights and innovations. *Journal of oncology*, 2010, 132641.
- Oliveira-Marques, V., Marinho, H. S., Cyrne, L., & Antunes, Fernando. (2009). Role of hydrogen peroxide in NF-kappaB activation: from inducer to modulator. *Antioxidants redox signaling*, 11(9), 2223-2243.
- Pai, R., Szabo, I. L., Soreghan, B. A., Atay, S., Kawanaka, H., & Tarnawski, A. S. (2001). PGE(2) stimulates VEGF expression in endothelial cells via ERK2/JNK1 signaling pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 286(5), 923-928.
- Park, S.-Y., Yu, X., Ip, C., Mohler, J. L., Bogner, P. N., & Park, Y.-M. (2007). Peroxiredoxin 1 interacts with androgen receptor and enhances its transactivation. *Cancer Research*, 67(19), 9294-9303.

- Paulsen, C. E., & Carroll, K. S. (2010a). Orchestrating redox signaling networks through regulatory cysteine switches. *ACS chemical biology*, 5(1), 47-62.
- Paulsen, C. E., & Carroll, K. S. (2010b). Orchestrating redox signaling networks through regulatory cysteine switches. *ACS chemical biology*, 5(1), 47-62.
- Ren, G., Michael, L. H., Entman, M. L., & Frangogiannis, N. G. (2002). Morphological characteristics of the microvasculature in healing myocardial infarcts. *The journal of histochemistry and cytochemistry official journal of the Histochemistry Society*, 50(1), 71-79.
- Rhee, S. G. (1999). Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Experimental molecular medicine*, 31(2), 53-59.
- Rhee, S. G. (2006). H₂O₂ , a Necessary Evil for Cell Signaling. *Science*, 312(5782), 1882-3. American Association for the Advancement of Science, 1333 H St, NW, 8 th Floor, Washington, DC, 20005, USA.
- Riddell, J. R., Bshara, W., Moser, M. T., Sperryak, J. A., Foster, B. A., & Gollnick, S. O. (2011). Peroxiredoxin 1 controls prostate cancer growth through Toll-like receptor 4-dependent regulation of tumor vasculature. *Cancer Research*, 71(5), 1637-1646.
- Rogers, L. K., Leinweber, B. L., & Smith, C. V. (2006). Detection of reversible protein thiol modifications in tissues. *Analytical biochemistry*, 358(2), 171-84.
- Sasaki, K., Bannai, S., & Makino, N. (1998). Kinetics of hydrogen peroxide elimination by human umbilical vein endothelial cells in culture. *Biochimica et biophysica acta*, 1380(2), 275-88.
- Smeets, E. F., Von Asmuth, E. J., Van Der Linden, C. J., Leeuwenberg, J. F., & Buurman, W. A. (1992). A comparison of substrates for human umbilical vein endothelial cell culture. *Biotechnic histochemistry official publication of the Biological Stain Commission*, 67(4), 241-250. Informa Healthcare.
- Smith, William L, & Song, I. (2002). The enzymology of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Prostaglandins other lipid mediators*, 68-69, 115-128.
- Stone, J. R., & Yang, Suping. (2006). Hydrogen peroxide: a signaling messenger. *Antioxidants redox signaling*, 8(3-4), 243-270. Mary Ann Liebert, Inc. 2 Madison Avenue Larchmont, NY 10538 USA.
- Szatrowski, T. P., & Nathan, C. F. (1991). Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Research*, 51(3), 794-798.

- Tamura, M., Seabastian, S., Gurates, B., Yang, Sijun, Fang, Z., & Bulun, S. E. (2002). Vascular Endothelial Growth Factor Up-Regulates Cyclooxygenase-2 Expression in Human Endothelial Cells. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87(7), 3504-3507.
- Tanabe, T., & Tohnai, N. (2002). Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins other lipid mediators*, 68-69, 95-114.
- Tang, J., & Zhang, J. H. (2000). Mechanisms of $[Ca^{2+}]_i$ elevation by H_2O_2 in islets of rats. *Life Sciences*, 68(4), 475-481.
- Tyagarajan, K., Pretzer, E., & Wiktorowicz, J. E. (2003). Thiol-reactive dyes for fluorescence labeling of proteomic samples. *Electrophoresis*, 24(14), 2348-58.
- Unger, R. E., Krump-Konvalinkova, V., Peters, K., & Kirkpatrick, C. J. (2002). In vitro expression of the endothelial phenotype: comparative study of primary isolated cells and cell lines, including the novel cell line HPMEC-ST1.6R. *Microvascular Research*, 64(3), 384-397.
- Ushio-Fukai, M., & Nakamura, Y. (2009). Reactive Oxygen Species and Angiogenesis: NADPH Oxidase as Target for Cancer Therapy. *Cancer*, 266(1), 37-52.
- Ushio-Fukai, M., & Urao, N. (2009). Novel role of NADPH oxidase in angiogenesis and stem/progenitor cell function. *Antioxidants & redox signaling*, 11(10), 2517-33.
- Ushio-Fukai, M., Tang, Y., Fukai, T., Dikalov, S. I., Ma, Y., Fujimoto, M., Quinn, M. T., et al. (2002). Novel role of gp91(phox)-containing NAD(P)H oxidase in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis. *Circulation Research*, 91(12), 1160-1167.
- Wu, G., Luo, J., Rana, J. S., Laham, R., Sellke, F. W., & Li, J. (2006). Involvement of COX-2 in VEGF-induced angiogenesis via P38 and JNK pathways in vascular endothelial cells. *Cardiovascular research*, 69(2), 512-9.
- Wyler Von Ballmoos, M., Yang, Z., Völzmann, J., Baumgartner, I., Kalka, C., & Di Santo, S. (2010). Endothelial Progenitor Cells Induce a Phenotype Shift in Differentiated Endothelial Cells towards PDGF/PDGFR β Axis-Mediated Angiogenesis. (T. Kume, Ed.) *PLoS ONE*, 5(11), 10. Public Library of Science.
- Yasuda, M., Ohzeki, Y., Shimizu, S., Naito, S., Ohtsuru, A., Yamamoto, T., & Kuroiwa, Y. (1999). Stimulation of in vitro angiogenesis by hydrogen peroxide and the relation with ETS-1 in endothelial cells. *Life Sciences*, 64(4), 249-258.

- Zachary, I., & Morgan, R. D. (2011). Therapeutic angiogenesis for cardiovascular disease: biological context, challenges, prospects. *Heart British Cardiac Society*, 97(3), 181-189.
- Zadeh, M. S., Kolb, J.-pierre, Geromin, D., Anna, R. D., Boulmerka, A., Alessio, P. D., Marconi, A., et al. (2000). Regulation of ICAM-1 / CD54 expression on human endothelial cells by hydrogen peroxide involves inducible NO synthase Abstract□: Expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase (iNOS) is stimulated by cyto-. *Journal of Leukocyte Biology*, 67(March).
- Zanetti, M., Katusic, Z. S., & O'Brien, T. (2002). Adenoviral-mediated overexpression of catalase inhibits endothelial cell proliferation. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*, 283(6), H2620-H2626.
- Łuczak, K., Balcerczyk, A., Soszyński, M., & Bartosz, G. (2004). Low concentration of oxidant and nitric oxide donors stimulate proliferation of human endothelial cells in vitro. *Cell Biology International*, 28(6), 483-486.

Anexo

Proteínas identificadas nos géis 2-D relativos aos extractos proteicos totais das HUVEC, por MALDI TOF-TOF pela técnica *Peptide Mass Fingerprint*. Para proteínas de elevada massa molecular não foi possível estimar o seu ponto isoeléctrico (pI).

Proteína	Abreviatura	Código Uniprot³	Aminoácidos	Massa Molecular (kDa)	pI estimado
<i>28S ribosomal protein S15, mitochondrial</i>	RT15	P82914	257	29,8	10,9
<i>Proteínas 40S ribossomal SA</i>	RSSA	P08865	295	32,9	4,59
<i>Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial</i>	AIFM1	O95831	613	66,9	9,26
<i>ATP synthase subunit beta, mitochondrial</i>	ATPB	P06576	529	56,6	5,09
<i>ATPase family AAA domain-containing protein 3B</i>	ATD3B	Q5T9A4	648	72,6	9,48
<i>Beta-enolase</i>	ENOB	P13929	434	46,9	7,66
<i>BRSK1 Serine/threonine-protein kinase</i>	BRSK1	Q8TDC3	778	85,1	9,63
<i>cDNA FLJ54184, highly similar to Tropomyosin alpha-4 chain</i>	B4DVY2	B4DVY2	229	26,2	-
<i>cDNA FLJ60461, highly similar to Peroxiredoxin-2</i>	B4DF70	B4DF70	183	20,1	9,15
<i>cDNA, FLJ92164, highly similar to peroxiredoxin 1</i>	B2R4P2	B2R4P2	199	22,2	8,56
<i>Ciclooxigenase 2</i>	COX-2	P35354	604	69,0	7,03
<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B</i>	CDN1B	P46527	198	22,1	6,61
<i>Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial</i>	QCR1	P31930	480	52,6	5,91
<i>Cytochrome c</i>	CYC	P99999	105	11,7	9,96

³ www.uniprot.org/

Proteína	Abreviatura	Código Uniprot ³	Aminoácidos	Massa Molecular (kDa)	pI estimado
<i>Enolase-like protein ENO4</i>	ENO4	A6NNW6	628	68,8	5,62
<i>Fructose-bisphosphate aldolase</i>	B7Z3K9	B7Z3K9	451	48,4	8,01
<i>Fructose-bisphosphate aldolase A</i>	ALDOA	P04075	364	39,4	8,06
<i>Fructose-bisphosphate aldolase B</i>	ALDOB	P05062	364	39,5	7,79
<i>Glutathione S-transferase A1</i>	GSTA1	P08263	222	25,6	9,26
<i>Glutathione S-transferase A5</i>	GSTA5	Q7RTV2	222	25,7	8,42
<i>Myosin-13</i>	MYH13	Q9UKX3	1938	223,6	5,39
<i>Myosin-3</i>	MYH3	P11055	1940	223,9	-
<i>Peroxiredoxina 1</i>	PRDX1	Q06830	199	22,1	8,23
<i>Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12C</i>	PP12C	Q9BZL4	782	84,9	5,28
<i>Putative cytochrome P450 21-like protein ENSP00000364438</i>	C21AL	A6NCC7	296	33,5	6,42
<i>Serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit beta isoform</i>	2A5B	Q15173	497	57,4	6,26
<i>Sodium/potassium/calcium exchanger 3</i>	NCKX3	Q9HC58	644	72,0	5,02
<i>Stathmin</i>	STMN1	P16949	149	17,3	5,65
<i>Transcription elongation factor A protein-like 4</i>	TCAL4	Q96EI5	215	24,6	4,97
<i>Transgelin-2</i>	TAGL2	P37802	199	22,4	8,45

Proteína	Abreviatura	Código Uniprot³	Aminoácidos	Massa Molecular (kDa)	pI estimado
<i>Tropomyosin alpha-3 chain</i>	TPM3	P06753	284	32,8	4,48
<i>Tropomyosin alpha-4 chain</i>	TPM4	P67936	248	28,5	4,47
<i>Tubulin beta-2A chain</i>	TBB2A	Q13885	445	49,9	4,59
<i>Tubulin beta-2B chain</i>	TBB2B	Q9BVA1	445	50,0	4,59
<i>Tubulin beta-4 chain</i>	TBB4	P04350	444	49,6	4,59
<i>Tubulin beta-2C chain</i>	TBB2C	P68371	445	49,8	4,6
<i>Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 24</i>	UBP24	Q9UPU5	2620	294,4	-
<i>Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 6</i>	UBP6	P35125	1406	158,7	7,5
<i>Uncharacterized protein</i>	-	-	-	-	-
<i>Proteína Zinc finger 646</i>	ZN646	O15015	1829	200,8	-
<i>Zinc finger protein 82 homolog</i>	ZFP82	Q8N141	532	62,6	9,11