



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO  
CAMPUS DIADEMA



BIANCA RODRIGUES CARDOSO PELITZ

A Imunoprecipitação como Método de Purificação de Nitrotirosinas

DIADEMA

2019

BIANCA RODRIGUES CARDOSO PELITZ

## A Imunoprecipitação como Método de Purificação de Nitrotirosinas

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como exigência parcial para obtenção do título de Bacharel em Farmácia e Bioquímica, ao Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas da Universidade Federal de São Paulo – Campus Diadema.

Orientadora: Profa. Dra. Liliam Fernandes.

DIADEMA

2019

Rodrigues Cardoso Pelitz, Bianca  
A Imunoprecipitação como Método de Purificação de Nitrotirosinas /  
Bianca Rodrigues Cardoso Pelitz. – – Diadema, 2019.  
53 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) -  
Universidade Federal de São Paulo – Campus Diadema, 2019.

Orientador: Liliam Fernandes

1. Imunoprecipitação. 2. Nitrotirosina. I. Título.

CDD 543.8

BIANCA RODRIGUES CARDOSO PELITZ

A Imunoprecipitação como Método de Purificação de Nitrotirosinas

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como exigência parcial para obtenção do título de Bacharel em Farmácia e Bioquímica, ao Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas da Universidade Federal de São Paulo – Campus Diadema.

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Liliam Fernandes – UNIFESP

---

Prof. Dr. Julio Cezar Franco de Oliveira – UNIFESP

---

Profa. Dra. Patrícia Santos Lopes - UNIFESP

Dedico este trabalho à minha querida professora e orientadora: por todos os ensinamentos, pela grande paciência e por toda sua dedicação.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e família.

Aos meus colegas André, Julia, Gabriela, Yan e Henrique.

Ao querido Daniel.

## RESUMO

A imunoprecipitação, considerada uma adaptação da cromatografia de afinidade, utiliza anticorpos de alta especificidade para isolar proteínas alvo (antígenos). A combinação dessa técnica com a análise por Western Blot fornece maior especificidade para identificar proteínas de baixa ocorrência, além de aumentar a sensibilidade da detecção. As nitrotirosinas são proteínas significantes no processo de estresse oxidativo e nitrosativo. Nos vasos sanguíneos, a nitração de resíduos de tirosina a partir de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio pode levar a alterações importantes na sinalização celular, promovendo a disfunção endotelial e consequente prejuízo a toda a rede circulatória. Nesse contexto, o presente trabalho descreve detalhadamente a sinalização redox e a geração de nitrotirosinas no endotélio vascular, e, paralelamente, apresenta e comenta a implantação da técnica de imunoprecipitação de nitrotirosinas em células endoteliais em cultura, seguida da detecção dessas proteínas por método de Western Blot. Inicialmente as culturas foram subcultivadas e, ao atingirem estágio de semiconfluência, foram expostas a agentes vasoativos durante 24 horas. Os agentes empregados foram: 1) Angiotensina II, um peptídeo endógeno vasoconstritor, descrito na literatura como um agente pró-oxidante em vários tipos celulares, e 2) Luteolina, um flavonoide da classe das flavonas, presente em vários alimentos, e descrito na literatura como um agente antioxidante. As culturas celulares foram então coletadas, as proteínas totais foram quantificadas, e as amostras foram submetidas à imunoprecipitação em gel de agarose previamente incorporado com anticorpos anti-nitrotirosina. A quantidade de proteínas nas amostras se mostrou adequada para o prosseguimento do ensaio, demonstrando que medição foi realizada de maneira correta. A fração eluída foi então submetida a eletroforese, seguida de transferência para membrana de nitrocelulose e posterior incubação com os anticorpos primário (anti-nitrotirosina) e secundário correspondente. A separação das proteínas ocorreu de forma satisfatória e foi possível observar o marcador de peso molecular na membrana de nitrocelulose, indicando que o procedimento de transferência do Western Blot foi realizado com sucesso. A revelação da membrana foi feita por quimioluminescência e detectada em fotodocumentador. A revelação demonstrou que o método de imunoprecipitação de nitrotirosinas foi implantado com sucesso: a marcação de peso molecular foi bem-sucedida, assim como os controles negativo e positivo. Foram detectadas marcações em todas as amostras experimentais. Todos os passos

do procedimento foram bem definidos e adequadamente estabelecidos. A metodologia da imunoprecipitação de nitrotirosinas em células endoteliais cultivadas foi implantada e padronizada com sucesso. Essa abordagem será valiosa no estudo da ação de substâncias pró- e antioxidantes sobre o endotélio vascular, e poderá ser empregada em futuros projetos do Laboratório de Farmacologia Vascular.



## ABSTRACT

Immunoprecipitation, considered an adaptation of affinity chromatography, uses antibodies of high specificity to isolate target proteins (antigens). The combination of this technique with Western Blot analysis provides greater specificity to identify low occurrence proteins as well as increases detection sensitivity. Nitrotyrosines are significant proteins in the process of oxidative and nitrosative stress. In the blood vessels nitration of tyrosine residues from oxygen and nitrogen reactive species can lead to important alterations in cellular signaling, promoting endothelial dysfunction and consequent damage to the entire circulatory network. In this context, the present work describes in detail the redox signaling and the generation of nitrotyrosines in the vascular endothelium, and, in parallel, presents and comments the implantation of the immunoprecipitation technique of nitrotyrosines in endothelial cells in culture, followed by detection of these proteins by Western Blot method. Initially the cultures were sub cultured and, upon reaching a semi confluence stage, were exposed to vasoactive agents for 24 hours. The agents used were: 1) Angiotensin II, an endogenous vasoconstrictor peptide, described in literature as a pro-oxidant agent in several cell types, and 2) Luteolin, a flavonoid of the flavone class present in several foods, and described in literature as an antioxidant agent. Cell cultures were then collected, total proteins quantified, and samples were subjected to immunoprecipitation with agarose gel previously incorporated with anti-nitrotyrosine antibodies. The amount of protein in the samples proved to be adequate for the continuation of the assay, demonstrating that measurement was performed correctly. The eluted fraction was then subjected to electrophoresis, followed by transfer to nitrocellulose membrane and subsequent incubation with the corresponding primary antibody (anti-nitrotyrosine) and corresponding secondary antibody. Protein separation occurred satisfactorily and it was possible to observe the molecular weight marker on the nitrocellulose membrane, indicating that the Western Blot transfer procedure was successfully performed. The membrane was revealed by chemiluminescence and detected by photodocumentation. The revelation demonstrated that the nitrotyrosine immunoprecipitation method was successfully implanted: molecular weight marking was successful, as the negative and positive controls. Markers were detected in all experimental samples. All steps of the procedure were well defined and adequately established. The methodology of immunoprecipitation of nitrotyrosines in cultured endothelial cells was

successfully implanted and standardized. This approach will be valuable in the study of the action of pro-and antioxidant substances on the vascular endothelium, and may be used in future projects of the Laboratory of Vascular Pharmacology.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Dynabeads® .....	20
Figura 2 – Papel do aumento da concentração de cálcio citosólico na liberação de EDRFs.....	24
Figura 3 – Principais vias bioquímicas envolvidas na geração / destruição de espécies reativas de oxigênio e seus efeitos em células vasculares.....	28
Figura 4 – Geração de nitrotirosina através do radical tirosil.....	29
Figura 5 – Resumo esquemático do papel do estresse oxidativo vascular na hipertensão.....	35
Figura 6 – Células endoteliais em cultura, aumento em 200x.....	38
Figura 7 – Curva padrão para dosagem de proteínas com BSA: Absorbância x Concentração.....	42
Figura 8 – Início do Western Blot: eletroforese das amostras em gel de poliacrilamida 10%.....	43
Figura 9 – Transferência das proteínas nitradas do gel para a membrana de nitrocelulose.....	43
Figura 10 – Membrana de nitrocelulose contendo as proteínas nitradas para incubação com anticorpo.....	44
Figura 11 – Revelação da membrana incubada.....	45

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Afinidade das proteínas A e G para várias subclasses de imunoglobulinas do tipo IgG.....	17
Tabela 2 – Afinidade das proteínas A e G para imunoglobulinas de várias espécies.....	18
Tabela 3 – Quantificação de proteínas nas células após incubação por 24 horas.....	41

## SUMÁRIO

1. Introdução.....	13
1.1 O Fundamento da Imunoprecipitação.....	16
1.2 As Espécies Reativas e o Óxido Nítrico.....	21
1.3 A Nitração de Tirosinas.....	28
1.4 O Endotélio Vascular e o Estresse Oxidativo/Nitrosativo.....	31
1.5 A Angiotensina II e o Flavonoide Luteolina.....	35
1.6 Justificativa.....	36
2. Objetivo.....	37
3. Materiais e Metodologias.....	37
4. Resultados e Discussão.....	41
5. Conclusão.....	45

## 1. Introdução

A imunoprecipitação é um método usado para purificar e detectar modificações de proteínas, como as nitrotirosinas. Essa técnica é considerada uma adaptação da cromatografia de afinidade, e utiliza anticorpos de alta especificidade para isolar proteínas alvo (antígenos) de misturas de amostras complexas, cuja fonte pode ser celular ou de tecidos, ou proteínas traduzidas *in vitro*. Os anticorpos podem se ligar não covalentemente a imunoabsorventes como agarose de proteína A ou de proteína G, usadas dependendo da espécie fonte de imunoglobulina, ou podem ser covalentemente acopladas a uma matriz de fase sólida. A combinação da imunoprecipitação com análise por Western Blot pode fornecer maior especificidade para identificar essas proteínas, além de aumentar a sensibilidade da detecção das proteínas imunoprecipitadas e reconhecimento de proteínas de baixa abundância. As variantes dessa técnica incluem a co-imunoprecipitação, quando o antígeno está ligado a outras proteínas, e a técnica de beads magnéticos revestidos com anticorpos.

Radicais livres são quaisquer átomos ou moléculas com número ímpar de elétrons na camada de valência (última camada eletrônica), e as duas principais classes são as Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) e as Espécies Reativas de Nitrogênio (RNS). As espécies reativas em geral são produzidas em baixas concentrações nas células em condições fisiológicas, já o aumento da produção dessas espécies está intimamente relacionado com patologias cardiovasculares. Ao aumentar a produção ou prejudicar a degradação dessas espécies, a disponibilidade de óxido nítrico diminui e, portanto, favorece a atividade de fatores vasoconstritores.

O óxido nítrico (NO) é um gás solúvel e radical livre de meia vida curta, além de ser o principal regulador parácrino do tônus vascular. Sua síntese ocorre em diversos tipos celulares através da enzima óxido nítrico sintase (NOS). Existem três isoformas da enzima NOS, e que são codificadas por diferentes genes: NOS neuronal (nNOS ou NOS-1), NOS induzível por citocinas (iNOS ou NOS-2) e NOS endotelial (eNOS ou NOS-3). Uma vez sintetizado intracelularmente pela eNOS, o óxido nítrico derivado do endotélio difunde-se para a camada muscular lisa do vaso, levando a inibição do processo contrátil. Além de efeito no tônus do músculo liso vascular, o NO derivado do endotélio também inibe a proliferação e diferenciação da parede muscular lisa vascular, síntese de proteínas da matriz extracelular, inibição e

dissolução de agregados plaquetários e leucocitários, e inibição da expressão de moléculas de adesão.

O ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), assim como os outros fatores produzidos pela célula endotelial em condições fisiológicas, é produzido de forma controlada e em baixas concentrações. Alguns papéis pró-inflamatórios do ânion superóxido são: dano na célula endotelial e aumento da permeabilidade microvascular, formação de sítios de inflamação, destruição autocatalítica de neurotransmissores e hormônios como noradrenalina e adrenalina, geração de peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) – um oxidante citotóxico e altamente reativo – além de também ter a capacidade de nitrar e desativar a enzima manganês superóxido dismutase MnSOD (responsável por transformar o radical superóxido em não tóxico), perpetuando a resposta inflamatória. A principal fonte de  $O_2^{\cdot-}$  é a família da NAD(P)H oxidase (NOX). O  $ONOO^-$  causa danos a células hospedeiras e tecidos, como oxidação lipídica, dano ao DNA, e modificação de proteínas via nitração de tirosinas e outros constituintes celulares. Por ser considerado um marcador do estresse oxidativo, tem suas concentrações elevadas associadas a disfunções celulares do endotélio vascular. O  $ONOO^-$  é capaz de formar o radical hidroxila ( $\cdot OH$ ), o que possivelmente é responsável por modificações celulares como lipoperoxidação, nitração de resíduos de tirosina em proteínas fundamentais do endotélio, como a PGI<sub>2</sub> sintase, além da oxidação de BH<sub>4</sub>, indução de iNOS e oxidação da própria eNOS, levando à disfunção vascular

A tirosina é um aminoácido não essencial e membro do grupo de aminoácidos aromáticos (os outros sendo fenilalanina e triptofano). A formação de 3-NT (ácido 2-amino-3-(4-hidroxi-3-nitrofenil) propanoico) é uma modificação pós-translacional covalente na qual a tirosina é a proteína alvo, mediada principalmente por  $ONOO^-$ . Essa modificação leva a consequências, incluindo modulação de cascatas de fosforilação, afetando função proteica e induzindo resposta imunológica. Portanto, nitrotirosina é um marcador do estresse nitrosativo. Suas consequências biológicas incluem efeito na função proteica, resultando em perda, aumento, ou até mesmo nenhum efeito em sua função, sensibilidade à degradação proteolítica, influência na fosforilação de tirosina e imunogenicidade.

O endotélio vascular possui a capacidade de gerar as espécies reativas de oxigênio e as espécies reativas de nitrogênio, e é reguladora fundamental da fisiologia vascular e da homeostase. O endotélio íntegro contribui na modulação do tônus e da estrutura da

musculatura lisa vascular, intervém na coagulação sanguínea e agregação plaquetária, age na resposta inflamatória e promove o crescimento de novos vasos sanguíneos (angiogênese). As interações dos mediadores vasodilatadores e vasoconstritores dependentes do endotélio são cruciais para a regulação do fluxo sanguíneo, da pressão arterial e da perfusão tissular, tanto em condições fisiológicas quanto patológicas. Sendo assim, o desequilíbrio entre as vias pró-oxidantes e antioxidantes relaciona-se diretamente ao desenvolvimento de doenças do sistema circulatório, especialmente a hipertensão arterial.

A Angiotensina II (AngII), um Fator Constritor Derivado do Endotélio, promove efeitos hipertensores agindo diretamente em receptores específicos, indiretamente através da liberação de outros fatores vasoativos, e por meio de interações com vias intracelulares estimuladas por outros agentes. A intensificação do sinal de AngII gera uma maior quantidade de  $O_2^{\cdot-}$  e  $H_2O_2$ , os quais ativam mais proteínas sensíveis a reações de redução-oxidação. Em vista do grande impacto da AngII na promoção de estresse oxidativo endotelial, muitos estudos têm sido realizados para a validação do emprego de antioxidantes para a proteção vascular. Dentre esses antioxidantes, destaca-se a Luteolina (3,4,5,7-tetrahidroxil-flavona), um flavonoide que interfere diretamente em diferentes vias de sinalização intracelular, alterando a expressão e/ou atividade de enzimas envolvidas na geração e degradação de espécies reativas de oxigênio, especialmente eNOS e NAD(P)H oxidase.



## 1.1. O Fundamento da Imunoprecipitação

Muitos métodos imunológicos foram desenvolvidos para a detecção de modificações de proteínas como as nitrotirosinas. Tais métodos para identificação e quantificação dessas proteínas são muito importantes, pois ajudam a assignar papéis fundamentais à nitrotirosina e facilitar o diagnóstico de doenças inflamatórias (HADDAD et al., 1994; ZHAN; DESIDERIO, 2009) (DEKKER et al., 2012). Um elemento chave para a quantificação de 3-nitrotirosina (principal produto da nitração de tirosinas) em amostras biológicas é uma sensibilidade satisfatória e a produção de anticorpos específicos de alta pureza (TSIKAS, 2017; FOLKERSEN et al., 1978).

MacMillan-Crow e Thompson foram os primeiros a descrever um método para a imunoprecipitação de proteínas contendo nitrotirosinas baseado no uso de anticorpos monoclonais anti-nitrotirosinas seguido por SDS-PAGE (extração e análise eletroforética em gel de poliacrilamida) e análise de Western Blot; a imunoprecipitação com anticorpos anti-nitrotirosina é a técnica preferida para detectar proteínas tirosinas nitradas desconhecidas em tecidos (GUO et al, 2003). Apesar disso, essa técnica não discrimina proteínas com pontos isoelétricos muito básicos ou proteínas de membrana, e seu inconveniente está em ser longo (16h de incubação), usar mais anticorpo que na análise típica de Western Blot (ABELLO et al., 2009) e a recuperação e microsequenciamento de proteínas com massas moleculares semelhantes às do reagente será restrito. Esforços atuais para imobilizar covalentemente o reagente em uma forma reticulada da agarose são projetados para contornar este problema (MACMILLAN-CROW; THOMPSON, 1999)

A imunoprecipitação é considerada uma adaptação da técnica de cromatografia de afinidade, e se utiliza da especificidade de anticorpos para isolar proteínas alvo (antígenos) de misturas de amostras complexas. Nessa técnica um antígeno é isolado por se ligar a um anticorpo específico anexado a uma matriz sedimentada e formar um complexo imunológico. A fonte de antígeno para imunoprecipitação pode ser celular ou de tecidos, ou proteínas traduzidas in vitro. Tanto anticorpos policlonais quanto monoclonais de várias espécies animais podem ser usadas em protocolos de imunoprecipitação. Anticorpos podem se ligar não covalentemente a imunoabsorventes como agarose de proteína A ou proteína G, ou

podem ser covalentemente acoplados a uma matriz de fase sólida. (BONIFACINO; DELL'ANGELICA; SPRINGER, 2006).

A proteína A e a proteína G são proteínas bacterianas: a proteína A é expressa em *Staphylococcus aureus* e a proteína G é expressa em *Streptococcus sp.* (ROCKLAND, 2019) Elas são melhores escolhas para a purificação de anticorpos, pois ambos são estáveis e seletivos. As imunoglobulinas do tipo IgG de múltiplas espécies se ligam a eles, permitindo que o anticorpo seja capturado aos *beads* de proteína. Os subtipos de IgG possuem afinidades variáveis a proteína A e a proteína G, e a força de ligação é determinada pela espécie ou pelas propriedades da cadeia pesada (TRIEU; TARGOFF, 2015). Em ambas as proteínas, o maior sítio de ligação em IgG é localizado na parte Fc do anticorpo, porém a proteína G se liga a todas as subclasses de IgG humanas e de rato (ROCKLAND, 2019; KABOORD; PERR, 2008) enquanto que proteína A geralmente só se liga a IgG1, IgG2 e IgG4, mas não IgG3. Porque Arg435 em IgG3 é responsável pela falta de ligação a proteína A, alótípos IgG3 com histidina em vez de arginina na posição 435 se liga a proteína A (RISPENS; VIDARSSON, 2014). Sendo assim, a proteína G é uma escolha melhor para uma captura mais abrangente de anticorpos (ROCKLAND, 2019), entretanto é mais cara do que a proteína A (KABOORD; PERR, 2008).

Tabela 1 – Afinidade das proteínas A e G para várias subclasses de imunoglobulinas do tipo IgG

Antibody	Protein A	Protein G
Human IgG <sub>1</sub>	++++	++++
Human IgG <sub>2</sub>	++++	++++
Human IgG <sub>3</sub>	-	++++
Human IgG <sub>4</sub>	++++	++++
Rat IgG <sub>1</sub>	-	+
Rat IgG <sub>2a</sub>	-	++++
Rat IgG <sub>2b</sub>	-	++
Rat IgG <sub>2c</sub>	+	++
Mouse IgG <sub>1</sub>	+	++++
Mouse IgG <sub>2a</sub>	++++	++++
Mouse IgG <sub>2b</sub>	+++	+++
Mouse IgG <sub>3</sub>	++	+++

Fonte: SIGMA-ALDRICH, 2016

Tabela 2 – Afinidade das proteínas A e G para imunoglobulinas de várias espécies

Antibody	Protein A	Protein G
Human	++++	++++
Horse	++	++++
Cow	++	++++
Pig	+++	+++
Sheep	+/-	++
Goat	-	++
Rabbit	++++	+++
Chicken	-	+
Hamster	+	++
Guinea pig	++++	++
Rat	+/-	++
Mouse	++	++

Fonte: SIGMA-ALDRICH, 2016

A cromatografia de afinidade envolve a passagem da amostra e outras soluções através de uma coluna cheia de resina porosa (tipicamente agarose) aberta em ambos os lados, na qual o anticorpo específico para um alvo também é imobilizado. Ao passar pela coluna, a proteína de interesse se liga temporariamente à coluna de forma específica, e todo o material restante é descartado do sistema. Em seguida, é realizada a lavagem da coluna com uma solução tampão, em geral, de pH mais baixo, competindo pelas ligações da coluna e eluindo a proteína de interesse, que é então coletada em um coletor de frações ou através de uma válvula de fracionamento. Após o equilíbrio do sistema com a solução tampão de pH neutro, a amostra é injetada e a proteína de interesse é retida na coluna por afinidade. A solução tampão então arrasta todos os outros materiais indesejados para fora da coluna e do sistema, direcionando-os para o descarte. Após a coleta do descarte, a solução tampão de pH mais baixo é injetada no sistema, que gradualmente vai aumentando sua condutividade. Quando a concentração salina na coluna atinge o nível ideal para eluir a proteína de interesse, ela é arrastada da coluna e é detectada pelo detector. Em seguida, a solução tampão de equilíbrio do sistema é reinjetada, de forma a lavar todo o sistema e a coluna, deixando os sítios ativos novamente disponíveis para uma nova injeção de amostra (DCTECH, 2019)

Já a imunoprecipitação, ao invés de usar uma coluna cheia de resina, utiliza uma pequena quantidade de resina contida dentro de um tubo de microcentrífuga. Para cada passo do ensaio, a solução é adicionada aos *beads*, os quais são então misturados e incubados

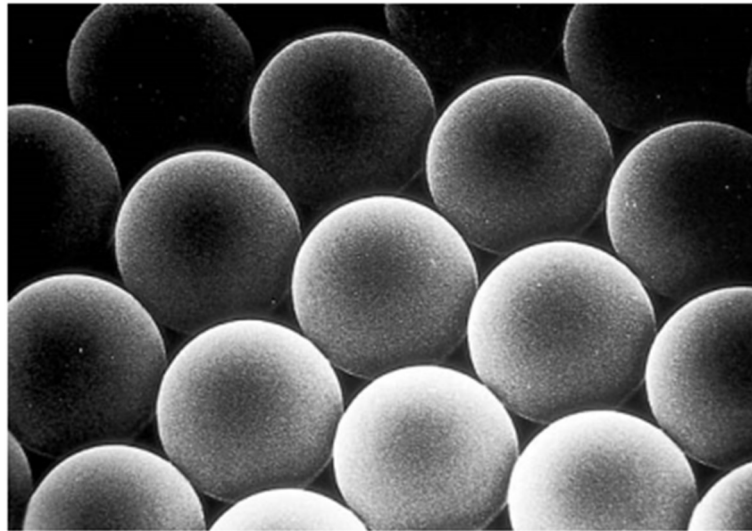
juntos. No fim de cada incubação, os *beads* são transformados em pellets e vão para o fundo do tubo por centrifugação (ou imã), para que a solução possa ser removida usando uma pipeta (THERMOFISHER, 2019). Caso o antígeno esteja ligado a outras proteínas, elas também serão transformadas em *pellets*, o que é conhecido como co-imunoprecipitação.

Existem muitas vantagens em usar a imunoprecipitação: usá-la pode fornecer um ensaio mais sensível para visualizar as proteínas tirosinas nitradas que não são detectáveis em lisados de células inteiras (tecido) usando a análise convencional de Western Blot. Essa técnica também permite a identificação de alvos precisos da nitração quando usado em combinação com técnicas de microsequenciação e Western Blot. (MACMILLAN-CROW; THOMPSON, 1999)., a combinação de imunoprecipitação com Western Blot pode fornecer maior especificidade para a identificação de proteínas, além de aumentar a sensibilidade da detecção de proteínas imunoprecipitadas e o reconhecimento de proteínas de baixa abundância, como é o caso das nitroproteínas (TRIEU; TARGOFF, 2015).

O Western Blot é comumente usado para separar e identificar proteínas. Nessa técnica, uma mistura de proteínas é separada com base no peso molecular através de eletroforese em gel de poliacrilamida. Essas proteínas são então transferidas para uma membrana de nitrocelulose. A membrana é incubada com anticorpos específicos para a proteína de interesse e os anticorpos não ligantes são lavados, deixando apenas os anticorpos ligantes à proteína de interesse. Os anticorpos ligantes são detectados por quimioluminescência. A quantificação da proteína de interesse pode então ser realizada por densitometria. Em geral, emprega-se um padrão de peso molecular (proteínas de tamanho conhecido) para correlação com a proteína em estudo (MAHMOOD; YANG, 2012).

Uma técnica muito eficiente que também pode ser utilizada dentro do contexto da imunoprecipitação é a técnica baseada na separação das células pelo uso de *beads* magnéticos. Os chamados Dynabeads<sup>®</sup> ganharam importância devido sua natureza não tóxica e sua capacidade de serem revestidos de anticorpos. Também podem ser utilizados através das duas técnicas, a baseada em colunas e a baseada em tubos. A tecnologia baseada em colunas utiliza partículas menores (tamanho nano), e portanto requer que as células passem através de uma coluna magnetizada com malha de ferro para aumentar a capacidade de capturar células, enquanto que a baseada em tubos utiliza partículas maiores (tamanho micron).

Figura 1 – Dynabeads®



Fonte: NEURAUTER et al., 2007, p. 43

As células específicas, após se ligarem aos *beads* magnéticos revestidos com anticorpos, são separadas pelo uso de apenas um ímã que é segurado contra o tubo contendo a amostra. Há dois principais tipos de isolamento de um tipo específico de célula: o isolamento positivo e o isolamento negativo.

Pelo isolamento positivo, um único tipo de célula é diretamente isolado de uma mistura complexa de células usando anticorpos específicos ou ligantes conectados aos *beads* magnéticos. Os anticorpos ou ligantes podem estar covalentemente ligados diretamente aos *beads* magnéticos ou – para maior flexibilidade – via anticorpos secundários. Os complexos imunes resultantes de *beads* revestidos com anticorpos e células alvo são coletados usando um ímã. Para estudos funcionais, os *beads* devem ser removidos das células isoladas positivamente. Há algumas maneiras pelas quais os Dynabeads® podem ser liberados das células após o isolamento, usando certas moléculas que através da competição pela ligação por afinidade soltam os *beads* ou complexos *beads*-anticorpos da célula de interesse.

O isolamento positivo pode ser performed a partir de duas abordagens, a técnica direta ou a técnica indireta. Na direta, a ligação do anticorpo primário ou ligante aos *beads* é feita antes do isolamento celular. Os *beads* revestidos com anticorpo primário são misturados com a amostra e após o período de incubação, as células se ligam ao *beads* e são facilmente coletadas com o ímã. Na indireta, a amostra é primeiro misturada com o anticorpo primário (ou outra molécula ligante, definindo o alvo), e após a incubação, o excesso de anticorpo pode

ser removido por centrifugação. Os *beads* revestidos com anticorpo secundário são então misturados com a amostra e durante a incubação as células de interesse irão se ligar aos *beads*, podendo ser isoladas pelo ímã. A técnica direta tem a vantagem de poder ser usada com amostras como o sangue, especialmente quando são usados anticorpos tem alta afinidade.

Pelo isolamento negativo, todas as células não desejadas sensibilizadas com anticorpos são removidas da amostra pela ligação aos *beads* magnéticos. Geralmente um coquetel de anticorpos monoclonais contra as células não desejadas são incubados com a amostra, seguido de depleção dessas células usando *beads* revestidos com anticorpos secundários. As células alvo isoladas negativamente não foram ligadas aos anticorpos em nenhum momento, o que se torna uma vantagem já que anticorpos ligados a antígenos de superfície podem provocar a transmissão de sinais através da membrana celular. Fatores como o tempo de incubação, temperatura e concentração dos reagentes podem interferir na eficiência do isolamento de forma mensurável. Além disso, o processo também é afetado por parâmetros específicos, como a natureza e o estado da célula alvo, característica da ligação antígeno-anticorpo, tipo de amostra, concentração, e proporção entre *beads* e células. Anticorpos monoclonais são geralmente recomendados, devido a sua alta especificidade perante o antígeno alvo. De maneira a alcançar um tipo de espécie celular de baixa abundância, é recomendado a combinação do isolamento positivo com o negativo (NEURAUTER et al., 2007).

## **1. 2 As Espécies Reativas e o Óxido Nítrico**

Radicais livres são quaisquer átomos ou moléculas com número ímpar de elétrons na camada de valência (última camada eletrônica), ou seja, possuem elétrons desemparelhados que os tornam instáveis e altamente reativos no organismo humano. São duas as principais classes de radicais livres, que são assim identificadas de acordo com o átomo presente no grupo mais reativo ou que origina a molécula: as Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) e as Espécies Reativas de Nitrogênio (RNS). As ROS são originadas pela redução do oxigênio, enquanto que as RNS são derivadas do radical livre óxido nítrico (FRANCO; ESTÉVEZ, 2014).

As espécies reativas em geral são produzidas em baixas concentrações nas células em condições fisiológicas, e é bem documentado que nessas condições podem agir como

mensageiros a níveis de sinalização celular. Já o aumento da produção dessas espécies está intimamente relacionado com patologias cardiovasculares. (FRANCO; ESTÉVEZ, 2014).

A superprodução endotelial de ROS e RNS pode ocorrer a partir de duas vias: (1) por via enzimática [NAD(P)H oxidase], xantina oxidase [XO], lipoxigenase [LOX], ciclooxigenase [COX] e óxido nítrico sintase endotelial [eNOS]) ou (2) por via não enzimática através de forças mecânicas, como o *shear stress* do fluxo sanguíneo turbulento e o estiramento do vaso em consequência da maior pressão no lúmen vascular (VASCONCELOS et al., 2007). Essa abundância, em condições como a hipertensão, pode resultar tanto do aumento da produção, quanto da degradação prejudicada dessas espécies (LASSÈGUE; GRIENGLING, 2004), o que diminui a disponibilidade de óxido nítrico e, portanto, favorece a atividade de fatores vasoconstritores (VASCONCELOS et al., 2007). Apesar de todas as células possuírem níveis basais de modificações oxidativas no DNA (OSTEROD et al., 2001), em grandes concentrações, ROS levam à destruição das estruturas celulares, lipídeos, membranas, proteínas e ácidos nucleicos.

O óxido nítrico (NO) é um gás solúvel e radical livre de meia vida curta, além de ser o principal regulador parácrino do tônus vascular. Sua síntese ocorre em diversos tipos celulares através da enzima óxido nítrico sintase (NOS), que catalisa a oxidação do terminal guanidina-nitrogênio do aminoácido L-arginina (L-arg) para formar L-citrulina e NO. Sua ativação depende da presença de cofatores como a 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>), a flavina mononucleotídeo (FMN), a flavina adenina dinucleotídeo (FAD), a nicotinamida-adenina-dinucleotídeo fosfato reduzida (NAD(P)H) e o consumo de oxigênio molecular (FÖSTERMANN; SESSA, 2012). A L-arg, substrato da NOS, é um aminoácido catiônico dibásico que constitui diversas proteínas no organismo e está envolvida em diversas cascatas metabólicas importantes, como por exemplo o ciclo da ureia.

Existem três isoformas da enzima NOS, e que são codificadas por diferentes genes: NOS neuronal (nNOS ou NOS-1), NOS induzível por citocinas (iNOS ou NOS-2) e NOS endotelial (eNOS ou NOS-3) (VANHOUTTE et al., 2016). A estrutura das isoformas é composta por dois domínios: um domínio oxigenase, que contém sítios de ligação para L-arg e BH<sub>4</sub>, e um domínio redutase, que contém sítios de ligação para FAD, FMN e NAD(P)H, acoplados entre si por um sítio de reconhecimento para calmodulina (CaM). As isoformas eNOS e nNOS tem como particularidade a dependência do aumento dos níveis de cálcio intracelular (Ca<sup>2+</sup>) para a

ligação da CaM em seu sítio específico, formação do complexo NOS-CaM e ativação da enzima (FÖSTERMANN; SESSA, 2012). Além disso, a eNOS pode ser inibida competitivamente pela L-arg e seus análogos (VANHOUTTE, 2003).

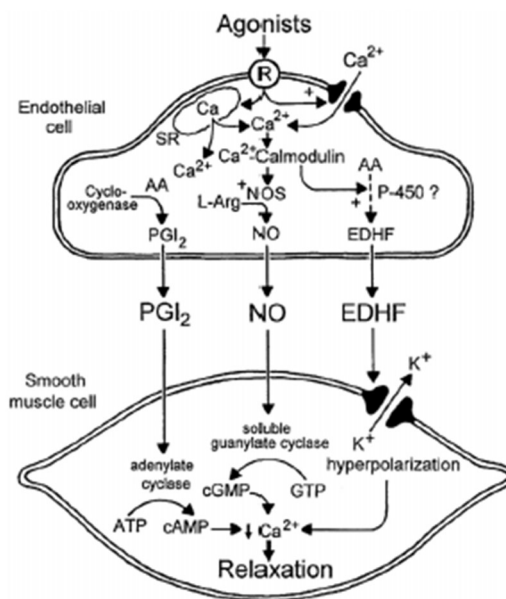
As isoformas da NOS geralmente estão associadas em homodímeros intimamente relacionados à proteína CaM e dependem da L-arg e do BH<sub>4</sub> para formação e estabilidade dos dímeros. De fato, BH<sub>4</sub> é essencial para a ativação e dimerização de todas as isoformas: a redução na biodisponibilidade desse cofator pode causar a produção de ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>) ao invés de NO (SCHULZ et al., 2008). Além disso, BH<sub>4</sub> pode ser oxidado para formar BH<sub>2</sub>, um produto inativo que ocupa o sítio de BH<sub>4</sub> na enzima, determinando seu desacoplamento e produção de O<sub>2</sub><sup>·-</sup> e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (VÁSQUEZ-VIVAR et al., 2002, CRABTREE et al., 2009; VASCONCELOS et al., 2007).

Apesar da iNOS ser induzível e nNOS também estar presente na parede do vaso sanguíneo, eNOS é a maior fonte de óxido nítrico derivado do endotélio (VANHOUTTE et al., 2016). Na célula endotelial, a enzima eNOS está localizada em pequenas invaginações da membrana celular conhecidas como cavéolas, microdomínios que concentram grande variedade de moléculas sinalizadoras (FÖSTERMANN; SESSA, 2012). A adição de um grupo fosfato (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) em eNOS por quinases (fosforilação) modulam a atividade da enzima, já a remoção desse mesmo grupo é realizada por proteínas fosfatases. Diferentes sítios de fosforilação podem ter efeitos opostos: fosforilação em Ser1177 (ou Ser1179 dependendo da espécie) ativa enquanto que em Thr495 inibe a enzima. (VANHOUTTE et al., 2016)

Uma vez sintetizado intracelularmente pela eNOS, o óxido nítrico derivado do endotélio difunde-se para a camada muscular lisa do vaso, causando a estimulação da enzima citosólica guanilil ciclase solúvel (GCs) (STONE; MARLETTA, 1995), que catalisa a produção de 3,5-guanosina monofosfato cíclico (GMPc) (IGNARRO et al., 1987), ativação da proteína quinase G (PKG) que, dentre outras funções, fosforila a quinase da cadeia leve da miosina, tornando-a inativa e levando a inibição do processo contrátil (RAPOPORT; MURAD, 1983a,b). Ainda, uma segunda via de ação da PKG é a ativação de canais de potássio (K<sup>+</sup>), ocasionando hiperpolarização e conseqüente relaxamento (ARCHER et al., 1994). O GMPc, por sua vez, é capaz de produzir efeitos independentes da PKG, como a ativação de fosfodiesterases (PDE) 5, enzima capaz de destruir o GMPc, funcionando como uma espécie de retroalimentação negativa (RYBALKIN et al., 2003).



Figura 2 – Papel do aumento da concentração de cálcio citosólico na liberação de EDRFs



Fonte: VANHOUTTE, 2003, p. 572

Além de efeito no tônus do músculo liso vascular, o NO derivado do endotélio também exerce efeitos locais pela sua liberação no lúmen do vaso sanguíneo. Tais efeitos incluem a inibição da proliferação e diferenciação da parede muscular lisa vascular, síntese de proteínas da matriz extracelular (SCHINI-KERTH, 1999), inibição e dissolução de agregados plaquetários e leucocitários (MARUMO et al., 1999), e inibição da expressão de moléculas de adesão (PELUFFO; RADII, 2007; VANHOUTTE et al., 2016). Por iniciar as cascatas de sinalização GMPc/PKG, também tem papel importante na estimulação e síntese de DNA mitocondrial e proteínas, contribuindo para a manutenção da massa mitocondrial e sua função, incluindo a regulação da produção celular de ROS e metabolismo energético (VANHOUTTE et al., 2016).

Sua produção é regulada pelo humor físico e humoral. Entretanto, o *shear stress* causado pelo fluxo sanguíneo contra as células endoteliais é o principal fator determinante na liberação local de NO. Outras substâncias endógenas também estimulam a liberação de NO, como a catecolamina, vasopressina, bradicinina, histamina e substâncias liberadas pela agregação plaquetária [serotonina e adenosina difosfato (ADP)] ou formadas durante a coagulação do sangue (trombina) (VANHOUTTE, 2003). Já o declínio na sua atividade pode ser devido a quatro fatores: (1) diminuição na expressão de eNOS, (2) ausência de substrato ou cofator para eNOS, (3) alteração da sinalização celular de modo que eNOS não é apropriadamente ativada e (4) degradação acelerada de eNOS (VASCONCELOS et al., 2007).

Para atuar como regular local do tônus vascular, NO deve desaparecer logo após sua liberação e sua ação tem que ser breve. Esse é o caso na maioria das condições fisiológicas, já que NO, por ser um radical, é altamente reativo com outras moléculas que também tenham elétrons desemparelhados, como é o caso para outros radicais livres e o ferro heme. O NO é, porém, inativado não somente pelo ânion superóxido na formação de peroxinitrito, mas também por nitrito e nitrato por oxigênio, que contém dois desses elétrons desemparelhados e se apresentam em grandes quantidades em tecidos oxigenados (VANHOUTTE et al., 2016).

Em fluidos biológicos, sistemas de NO estão quase que completamente oxidados a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), um metabolito biológico inerte (TEIXEIRA et al., 2016). O nitrito e nitrato não somente são produtos do metabolismo de NO, mas também agem como reservatório para o mediador endotelial. Diversas enzimas [hemoglobina, mioglobina, xantina oxido-redutase, complexo mitocondrial IV (citocromo c oxidase), aldeído desidrogenase 2 (ALDH2), citocromo p450 redutase e citocromo p450] podem catalisar a redução de nitrito e nitrato para gerar NO. Em particular, produção de NO por nitrito e nitrato por xantina oxido-redutase e citocromo c oxidase mitocondrial podem contribuir para a redistribuição do fluxo sanguíneo a tecidos isquêmicos. (VANHOUTTE et al., 2016).

O ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), assim como os outros fatores produzidos pela célula endotelial em condições fisiológicas, é produzido de forma controlada e em baixas concentrações, e funciona como uma molécula sinalizadora na manutenção da função endotelial, desempenhando importante papel em vários processos intracelulares, como indução de expressão de proteínas envolvidas no processo inflamatório e no crescimento celular.

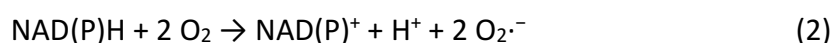
Muitas enzimas antioxidantes ativas, como a superóxido dismutase (SOD) e catalase, convertem  $\text{O}_2^{\cdot-}$  a  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Existem evidências de que o  $\text{H}_2\text{O}_2$  possa mediar prejudicialmente a expressão de genes envolvidos no crescimento celular e inflamação, além de interferir diretamente no tônus vascular em alguns leitos (BLANC; PANDEY; SRIVASTAVA, 2003; MATOBA; SHIMOKAWA, 2003; MIURA et al., 2003; BYON; HEATH; CHEN, 2016). Em adição, o ânion superóxido é degradado pela reação com NO três vezes mais rápido do que com SOD, levando a perda de NO e geração de peroxinitrito (LASSÈGUE; GRIENDLING, 2004). Existem três isoformas conhecidas de SOD, produzidas por diferentes genes, mas capazes de catalisar a mesma reação:



As três isoformas da SOD localizam-se em diferentes regiões, e são denominadas SOD-1 (citoplasmática), SOD-2 (mitocondrial) e SOD-3 (extracelular). A expressão e atividade dessas enzimas representam um importante mecanismo de defesa em células vasculares em situações de estresse oxidativo agudo ou crônico (FARACI; DIDION, 2004).

O  $\text{O}_2^{\cdot-}$  é produzido pela redução de um elétron do oxigênio molecular. Isso acontece através de inúmeras vias e células inflamatórias, assim como no metabolismo do ácido araquidônico. Alguns papéis pró-inflamatórios do ânion superóxido são: dano na célula endotelial e aumento da permeabilidade microvascular, formação de sítios de inflamação, destruição autocatalítica de neurotransmissores e hormônios como norepinefrina e epinefrina respectivamente, geração de peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) - um oxidante citotóxico e altamente reativo - além de também ter a capacidade de nitrar e desativar a enzima manganês superóxido dismutase MnSOD (responsável por transformar o radical superóxido em não tóxico), perpetuando a resposta inflamatória (SALVEMINI; ISCHIROPOULOS; CUZZOCREA, 2003).

A principal fonte de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  é a família da NAD(P)H oxidase (NOX), incluindo a fagócito oxidase (phox), que catalisa a redução do oxigênio molecular utilizando NADH ou NAD(P)H como doador de elétrons.



Sua ativação depende de uma série de fatores humorais (hormônios, citocinas, fatores de crescimento, peptídeos e outros agentes vasoativos) e físicos (força de cisalhamento ou estiramento do vaso) e, quando ativadas, as NOX vasculares (isoformas encontradas nas membranas das células endoteliais, fibroblastos e células da musculatura lisa vascular) produzem  $\text{O}_2^{\cdot-}$  crônica intra e extracelularmente, em contraste com a produção instantânea e apenas extracelular pela NOX do neutrófilo (onde foi primeiro caracterizada) (VASCONCELOS et al., 2007).

O complexo NOX é composto por dois componentes ligados à membrana (p22-phox e gp91-phox, a última agora referida como NOX2), três subunidades citoplasmáticas (p40-phox, p47-phox e p67-phox), e a pequena GTPase Rac. (LAMBETH, 2004), mas é a gp91-phox que contém o sítio de ligação para o NAD(P)H (LASSÈGUE; GRIENDLING, 2010). Essa subunidade é composta por uma família de homólogos, denominados NOX1-5 e Duox1-2. Algumas

características importantes das homólogas da NOX são: algumas ocorrem em vários tipos de tecidos (NOX1 e NOX4); sua ativação pode se dar tanto pela estimulação de sua atividade (NOX1, NOX2, NOX3, NOX5), ou pelo aumento de sua expressão (NOX4) e todas exceto a NOX2 produzem primariamente  $O_2^{\cdot-}$  intracelularmente (BROWN; GRIENGLING, 2009).

Macrófagos ativados, por exemplo, podem gerar simultaneamente grande fluxos de NO e  $O_2^{\cdot-}$ , dos quais nenhum é excepcionalmente reativo (NIKOV et al., 2003). Porém, por serem ambos radicais livre, o ânion superóxido reage com o óxido nítrico a uma taxa aproximada do seu limite de difusão, reduzindo a biodisponibilidade de NO e produzindo um intermediário reativo e muito oxidante, o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ).

Acredita-se que o peroxinitrito é produzido por células inflamatórias para defesa contra células cancerígenas ou contra infecção causada por parasitas, vírus e bactérias, mas ao mesmo tempo pode ter importantes consequências patológicas, causando danos a células hospedeiras e tecidos, como oxidação lipídica, dano ao DNA, e modificação de proteínas via nitração de tirosinas e outros constituintes celulares. Por ser considerado um marcador do estresse oxidativo, tem suas concentrações elevadas associadas a disfunções celulares do endotélio vascular, já que o estresse oxidativo por si é intimamente relacionado com várias doenças, como pré-eclâmpsia, diabetes e aterosclerose (BYON; HEALTH; CHEN, 2016 ; NIKOV et al., 2003).

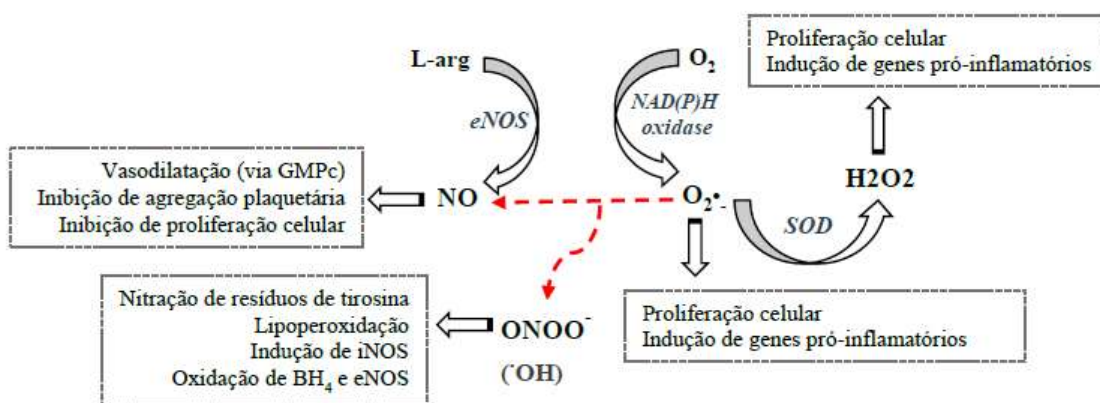
O  $ONOO^-$  pode oxidar  $BH_4$  e levar ao desacoplamento de eNOS no endotélio, levando ao estresse oxidativo e disfunção endotelial via três mecanismos: (1) produção enzimática de NO diminuída, permitindo que o radical possa reagir e atacar outros alvos celulares, (2) produção de  $O_2^{\cdot-}$  pela própria enzima, que contribui para o estresse oxidativo e (3) é comum que eNOS se torne parcialmente desacoplada de modo que ambos,  $O_2^{\cdot-}$  e NO sejam produzidos simultaneamente. Sob essas circunstâncias, eNOS pode tornar-se gerador de  $ONOO^-$  e levar ao aumento drástico do estresse oxidativo (VASCONCELOS et al., 2007). Portanto, a produção de  $ONOO^-$  pode ocorrer independentemente se a concentração de antioxidantes nos tecidos é alta (LYMAR; HURST, 1996).

O  $ONOO^-$  é capaz de formar o radical hidroxila ( $\cdot OH$ ), o que possivelmente é responsável por modificações celulares como lipoperoxidação, nitração de resíduos de tirosina em proteínas fundamentais do endotélio, como a  $PGI_2$  sintase, além da oxidação de  $BH_4$ , indução de iNOS e oxidação da própria eNOS, levando à disfunção vascular (LAURSEN et

al., 2001; COOKE; DAVIDGE, 2002, GUO et al., 2003; FORMAN; URSINI; MAIORINO, 2014; SUN et al., 2016).



Figura 3 – Principais vias bioquímicas envolvidas na geração / destruição de espécies reativas de oxigênio e seus efeitos em células vasculares



Fonte: autoria do Laboratório de Farmacologia Vascular - UNIFESP

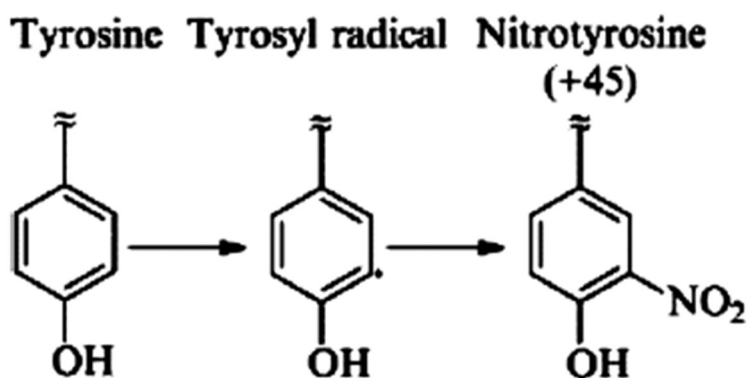
### 1.3 A Nitração de Tirosinas

A tirosina é um aminoácido não essencial e membro do grupo de aminoácidos aromáticos (os outros sendo fenilalanina e triptofano). A maioria das proteínas contém resíduos de tirosina com abundância natural de 3%. Por ser metade hidrofílica – explicado pelo anel aromático de benzeno hidrofóbico carregando um grupo hidroxila – tirosina é comumente exposta na superfície das proteínas (apenas 15% dos resíduos de tirosina ficam dentro da proteína) e por isso está disponível para modificações como por exemplo a nitração por inúmeros fatores, resultando na 3-nitrotirosina (3-NT) ou proteínas tirosina nitradas (AHSAN, 2013).

A formação de 3-NT [ácido 2-amino-3-(4-hidroxi-3-nitrofenil) propanoico] é uma modificação pós-translacional covalente na qual a tirosina é a proteína alvo, mediada principalmente por peroxinitrito (ISCHIROPOULOS et al., 1992; AHSAN, 2013; TEIXEIRA et al., 2016). Os fenóis substituídos em para, assim como em tirosina, são quimicamente reativos e alvos de eletrófilos e oxidantes no átomo de carbono na posição 3 do anel aromático (TEIXEIRA et al., 2016). Essa modificação ocorre pela ação do agente nitrante (ONOO<sup>-</sup>) resultando na

adição de um grupo nitro ( $\text{NO}_2$ ) em um dos dois átomos de carbono equivalentes na posição orto do grupo hidroxila fenólico, levando à nitração da proteína tirosina. É uma modificação estável e não ocorre aleatoriamente. Nem todos os resíduos de tirosina estão disponíveis para nitração. Por exemplo, apesar da albumina ser a proteína mais abundante no plasma, e poder ser um alvo da nitração de tirosina, é menos nitrada extensivamente que outras proteínas plasmáticas. Isso mostra que a nitração de resíduos de tirosina exibe um certo grau de seletividade (AHSAN, 2013).

Figura 4 – Geração de nitrotirosina através do radical tirosil



Fonte: adaptado de TURKO; MURAD, 2005, p. 266-275

A 3-NT pode ser incorporada por dois mecanismos: (1) pós-translacionalmente em  $\alpha$ -tubulina pela tubulina-tirosina ligase e (2) co-translacionalmente por um par de aminoacil-RNA transportador sintetase selecionado cujo sítio de ligação incorpora especificamente 3-NT em sítios propositadamente codificados. Em doenças associadas com o estresse nitrosativo, há um aumento significativo de 3-NT (SOUZA; PELUFFO; RADI, 2008)

Peroxinitrito e outras RNS relacionadas são capazes tanto de oxidação quanto de nitração das cadeias laterais aromáticas das proteínas de tirosina e triptofano, resultando numa condição chamada estresse nitrosativo. O  $\text{ONOO}^-$  pode alterar profundamente a estrutura da proteína e sua conformação, conseqüentemente mudando também sua função, sugerindo que a nitração está fundamentalmente relacionada ao dano oxidativo celular. A liberação subsequente de proteínas alteradas pode capacitá-las a agir como antígenos induzindo anticorpos contra proteínas próprias do organismo.

Essa modificação leva a conseqüências, incluindo modulação de cascatas de fosforilação, afetando função proteica e induzindo resposta imunológica. Fatores como um

ambiente polar e não ácido na estrutura da proteína onde a tirosina se localiza, poucos efeitos estéricos e grande área de superfície acessível estão associadas com maior condução à nitração (CHENG et al., 2013).

A imunorreatividade de 3-NT foi reportada em diversas condições patológicas em humanos, e elevados níveis foram reportados em doenças como aterosclerose, esclerose múltipla, Alzheimer, Parkinson etc., e estudos acharam uma forte correlação entre níveis de 3-NT plasmático e a doença arterial coronariana (CAD), identificando altos níveis como fator de risco emergente cardiovascular. (AHSAN, 2013)

A fosforilação de resíduos chave de tirosina tem papel crucial na transdução de sinais, e adota-se como hipótese que um dos efeitos deletérios da nitração da tirosina pode ser sua interferência com o funcionamento correto de fosfotirosina quinases (PTKases) (DI STASI et al., 1999). A nitração em resíduos críticos de tirosina podem essencialmente mimetizar a fosforilação de tirosinas em relação a carga do resíduo aromático, resultando na ativação dessas quinases, já que a adição de NO<sub>2</sub> na posição 3 do anel aromático, além de ser um substituinte volumoso, abaixa o pKa do grupo hidroxila da tirosina de 10,2 para 7,2 e então, em pH levemente alcalinos, adiciona-se uma carga negativa. (MALLOZZI; DI STASI; MINETTI, 2001 ; BATTHYÁNY et al., 2017)

O significado biológico da nitração e formação de 3-NT é por ser um marcador específico relativo do dano oxidativo mediado por peroxinitrito e outras RNS. Portanto, nitrotirosina é um marcador do estresse nitrosativo. Nitração é máxima em pH fisiológico (7,4), e decresce em condições mais básicas ou mais ácidas. Nitração por peroxinitrito também é acelerada na presença de íons de metais de transição, tanto na forma livre quanto na forma de complexos envolvendo a protoporfirina IX (heme) ou quelantes como o EDTA (AHSAN, 2013). Entretanto, a 3-nitrotirosina pode ser produzida por mecanismos independentes de peroxinitrito (Eiserich et al., 1998).

Consequências biológicas: efeito na função proteica, resultando em perda, aumento, ou até mesmo nenhum efeito em sua função; sensibilidade à degradação proteolítica, aumentando a suscetibilidade de proteínas modificadas à proteólise; influência na fosforilação de tirosina, um importante regulador do sinal de transdução em células, o que implica em resposta celular à fatores de crescimento, citocinas e ionóforos de cálcio; imunogenicidade, proteínas endógenas normalmente não são imunogênicas devido a

tolerância imunogênica, mas modificações pós-translacionais podem levar a uma geração de epítomos, resultando em uma resposta imunológica, que pode induzir doenças autoimunes (ABELLO et al., 2009).

Em tecidos humano, a nitração de resíduos de tirosina foi demonstrada sob condições fisiológicas e mostrado que aumenta significativamente em condições inflamatórias e doenças degenerativas: aterosclerose (BECKMAN et al., 1994; CROMHEEKE et al., 1999), esclerose múltipla (CROSS et al., 1998; OLESZAK et al., 1998;), Alzheimer (HENSLEY et al., 1998; TEUNISSEN et al., 2002; TOHGI et al., 1999), Parkinson (FERRANTE et al., 1999; GIASSON et al., 2000; PENNATHUR et al., 1999), asma (HANAZAWA et al., 2000), disfunção do miocárdio (FENG et al., 2001; MIHM et al., 2001; ZWEIER; FERTMANN; WEI, 2001), acidente vascular encefálico (FORSTER et al., 1999), rejeição de transplante (AKIZUKI et al., 2000; ALBRECHT et al., 2002; DE ANDRADE et al., 2000), diabetes (CERIELLO et al., 2001) e uma série de outras desordens (DUNCAN, 2003).

A análise de proteínas nitradas necessita estratégias mais complexas. Até hoje, os estudos por eletroforese de duas dimensões resultam na maioria das identificações de proteínas nitradas endógenas conhecidas. As dificuldades provavelmente surgem do relativo número pequeno de proteínas tirosina nitradas versus o total de resíduos de tirosina. Para solucionar parcialmente esses problemas, considera-se uma boa abordagem analítica a combinação dos melhores métodos de separação de proteínas. Nesse sentido, o método ideal seria a separação do total de proteínas por eletroforese 2D seguido de imunodeteção de nitrotirosinas (BATTHYÁNY et al, 2017).

#### **1.4 O Endotélio Vascular e o Estresse Oxidativo/Nitrosativo**

O endotélio vascular, constituído por uma camada monocelular, possui a capacidade de gerar as espécies reativas de oxigênio e as espécies reativas de nitrogênio, que em altas concentrações caracterizam a condição de estresse oxidativo e nitrosativo.

Situa-se estrategicamente entre o lúmen do vaso sanguíneo e a parede vascular, o que permite a interface direta entre eles. No endotélio, uma série de reações estimulam a produção e liberação de diversas substâncias com funções vasculares ativas, o que o torna capaz de ser um sistema autócrino, parácrino e endócrino. Por esse motivo, a célula endotelial



é reguladora fundamental da fisiologia vascular e da homeostase, ao controlar a permeabilidade do vaso. O endotélio íntegro contribui na modulação do tônus e da estrutura da musculatura lisa vascular, intervém na coagulação sanguínea e agregação plaquetária, age na resposta inflamatória e promove o crescimento de novos vasos sanguíneos (angiogênese).

Muitos fatores podem controlar a síntese de substâncias pela célula endotelial, incluindo *shear stress* (força de cisalhamento, que é a força tangencial de fricção produzida pelo fluxo sanguíneo sobre a superfície endotelial) (VASCONCELOS et al., 2007) e ativação por substâncias vasoativas, como neurotransmissores autonômicos, alguns hormônios como insulina e vasopressina, além de vários peptídeos vasoativos, como endotelina, angiotensina e cininas. Em geral, a célula endotelial é responsável pela produção de *Fatores Relaxantes Derivados do Endotélio* (EDRFs), representados pelo radical livre óxido nítrico (NO), pela prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) e pelo fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), e *Fatores Constritores Derivados do Endotélio* (EDCFs), que são representados pelos prostanóides constritores derivados da enzima ciclooxigenase (COX) – prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) e tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) –, pelo ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) e pelos peptídeos Angiotensina II (AngII) e Endotelina (ET-1) (VANHOUTTE, 2003; VERSARI et al., 2009, FÉLÉTOU; HUANG; VANHOUTTE, 2011). As interações dos mediadores vasodilatadores e vasoconstritores dependentes do endotélio são cruciais para a regulação do fluxo sanguíneo, da pressão arterial e da perfusão tissular, tanto em condições fisiológicas quanto patológicas. Sendo assim, o desequilíbrio entre as vias pró-oxidantes e antioxidantes relaciona-se diretamente ao desenvolvimento de doenças do sistema circulatório, especialmente a hipertensão arterial (VASCONCELOS et al., 2007).

Isso é evidenciado pela atenuação dos efeitos de relaxamento dependentes do endotélio (efeitos vasoconstritores) em relação aos efeitos de constrição dependentes do endotélio (efeitos vasodilatadores), causada principalmente pela liberação reduzida dos EDRFs, em particular o NO (VANHOUTTE, 2003). Essa supressão do vasorelaxamento é chamada de disfunção endotelial (CARVALHO et al., 2001; VASCONCELOS et al., 2007).

As células endoteliais se tornam disfuncionais tanto em doenças cardiovasculares, quanto com o decorrer da idade. Além disso, também são disfuncionais em condições como dieta não balanceada [exemplo: alta ingestão de sódio, hipercolesterolemia (alta quantidade de colesterol no sangue) e deficiência de vitamina D], exposição a fatores ambientais

prejudiciais (fumantes ativos e passivos, exposição crônica à poluição no ar) e condições patológicas como obesidade, diabetes mellitus (resistência à insulina inicia respostas endoteliais inflamatórias e hiperglicemia favorece glicosilação de eNOS, enzima produtora de NO), hipertensão (expressão de enzimas antioxidantes é reduzida e produção de espécies reativas de oxigênio é aumentada), aterosclerose, imunodeficiência e algumas condições inflamatórias (exemplo: artrite reumatoide) (VANHOUTTE et al., 2016).

A principal característica de sinalização redox é que ela envolve uma reação de oxidação-redução ou a formação de um aduto covalente entre a proteína de sinalização e o segundo mensageiro. As sinalizações envolvendo espécies reativas envolvem modificação química de um resíduo de cisteína de uma proteína de sinalização alvo ao invés de uma ligação não covalente à proteína. (FORMAN; URSINI; MAIORINO, 2014)

A AngII é um peptídeo hormonal multifuncional e principal efetor do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). O sistema renina-angiotensina é um elemento fundamental na regulação da pressão arterial e homeostase cardiovascular.

A síntese de AngII é feita a partir da clivagem enzimática do precursor proteína angiotensinogênio (uma  $\alpha_2$  globulina de origem hepática) por renina, gerando o decapeptídeo angiotensina I, que após poucos segundos é clivada pela enzima conversora de angiotensina (ECA), originando o octapeptídeo AngII. Fatores que reduzem a pressão, como as reduções no volume sanguíneo ou a redução da resistência periférica total, ativam a liberação de renina pelas células justaglomerulares situadas adjacente às arteríolas renais. A geração de AngII pode ocorrer no plasma e em diferentes tecidos, porém, uma maior densidade de ECA está ancorada na membrana plasmática da célula endotelial. No sistema circulatório a AngII promove efeitos hipertensores agindo diretamente em receptores específicos, indiretamente através da liberação de outros fatores vasoativos, e por meio de interações com vias intracelulares estimuladas por outros agentes (TOUZY; SCHIFFRIN, 2000). Níveis aumentados de AngII contribuem para várias doenças, incluindo hipertensão, doenças renais e potencialmente câncer (SADOSHIMA, 2000; DESHAYES; NAHMIAS, 2005).

Os efeitos exercidos pela AngII são mediados por dois principais subtipos de receptores específicos acoplados à proteína G: o subtipo 1 (AT1) e o subtipo 2 (AT2) (MURPHY et al., 1991, MUKOYAMA et al., 1993). O AT1 é expresso em diversos tecidos, enquanto que AT2 é principalmente achado em tecidos fetais (SMITH; MISSAILIDIS, 2004). Todos os efeitos

fisiológicos clássicos da AngII como vasoconstrição, liberação de aldosterona e vasopressina, retenção de sódio e água são mediados em sua maior parte por AT1. Por via desse receptor, AngII também está envolvida em proliferação celular, disfunção endotelial e nefrosclerose. Acredita-se que os receptores AT2 atuem como antagonistas fisiológicos de receptores AT1, já que estão diretamente envolvidos em processos de inibição de crescimento celular, produção de NO e vasodilatação (DE GASPARO et al., 2000, CAREY et al., 2017; KASCHINA; UNGER, 2003; DESHAYES; NAHMIAS, 2005).

A sinalização mediada pela via clássica dependente da proteína G ativa a fosfolipase C, resultando na produção de inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG). A ligação de IP3 ao seu receptor no retículo sarcoplasmático inicia a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro do citoplasma, que se liga à CaM e termina no processo de contração celular antes elucidado (MEHTA; GRIENGLING, 2007). Ocorre também a ativação de fosfolipase  $\text{A}_2$ , resultando em liberação de ácido araquidônico e geração de prostanóides vasoconstritores e vasodilatadores (PUEYO; N'DIAYE; MICHEL, 1996, TOUYZ; SCHIFFRIN, 2000).

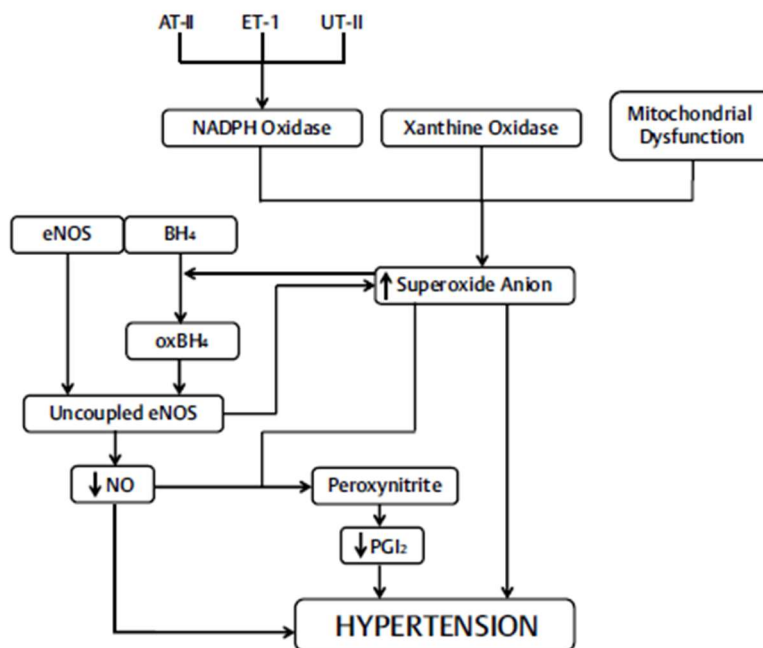
Além desses efeitos, a AngII é um potente agente indutor de estresse oxidativo em células vasculares. AngII ativa a NAD(P)H oxidase ou pelo aumento da expressão das subunidades como NOX1, p22-phox, p47-phox, p67-phox (SACHSE; WOLF, 2007; MANEA et al., 2008), facilitando a montagem do complexo multiprotéico NOX (LI; SHAH, 2003; WELCH, 2008), ou pela fosforilação de p47-phox via proteína quinase C (PKC) (MEHTA; GRIENGLING, 2007), induzindo a enzima a produzir ROS como  $\text{O}_2^{\cdot-}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  em células de músculo liso vascular, em adição da produção de RNS como NO e ONOO-.

A intensificação do sinal de AngII gera uma maior quantidade de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ , os quais ativam mais proteínas sensíveis a reações de redução-oxidação. Essas quantidades aumentadas também podem levar ao dano de moléculas celulares, como lipídeos e provavelmente ácidos nucleicos. Além da geração de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  pela ativação de NAD(P)H oxidase, também mostrou-se que AngII estimula a disfunção mitocondrial in vivo no coração, rim e vasculatura (MONTERO et al., 2005; DE CAVANAGH et al., 2006; DOUGHNAN et al., 2008), levando a produção de grandes quantidades de ROS por organelas disfuncionais.

Em modelos de hipertensão experimental, a indução é frequentemente por estímulos do sistema renina-angiotensina: pela infusão crônica de AngII, superexpressão dos genes de renina e angiotensina, ou coarctação da artéria renal (estreitamento do vaso sanguíneo) com

ou sem excisão de um rim. Nesse contexto, a peroxidação lipídica foi evidenciada em hipertensão induzida por AngII (NISTALA et al., 2008). Nesses modelos, ROS como ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, assim como marcadores de oxidação como nitração de tirosina de proteínas aumentam nas veias, coração e rins (LASSÈGUE; GRIENGLING, 2004).

Figura 5 – Resumo esquemático do papel do estresse oxidativo vascular na hipertensão



AT-II: angiotensina II, ET-1: endotelina 1, UT-II: urotensina II, NO: óxido nítrico, eNOS: óxido nítrico sintase endotelial, PGI2: prostaciclina, BH4: tetrahydrobiopterina.

Fonte: BRITO et al., 2015, p. 328

### 1.5 A Angiotensina II e o Flavonoide Luteolina

Em vista do grande impacto da AngII na promoção de estresse oxidativo endotelial, muitos estudos têm sido realizados para a validação do emprego de antioxidantes para a proteção vascular (MASI;ULIANA;VIRDIS, 2019). Dentre esses antioxidantes, destaca-se a Luteolina (3,4,5,7-tetrahidroxil-flavona), um flavonoide que interfere diretamente em diferentes vias de sinalização intracelular, alterando a expressão e/ou atividade de enzimas envolvidas na geração e degradação de espécies reativas de oxigênio, especialmente eNOS e NAD(P)H oxidase.

Ao reagir com  $O_2^{\cdot-}$  e diminuir suas concentrações, a Luteolina preserva NO por prevenir sua degradação e aumentar sua atividade biológica antioxidante. Por bloquear a ação de  $O_2^{\cdot-}$ ,

previne a formação de ONOO<sup>-</sup>. Além disso, a Luteolina pode desativar diretamente ONOO<sup>-</sup>, nitrando suas estruturas ou desativando-o pela doação de elétrons. Como consequência, Luteolina também previne a nitração de tirosinas mediada por ONOO<sup>-</sup> (DUARTE; FRANCISCO; PEREZ-VIZCAINO, 2014). Essas reações são dependentes das concentrações de oxigênio e do pH, e podem ser bloqueadas pela SOD (LÓPEZ-LÓPEZ et al., 2004)

Estudos muito recentes indicaram que os efeitos celulares da Luteolina podem reduzir ou até mesmo bloquear algumas das ações induzidas pela AngII em tecidos cardiovasculares. Por exemplo, em células de músculo liso vascular de ratos, a incubação com luteolina mostrou-se competente em inibir os efeitos proliferativos de AngII pela redução das vias MAPK e Akt (SU et al., 2015, XU et al., 2015). Efeito semelhante foi também observado por outros dois estudos realizados em linhagens de células endoteliais (ZHU et al., 2013, DING et al., 2014)

Presente em inúmeros alimentos, como amendoim, camomila, salsa, hortelã, manjeriço, aipo e folhas de alcachofra, a Luteolina já é comercializada como suplemento nutricional, com indicação de até 200 mg/dia. Entretanto, até o momento, não existem informações consistentes sobre possíveis efeitos benéficos dessas concentrações, e muito pouco se sabe sobre as ações da luteolina nos vasos sanguíneos.

## **1.6 Justificativa**

A geração de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio dá início a uma intrincada rede de sinalização celular envolvida em processos fisiológicos e fisiopatológicos. Nesse contexto, a nitração de proteínas é um dos produtos finais, e por isso pode ser considerada um forte marcador do dano oxidativo.

No endotélio vascular, a complexa sinalização redox é parcialmente controlada pela AngII – um peptídeo vasoativo intimamente relacionado ao desenvolvimento de hipertensão arterial. Logo, a identificação de espécies reativas e respectivos metabólitos gerados pela estimulação com AngII pode contribuir diretamente para a prevenção e tratamento de doenças vasculares.

Diante do exposto, o presente trabalho descreve a metodologia para detecção de nitrotirosinas em células endoteliais, empregando culturas de células obtidas a partir de

explantes de veia cava de ratos. Nessa abordagem, as células foram previamente tratadas com AngII para a indução de estresse oxidativo. Em paralelo, outras culturas foram incubadas com o flavonoide luteolina para a verificação de seu possível efeito antioxidante.

## **2. OBJETIVO**

Estabelecer a metodologia de purificação, identificação e caracterização de resíduos de tirosina que sofreram o processo de nitração em células endoteliais em cultura, previamente expostas à AngII e Luteolina, empregando as metodologias de imunoprecipitação e Western Blot.

## **3. MATERIAS E METODOLOGIAS**

### **Materiais:**

- Cultura celular endotelial imortalizada de veia cava de ratos (banco de culturas celulares do Laboratório de Farmacologia Celular)
- Meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) low-glucose, soro fetal bovino e penicilina/estreptomicina (Gibco),
- Angiotensina II (Bachem)
- Luteolina (Sigma-Aldrich)
- Tripsina Tryple Express, kit para dosagem de proteínas – Método BCA, marcador de peso molecular Spectra, kit para detecção de quimioluminescência Pierce ECL Plus Western Blotting (Thermo Scientific).
- Kit de imunoprecipitação Nitrotyrosine IP Kit (Cayman Chem)
- Membrana de nitrocelulose (Bio-Rad, CA),
- Anticorpo secundário Goat Anti-Rabbit (HRP Conjugate) (Cell Signaling)
- Sais e Reagentes empregados no preparo de soluções (Amresco)

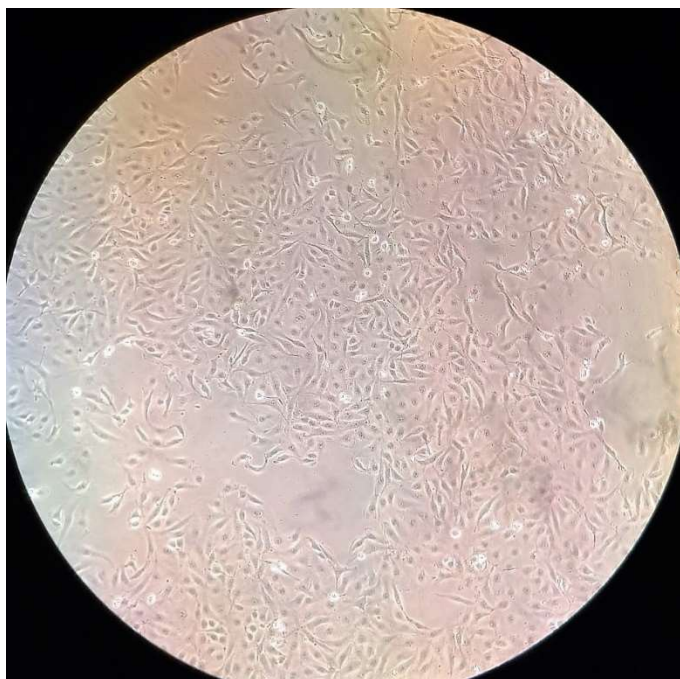
### **1. Cultura Celular:**

A linhagem de células endoteliais foi estabelecida a partir do projeto desenvolvido anteriormente no mesmo laboratório (Fapesp 14/18760-4). Nesse projeto, culturas primárias

de endotélio venoso foram estabelecidas e caracterizadas a partir de explantes de veia cava de ratos wistar. As culturas foram imortalizadas segundo técnica também desenvolvida anteriormente pelo laboratório (Loiola et. al, 2013) e eram armazenadas em freezer -80°C, até decisão de descongelá-las para começar uma nova cultura.

As células eram cultivadas pela incubação com meio de cultura DMEM low glucose adicionado de soro fetal bovino em 10% contendo penicilina/estreptomicina 10 mg/L, pH 7,3-7,4, e mantidas em incubadora de CO<sub>2</sub> a 37°C. A cada dois dias as células eram lavadas com PBS e o meio trocado. Ao atingirem o estado de semi confluência, as células eram tripsinizadas e expandidas na proporção 1:2. O processo se manteve até que se obtivesse quantidade suficiente de células para os ensaios.

Figura 6 – Células endoteliais em cultura, aumento em 200x



Fonte: autoria do Laboratório de Farmacologia Vascular – UNIFESP

## 2. Tratamento das culturas:

2.1. Para a verificação do efeito da AngII sobre a nitratação de proteínas endoteliais, as células foram incubadas com o peptídeo nas concentrações 1, 10 e 50 µM, durante 24 horas, à 37°C, em incubadora CO<sub>2</sub> (5%).

2.2. Para a verificação de um possível efeito antioxidante no endotélio vascular, o flavonoide Luteolina foi empregado em incubações de culturas celulares nas concentrações

de 10, 20 e 50  $\mu\text{M}$ , durante 24 horas, à 37°C, em incubadora  $\text{CO}_2$  (5%). Essas concentrações foram baseadas nos estudos prévios de ZHU et al. (2013), SU et al. (2015) e XU et al. (2015).

### 3. Preparação das amostras:

Após os períodos de incubação, as garrafas de cultura celular foram lavadas com PBS gelado e raspadas com *scraper*, e o PBS contendo as células descoladas foi armazenado em tubos do tipo falcon. O processo de lavagem e raspagem foi repetido duas vezes para cada garrafa. Os tubos foram centrifugados a 1500 rpm por 5 minutos à 4°C e o sobrenadante desprezado.

Então, os pellets foram ressuspensos em 70  $\mu\text{L}$  de tampão de lise [Tris HCl pH 7.4 (50 mM); NaCl (100 mM); NP40 0,5%; coquetel inibidor de Protease e Fosfatase 10  $\mu\text{L}$ /amostra], passados para tubos do tipo eppendorf, vortexados e mantidos por 30 minutos à 4°C.

Os tubos eppendorf foram centrifugados a 14000 rpm por 20 minutos à 4°C, e o sobrenadante estocado à -80°C até o momento de uso.

A dosagem de proteínas foi feita através do Método do Ácido Bicinchonínico (BCA - Bicinchoninic Acid) utilizando-se um kit comercial (Thermo Scientific), as amostras foram diluídas na proporção 1:10, e as leituras realizadas em espectrofotômetro (Epoch-Biotech Instruments), em comprimento da onda em 560 nm.

### 4. Imunoprecipitação

A imunoprecipitação foi performada a partir da utilização de um kit comercial Nitrotyrosine IP Kit (Cayman Chem)

Os 400  $\mu\text{L}$  de Nitrotyrosine Affinity Sorbent foram ressuspensos por inversão. 40  $\mu\text{L}$  de solução de Nitrotyrosine Affinity Sorbent foram aliquotados em 8 *Spin Columns*, dos quais 20  $\mu\text{L}$  se acomodaram em cada resina.

Adicionou-se 500  $\mu\text{L}$  de tampão de lavagem em cada coluna, misturando com a pipeta. Os tubos de microcentrífuga contendo as colunas foram centrifugados a baixa velocidade (1000 x g por um minuto) para que matriz fosse coletada, e o restante descartado. O procedimento de lavagem da matriz e coleta foi repetido duas vezes.



Adicionou-se 200  $\mu\text{L}$  do lisado celular padronizado à 3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (ou controle) ao Nitrotyrosine Affinity Sorbent e misturou-se com pipeta.

A incubação foi feita por 2 horas à 4°C em misturador rotatório.

Centrifugou-se a baixa velocidade (1000 x g por um minuto) para coletar a matriz.

A matriz foi lavada adicionando 500  $\mu\text{L}$  de buffer de lavagem por coluna e coletada após centrifugação a baixa velocidade (1000 x g por um minuto). A lavagem e coleta foram repetidas duas vezes.

Adicionou-se 20  $\mu\text{L}$  do buffer de eluição ao Spin Column e misturou-se com pipeta.

Os tubos foram aquecidos a 95°C por 5 minutos.

Centrifugou-se a baixa velocidade (1000 x g por um minuto) para coletar o material eluído, que foi estocado em freezer -20°C até o momento da análise.

## 5. Western Blot:

Concentrações iguais de proteína foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida utilizando a câmara de transferência.

As amostras foram aquecidas a 100°C por 5 minutos.

Pipetou-se o marcador de peso molecular no primeiro poço. No segundo, pipetou-se o controle negativo (água + tampão de eluição). Nos poços seguintes, foram pipetados 20  $\mu\text{L}$  das seguintes amostras: AngII 1  $\mu\text{M}$ , AngII 10  $\mu\text{M}$ , Lut 10  $\mu\text{M}$ , Lut 20  $\mu\text{M}$ , Lut 50  $\mu\text{M}$ , AngII 50  $\mu\text{M}$  e controle positivo (BSA nitrado fornecido no kit), respectivamente.

A eletroforese foi realizada a 60 mA, até que o tampão saísse por completo do gel.

A parte superior do gel foi cortada e as proteínas constantes no gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose através do método de câmara úmida utilizando câmara de transferência à 400 mA por 2 horas.

A membrana então foi lavada 3 vezes por 5 minutos com TTBS para retirar o excesso de tampão.

Após ser bloqueada com BSA 1% a temperatura ambiente por 30 minutos, a membrana foi lavada 3 vezes por 10 minutos com TTBS.

Então, a membrana foi incubada com anticorpo primário Nitrotyrosine Polyclonal Antibody presente no kit, na concentração de 1:200 no tampão de bloqueio, a 4°C overnight sob agitação.

No dia seguinte, a membrana foi novamente lavada 3 vezes por 10 minutos com TTBS.

A membrana foi incubada com anticorpo secundário Goat Anti-Rabbit (HRP Conjugate) na concentração de 1:1000 no tampão de bloqueio, durante 1 hora sob temperatura ambiente.

Após ser lavada 3 vezes por 5 minutos com TTBS, a revelação das membranas foi feita por quimioluminescência (kit comercial de ECL) em fotodocumentador (GeneGnome System-Syngene, UK).

#### 4. Resultados e Discussão

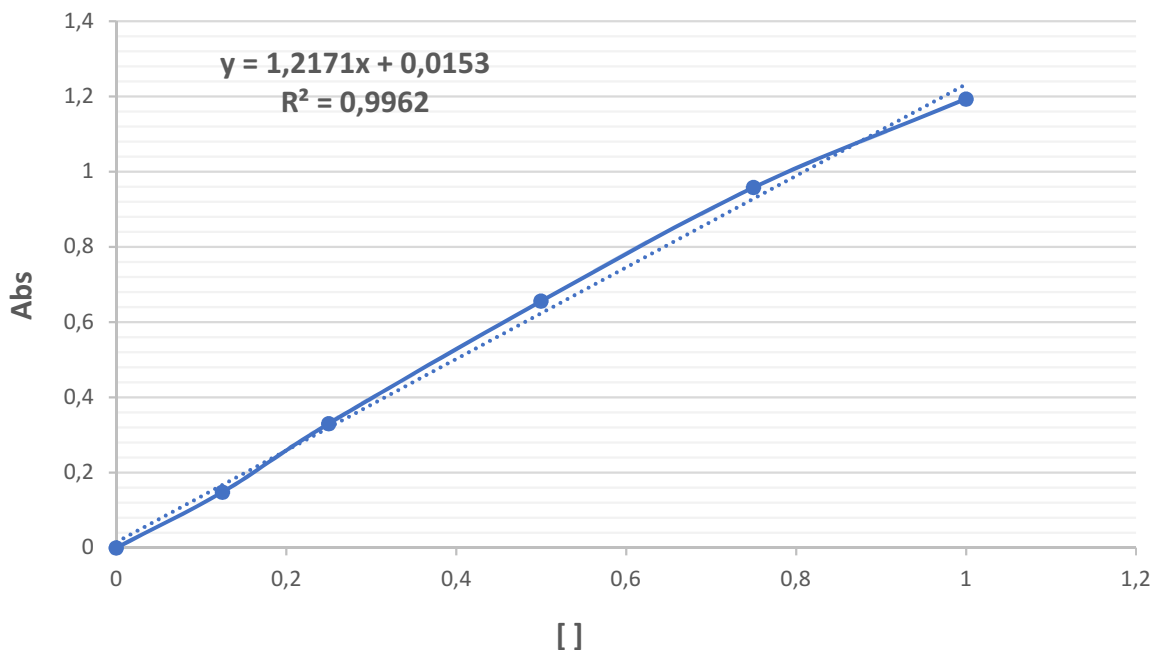
Após tratamento e incubação das culturas celulares endoteliais com AngII nas concentrações de 1, 10 e 50  $\mu$ M e com Luteolina nas concentrações de 10, 20 e 50  $\mu$ M, a dosagem de proteínas totais foi feita a partir do Método BCA, em duplicata, e a leitura realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda em 560 nm. Como controle positivo, foi usado o BSA nitrado contido no kit comercial de imunoprecipitação.

Tabela 3 – Quantificação de proteínas nas células após incubação por 24 horas

[ ]	ABS	AMOSTRA	ABS MÉDIA AMOSTRA	AMOSTRA DILUÍDA	x 10
0	0	Basal	0,7975	0,64269468	6,4269468 $\mu$ g/ $\mu$ L
0,125	0,1485	AngII 1 $\mu$ M	0,79	0,63653267	6,3653267 $\mu$ g/ $\mu$ L
0,25	0,3305	AngII 10 $\mu$ M	1,1015	0,89246117	8,9246117 $\mu$ g/ $\mu$ L
0,5	0,656	Lut 10 $\mu$ M	0,596	0,47714221	4,7714221 $\mu$ g/ $\mu$ L
0,75	0,958	Lut 20 $\mu$ M	0,6555	0,52602743	5,2602743 $\mu$ g/ $\mu$ L
1	1,1935	Lut 50 $\mu$ M	0,655	0,52561663	5,2561663 $\mu$ g/ $\mu$ L
		AngII 50 $\mu$ M	0,6385	0,51206023	5,1206023 $\mu$ g/ $\mu$ L
		BSA (+)	0,564	0,450851	4,50851 $\mu$ g/ $\mu$ L

Fonte: autoria do Laboratório de Farmacologia Vascular - UNIFESP

Figura 7 – Curva padrão para dosagem de proteínas com BSA: Absorbância x Concentração



Fonte: autoria do Laboratório de Farmacologia Vascular – UNIFESP

Como é possível perceber na Figura 7, a curva padrão elaborada a partir do BSA obteve alto nível de qualidade, com um coeficiente angular ( $R^2$ ) próximo à 1,0, indicando alta sensibilidade e precisão da quantificação relacionada às amostras.

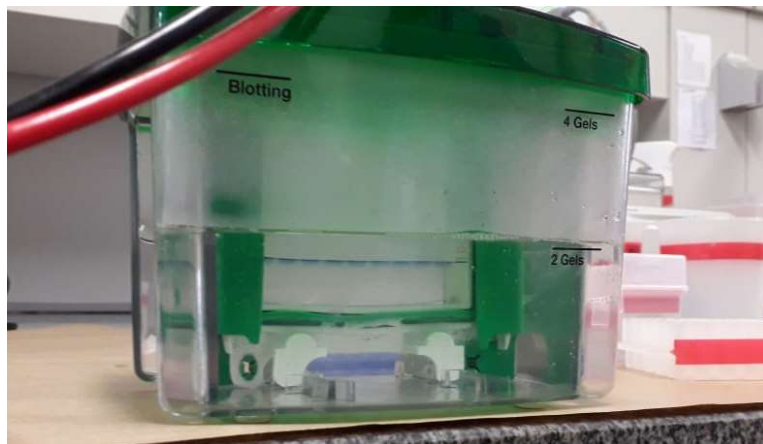
A quantidade de proteínas nas amostras, demonstrada na Tabela 3, se mostrou adequada para o prosseguimento do ensaio, demonstrando que medição foi realizada de maneira correta. Para uma boa confiabilidade nos resultados das etapas seguintes, a concentração de proteínas de todas as amostras deve ser a mesma. Portanto, a partir desses resultados, foi possível padronizar todas as amostras até que chegassem à concentração de 3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de forma precisa.

Para a imunoprecipitação, 200  $\mu\text{L}$  de amostra foram aplicados nas colunas correspondentes, previamente tratadas com o anticorpo primário anti-nitrotirosina. Considerando que nossas amostras estavam diluídas a 3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , um total de 600  $\mu\text{g}$  de proteínas totais foram aplicados em cada uma das colunas. Sem dúvida, essa quantidade de proteínas é bastante elevada, assim como a concentração do anticorpo primário empregado na preparação das colunas. Nesse momento de padronização de técnica, optamos por seguir estritamente as condições estabelecidas pelo fabricante do kit; entretanto, com base no

aprendizado obtido no presente trabalho, novos ensaios serão realizados, buscando-se o aprimoramento técnico e também a redução da quantidade de amostra inicial.

Após terem sido realizados todos os procedimentos de purificação de amostras por imunoprecipitação, o material eluído foi submetido ao ensaio de Western Blot para identificação. Volumes idênticos do material eluído foram submetidos à separação por eletroforese, conforme demonstrado na Figura 8.

Figura 8 – Início do Western Blot: eletroforese das amostras em gel de poliacrilamida 10%



Fonte: autoria do Laboratório de Farmacologia Vascular - UNIFESP

A separação das proteínas ocorreu de forma satisfatória. O gel foi então levado à câmara de transferência juntamente com a membrana de celulose, conforme demonstrado na Figura 9.

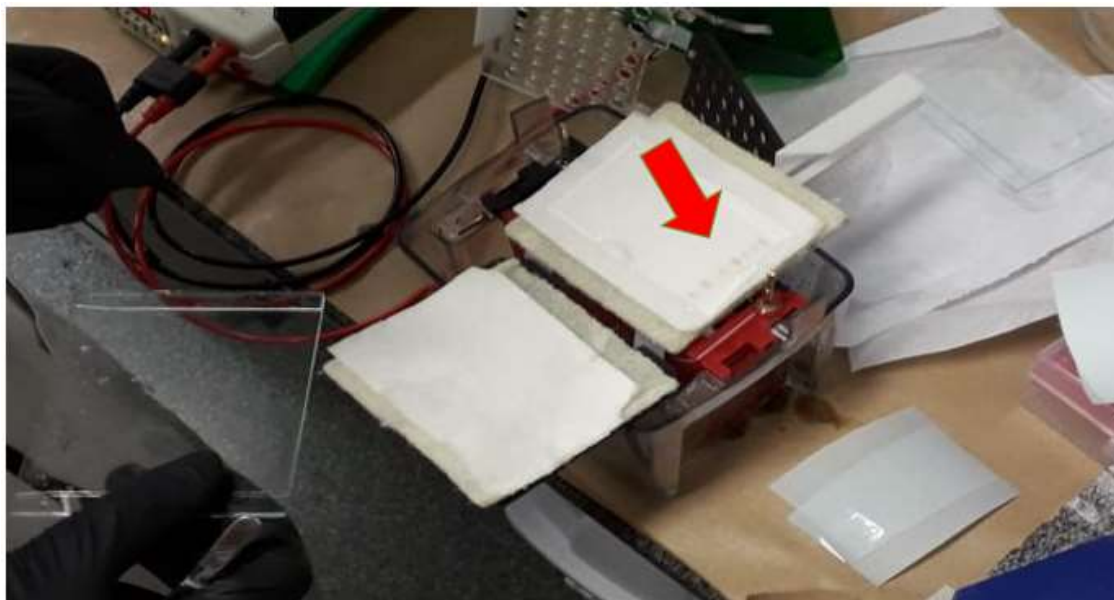
Figura 9 – Transferência das proteínas nitradas do gel para a membrana de nitrocelulose



Fonte: autoria do Laboratório de Farmacologia Vascular - UNIFESP

É possível observar, através da Figura 10, o marcador de peso molecular na membrana de nitrocelulose, indicando que o procedimento de transferência do Western Blot foi realizado com sucesso. Assim, a membrana foi revelada.

Figura 10 – Membrana de nitrocelulose contendo as proteínas nitradas para incubação com anticorpo

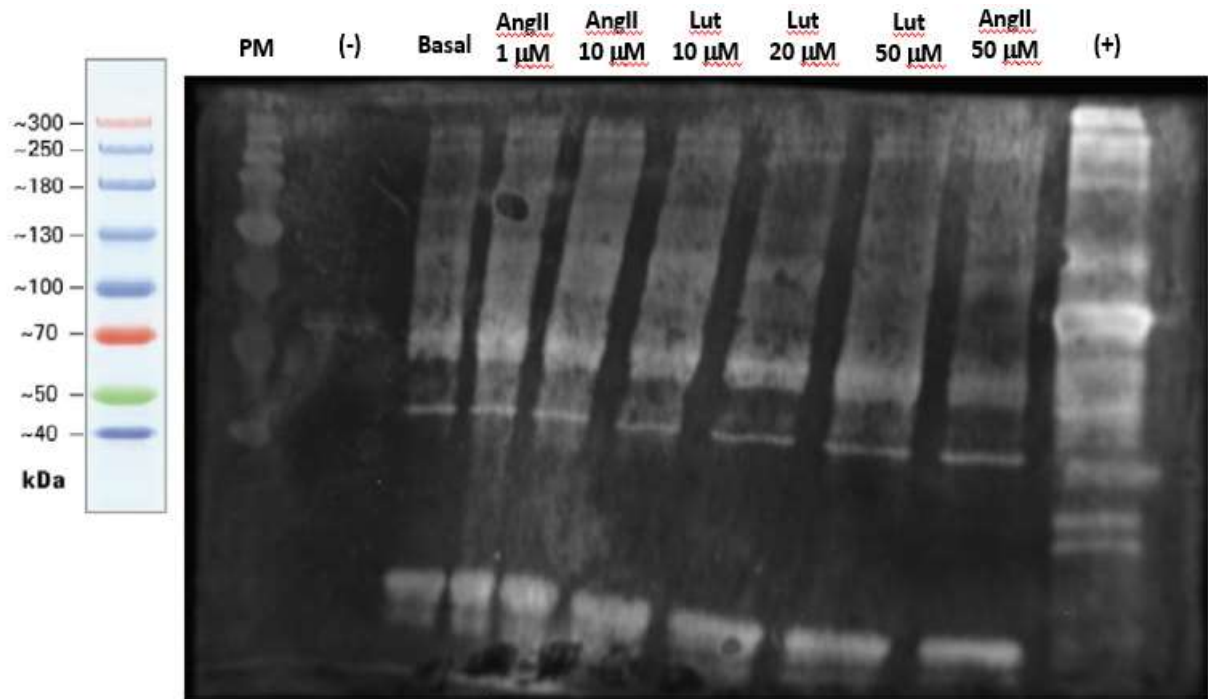


Fonte: autoria do Laboratório de Farmacologia Vascular - UNIFESP

A revelação da membrana de nitrocelulose demonstrou que o método de imunoprecipitação de nitrotirosinas foi implantado com sucesso.

A partir da Figura 11, é possível ver que a marcação de peso molecular foi bem-sucedida, assim como os controles negativo e positivo. Foram detectadas marcações em todas as amostras experimentais. Apesar da nitração de proteínas ser considerada uma reação com certo grau de seletividade, resíduos de tirosina são encontrados na maioria das proteínas naturais, o que significa que em condições de estresse oxidativo uma grande variedade de proteínas são nitradas e no filme revelado por fotodocumentador, as proteínas alvo não aparecem como uma banda apenas, mas sim como várias bandas próximas umas às outras de acordo com o peso em kDa, o que é chamado de “arraste”.

Figura 11 – Revelação da membrana incubada



Fonte: autoria do Laboratório de Farmacologia Vascular - UNIFESP

Em combinação com a técnica de Western Blot, o ensaio forneceu mais especificidade para identificar as proteínas nitradas, já que as nitrotirosinas são consideradas de baixa abundância no organismo. A imunoprecipitação foi realizada utilizando anticorpos policlonais de alta afinidade. O anticorpo usado da espécie mouse é, de acordo com a Tabela 2, considerado de média afinidade para ambas as proteínas A e G, sendo uma boa opção para o ensaio.

## 5. CONCLUSÃO

As nitrotirosinas são consideradas marcadores biológicos do estresse oxidativo mediado por peroxinitrito e outras espécies reativas de nitrogênio, afetando a função e estrutura de diversas proteínas, e aumentando significativamente a chance de doenças inflamatórias e cardiovasculares.

Apesar de muitos métodos imunológicos existirem para a detecção de proteínas nitradas, como o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção por fluorescência, e a própria cromatografia de afinidade, a

imunoprecipitação mostrou-se ser uma técnica de alta sensibilidade. Neste trabalho a imunoprecipitação foi detalhada e estudada como um dos métodos mais eficientes para a purificação e detecção das nitrotirosinas. A combinação dessa técnica com o Western Blot aumentou ainda mais a especificidade para a identificação de tais proteínas, consideradas de baixa abundância, mas tão expressivas no contexto da disfunção endotelial.

A metodologia da imunoprecipitação de nitrotirosinas em células endoteliais cultivadas foi implantada e padronizada com sucesso. Essa abordagem será valiosa no estudo da ação de substâncias pró- e antioxidantes sobre o endotélio vascular, e poderá ser empregada em futuros projetos do Laboratório de Farmacologia Vascular.

## REFERÊNCIAS

- ABELLO, N. et al. **Protein tyrosine nitration: Selectivity, physicochemical and biological consequences, denitration, and proteomics methods for the identification of tyrosine-nitrated proteins.** *Journal of Proteome Research*, v. 8, n. 7 p. 3222-3238, 2009.
- AHSAN, H. **3-Nitrotyrosine: A biomarker of nitrogen free radical species modified proteins in systemic autoimmune conditions.** *Human Immunology*, v. 74, n. 10, p. 1392–1399, 2013.
- AKIZUKI, E. et al. **Role of nitric oxide and superoxide in acute cardiac allograft rejection in rats.** *Proc Soc Exp Biol Med.*, v. 225, n. 2, p. 151-159, 2000.
- ALBRECHT, E. W. J. A. et al. **Expression of Inducible and Endothelial Nitric Oxide Synthases, Formation of Peroxynitrite and Reactive Oxygen Species in Human Chronic Renal Transplant Failure.** *American Journal of Transplantation*, v. 2, n. 5, p. 448–453, 2002.
- ARCHER, S. L. et al. **Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 91, n. 16, p. 7583 LP – 7587, 2 ago. 1994.
- BATTHYÁNY, C. et al. **Tyrosine-Nitrated Proteins: Proteomic and Bioanalytical Aspects.** *Antioxidants & redox signaling*, v. 26, n. 7, p. 313–328, 2017.
- BECKMANN, J. S. et al. **Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry.** *Biological chemistry Hoppe-Seyler*, v. 375, n. 2, p. 81–8, 1994.
- BLANC, A.; PANDEY, N. R.; SRIVASTAVA, A. K. **Synchronous activation of ERK 1/2, p38mapk and PKB/Akt signaling by H2O2 in vascular smooth muscle cells: potential involvement in vascular disease.** *International journal of molecular medicine*, v. 11, n. 2, p. 229-234, 2003.
- BONIFACINO, J. S.; DELL'ANGELICA, E. C.; SPRINGER, T. A. **Immunoprecipitation.** *Current Protocols in Neuroscience*, v. 35, n. 1, p. 5.24.1-5.24.28, 2006.
- BRITO, R. et al. **Oxidative stress in hypertension: Mechanisms and therapeutic opportunities.** *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*, v. 123, n. 6, p. 325-335, 2015.
- BROWN, D. I.; GRIENGLING, K. K. **Nox proteins in signal transduction.** *Free Radical Biology and Medicine*, v. 47, n. 9, p. 1239–1253, 2009.
- BYON, C. H.; HEATH, J. M.; CHEN, Y. **Redox signaling in cardiovascular pathophysiology: A focus on hydrogen peroxide and vascular smooth muscle cells.** *Redox biology*, v. 9, p. 244–253, 2016.
- CARVALHO, M. H. C. et al. **Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções.** *Rev Bras Hipertens*, v. 8, n. 176–88, 2001.
- CERIELLO, A. et al. **Detection of nitrotyrosine in the diabetic plasma: evidence of oxidative stress.** *Diabetologia*, v. 44, n. 7, p. 834–838, 2001.
- CHENG, S. et al. **Site selectivity for protein tyrosine nitration: Insights from features of structure and topological network.** *Molecular BioSystems*, v. 9, n. 11, p. 2860-2868, 2013.



- COOKE, C.-L. M.; DAVIDGE, S. T. **Peroxynitrite increases iNOS through NF- $\kappa$ B and decreases prostacyclin synthase in endothelial cells.** American Journal of Physiology-Cell Physiology, v. 282, n. 2, p. C395–C402, 2002.
- CROMHEEKE, K. et al. **Inducible nitric oxide synthase colocalizes with signs of lipid oxidation/oxidation in human atherosclerotic plaques.** Cardiovascular Research, v. 43, n. 3, p. 744–754, 1999.
- CROSS, A. H. et al. **Peroxynitrite formation within the central nervous system in active multiple sclerosis.** Journal of neuroimmunology, v. 88, n. 1–2, p. 45–56, 1998.
- DCTECH LABORATORY TECHNOLOGIES. [Site]. Apresenta informações sobre equipamentos para laboratório. Disponível em: <<https://www.dctech.com.br/cromatografia-de-afinidade/>>. Acesso em: 09 jun. 2019.
- DE ANDRADE, J. A. et al. **Protein Nitration, Metabolites of Reactive Nitrogen Species, and Inflammation in Lung Allografts.** American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, v. 161, n. 6, p. 2035–2042, 2000.
- DE CAVANAGH, E. M. V et al. **Renal mitochondrial dysfunction in spontaneously hypertensive rats is attenuated by losartan but not by amlodipine.** American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, v. 290, n. 6, p. 1616–1625, 2006.
- DE GASPARO, M. et al. **International Union of Pharmacology. XXIII. The Angiotensin II Receptors.** Pharmacological Reviews, v. 52, n. 3, p. 415 LP – 472, 2000.
- DESHAYES, F.; NAHMIAS, C. **Angiotensin receptors: a new role in cancer?** Trends in endocrinology and metabolism: TEM, v. 16, n. 7, p. 293–9, 2005.
- DING, H. et al. **Luteolin Inhibits Smooth Muscle Cell Migration and Proliferation by Attenuating the Production of Nox4, P-Akt and VEGF in Endothelial Cells.** Current Pharmaceutical Biotechnology, v. 14, n. 12, p. 1009- 1015, 2013.
- DI STASI, A. M. et al. **Peroxynitrite induces tyrosine nitration and modulates tyrosine phosphorylation of synaptic proteins.** Journal of Neurochemistry, v. 73, n. 2, p. 727-735, 1999.
- DOUGHAN, A. K.; HARRISON, D. G.; DIKALOV, S. I. **Molecular Mechanisms of Angiotensin II-Mediated Mitochondrial Dysfunction.** Circulation Research, v. 102, n. 4, p. 488–496, 2008.
- DUARTE, J.; FRANCISCO, V.; PEREZ-VIZCAINO, F. **Modulation of nitric oxide by flavonoids.** Food and Function, v. 00, n. 1-3, p. 1-15, 2014.
- DUNCAN, M. W. **A review of approaches to the analysis of 3-nitrotyrosine.** Amino Acids, v. 112, n. 3-4, p. 351-361, 2003.
- EISERICH, J. P. et al. **Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils.** Nature, v. 391, n. 6665, p. 393–397, 1998.
- FARACI, F. M.; DIDION, S. P. **Vascular Protection: Superoxide Dismutase Isoforms in the Vessel Wall.** Arterioscler Thromb Vasc Biol, v. 24, n. 8, p. 1367-1373, 2004.

FÉLÉTOU, M.; HUANG, Y.; VANHOUTTE, P. M. **Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products.** *British Journal of Pharmacology*, v. 164, n. 3, p. 894–912, 2011.

FENG, Q. et al. **Increased Inducible Nitric Oxide Synthase Expression Contributes to Myocardial Dysfunction and Higher Mortality After Myocardial Infarction in Mice.** *Circulation*, v. 104, n. 6, p. 700–704, 2001.

FERRANTE, R. J. et al. **Increased nitrotyrosine immunoreactivity in substantia nigra neurons in MPTP treated baboons is blocked by inhibition of neuronal nitric oxide synthase.** *Brain Research*, v. 823, n. 1–2, p. 177–182, 1999.

FOLKERSEN, J. et al. **An immunoprecipitation-dissociation technique for large scale antibody purification and an antigen consumption electroimmunoassay for antibody quantitation. A model study with antibodies to pregnancy zone protein.** *Journal of Immunological Methods*, v. 23, Issues 1-2, p. 127-135, 1978.

FORMAN, H. J.; URSINI, F.; MAIORINO, M. **An overview of mechanisms of redox signaling.** *Journal of molecular and cellular cardiology*, v. 73, p. 2–9, 2014.

FORSTER, C. et al. **Inducible nitric oxide synthase expression in human cerebral infarcts.** *Acta Neuropathologica*, v. 97, n. 3, p. 215–220, 1999.

FRANCO, M. C.; ESTÉVEZ, A. G. **Tyrosine nitration as mediator of cell death.** *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, v. 71, n. 20, p. 3939-3950, 2014.

GIASSON, B. I. et al. **Oxidative Damage Linked to Neurodegeneration by Selective  $\alpha$ -Synuclein Nitration in Synucleinopathy Lesions.** *Science*, v. 290, n. 5493, p. 985-989, 2000.

GUO, W. et al. **Quantitative assessment of tyrosine nitration of manganese superoxide dismutase in angiotensin II-infused rat kidney.** *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, v. 285, n. 4, p. 1396–1403, 2003.

HADDAD, I. Y. et al. **Quantitation of nitrotyrosine levels in lung sections of patients and animals with acute lung injury.** *The Journal of clinical investigation*, v. 94, n. 6, p. 2407–2413, 1994.

HANAZAWA, T.; KHARITONOV, S. A.; BARNES, P. J. **Increased Nitrotyrosine in Exhaled Breath Condensate of Patients with Asthma.** *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 162, n. 4, p. 1273–1276, 2000.

HENSLEY, K. et al. **Electrochemical Analysis of Protein Nitrotyrosine and Dityrosine in the Alzheimer Brain Indicates Region-Specific Accumulation.** *Journal of Neuroscience*, v. 18, n. 20, p. 8126–8132, 1998.

IGNARRO, L. J. et al. **Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxidizeradical.** *Circ Res*, v. 6, p. 866-879, 1987.

ISCHIROPOULOS, H. et al. **Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase.** *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 298, n. 2, p. 431-437, 1992.

- KABOORD, B.; PERR, M. **Isolation of Proteins and Protein Complexes by Immunoprecipitation.** *Methods Mol Biol*, v. 424, p. 349-364, 2008.
- KASCHINA, E.; UNGER, T. **Angiotensin AT1/AT2 Receptors: Regulation, Signalling and Function.** *Blood Pressure*, v. 12, n. 2, p. 70–88, 2003.
- LAMBETH, J. D. **NOX enzymes and the biology of reactive oxygen.** *Nature Reviews Immunology*, v. 4, n. 3, p. 181-189, 2004.
- LASSÈGUE, B.; GRIENDLING, K. K. **NADPH oxidases: functions and pathologies in the vasculature.** *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, v. 30, n. 4, p. 653-661, 2010.
- LASSÈGUE, B.; GRIENDLING, K. K. **Reactive oxygen species in hypertension: An update.** *American Journal of Hypertension*, v. 17, n. 9, p. 852-860, 2004.
- LAURSEN, J. B. et al. **Endothelial Regulation of Vasomotion in ApoE-Deficient Mice.** *Circulation*, v. 103, n. 9, p. 1282–1288, 2001.
- LI, J.-M.; SHAH, A. M. **Mechanism of Endothelial Cell NADPH Oxidase Activation by Angiotensin II: ROLE OF THE p47 phox SUBUNIT.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 14, p. 12094–12100, 2003.
- LOIOLA, R. A. et al. **Generation and characterization of a spontaneously immortalized endothelial cell line from mice microcirculation.** *Exp Cell Res*, v. 319, p. 1102-1110, 2013.
- LÓPEZ-LÓPEZ, G. et al. **Nitric Oxide (NO) Scavenging and NO Protecting Effects of Quercetin and Their Biological Significance in Vascular Smooth Muscle.** *Molecular Pharmacology*, v. 65, n. 4, p. 851 LP – 859, 2004.
- LYMAR, S. V; HURST, J. K. **Carbon Dioxide: Physiological Catalyst for Peroxynitrite-Mediated Cellular Damage or Cellular Protectant?** *Chemical Research in Toxicology*, v. 9, n. 5, p. 845–850, 1996.
- MACMILLAN-CROW, L. A.; THOMPSON, J. A. **Immunoprecipitation of nitrotyrosine-containing proteins.** *Methods in Enzymology*, v. 301, p. 135-145, 1999.
- MAHMOOD, T.; YANG, P.-C. **Western blot: Technique, theory, and trouble shooting.** *North American Journal of Medical Sciences*, v. 4, n. 9, p. 429-434, 2012.
- MALLOZZI, C.; DI STASI, A. M. M.; MINETTI, M. **Nitrotyrosine mimics phosphotyrosine binding to the SH2 domain of the src family tyrosine kinase lyn.** *FEBS Letters*, v. 503, n. 2-3, p. 189-195, 2001.
- MANEA, A. et al. **AP-1–Dependent Transcriptional Regulation of NADPH Oxidase in Human Aortic Smooth Muscle Cells.** *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 28, n. 5, p. 878–885, 2008.
- MARUMO, T.; SCHINI-KERTH, V. B.; BUSSE, R. **Vascular endothelial growth factor activates nuclear factor-kappaB and induces monocyte chemoattractant protein-1 in bovine retinal endothelial cells.** *Diabetes*, v. 48, n. 5, p. 1131-1137, 1999.
- MATOBA, T.; SHIMOKAWA, H. **Hydrogen Peroxide Is an Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor in Animals and Humans.** *Journal of Pharmacological Sciences*, v. 92, n. 1, p. 1–6, 2003.

MEHTA, P. K.; GRIENGLING, K. K. **Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system.** American Journal of Physiology-Cell Physiology, v. 292, n. 1, p. 82-97, 2007.

MIHM, M. et al. **Peroxynitrite induced nitration and inactivation of myofibrillar creatine kinase in experimental heart failure.** Cardiovascular Research, v. 49, n. 4, p. 798–807, 2001.

MIURA, H. et al. **Role for Hydrogen Peroxide in Flow-Induced Dilation of Human Coronary Arterioles.** Circulation Research, v. 92, n. 2, p. 31-40, 2003.

MONTERO, R. et al. **Muscle coenzyme Q10 concentrations in patients with probable and definite diagnosis of respiratory chain disorders.** Biofactors, v. 25, n. 1-4, p. 109-115, 2005.

MUKOYAMA, M. et al. **Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors.** Journal of Biological Chemistry, v. 268, n. 33, p. 24539–24542, 1993.

MURPHY, T. J. et al. **Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor.** Nature, v. 351, n. 6323, p. 233–236, 1991.

NEURAUTER, A. A. et al. **Cell isolation and expansion using Dynabeads.** Adv Biochem Eng Biotechnol, v. 106, p. 41-73, 2007.

NIKOV, G. et al. **Analysis of nitrated proteins by nitrotyrosine-specific affinity probes and mass spectrometry.** Analytical Biochemistry, v. 320, p. 214-222, 2003.

NISTALA, R.; WHALEY-CONNELL, A.; SOWERS, J. R. **Redox Control of Renal Function and Hypertension.** Antioxidants & Redox Signaling, v. 10, n. 12, p. 2047–2089, 2008.

OLESZAK, E. L. et al. **Inducible Nitric Oxide Synthase and Nitrotyrosine Are Found in Monocytes/Macrophages and/or Astrocytes in Acute, but Not in Chronic, Multiple Sclerosis.** Clinical and Vaccine Immunology, v. 5, n. 4, p. 438-445, 1998.

OSTEROD, M. et al. **Age-related and tissue-specific accumulation of oxidative DNA base damage in 7,8-dihydro-8-oxoguanine-DNA glycosylase (Ogg1) deficient mice.** Carcinogenesis, v. 22, n. 9, p. 1459–1463, 2001.

PELUFFO, G.; RADY, R. **Biochemistry of protein tyrosine nitration in cardiovascular pathology.** Cardiovascular Research, v. 75, n. 2, p. 291–302, 2007.

PENNATHUR, S. et al. **Mass Spectrometric Quantification of 3-Nitrotyrosine, ortho-Tyrosine, and o,o'-Dityrosine in Brain Tissue of 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated Mice, a Model of Oxidative Stress in Parkinson's Disease.** J Biol Chem, v. 274, n. 49, p. 34621-34628, 1999.

Protein A-Agarose Protein G-Agarose: Affinity chromatography for purification of antibodies and for the immunoprecipitation of proteins. Sigma-Aldrich, versão 15, p 1-4, abr/2016. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Roche/Bulletin/1/protgarobul.pdf>>. Acesso em: 09 jun. 2019.

PUEYO, M. E.; N'DIAYE, N.; MICHEL, J.-B. **Angiotensin II-elicited signal transduction via AT1 receptors in endothelial cells.** British Journal of Pharmacology, v. 118, n. 1, p. 79–84, 1996.

RAPOPORT, R. M. ; MURAD, F. **Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat**

**thoracic aorta may be mediated through cGMP.** *Circ Res*, v. 52, n. 3, p. 352-357, 1983. (a)

RAPOPORT, R. M.; MURAD, F. **Endothelium-dependent and nitrovasodilator-induced relaxation of vascular smooth muscle: Role of cyclic GMP.** *J Cyclic Nucleotide Protein Phosphor Res*, v. 9, n. 4-5, p. 281 - 296, 1983. (b)

ROCKLAND ANTIBODIES & ASSAYS. [Site]. Apresenta informações sobre anticorpos e ensaios para laboratório. Disponível em: <<https://rockland-inc.com/protein-a-protein-g-tips.aspx>>. Acesso em: 09 jun. 2019.

RYBALKIN, S. D. et al. **Cyclic GMP Phosphodiesterases and Regulation of Smooth Muscle Function.** *Circ Res*, v. 93, n. 4, p. 280-291, 2003.

SACHSE, A.; WOLF, G. **Journal of the American Society of Nephrology.** *J. Am. Soc. Nephrol.*, v. 12, n. 12, p. 2585–2593, 2007.

SADOSHIMA, J. **Cytokine Actions of Angiotensin II.** *Circulation Research*, v. 86, n. 12, p. 1187–1189, 2000.

SALVEMINI, D.; ISCHIROPOULOS, H.; CUZZOCREA, S. **Roles of Nitric Oxide and Superoxide in Inflammation.** *Methods Mol Biol*, v. 225, p. 291-303, 2003.

SCHINI-KERTH, V. B. **Vascular biosynthesis of nitric oxide: effect on hemostasis and fibrinolysis.** *Transfusion Clinique et Biologique*, v. 6, n. 6, p. 355–363, 1999.

SCHULZ, E. et al. **Nitric Oxide, Tetrahydrobiopterin, Oxidative Stress, and Endothelial Dysfunction in Hypertension.** *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 10, n. 6, p. 1115-1126, 2008.

SMITH, G. R.; MISSAILIDIS, S. **Cancer, inflammation and the AT1 and AT2 receptors.** *Journal of Inflammation*, v. 1, n. 1, p. 3, 2004.

SOUZA, J. M.; PELUFFO, G.; RADJ, R. **Protein tyrosine nitration-Functional alteration or just a biomarker?** *Free Radical Biology and Medicine*, v. 45, n. 4, p. 357-366, 2008.

SU, J. et al. **Luteolin Ameliorates Hypertensive Vascular Remodeling through Inhibiting the Proliferation and Migration of Vascular Smooth Muscle Cells.** *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*, v. 2015, p. 364876, 2015.

SUN, Z. et al. **RhoA/rock signaling mediates peroxynitrite-induced functional impairment of Rat coronary vessels.** *BMC cardiovascular disorders*, v. 16, n. 1, p. 193, 2016.

TEIXEIRA, D. et al. **3-Nitrotyrosine quantification methods: Current concepts and future challenges.** *Biochimie*, v. 125, p. 1–11, 2016.

TEUNISSEN, C. E. et al. **Evaluation of 3-nitrotyrosine as a marker for 3-nitropropionic acid-induced oxidative stress in Lewis and Wistar rats and strain-specific whole brain spheroid cultures.** *Brain Research*, v. 931, n. 1, p. 5–20, 2002.

THERMOFISHER SCIENTIFIC. [Site]. Apresenta informações sobre equipamentos para laboratório. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/immunoprecipitation-ip.html>>. Acesso em: 09 jun. 2019

- TOHGI, H. et al. **Alterations of 3-nitrotyrosine concentration in the cerebrospinal fluid during aging and in patients with Alzheimer's disease.** *Neuroscience Letters*, v. 269, n. 1, p. 52–54, 1999.
- TOUYZ, R. M.; SCHIFFRIN, E. L. **Signal Transduction Mechanisms Mediating the Physiological and Pathophysiological Actions of Angiotensin II in Vascular Smooth Muscle Cells.** *Pharmacological Reviews*, v. 52, n. 4, p. 639 LP – 672, 2000.
- TRIEU, E. P.; TARGOFF, I. N. **Immunoprecipitation: Western blot for proteins of low abundance.** *Western Blotting: Methods and Protocols*, v. 1312, p. 327-342, 2015.
- TSIKAS, D. **What we—authors, reviewers and editors of scientific work—can learn from the analytical history of biological 3-nitrotyrosine.** *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v. 1058, p. 68-72, 2017.
- TURKO, I. V.; MURAD, F. **Mapping Sites of Tyrosine Nitration by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry.** *Methods in Enzymology*, v. 396, p. 266–275, 2005.
- VANHOUTTE, P. M. **Endothelial Control of Vasomotor Function.** *Circulation Journal*, v. 67, n. 7, p. 572–575, 2003.
- VANHOUTTE, P. M. et al. **Thirty Years of Saying NO: Sources, Fate, Actions, and Misfortunes of the Endothelium-Derived Vasodilator Mediator.** *Circulation Research*, v. 119, n. 2, p. 375-396, 2016.
- VASCONCELOS, S. M. L. et al. **Hipótese oxidativa da hipertensão arterial : uma minirrevisão.** *Rev Bras Hipertens*, v. 14, n. 4, p. 269 -274, 2007.
- VERSARI, D. et al. **Endothelium-dependent contractions and endothelial dysfunction in human hypertension.** *British Journal of Pharmacology*, v. 157, n. 4, p. 527–536, 2009.
- XU, T. et al. **Luteolin Inhibits Angiotensin II-Stimulated VSMC Proliferation and Migration through Downregulation of Akt Phosphorylation.** *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*, v. 2015, p. 931782, 2015.
- WELCH, W. J. **Angiotensin II–Dependent Superoxide.** *Hypertension*, v. 52, n. 1, p. 51–56, 2008.
- ZHAN, X.; DESIDERIO, D. M. **MALDI-induced Fragmentation of Leucine enkephalin, Nitro-Tyr Leucine Enkephalin, and d(5)-Phe-Nitro-Tyr Leucine Enkephalin.** *International journal of mass spectrometry*, v. 287, n. 1–3, p. 77–86, 2009.
- ZHU, M. et al. **Luteolin Inhibits Angiotensin II-Induced Human Umbilical Vein Endothelial Cell Proliferation and Migration Through Downregulation of Src and Akt Phosphorylation.** *Circulation Journal*, v. 77, n. 3, p. 772-779, 2013.
- ZWEIER, J. L.; FERTMANN, J.; WEI, G. **Nitric Oxide and Peroxynitrite in Postischemic Myocardium.** *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 3, n. 1, p. 11–22, 2001.