

**ANGÉLICA MASTANDRÉA AMANSO**

**Inibição do proteasoma aumenta o estresse oxidativo e  
bloqueia a resposta da NADPH oxidase a estímulos em  
células musculares lisas vasculares**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de  
São Paulo, para obtenção de título de doutor em Ciências  
Área de concentração: Cardiologia  
Orientação: Prof. Dr. Francisco Rafael Martins Laurindo

São Paulo

2009

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Amanso, Angélica Mastrandréa

Inibição do proteasoma aumenta o estresse oxidativo e bloqueia a resposta da NADPH oxidase a estímulos em células musculares lisas vasculares / Angélica Mastrandréa Amanso. -- São Paulo, 2009.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.  
Departamento de Cardio-Pneumologia.

Área de concentração: Cardiologia.

Orientador: Francisco Rafael Martins Laurindo.

Descritores: 1.NADPH oxidase 2.Estresse oxidativo 3.Isomerase de dissulfeto da proteína 4.Miócitos de músculo liso

USP/FM/SBD-195/09

*Aos meus pais, Paulo e Neusa,  
pela vida, pelo amor,  
pelo apoio incondicional e  
pela fé nos meus estudos.*

*Aos meus irmãos, Ana Lúcia e Alexandre,  
pelo carinho e pelo amor durante toda a minha vida.*

*Ao meu orientador, Professor Francisco Rafael Martins Laurindo, pela oportunidade, pelo respeito, pelo apoio, pelo carinho, pela paciência, pelas discussões científicas intermináveis e por ter sido amigo e pai em muitos momentos dessa nossa jornada, sempre batalhando pelo meu amadurecimento tanto científico quanto pessoal.*

*Ao meu grande amigo de longa data e co-orientador desse trabalho, Dr. Célio Xavier da Costa dos Santos, pela amizade, pelas nossas reflexões calorosas e engraçadas, e pelo apoio fraternal que contribuíram muito na minha jornada acadêmica, desde monitoria na Disciplina de Bioquímica no Instituto de Química da USP, passando pela iniciação científica no laboratório da Professora Ohara Augusto, e por fim durante o meu doutorado no Incor.*

*À minha querida amiga Maria Cristina Thomazella, pela amizade sincera e verdadeira, pela presença sempre tão maternal e tão carinhosa nessa minha jornada.*

*À Professora Kathy K. Griendling, Emory University (EUA), pelo exemplo de cientista, por ter me dado a oportunidade de estagiar no seu laboratório de pesquisa em Atlanta, e ainda por me orientar e ajudar pessoalmente como parte integrante do seu grupo de pesquisa.*

*À Dr. Alejandra San-Martín, Emory University (EUA), pela amizade, por ter me recebido com o coração tão aberto e por tornar a minha estadia em Atlanta fácil e muito agradável.*

*Ao Professor Bernard Lássegue, Emory University (EUA), pela amizade, pelo exemplo e seriedade à pesquisa, por ter me ensinado e me apoiado, e pelas maravilhosas tortas do FarmersMarket em Atlanta.*

*Ao Dr. Joao Wosniak Junior, pela amizade, pelo apoio e auxílio em vários experimentos, em especial aos de Biologia Molecular.*

*À Maria Bertoline, pelas engraçadas e estimadas conversas, pelo apoio e auxílio fundamentais nos experimentos com HPLC.*

*Ao Victor Debbas, pelo apoio e auxílio em muitos experimentos, sem contar nos inúmeros quebra-galhos.*

*À Ana Lúcia Garippo, pelo apoio e auxílio nos experimentos com microscopia confocal.*

*À Neuza, Juliana e Eva, da Secretaria de pós-graduação do Departamento de Cardiologia da FMUSP, pelo apoio e suporte nos trâmites burocráticos da pós-graduação.*

*Aos companheiros do Laboratório de Biologia Vascular e da Unidade de Aterosclerose, pela convivência, pelas discussões científicas, pelo apoio mútuo, e pela troca de experiências que favoreceram meu enriquecimento pessoal.*

*A Deus pela beleza e complexidade da vida e pelas bênçãos que abriram portas durante toda a minha vida.*

Este projeto recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) processos nº 04/13583-5 e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ-Milênio Redoxoma).

# SUMÁRIO

**Lista de Abreviaturas**

**Resumo**

**Summary**

<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>2</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>33</b>
<b>Reagentes .....</b>	<b>33</b>
<b>Cultura celular .....</b>	<b>34</b>
<b>Co-imunoprecipitação da PDI e p22phox.....</b>	<b>34</b>
<b>Eletroforese Bidimensional .....</b>	<b>35</b>
<b>Obtenção de fração de membrana.....</b>	<b>35</b>
<b>Produção/indução de superóxido gerado pela atividade da NADPH oxidase....</b>	<b>36</b>
<b>Preparação do lisado celular e imunoprecipitação .....</b>	<b>38</b>
<b>Western Blot .....</b>	<b>39</b>
<b>Medida GSH/GSSG intracelular por HPLC .....</b>	<b>39</b>
<b>Ensaio de proliferação celular utilizando MTT .....</b>	<b>40</b>
<b>Atividade da Superóxido Dismutase.....</b>	<b>40</b>
<b>Análise da expressão de mRNA das Noxes, p22phox e PDI por PCR quantitativa.....</b>	<b>41</b>



<b>Medida da atividade proteolítica 20S do proteasoma.....</b>	<b>42</b>
<b>Análise do <i>splicing</i> do fator de transcrição XBP1 .....</b>	<b>42</b>
<b>Microscopia Confocal .....</b>	<b>43</b>
<b>Transcrição transitória da PDI.....</b>	<b>43</b>
<b>Análise estatística .....</b>	<b>44</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>46</b>
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>74</b>
<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>83</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>85</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>102</b>
<b><i>CURRICULUM VITAE</i> .....</b>	<b>128</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANGII	Angiotensina
BSA	Albumina bovina sérica
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propane-sulfonate
DHE	dihidroetidina, hidroetidina, dihidroetídio
DTT	Dithiothreitol
DTPA	N,N,N',N''-penta-acetato-dietilenotriamina
E/DHE	razão etídio/DHE consumida
2-EOH	2-hidroxietídio
EOH/DHE	razão 2-hidroxietídio/DHE consumida
EDTA	etilenodiaminatetraacetato de sódio dihidratado
EGTA	etileno-bis(oxietilenonitrila)tetraacetato de sódio
EO	estresse oxidativo
ERAD	degradação de proteínas dependente do RE
ERE	estresse do retículo endoplasmático
F12	<i>F-12 Coon's Modification</i>
GRP	<i>glucose-regulated protein</i>
HRP	peroxidase de rabanete
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrogênio
HPLC	cromatografia de alta performance
Lacta	Lactacistina

## Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

