

# **Papel da dissulfeto isomerase proteica (PDI) na migração de células musculares lisas vasculares: possível envolvimento de Nox1 NADPH oxidase e RhoGTPases**

**LUCIANA PESCATORE ALVES**

**Orientador: Prof. Dr. Francisco Rafael Martins Laurindo**

**Programa de Cardiologia**

## **Resumo**

Pescatore, LA, Papel da dissulfeto isomerase proteica (PDI) na migração de células musculares lisas vasculares: possível envolvimento de Nox1 NADPH oxidase e RhoGTPases [Tese]. São Paulo. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2011. 89 p.

A migração de células musculares lisas (VSMC) da camada média do vaso para a íntima é essencial para vasculogênese e contribui para o processo de aterosclerose e estenose após lesão por cateter-balão, caracterizando-se como um importante alvo terapêutico. Diversos trabalhos já demonstraram que fatores de crescimento (como PDGF e FGF) estimulam a migração de VSMC, inclusive, muitos desses fatores de crescimento induzem sinalização redox associadas à geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) (ex. Nox1 NADPH oxidase). Nosso grupo já descreveu interações físicas e regulação funcional da NADPH oxidase por uma chaperona redox do retículo endoplasmático, a Dissulfeto Isomerase Protéica (PDI). Contudo, tanto a relevância fisiológica como os mecanismos desta interação ainda não estão claros. O objetivo geral do presente trabalho é investigar por meio de experimentos de perda e ganho de função da PDI, a importância da PDI na migração celular associada à ativação do complexo NADPH oxidase, bem como possíveis mecanismos envolvidos na interação entre a PDI e esse complexo enzimático durante a migração celular. Os objetivos específicos são: i) avaliar o efeito do silenciamento da PDI, bem como da expressão forçada de PDI "wild type" na migração de VSMC in vitro; ii) analisar o

efeito da transfecção de siRNA da PDI atividade e expressão de distintas isoformas da NADPH oxidase vascular e produção de ROS induzida por PDGF; iii) investigar o envolvimento de RhoGTPases na regulação do complexo NADPH oxidase pela PDI. No presente trabalho, mostramos que o PDGF induz redistribuição da PDI e aumento da produção de ROS. O silenciamento da PDI inibe a produção de ROS e a expressão do mRNA da Nox1, sem alterar a expressão do mRNA da Nox4. Mais ainda, o silenciamento da PDI reduz a migração celular induzida por PDGF, em diferentes modelos de migração, enquanto a super-expressão da PDI induz aumento espontâneo da migração na condição basal. Análise utilizando métodos de Biologia de Sistemas de redes de interação física proteína-proteína em bancos de dados e técnicas de análise de centralidade, topologia e ontologia gênica indicou forte convergência entre PDI e proteínas da família das pequenas RhoGTPases e seus reguladores. Em VSMC com silenciamento da PDI, a presença do PDGF induziu uma redução na atividade de Rac1 e RhoA, sem alterar a expressão total destas proteínas. Estudos mostraram que a PDI colocaliza com Rac1 na região perinuclear e co imunoprecipita com Rac1 e RhoA, tanto na presença como na ausência de PDGF. Além disso, ocorreu a interação entre PDI e o regulador de GTPases RhoGDI (inibidor da dissociação da guanina) na condição basal (por microscopia confocal e co-imunoprecipitação), diminuída após estímulo com PDGF. O silenciamento da PDI induziu ainda alterações em estrutura de citoesqueleto: desorganização das fibras de estresse, e redução no número e tamanho de adesões focais e vesículas de adesão marcadas por RhoGDI e Rac1. Assim, os dados apresentados no presente trabalho sugerem que a PDI sustenta a migração de VSMC dependente de sinalização redox e RhoGTPases. Além disso, RhoGTPases podem ser um alvo proximal importante mediando a convergência entre PDI e o complexo NADPH oxidase.

**Descritores:** 1. Isomerase de dissulfetos de proteínas 2. NADPH oxidase 3. Proteínas rho de ligação ao GTP 4. Movimento celular 5. Fator de crescimento derivado de plaquetas 6. Retículo endoplasmático 7. Espécies de oxigênio reativas 8. Superóxidos 9. Peróxido de hidrogênio.