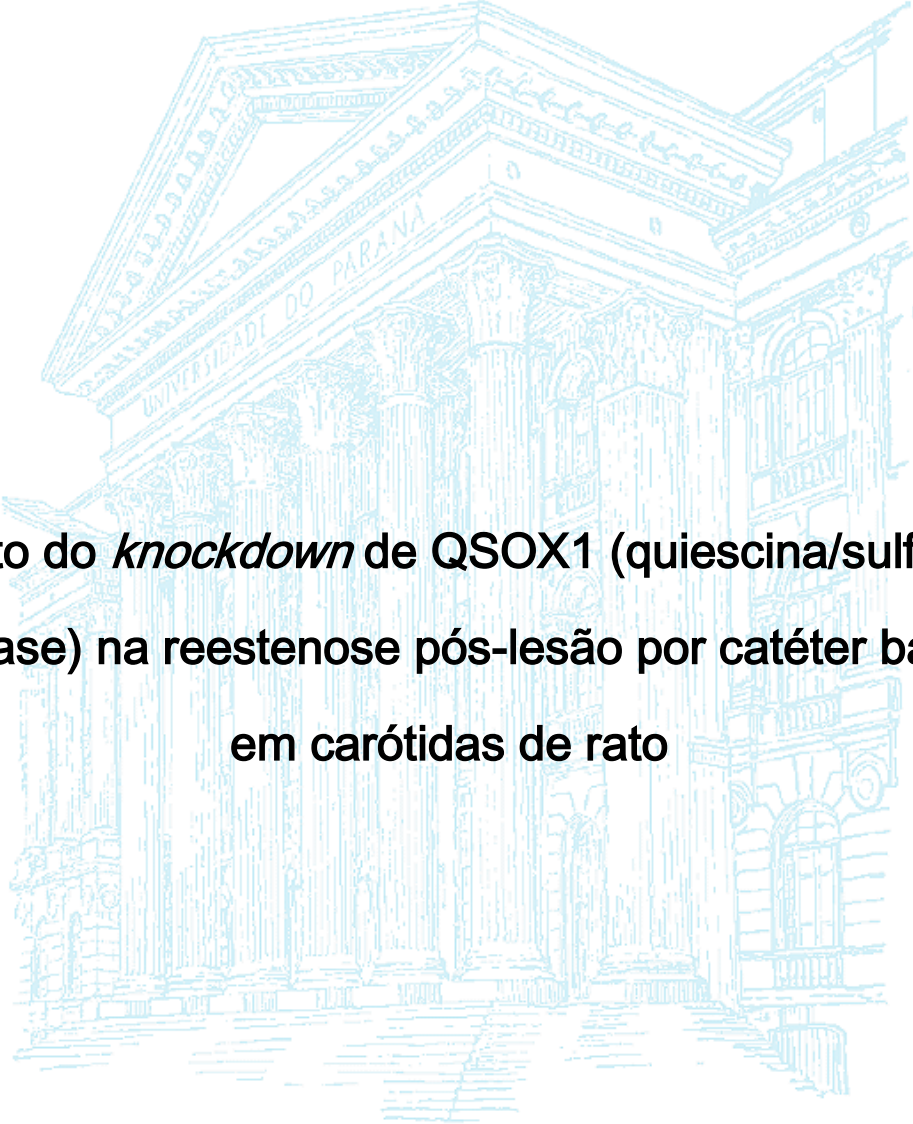


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

AXEL HELMUT RULF COFRÉ



Efeito do *knockdown* de QSOX1 (quiescina/sulfidril oxidase) na reestenose pós-lesão por catéter balão em carótidas de rato

Curitiba 2011

AXEL HELMUT RULF COFRÉ

Efeito do *knockdown* de QSOX1 (quiescina/sulfidril oxidase) na reestenose pós-lesão por catéter balão em carótidas de rato

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de mestre, pelo curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof. Dra. Lia Sumie Nakao

CURITIBA 2011

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Cofré, Axel Helmut Huf

Efeito do *knockdown* de QSOX1 (quiescina/sulfidril oxidase) na reestenose pós-lesão por catéter balão em carótidas de rato. / Axel Helmut Huf Cofré. – Curitiba, 2012.

66 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Lia Sumie Nakao

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Reestenose coronária 2. Oxirredutases I. Título II. Nakao, Lia Sumie III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.


CDD (20. ed.) 574.19258

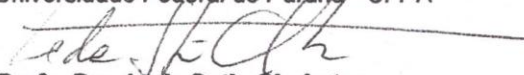
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

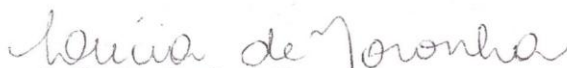
Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:


Profa. Dra. Lia Sumie Nakao
Orientadora e presidente da banca
Universidade Federal do Paraná - UFPR


Profa. Dra. Leda Satie Chubatsu
Universidade Federal do Paraná - UFPR


Profa. Dra. Lucia de Noronha
Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUCPR

E tendo como suplente,

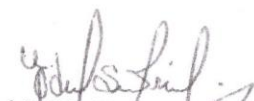
Prof. Dr. Bruno Dallagiovanna
Instituto Carlos Chagas - ICC

Após arguir o mestrando **Axel Helmut Ruif Cofré**, em relação ao seu trabalho intitulado: "Efeito da supressão gênica de QSOX1 (quiescina/sulfidril oxidase) na reestenose pós-lesão por cateter-balão em carótidas de rato" são de parecer favorável à aprovação do acadêmico, habilitando-o ao título de MESTRE em Biologia Celular e Molecular.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 23 de fevereiro de 2011




Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular - UFPR
Matr. 185795

Ao meu avô "Lalo" (*in memoriam*) que é minha inspiração

Às minhas sobrinhas Manuela e Isabela.

AGRADECIMENTOS

- À minha orientadora Dr^a. Lia Sumie Nakao não só pela orientação, mas pela oportunidade de aprendizagem, pela amizade e compreensão.
- Ao professor Dr. Silvo Marques Zanata pela estrutura do laboratório.
- À professora Adriana Mercadante pelos auxílios em biologia molecular.
- À Beatriz Essenfelder Borges, Chelin Auswaldt Steclan e Márcia Helena Appel pela grande ajuda nos experimento *in vitro*.
- Ao pessoal do laboratório de Matriz Extracelular da UFPR, pela amizade e disponibilidade.
- Aos meus amigos do laboratório: Silvia, Breno, Max, Sofia, Michele, Luiz, Rodrigo, Beth e todos os outros alunos que de alguma forma contribuíram com a realização deste trabalho, seja com conselhos de experimento ou uma boa conversa.
- À minha namorada Ana Luiza pelo companheirismo, cumplicidade e amor.
- A toda minha família que é a base da minha educação e formação.
- A Deus pela saúde, sabedoria e serenidade.
- Ao CNPq, Capes e INCT - Redoxoma pelo financiamento.

“Está instaurada a dúvida. A metódica dúvida epistemológica. Neste mundo a Terra não está no centro, nenhum saber é saber completo. Seja bem-vinda era da razão. Não há que se temer a revisão.

Nada que se diga ou que foi dito merece estatuto de dogma irrestrito. Cuidado com a verdade que se pretende maior que a realidade, pois, os fatos são os fatos e fluem diante de nós que estupefatos assistimos ao espetáculo”.

Galileu Galilei

RESUMO

A reestenose é um processo que atinge cerca de 30% das pessoas submetidas à angioplastia. Durante a reestenose há migração e proliferação de células musculares lisas (VSMC) em direção ao lúmen do vaso, provocando a formação de uma camada neo-íntima rica em VSMC e matriz extracelular (MEC). A QSOX é uma proteína sulfidril oxidase que catalisa a oxidação de ditióis a dissulfetos e, por isso, pode ser um alvo interessante, já que a MEC é rica em tióis. Nossos estudos mostraram a expressão de QSOX durante o processo de reestenose em ratos lesados com cateter balão (1, 7, 14 e 21 dias). Imediatamente após a lesão com cateter balão, os ratos foram submetidos à transfecção de RNAi para QSOX com gel plurônico. Após 14 dias, observamos uma clara mudança na morfologia das células tratadas com RNAi para QSOX em comparação ao controle negativo “scrambled”, apesar de não haver diferença na relação íntima/média. Foi possível observar dois tipos distintos de células nos animais tratados com RNAi para QSOX, fato que não foi visto nos animais sem tratamento, 14 dias após a lesão. Sugerimos que a QSOX possa estar envolvida no processo de diferenciação celular, já que as células observadas eram morfologicamente semelhantes às células encontradas após três meses de lesão. Ensaio *in vitro* mostraram que a transfecção de RNAi para QSOX levou a uma diminuição na migração (~30%, 48 horas) e viabilidade celular (~10%) em cultura de VSMC. Estes resultados sugerem que a QSOX possa ter um papel na diferenciação celular *in vivo*, mas *in vitro* a supressão parcial promove a inibição da proliferação e migração celulares.

Palavras-chave: QSOX, Reestenose, RNA de interferência.

ABSTRACT

Restenosis is a process that affects around 30% of people undergoing angioplasty. During restenosis occurs migration and proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMC) into the lumen of the vessel, leading to the formation of a neo-intimal layer rich in VSMC and extracellular matrix (ECM). QSOX is a sulfhydryl oxidase protein that catalyzes the oxidation of thiols to disulfides and, because of that, it can be an attractive target, given that ECM is rich in thiols. Our studies showed the expression of QSOX during the process of restenosis in rats injured with a balloon catheter (1, 7, 14 and 21 days). Immediately after the catheter balloon injury, rats were subjected to QSOX RNAi transfection with pluronic gel. After 14 days we observed a clear change in cell morphology of cells treated with QSOX RNAi compared to the negative control scrambled, although no difference in the relation between intima/media was detected. It was possible to observe two distinct types of cells in animals' transfected with QSOX RNAi, a fact which was not observed in animals not submitted to this treatment, at 14 days of injury. We suggest that QSOX may be involved during cell differentiation process, since the analyzed cells were morphologically similar to cells found after three months of injury. In vitro assays showed that transfection of RNAi to QSOX led to a decrease in migration (~ 30%, 48 hours) and cell viability (~ 10%) in cultured VSMC. These results suggest that QSOX1 may play a role at in vivo differentiation, but, in vitro, its partial suppression promotes inhibition of VSMC proliferation and migration.

Keywords: QSOX, Restenosis, interference RNA.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- REPRESENTAÇÃO DO PROCESSO DE ATEROSCLEROSE	17
Figura 2	- REPRESENTAÇÃO DO PROCEDIMENTO DE ANGIOPLASTIA.....	18
Figura 3	- ESQUEMA REPRESENTATIVO DO MECANISMO DE AÇÃO DE RNA DE INTERFERÊNCIA.....	21
Figura 4	- LESÃO COM CATETER BALÃO EM CARÓTIDA DE RATOS	27
Figura 5	- ANÁLISE SEMI-QUANTITATIVA DA IMUNOMARCAÇÃO....	31
Figura 6	- CURSO DA FORMAÇÃO DA NEO-INTIMA EM CARÓTIDA DE RATOS APÓS LESÃO COM CATETER BALÃO.....	37
Figura 7	- EXPRESSÃO DE QSOX NA NEO-INTIMA APÓS LESÃO POR CATETER BALÃO.....	38
Figura 8	- CONTROLE NEGATIVO DE IMUNOMARCAÇÃO.....	39
Figura 9	- EXPRESSÃO DE FIBRONECTINA NA NEO-INTIMA APÓS LESÃO POR CATETER BALÃO.....	40
Figura 10	- TRANSFECCÃO DE MOLÉCULAS DE DNA E RNA EM CARÓTIDA DE RATOS COM GEL PLURÔNICO.....	41
Figura 11	- EXPRESSÃO DE QSOX EM NEO-INTIMA DE RATOS APÓS TRANSFECCÃO DE RNAI.....	42
Figura 12	- ÁREA INTIMA E MÉDIA DE CARÓTIDA DE RATOS LESADA COM CATETER BALÃO E RNAI QSOX.....	43
Figura 13	- EFEITO MORFOLÓGICO DO KNOCKDOWN DE QSOX NA REESTENOSE APÓS 14 DIAS DA LESÃO.....	44
Figura 14	- QUANTIDADE RELATIVA DE NÚCLEOS CELULARES NA NEO-INTIMA DE ANIMAIS TRATADOS COM RNAI.....	45
Figura 15	- CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULA MUSCULAR LISA DE AORTA DE RATOS.....	46
Figura 16	- EFICIÊNCIA DE TRANSFECCÃO EM VSMC POR OLIGOFECTAMINA E ELETROPORAÇÃO.....	47
Figura 17	- VALIDAÇÃO DOS INICIADORES PELO METODO $2^{-\Delta\Delta CT}$	48
Figura 18	- NÍVEL DE RNAM DE QSOX APÓS KNOCKDOWN.....	49
Figura 19	- NÍVEL DE EXPRESSÃO DE RNAM APÓS SUPEREXPRESSÃO DE QSOX.....	50
Figura 20	- EFEITO DA SUPRESSÃO DA EXPRESSÃO DE QSOX NA PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	51
Figura 21	- EFEITO DA SUPEREXPRESSÃO DE QSOX NA PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	51
Figura 22	- VIABILIDADE CELULAR APÓS KNOCKDOWN DE QSOX..	52
Figura 23	- VIABILIDADE CELULAR APÓS SUPEREXPRESSÃO DE QSOX.....	53
Figura 24	- EFEITO DO RNAI PARA QSOX NA MIGRAÇÃO CELULAR	54

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Composição da hematoxilina de Harris e eosina.....	29
Quadro 2 - Condições de transfecção <i>in vitro</i>	33
Quadro 3 - Reação de qPCR.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS

ALR	-	“Augmenter of Liver Regeneration”
DAB	-	Diaminobenzidina
DEPC	-	Dietil Pirocarbonato
DMSO	-	Dimetilsulfóxido
dsRNA	-	“Double stranded RNA”
ERV	-	“Essential for Respiration and Vegetative Growth”
FAD	-	Flavina Adenina Dinucleotídeo
HPRT	-	Hypoxanthine Guanine Phospho Ribosyltransferase
IGF-1	-	Fator de crescimento tipo leucina 1
IL-1	-	Interleucina 1
LDL	-	“Low Density Lipoprotein”
MEC	-	Matriz Extracelular
MCP-1	-	“Monocyte Chemoattractant Protein-1”
PAI-1	-	Plasminogênio ativador inibidor-1
PBS	-	Solução Salina Tamponada com Fosfato
PCNA	-	Proliferating-Cell Nuclear Antigen
PDGF	-	“Platelet-Derived Growth Factor”
PDI	-	Proteína Dissulfeto Isomerase
PF-127	-	Gel Plurônico F127
qPCR	-	“Quantitative Polymerase Chain Reaction”
QSOX	-	Quiescina/Sulfidril Oxidase
RISC	-	“RNA-Induced Silencing Complex”
RNAi	-	RNA de Interferência
RNA _m	-	RNA mensageiro
siRNA	-	“Small Interference RNA”
TGF β	-	“Transforming Growth Factor Beta”
TRX	-	Tiorredoxina
VSMC	-	“Vascular Smooth Muscle Cells”

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 ATEROSCLEROSE	16
1.2 ANGIOPLASTIA.....	17
1.3 REESTENOSE.....	18
1.4 RNA DE INTERFERÊNCIA.....	20
1.5 QSOX.....	21
2. OBJETIVOS	25
2.1 OBJETIVO GERAL	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS	26
3.2 LESÃO ARTERIAL.....	26
3.3 KNOCKDOWN DE QSOX1 <i>IN VITRO</i>	27
3.4 ANÁLISE MORFOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA.	28
3.4.1 Emblocagem dos tecidos.....	28
3.4.2 Coloração com hematoxilina e eosina	29
3.4.3 Imunomarcação	29
3.4.4 Análise semi-quantitativa da área imunomarcada	30
3.5 CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULA MUSCULAR LISA DE VASO	31
3.6 CULTURA DE VSMC.....	32
3.7 RNA DE INTERFERÊNCIA (KNOCKDOWN) <i>IN VITRO</i>	32
3.8 ELETROPORAÇÃO DE VSMC.....	33
3.9 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA POR qPCR	34
3.10 MIGRAÇÃO.....	35
3.11 VIABILIDADE CELULAR	36
3.12 PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	36

4. RESULTADOS	37
4.1 CURSO DA LESÃO LESADA EM CARÓTIDA DE RATO LESADA COM CATÉTER BALÃO	37
4.2 EXPRESSÃO DE QSOX EM CARÓTIDA DE RATO APÓS LESÃO COM CATÉTER BALÃO	38
4.3 EXPRESSÃO DE FIBRONECTINA EM CARÓTIDA DE RATO APÓS LESÃO POR CATÉTER BALÃO.....	39
4.4 EFICIÊNCIA DA TRANSFEÇÃO EM CARÓTIDA DE RATO COM GEL PLURÔNICO.....	40
4.5 EXPRESSÃO DE QSOX EM NEO-ÍNTIMA DE RATO APÓS LESÃO COM CATÉTER BALÃO E “KNOCKDOWN”	42
4.6 MORFOLOGIA DA NEO-ÍNTIMA DE RATO APÓS LESÃO COM CATÉTER BALÃO E KNOCKDOWN.....	43
4.7 CARACTERIZAÇÃO DE VSMC.....	45
4.8 TRANSFEÇÃO EM VSMC	46
4.9 VALIDAÇÃO DOS INICIADORES PARA qPCR	47
4.10 QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DE RNAm DE QSOX APÓS “KNOCKDOWN” <i>IN VITRO</i>	48
4.11 QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DE RNAm DE QSOX APÓS SUPEREXPRESSÃO DE QSOX <i>IN VITRO</i>	49
4.12 EFEITO DO “KNOCKDOWN” DE QSOX NA PROLIFERAÇÃO CELULAR	50
4.13 EFEITO DA SUPEREXPRESSÃO DE QSOX NA PROLIFERAÇÃO CELULAR	51
4.14 VIABILIDADE CELULAR APÓS “KNOCKDOWN” DE QSOX <i>IN VITRO</i>	52
4.15 VIABILIDADE CELULAR APÓS SUPEREXPRESSÃO DE QSOX <i>IN VITRO</i>	52
4.16 MIGRAÇÃO DE VSMC APÓS “KNOCKDOWN” DE QSOX.....	53
5. DISCUSSÃO	55

6. CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS	59
ANEXOS	68

1. INTRODUÇÃO

1.1 ATEROSCLEROSE

A aterosclerose é uma doença crônica inflamatória causada pela formação de ateromas nos vasos sanguíneos. Os ateromas são placas formadas principalmente por lipídios que se acumulam na parede do vaso causando o estreitamento do lúmen, podendo levar à interrupção total do fluxo sanguíneo (Tonkin, 2003). Dependendo da localização, pode causar infarto do miocárdio e derrames e, em muitos casos, é fatal (Glaudemans, Slart *et al.*, 2010; Nofer, Brodde *et al.*, 2010). De fato, doenças cardiovasculares são uma das principais causas de morte nos países industrializados (Handler e Coghlan, 2007). Em 2006, elas foram a maior causa individual de morte nos Estados Unidos da América (EUA), chegando a 26% do total de óbitos. Mais de 400 mil pessoas naquele país morreram decorrentes de infarto do miocárdio em 2006 (Lloyd-Jones, Adams *et al.*, 2010), que na maioria dos casos é causado pela aterosclerose (Hansson, 2005). Acredita-se que nos EUA foram gastos 155,7 bilhões de dólares com atendimentos de doenças cardiovasculares em 2010 e que houve mais de 1 milhão 255 mil casos de ataques cardíacos, dentre os quais 755 mil eram casos novos e os demais reincidentes (Lloyd-Jones, Adams *et al.*, 2010).

A artéria normal possui divisões histológicas bem definidas (Figura 1), sendo uma primeira camada composta por células endoteliais (túnica íntima), seguida de uma túnica média, que possui principalmente células musculares lisas e fibras elásticas dando firmeza aos vasos, e por fim a túnica adventícia rica em matriz extracelular que confere a sustentação (Junqueira e Carneiro, 2004; Sreejayan, Ren *et al.*, 2008a).

Quando os níveis de colesterol na corrente sanguínea são elevados há o risco de acúmulo de LDL (Low Density Lipoprotein), cálcio e outras substâncias sob o endotélio do vaso, levando a formação de placas (Figura 1) (Tonkin, 2003; Cheema, 2006). O LDL-colesterol circulante atravessa o endotélio e se acumula entre a média e a íntima. O acúmulo de LDL inicia um processo de oxidação que ativa as células endoteliais, levando a um processo inflamatório crônico (Berliner, Navab *et al.*, 1995). Monócitos e linfócitos migram através do

endotélio e permanecem na íntima. Lá, macrófagos fagocitam as partículas de LDL-colesterol modificadas, formando as células espumosas ou “foam cells” (Libby, 2001). As células espumosas podem se romper e formar estrias gordurosas. Células musculares lisas migram da média em direção a íntima, e contribuem para a deposição de matriz extracelular. Assim, células vivas, restos celulares e matriz extracelular compõem placa aterosclerótica, a qual leva a estenose (Hansson, 2005).

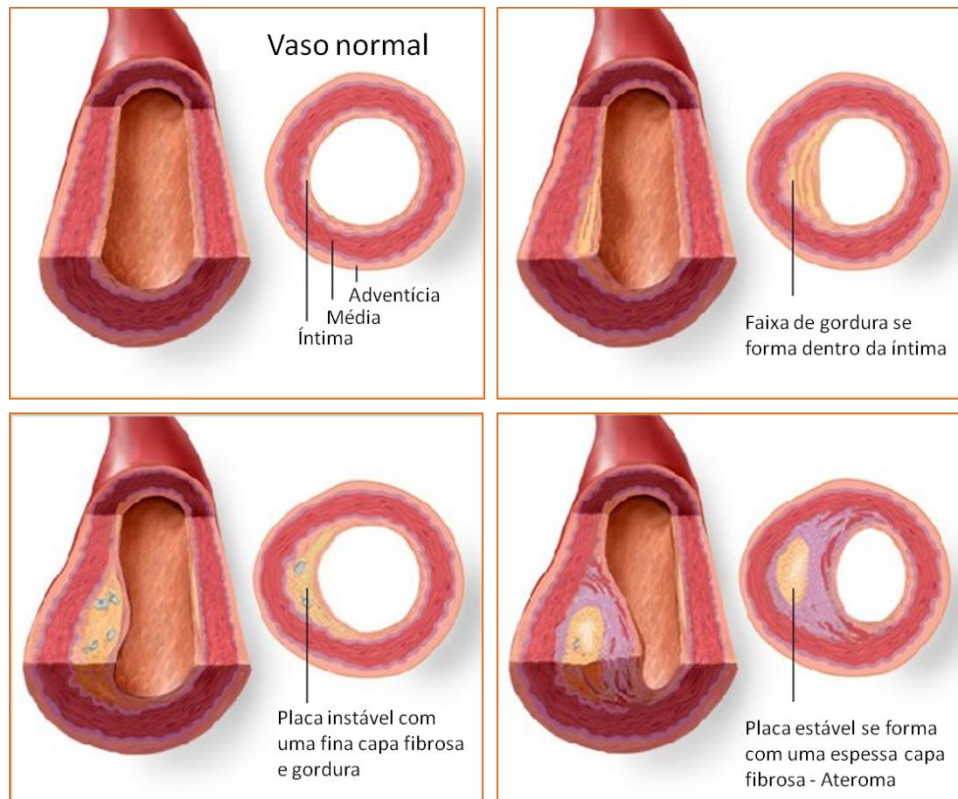


FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO DO PROCEDDO DE ATEROSCLEROSE. O Colesterol LDL atravessa a camada média do vaso. O acúmulo do colesterol juntamente com outras moléculas forma o ateroma, estreitando o lúmen do vaso.

FONTE: Adaptado de American Heart Association Learn and Live®

1.2 ANGIOPLASTIA

Intervenções de cateterismo vem sendo utilizadas há mais de 100 anos (Mueller e Sanborn, 1995). Em 1977, o cirurgião Andrew Grüntzig com auxílio de um catéter provido de um balão, que pode ser insuflado, em uma das suas extremidades, inventou a técnica da angioplastia com catéter balão (Gruntzig e Schneider, 1977).

A angioplastia é realizada por meio de um procedimento cirúrgico, no qual um catéter balão é introduzido no lúmen do vaso aterosclerótico. O balão é então insuflado, comprimindo o ateroma e restabelecendo o fluxo sanguíneo (Figura 2) (Gruntzig e Schneider, 1977; Levy, Jesse *et al.*, 1979). Contudo, alguns pacientes que haviam passado pelo procedimento de angioplastia voltaram a ter complicações no mesmo vaso em que a aterosclerose havia sido “removida”. Estudos levaram a descoberta de uma nova patologia, hoje conhecida como reestenose (Caramori, Yamamoto *et al.*, 1997).

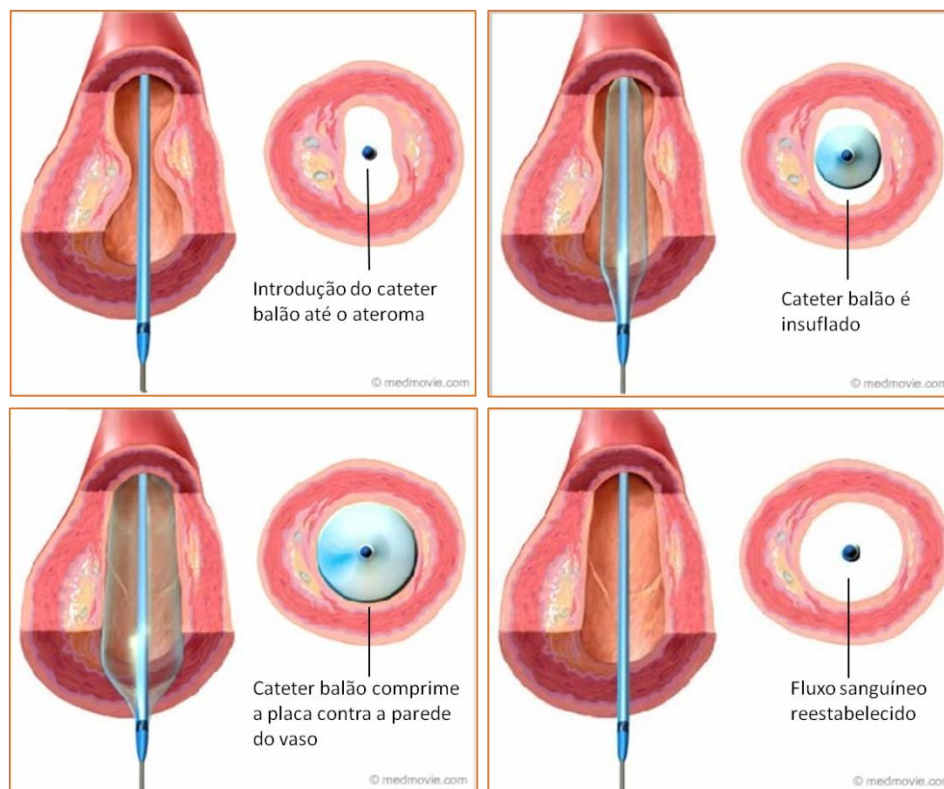


FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO DO PROCEDIMENTO DE ANGIOPLASTIA. Um catéter balão é introduzido no lúmen do vaso e é inflado na região do ateroma comprimindo-o e restabelecendo o fluxo sanguíneo.

FONTE: adaptada da American Heart Association Learn and Live®

1.3 REESTENOSE

A reestenose é uma complicação importante da angioplastia, pois atinge de 30% a 50% dos pacientes que sofreram este procedimento (Bauters e Isner, 1997). Devido à lesão que é causada na artéria pelo catéter quando insuflado, há a exposição de células musculares lisas pela perda das células endoteliais. Em seguida, um processo inflamatório é iniciado no local da lesão, com o acúmulo de plaquetas e leucócitos que liberam fatores de crescimento (Toutouzas, Colombo *et al.*, 2004), tais como TGF- β , PDGF (Nikol, Huehns *et*

al., 1996; Bauters e Isner, 1997) e a expressão de metaloproteases por VSMC (Galis e Khatri, 2002).

Sabe-se que na reestenose além dos fatores de crescimento que estimulam a proliferação celular, a matriz extracelular ocupa um papel importante nesse remodelamento, sendo que de toda a camada neo-íntima 60% do volume é composto por matriz extracelular (Bauters e Isner, 1997). Em pesquisas histológicas com carótidas de humanos com “stent”, foram identificadas uma série de componentes da matriz extracelular como colágeno do tipo III, versicam e ácido hialurônico, esses dois últimos co-localizados com α -actina e CD44 ligado ao espessamento da íntima (Farb, Kolodgie *et al.*, 2004).

Em humanos a reestenose leva cerca de três a seis meses para ser formada. (Nikol, Huehns *et al.*, 1996). Portanto, as investigações sobre complicações da angioplastia vêm sendo realizadas em animais experimentais. O macaco é o animal que mais se assemelha ao homem em termos de respostas fisiopatológicas. Porém, devido à dificuldade de manipulação e o tempo de demora para obtenção dos resultados, animais menores são mais frequentemente utilizados, como o coelho, o camundongo e o rato. O modelo experimental em rato é um estudo dirigido somente à reestenose, já que esse animal não sofre aterosclerose (Kantor, Ashai *et al.*, 1999).

O procedimento da formação da neo-íntima em rato é bem descrito e ainda muito estudado. A cirurgia é realizada na carótida esquerda com auxílio de um catéter balão e após 14 dias a formação da neo-íntima está completa e estabilizada após o 21º dia (Clowes, Reidy *et al.*, 1983; Clowes e Clowes, 1986; Tulis, 2008). Logo após a lesão há a perda das células endoteliais, rompimento das fibras elásticas e exposição das células musculares lisas (Clowes e Clowes, 1986). A disfunção das células endoteliais leva a expressão aumentada de plasminogenio ativador inibidor-1 (PAI-1), fibronectina, trombospondina, integrinas, selectinas, angiotensina e dezenas de fatores de crescimento, entre os principais presentes estão: TGF- β , PDGF, IL-1 e IGF-1. Outros fatores também são liberados nas células musculares lisas ativando-as (Nikol, Huehns *et al.*, 1996) juntamente com a ativação de alguns oncogenes

(Muller, 1997) e PCNA (“Proliferating-Cell Nuclear Antigen”), que é uma proteína nuclear necessária para a síntese de DNA pela DNA polimerase (Morishita, Gibbons *et al.*, 1993). Após 48 horas as SMCs começam a migrar da camada média e após 96 horas migram para formar a neo-íntima (Clowes e Clowes, 1986), juntamente com um aumento significativo na síntese protéica. Há a deposição de colágeno, elastina e proteoglicanos (Strauss, Chisholm *et al.*, 1994).

Durante os primeiros 14 dias ocorre o maior espessamento da neo-íntima (Clowes e Clowes, 1986), composta por células musculares lisas não diferenciadas, sem capacidade contrátil (Schwartz, Campbell *et al.*, 1986), juntamente com a expressão de proteínas da matriz extracelular como fibronectina, osteopontina e vitronectina. Tanto o RNA mensageiro (RNAm) como a proteína fibronectina apresentam expressão acumulada na porção luminal da neo-íntima (Bauters, Marotte *et al.*, 1995). Após o 21º dia de lesão, a neo-íntima começa a se estabilizar tendo uma diminuição no espessamento em relação ao 14º dia (Clowes e Clowes, 1986).

1.4 RNA DE INTERFERÊNCIA

Uma das melhores formas de se estudar uma proteína e entender a sua função é suprimindo a proteína de estudo. Uma das técnicas utilizadas é conhecida como “knockout” na qual mutações levariam a uma inativação do gene permitindo analisar os efeitos da ausência do produto gênico em estudos biológicos (Redmond, 2001). O problema desse modelo é que muitas proteínas são essenciais para o desenvolvimento e muitos animais não se desenvolviam e não nasciam. Até mesmo modelos de cultivo de células nocauteadas podem acarretar resultados duvidosos, já que algumas proteínas dependem exclusivamente de outras para serem expressas, além de demandar laboratórios especializados e do custo elevado.

O mecanismo de RNA de interferência (RNAi) é um processo de silenciamento gênico pós transcricional, onde um RNA dupla fita (dsRNA) com sequência específica inibe a expressão gênica (Kurreck, 2009). Esse processo foi primeiramente observado em plantas (Napoli, Lemieux *et al.*, 1990) e logo descrito no nematódeo *Caenorhabditis elegans* (Fire, Xu *et al.*, 1998). No

citoplasma, o dsRNA é processado pela RNase III Dicer em “small interfering RNA” (siRNA) de 21 a 23 nucleotídeos (Elbashir, Lendeckel *et al.*, 2001). Os siRNAs são processados então por um complexo de ribonucleoproteínas, a RISC (“RNA-induced silencing complex”). A RISC identifica seqüências complementares entre siRNA e RNA mensageiro e esse RNAm é clivado levando à degradação e conseqüente diminuição (“knockdown”) da expressão gênica (Baulcombe, 2002) (Figura 3).

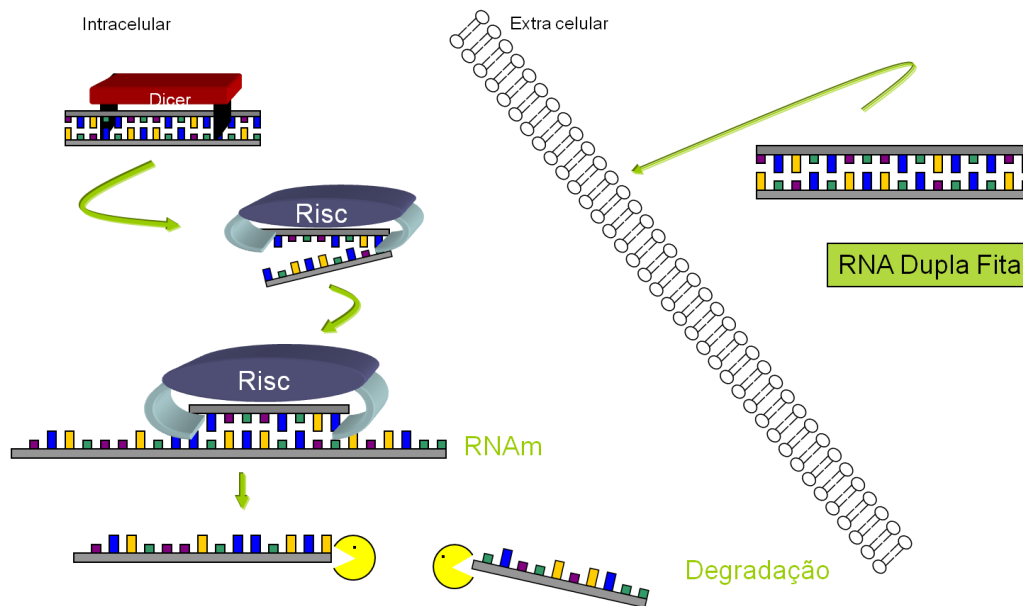
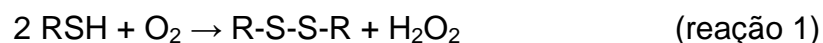


FIGURA 3 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DO MECANISMO DE AÇÃO DE RNA DE INTERFERÊNCIA. No citoplasma o RNA dupla fita é processado pela Dicer em siRNA de 21 a 23 nucleotídeos que é incorporado pela RISC que identifica seqüências complementares entre siRNA e RNAm inibindo a síntese protéica.
 FONTE: DO AUTOR.

1.5 QSOX

QSOX (quiescina/sulfidril oxidase) são tiol oxidases dependentes de FAD (flavina adenina dinucleotídeo) que catalisam, através de uma série de reações de troca tiol-dissulfeto, a oxidação de di(tióis) a dissulfeto com a redução concomitante de oxigênio molecular a peróxido de hidrogênio (reação 1) (Thorpe, Hooper *et al.*, 2002; Raje e Thorpe, 2003; Heckler, Rancy *et al.*, 2008).



Em mamíferos, existem dois genes para QSOX, os quais originam QSOX1, a mais abundante, e QSOX2 ou QSOXN, caracterizada inicialmente em células de neuroblastoma (Wittke, Wiedemeyer *et al.*, 2003). Estruturalmente, QSOX são compostas por um domínio TRX (tioredoxina) na porção N-terminal, seguido de um domínio característico de QSOX, *helix-rich region* (HRR), e um domínio Erv/Alr na porção C-terminal. Este último domínio contém o sítio de ligação de FAD. Erv1 e Erv2 (“Essential for respiration and vegetative growth”) são proteínas de levedura homólogas à proteína Alr (“Augmenter of liver regeneration”) de mamíferos (Fass, 2008). Estas proteínas (Erv e Alr) são pequenas tiol oxidases com diversas funções (Coppock e Thorpe, 2006; Thorpe e Coppock, 2007). Alr é um fator de crescimento que estimula a proliferação de hepatócitos para a regeneração do tecido hepático (Chen, Yu *et al.*, 2003).

A expressão de QSOX1 já foi demonstrada em diversos ambientes, como trato reprodutor masculino (Ostrowski, M. C. e Kistler, W. S., 1980; Benayoun, Esnard-Feve *et al.*, 2001), fibroblastos de pulmão (Coppock, Kopman *et al.*, 1993), tecido uterino (Musard, Sallot *et al.*, 2001), ilhotas de Langerhans, glândula parótida, glândulas apócrinas da pele, células no intestino que secretam peptídeos e proteínas (Coppock e Thorpe, 2006), cérebro, epiderme (Matsuba, Suga *et al.*, 2002), glândula sebácea, placenta (Thorpe e Coppock, 2007) e leite bovino (Jaje, Wolcott *et al.*, 2007). Trabalhos recentes mostram uma alta expressão de QSOX em tumores na próstata (Song, Zhang *et al.*, 2009) e em plasma de pacientes com câncer pancreático (Antwi, Hostetter *et al.*, 2009). Nosso grupo demonstrou que a QSOX1 está presente em tecidos fetais como soro (Zanata, Luvizon *et al.*, 2005) e aqueles derivados dos folhetos mesodérmico e ectodérmico (Portes, Ikegami *et al.*, 2008). Nesse trabalho, foi mostrado ainda que a expressão desta enzima em tecidos epiteliais aumenta durante o desenvolvimento fetal, indicando um papel regulatório no desenvolvimento embrionário e fetal. O gene QSOX1 pode também sofrer processamento alternativo do RNAm, levando a formação de duas isoformas de QSOX1, uma isoforma longa, com um domínio transmembrânico na porção C-terminal (Chakravarthi, Jessop *et al.*, 2007) e uma isoforma curta, solúvel e produzida pela perda do domínio

transmembrana (Radom, Colin *et al.*, 2006). A segunda forma do gene QSOX, QSOXN ou QSOX2, foi caracterizada em células de neuroblastoma humano e sua expressão, bem menor do que a de QSOX1 na maioria dos tecidos (Ostrowski, W. S. e Kistler, W. S., 1980; Coppock, Kopman *et al.*, 1993; Hooper, Joneja *et al.*, 1996; Coppock e Thorpe, 2006) parece estar associada a um fenótipo pró-apoptótico (Wittke, Wiedemeyer *et al.*, 2003).

Apesar de existirem muitos dados sobre a expressão da QSOX, seu papel biológico ainda não foram estabelecidos. É conhecida a associação entre expressão de QSOX1 e inibição da proliferação de diversas células (Musard, Sallot *et al.*, 2001; Hellebrekers, Melotte *et al.*, 2007). Enquanto QSOX2 foi descrita como pró-apoptótica (Wittke, Wiedemeyer *et al.*, 2003), a QSOX1 foi recentemente descrita como anti-apoptótica (Morel, Adami *et al.*, 2007). A isoforma longa da QSOX1 localiza-se no complexo de Golgi e participa do dobramento oxidativo intracelular de proteínas (Chakravarthi, Jessop *et al.*, 2007). De fato, baseado na reação catalítica e na sua localização intra-(ER e Golgi) e extracelular, é bem aceito que a QSOX1 esteja envolvida no dobramento oxidativo de proteínas nascentes (QSOX1 intracelular) e na organização da matriz extracelular (QSOX1 extracelular). A isoforma mais abundante da QSOX1 é a secretada (isoforma curta) (Ostrowski, M. C. e Kistler, W. S., 1980; Hooper, Joneja *et al.*, 1996; Zanata, Luvizon *et al.*, 2005).

Para o ambiente extracelular, a literatura propõe funções antimicrobianas, ao produzir peróxido de hidrogênio, e funções relacionadas à geração de estruturas ligadas/estabilizadas por pontes dissulfeto. Entre estas, estruturas que sejam muito grandes para serem montadas intracelularmente, ou ainda dobramentos oxidativos protéicos que sejam finalizados no meio extracelular (Heckler, Rancy *et al.*, 2008). De fato, a expressão de QSOX1 acompanha a expressão de várias proteínas de matriz extracelular, como subunidades de colágeno, decorina (Coppock, Kopman *et al.*, 1993) e lisil oxidase (Heckler, Rancy *et al.*, 2008). Interessantemente, foi sugerido que a montagem de partículas da lipoproteína A seja mediada por uma tiol oxidase extracelular que não a PDI (proteína dissulfeto isomerase) (Becker, Nesheim *et al.*, 2006). Além disso, diversas proteínas de superfície celular são reguladas pelo estado de oxidação de seus tióis voltados para o lado extracelular (Jiang,

Fitzgerald *et al.*, 1999; Laragione, Bonetto *et al.*, 2003; Sahaf, Heydari *et al.*, 2005; Gelderman, Hultqvist *et al.*, 2006). Embora ainda não seja bem conhecido, é possível que tal estado seja bem controlado pelo ambiente ou por proteínas extracelulares (Sahaf, Heydari *et al.*, 2005), particularmente os tióis participantes de dissulfetos alostéricos (Chen e Hogg, 2006), encontrados em integrinas e outras proteínas de superfície (Jordan e Gibbins, 2006).

Tendo em vista que a QSOX1 é uma proteína que pode estar envolvida no remodelamento da matriz extracelular (MEC), e que a neo-íntima é rica em MEC, é interessante o estudo de um possível papel da QSOX1 no processo de formação da neo-íntima.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar um possível papel da QSOX1 na formação da neo-íntima durante o processo de reestenose em carótida de rato lesada com catéter balão.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o curso da lesão com catéter balão em carótida de rato;
- Investigar e quantificar a presença da QSOX1 e de fibronectina na neo-íntima de rato;
- Realizar o “knockdown” de QSOX1 por RNAi em carótida de rato lesada com catéter balão e analisar possíveis mudanças morfológicas na falta dessa proteína;
- Determinar o efeito do silenciamento por meio de RNAi para QSOX na migração, proliferação e na viabilidade de células musculares lisas *in vitro*;
- Avaliar o efeito da superexpressão de QSOX1 na migração, proliferação e na viabilidade de células musculares lisas *in vitro*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Ratos Wistar machos, de cerca de 60 dias foram obtidos no biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Os ratos utilizados nos experimentos de lesão com catéter balão, após as cirurgias foram mantidos no biotério da UFPR onde as gaiolas com cepilho limpo eram trocadas três vezes por semana, juntamente com água filtrada e ração *ad libitum* (Jagadeesha, Lindley *et al.*, 2005; Touchard e Schwartz, 2006). Os animais foram ortotansados com dose letal de anestésico xilasina (500 mg/kg) e foram descartados em local específico de coleta de material biológico da UFPR.

3.2 LESÃO ARTERIAL

O procedimento cirúrgico foi aprovado pelo comitê de ética animal da Universidade Federal do Paraná sob o número 412 (anexo).

Antes da cirurgia todo o material cirúrgico foi autoclavado e o local onde as cirurgias eram realizadas foi previamente provido com os fios de sutura, lupa Leica EZ4, iodo-povidine, catéter balão e instrumento cirúrgico.

A angioplastia com catéter balão (Fogarty 2F, Edwards Lifesciences) foi realizada na carótida esquerda de ratos machos Wistar (250-300g) anestesiados com injeção intraperitoneal de ketamina (100 mg/kg) e xilazina (5 mg/kg) (Maffia, Grassia *et al.*, 2006). Logo após a anestesia foi realizada a tricotomia da região cervical e a anti-sepsia com iodo-povedine. Com auxílio de uma tesoura de pele serrilhada reta (Richter R-677-15R) foi realizado um corte cirúrgico da pele do animal na região cervical, logo abaixo do queixo em direção a cauda, até o começo do osso esterno. O músculo foi divulsionado e os músculos esternocleidomastoide, omohioideo foram mantidos separados com auxílio de um fórceps para expor a carótida (figura 4C). Com duas pinças micro reta com serrilha (Richter R-300-14S) a carótida foi separada de todos os tecidos adjacentes, nervos e fáscia. Na bifurcação da porção distal da carótida e na porção proximal próximo ao esterno, fios de algodão 4-0 foram usados para conter o fluxo sanguíneo. Usando uma tesoura Castroviejo 10 cm (Richter R-665-10) foi feito uma pequena incisão na porção direita da bifurcação da carótida, onde o catéter balão era introduzido (Figura 4A e 4B). A desnudação

endotelial e a lesão intimal da carótida esquerda foram realizadas com o catéter balão de embolectomia (Fogarty 2F, Edwards Lifesciences). O catéter foi introduzido através da artéria carótida externa até a artéria carótida comum e foi então inflado com 0,2 ml de solução fisiológica e arrastado com movimentos giratórios, desinsuflado e novamente posicionado na artéria carótida comum, insuflado e arrastado. Este procedimento era realizado três vezes. A carótida externa era ligada com fio mononylon 6-0, o fórceps era removido e o local da incisão suturado com fio mononylon 4-0 (Clowes, Reidy *et al.*, 1983; Sreejayan, Ren *et al.*, 2008b). Logo após o efeito da anestesia era administrado por via oral, 200mg/kg de dipirona como analgésico (Abbott e Bonder, 1997). Alguns animais foram anestesiados e submetidos ao procedimento sem a utilização do catéter balão (ratos sham-operados).

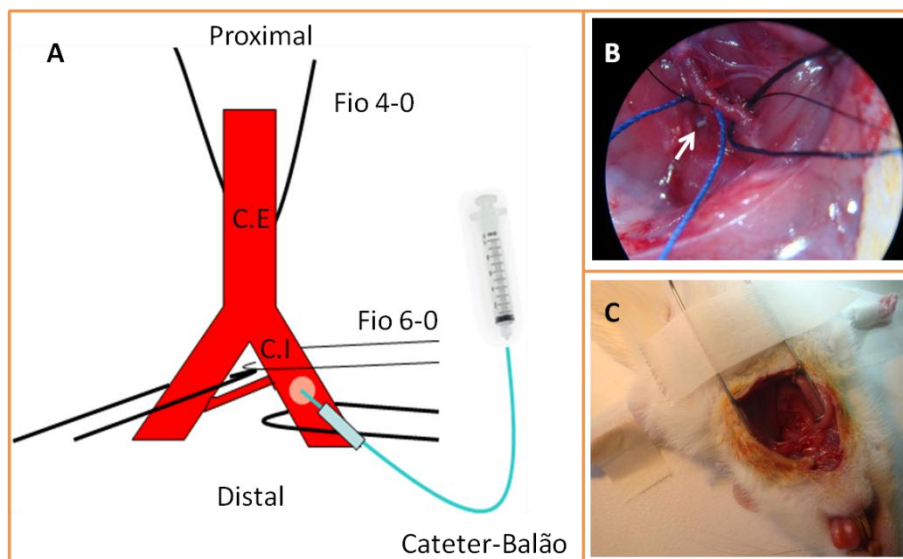


FIGURA 4 – LESÃO COM CATÉTER BALÃO EM CARÓTIDA DE RATO. **A.** Representação da carótida comum, interna (C.I) e externa (C.E) e do procedimento de lesão. Fios de algodão 4-0 foram utilizados para conter o fluxo sanguíneo. Com uma tesoura cirúrgica foi realizado um corte na carótida para introdução do catéter balão do sentido distal para o proximal. O catéter foi insuflado e a lesão foi realizada com a desnudação endotelial da carótida com a raspagem do catéter balão com movimentos circulares pela porção interna da carótida. O catéter balão foi retirado e com fio de nylon 6-0 o local de introdução do catéter foi fechado. **B.** Foto de uma cirurgia com os fios para conter o fluxo sanguíneo. A seta indica a bifurcação da carótida. **C.** Os músculos esternocleidomastoide e omohioide foram separados com auxílio de um fórceps para visualização da carótida.
FONTE: DO AUTOR.

3.3 “KNOCKDOWN” DE QSOX1 *IN VITRO*

O gel plurônico F127 (Sigma Aldrich) é um composto atóxico feito de polioxietileno-polioxipropileno-polioxietileno não iônico e possui aplicações

farmacêuticas (El-Kamel, 2002) formando micelas para transporte de compostos intracelularmente (Bohorquez, Koch *et al.*, 1999). Já foi mostrada sua eficiência para transfeção tanto *in vitro* como *in vivo* (El-Kamel, 2002; Escobar-Chávez, López-Cervantes *et al.*, 2006). O gel plurônico 30% (m/v) a 4°C é líquido, mas gelifica imediatamente à temperatura corporal.

A supressão *in vivo* foi realizada utilizando uma solução de 30% de gel plurônico em água tratada com DEPC (dietil pirocarbonato) (Hlawaty, San Juan *et al.*, 2007). O DEPC é utilizado para inativar RNAses atuando em seu sítio ativo. Quinze microgramas (923 pmol) de RNAi para QSOX1 ou controle negativo “scrambled” foram diluídos na solução de gel plurônico e aplicados à carótida imediatamente após a lesão arterial (Wang, Zheng *et al.*, 2009). Os animais foram ortotansados com 7 e 14 dias após a lesão e as carótidas emblocadas.

Dois siRNAs (Invitrogen) foram utilizados: um com uma seqüência para silenciamento da QSOX1 (5´ UGGAGCCUGCCAAGCUGAAGGAUUAU 3´) e um controle negativo “scrambled” (5´ UGGCCGUCCAACGGUAAGGAGAUUAU 3´). Os RNAs de interferência são do tipo Stealth comercializados pela Invitrogen, e ambos foram desenhados pelo software “Block-it RNAi Designer”, disponível no site da Invitrogen.

3.4 ANÁLISE MORFOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA

3.4.1 Emblocagem dos tecidos

As carótidas foram emblocadas em parafina ErvPlast® (Erviagas). Para isso, os animais foram ortotansados com dose letal de anestésico (500mg/kg de xilasina) e a carótida foi exposta. Aproximadamente 0,5 cm da artéria foi removida, lavada em PBS e submersa por 24 horas em paraformaldeído 4%. O tecido foi desidratado com banhos de 45 minutos de etanol em concentrações de 50, 70, 80, 90 e 100%. As carótidas foram mergulhadas em xilol P.A por cerca de 30 segundos e mantidas em parafina derretida em estufa a 60°C por três horas para logo serem emblocadas em moldes de papel. Após no mínimo 24 horas, os blocos foram cortados. Cortes de 6 µm foram realizados nos blocos com a utilização de um micrótomo Leica RM2145 e colocados sobre lâmina histológica de vidro.

3.4.2 Coloração com hematoxilina e eosina

As lâminas contendo os cortes foram incubadas (temperatura ambiente) em dois banhos de xilol por 30 minutos cada, seguidos de banhos sequenciais de 5 minutos em etanol para a reidratação começando com etanol na concentração de 100%, seguido por 90, 80, 70 e 50% e por último duas imersões de 5 minutos em água destilada. As lâminas foram então coradas com hematoxilina de Harris (para composição ver quadro 1) (Tolosa, Rodrigues *et al.*, 2003) por 15 segundos e lavadas com dois banhos de água destilada por 3 minutos e mais 10 minutos em água corrente. Em seguida, as lâminas foram mergulhadas em eosina (para composição ver quadro 1) (Tolosa, Rodrigues *et al.*, 2003) por 1 minuto e lavadas duas vezes em água destilada por 5 minutos. A desidratação foi feita utilizando os mesmos tempos e alcoóis do mais diluído para o menos diluído até a etapa do xilol, onde foram mantidas por 3 minutos. As lâminas foram seladas com Entellan[®] (Merck) e os cortes cobertos com lamínula para posterior análise em microscópio.

QUADRO 1 – COMPOSIÇÃO DE HEMATOXILINA E HERRIS E EOSINA.

Hematoxilina de Harris		Eosina		
Composto	Quantidade	Composto	Quantidade	
Hematoxilina (Merck)	5 g	Eosina	1 g	
Etanol 100% P.A	500 mL	Água Destilada	20 mL	Solução estoque
Alúmen de amônio	100 g	Álcool 95%	80 mL	
Água Destilada	1 L	Eosina estoque	1 Parte	Solução de uso
Óxido de Mercúrio	2,3 g	Álcool 80%	3 Partes	

FONTE: TOLOSA, RODRIGUES *et al.*, 2003

3.4.3 Imunomarcção

Diferentes anticorpos foram utilizados para as análises de imunistoquímica. As lâminas contendo as carótidas foram submetidas à remoção da parafina por 60 minutos em estufa a 60°C, seguido de dois banhos de xilol de 30 minutos e reidratadas como descrito no item 3.4.2. O tecido foi bloqueado com metanol P.A contendo 1% de peróxido de hidrogênio (30%) durante 45 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas com PBS por 5 minutos e detergente Triton X-100 0,05% em PBS por mais 5 minutos. As lâminas foram então colocadas em câmara úmida e bloqueadas com PBS contendo albumina de soro bovino 1% durante 1 hora. O anticorpo primário anti-QSOX de camundongo produzido em coelho (Portes, Ikegami *et al.*, 2008)

diluição 1:400 ou anti-fibronectina humana produzida em coelho (Brusamolin, 2006) diluição 1:400, foi incubado sobre os cortes durante 16 horas a 4°C em câmara úmida. As lâminas foram lavadas com PBS por 5 minutos, bloqueadas com PBS BSA 1% por 15 minutos, e incubadas por 30 minutos com anticorpo secundário Universal Peroxidase Kit (Diagnostics BioSystems). Diaminobenzidida (DAB) (DAB Plus Buffer – Diagnostics BioSystems) foi utilizado como revelador e, após esta etapa, as lâminas foram lavadas duas vezes com PBS durante 5 minutos seguido de uma lavagem com água destilada por 5 minutos. A contracoloração foi feita com hematoxilina por 15 segundos. As lâminas foram então lavadas com água destilada por duas vezes de 5 minutos desidratadas com álcool 50, 70, 80, 90, e 100% e após banho de xilol as lâminas foram seladas com Entellan® (Merck) e lamínula. Após secagem por 24 horas, as reações puderam ser analisadas em um microscópio Olympus modelo IX71 acoplado com uma câmera de captura DP72 e software DP2BSW. Foram utilizadas as objetivas de 4x, 10x, 20x, e 40x.

3.4.4 Análise semi-quantitativa da área imunomarcada

Cada carótida foi fotografada com objetiva 40x (400x de aumento) em quatro campos diferentes, de cada qual foram extraídos 6 subcampos (100x100 pixel) da região neo-íntima totalizando 24 subcampos por carótida. As análises foram realizadas com o programa Image Pro-Plus versão 6.0 desenvolvido pela MediaCybernetics®. Como as imunoistoquímicas foram realizadas em diferentes dias, a intensidade da marcação não foi comparável entre as diferentes datas. Dessa forma, foi analisada a área imunomarcada. Com o Image Pro-Plus, foi possível selecionar a cor desejada, convertê-la em cor selecionada e mensurar sua área (Figura 5).

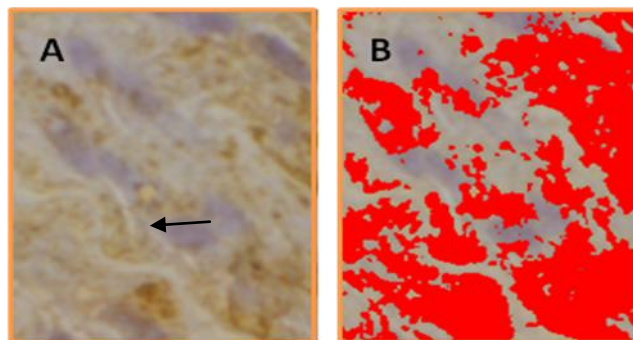


FIGURA 5 – ANÁLISE SEMI-QUANTITATIVA DA IMUNOMARCAÇÃO. . A análise foi realizada selecionando 24 subcampos de 100x100 pixel da neo-íntima de 4 campos diferentes. A área total dos subcampos foi medida com o software Image Pro-Plus 6. **A.** Imagem de um subcampo, a seta indica a área imunomarcada em marrom, a cor é selecionada manualmente através do software e **(B)** em vermelho a área marcada. A área total é dada em pixel (elemento de imagem).

FONTE: DO AUTOR.

Então, cada carótida possuía 4 campos e 24 subcampos, a área total dos subcampos foi dividido por 24 e realizada a média dos 4 campos, o valor obtido foi o valor representativo de nível de expressão da proteína para cada carótida.

3.5 CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULA MUSCULAR LISA DE VASO

Ratos Wistar machos pesando 300 gramas foram ortotansados com dose letal (500 mg/kg de xilasina) de anestésico. Com uma tesoura cirúrgica foi realizada toracotomia e com pinças e afastadores a aorta foi localizada e isolada. Um segmento de aproximadamente 3 cm da aorta torácica foi coletado e colocado em um tubo de 50 mL contendo tampão PBS estéril com 40 mg/L de garamicina (Shering-Plough). Em um fluxo laminar e com um bisturi a camada adventícia foi removida e o vaso cortado em sentido longitudinal. Fragmentos de aproximadamente 1mm² eram feitos com o bisturi e colocados em uma placa de 24 poços com o lúmen voltado para o fundo da placa. Aproximadamente 4 a 5 fragmentos eram colocados em cada poço juntamente com 500 µL de meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium high glucose - Gibco) e 20% de soro fetal bovino (Gibco). Em seguida, as placas pré-tratadas para inibir o crescimento de fibroblastos, foram mantidas em estufa com 5% de CO₂ e a 37°C. Por volta do quinto dia de cultura as células musculares lisa de vaso (VSMC) começaram a migrar e após alguns dias as células eram soltas com tripsina e passadas para uma placa maior (passagem 1) para serem

expandidas e utilizadas para diversos experimentos ou congeladas em nitrogênio líquido com 10% de DMSO e 90% de SFB.

3.6 CULTURA DE VSMC

Para os experimentos *in vitro* foram utilizadas células de cultura primária de músculo liso de aorta de rato (VSMC). As VSMC foram mantidas em cultura com meio DMEM contendo 10% SFB e 40 mg/L de garamicina. O meio das células era trocado três vezes por semana e quando confluentes, as células foram expandidas para outras placas. As células foram mantidas em uma estufa com 5% de CO₂ e temperatura constante de 37°C. A contagem de células foi feita com uma câmara de Neubauer. Após a sexta passagem as células eram descartadas.

3.7 RNA DE INTERFERÊNCIA (“KNOCKDOWN”) *IN VITRO*

VSMC na terceira/quarta passagem com confluência de 60-70% em placas de cultura de 96 poços, 24 poços ou 6 poços foram usadas para as transfeções de RNA de interferência *in vitro*. Oligofectamina (Invitrogen) foi utilizado como agente transfectante. Brevemente, as células eram plaqueadas com meio DMEM contendo garamicina e 10% SFB. Após um dia, as placas eram lavadas com PBS e o meio era substituído por DMEM contendo 10% SFB sem antibióticos. A transfecção era realizada conforme instruções do fabricante. Após 24 horas, era adicionada garamicina às placas. A concentração final de oligonucleotídeo foi 160 a 166 nM, com variações nos volumes de Opti-MEM® (Invitrogen), RNAi, Oligofectamina e meio DMEM para os diferentes tipos da placa conforme quadro 2. Todos os experimentos de transfecção foram realizados em condições estéreis em um fluxo laminar. Para a placa de 96 poços, por exemplo, foram preparadas duas soluções. Os valores a seguir são referentes a cada poço, geralmente eram preparadas soluções para 24 poços. Na primeira solução foram adicionados em um microtubo (1,5 mL) 0,4 µL de RNAi (scrambled ou QSOX) e 5 µL de Opti-MEM®, e em outro tubo foram misturados 0,3 µL de oligofectamina e 1,2 µL de Opti-MEM®. Ambas as soluções ficaram em repouso por 5 minutos. Em seguida, a primeira solução foi misturada a segunda e deixou-se em repouso a temperatura ambiente por 20 minutos. Por último, a solução foi aplicada diretamente no poço e completado com meio DMEM com 10% de SFB livre de

antibiótico para volume de 50 μL . Não há a necessidade da retirada do meio de transfecção. Dessa forma, o meio não foi trocado. Para as outras placas, os volumes foram redimensionados como consta no quadro 2.

QUADRO 2 – CONDIÇÕES DE TRANSFECÇÃO *IN VITRO*. Células VSMC com confluência de 60-70% foram transfectadas com aproximadamente 160 nM de RNAi utilizando oligofectamina. As etapas A e B foram preparadas em microtubos e deixadas em repouso em temperatura ambiente por 5 minutos. Logo, A foi misturado a B e deixado em temperatura ambiente por 20 minutos, essa solução foi aplicada diretamente ao poço e o meio completado (etapa C).

Placa de cultura	Etapas	96 Poços	24 Poços	6 Poços
Oligonucleotídeo (Estoque de 20 μM)	A	0,4 μL	2,5 μL	6,6 μL
Opti-MEM®		5 μL	30 μL	80 μL
Oligofectamina	B	0,3 μL	1,8 μL	4,8 μL
Opti-MEM®		1,2 μL	7,2 μL	19,2 μL
Volume final (Meio DMEM 10%SFB)	C	50 μL	300 μL	800 μL
Concentração final de oligonucleotídeo		160nM	166nM	165nM

FONTE: Adaptado de Invitrogen, lipofectamin protocol.

3.8 ELETROPORAÇÃO DE VSMC

VSMC (5×10^5) em placas de cultura P100 foram lavadas com PBS, depois com PBS EDTA, e soltas com tripsina. Esta última foi então inativada pela adição de 5 mL de meio DMEM com 10% de SFB e sem antibióticos. As células foram centrifugadas por 3 minutos, o meio foi descartado e o pellet ressuscitado em 400 μL de meio Opti-MEM®. As células com o meio foram então colocados em uma cubeta para células eucariótica de 0,4 cm (BioRad) e deixadas em gelo por 30 minutos, em seguida em banho-maria por 30 segundos e eletroporadas com método Exponential Decay em um eletroporador BioRad GenePulser XCell nas seguintes condições: 300 V, 500 μF e resistência infinita. Após a eletroporação, as cubetas com as células foram mantidas por 30 minutos em temperatura ambiente e só depois foram plaqueadas e incubadas em estufa com 5% de CO_2 e 37°C.

As células foram eletroporadas com o vetor pCR3.1 clonado com a seqüência para superexpressar QSOX1. O vetor foi gentilmente doado pelo Dr.

Esnard (Bon, Adami *et al.*, 2005). O vetor vazio foi utilizado como controle (“Mock”).

3.9 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA POR qPCR

O RNA total foi isolado com auxílio do Kit InviTrap® Spin Tissue RNA MiniKit (InviTek) e o procedimento foi seguido de acordo com orientações do fabricante. Após a extração do RNA total, o mesmo foi quantificado em um espectrofotômetro (Nanodrop Thermo®), utilizando a relação $A_{260nm}=40\mu g/ml$, utilizando o tampão que acompanha o kit de extração de RNA. Foi então realizada reação da transcriptase reversa de acordo com o sistema ImProm-II™ Reverse Transcription para a síntese do cDNA a partir do molde de RNAm.

Com o cDNA sintetizado, reação de PCR quantitativo (qPCR) foi realizada utilizando o reagente Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit (Qiagen), que possui os principais reagentes para a amplificação de cDNA tendo que acrescentar somente água DEPC, iniciadores e cDNA. O SYBR Green é um intercalante de DNA dupla fita, que fluoresce ao se associar ao DNA.

Na reação de qPCR foi utilizado o protocolo sugerido pela Qiagen adaptado para volumes menores, mantendo a mesma eficiência e sensibilidade de detecção. Foram utilizados para cada reação de qPCR: 5 μ L de Rotor- Gene SYBR Green PCR Kit, 1 μ L de iniciador Forward (HPRT 5' CAG GCC AGA CTT TGT TGG AT 3' e QSOX 5' TGC ATT CCA TAA ACG ATT GG 3'), 1 μ L de iniciador Reverso (HPRT 5' TCC ACT TTC GCT GAT GAC AC 3' e QSOX 5' GAA GTG GAA GAG GAC CCA CA 3'), 2 μ L de água contendo dietil pirocarbonato (DEPC) e 1 μ l de cDNA. O Kit de SYBR Green possui enzima polimerase “hot start”. Dessa forma, há um ciclo inicial de 95°C por 5 minutos, seguidos de 40 ciclos de dois passos: um primeiro de 90°C por 30 segundos e outro de 60°C por 30 segundos. No final dos ciclos foi feita uma análise de da temperatura de desnaturação (“melting”), onde foi feita a leitura de fluorescência a cada grau Celsius começando em 60°C até 90°C. Esta análise foi realizada para verificar existência de amplificações inespecíficas. Os volumes e concentrações constam no quadro 3.

QUADRO 3 – REAÇÃO DE qPCR.

REAGENTE	CONCENTRAÇÃO INICIAL	CONCENTRAÇÃO FINAL	VOLUME	CONDIÇÕES	DESNATURAÇÃO
Sybr Green Kit	2x	1x	5µL	1x 95° - 5 minutos 40x 90°C 30 segundos 60°C 30 segundos	60°C até 90°C de 1°C em 1°C
Iniciador Foward	5µM	0,5µM	1µL		
Iniciador Reverso	5µM	0,5µM	1µL		
Água DEPC			2µL		
cDNA	Variavel	Variavel	1µL		

FONTE: Adaptado de Syber Green Kit®.

Por se tratar de uma quantificação relativa, para que seja possível avaliar o desempenho dos iniciadores (isolados e em conjunto de um determinado gene) o SYBR Green necessita de uma curva com diferentes concentrações de cDNA, obtidas a partir de diluições seriadas da reação produto da transcrição reversa. Foi utilizado 50 ng de RNA total para a síntese de cDNA e utilizado 1 µL de cDNA para cada reação de qPCR. Para a curva, o cDNA foi diluído 1:10 e 1:100. Dessa forma, a curva foi realizada com: 1 µL de cDNA 50 ng, 1 µL de cDNA diluição 1:10 e 1 µL de cDNA diluição 1:100. Para as amostras tratadas e não tratadas foi utilizado 1 µL de cDNA 50 ng. As análises das amostras foram feitas em três experimentos independentes e uma curva de calibração com três pontos para verificar a eficiência dos iniciadores de cada reação. As reações foram feitas em termociclador Corbett Rotor-Gene 6000 controlado pelo programa Rotor-Gene Q Series versão 1.7.

3.10 MIGRAÇÃO CELULAR

VSMC (1×10^4) foram plaqueadas em uma placa de cultura de 24 poços e transfectadas com Oligofectamina e RNAi para QSOX ou o controle negativo “scrambled”, conforme o item 3.7 e mantidas com meio DMEM e 1% SFB. Após 4 horas de transfecção, com auxílio de uma ponteira de 20 µL foi feito um “Scratch” (Rodriguez, Wu *et al.*, 2005), isto é, um risco na placa removendo as células. Logo após o “Scratch” as células foram fotografadas em um microscópio Olympus IX71 e câmera de captura DP72, determinando a hora zero. Outras imagens foram fotografadas nos tempos 24, 48, 72, 96 e 112

horas. A distância entre as 2 margens foi medida utilizando o programa Image Pro-Plus 6.0 em todos os tempos capturados. Dessa forma, a distância da hora zero foi subtraída da hora 24 até 112 determinando a taxa de migração celular.

3.11 VIABILIDADE CELULAR

Placas de 96 poços previamente plaqueadas com 10^3 VSMC foram analisadas após 24, 48 e 72 horas da transfecção de RNAi para QSOX ou de vetores para superexpressão e seus respectivos controles. O meio foi aspirado e 100 μ l de uma solução 0,5 mg/ml (50 μ g) preparada em solução Hank's HBSS (Gibco) de MTT (Sigma), foram adicionados a cada poço. As células foram incubadas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C durante 3 horas. O meio contendo MTT foi cuidadosamente retirado e 100 μ l de DMSO (Sigma) foram adicionados em cada poço. A reação produziu uma coloração violeta que foi medida em espectrofotômetro (TECAM Intinite M200) a 550nm e os valores do tratamento são comparados com a do controle resultando na viabilidade celular.

3.12 PROLIFERAÇÃO CELULAR

Células VSMC foram plaqueadas em placas de 35 mm de diâmetro a uma densidade de 10^5 células/poço em meio DMEM (Gibco) suplementado com 1% de SFB e mantidas por aproximadamente 24, 48 e 72 horas. Após esse período, as células foram lavadas com PBS, soltas das placas com 300 μ L de tripsina e coletadas em um volume fixo de 700 μ L de meio DMEM (Gibco). Todas as amostras analisadas possuíam um mesmo volume final e foram submetidas à contagem por citometria de fluxo (BD Facscalibur) durante 10 minutos, sob fluxo baixo e constante. Os dados foram analisados no software WinMDI 2.9. Foi realizado apenas um experimento independente.

4. RESULTADOS

4.1 CURSO DA REESTENOSE EM CARÓTIDA DE RATO LESADA COM CATÉTER BALÃO

A razão da espessura íntima/média é utilizada como marcador de aterosclerose para prever doenças cardiovasculares como acidente vascular cerebral (AVC) e infarto (Lorenz, Markus *et al.*, 2007). Após as lesões em modelo experimental, o curso da formação da neo-íntima pode ser avaliado pela relação de áreas íntima/média. Em ratos, ocorre uma hiperplasia intimal até o 14º dia de lesão. Aos 21 dias, a reestenose é estabilizada e há uma diminuição da neo-íntima (Clowes e Clowes, 1986). A figura 6A mostra o curso da lesão em nossos experimentos. Observa-se um aumento significativo após 14 dias de lesão e uma pequena diminuição aos 21 dias (Figura 6C), estando de acordo com a literatura.

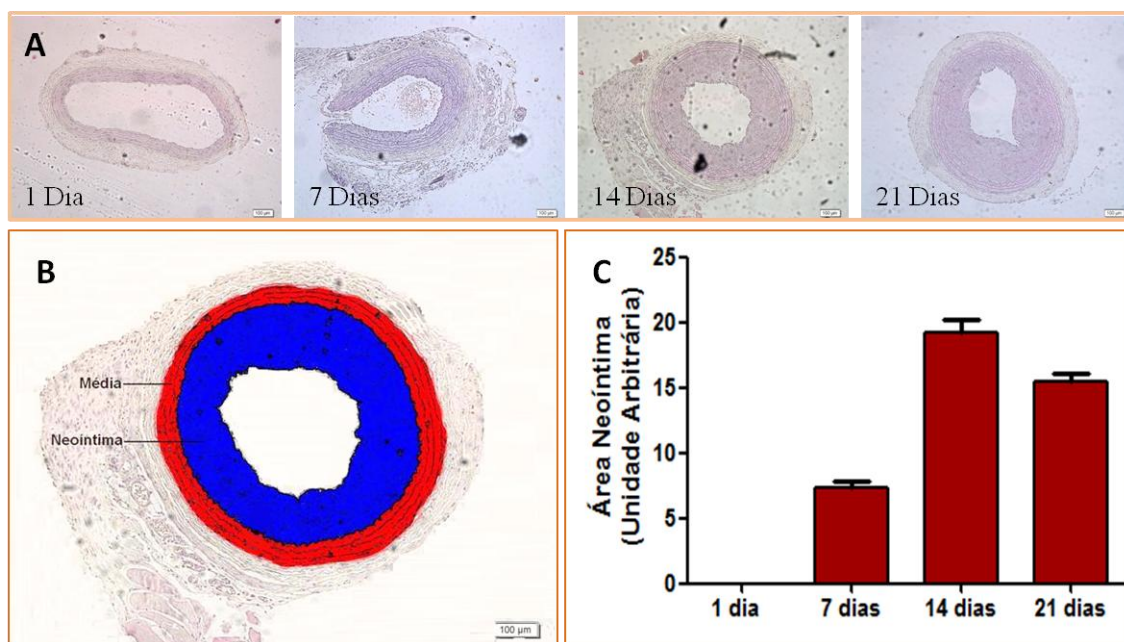


FIGURA 6. CURSO DA FORMAÇÃO DA NEO-ÍNTIMA EM CARÓTIDA DE RATO APÓS LESÃO COM CATÉTER BALÃO. **A.** Corte histológico de carótida de rato lesada com catéter balão. Coloração com hematoxilina e eosina mostrando o curso da lesão. **B.** Área delimitando a região íntima e média de carótida de rato após 14 dias da lesão. **C.** Área da neo-íntima mostrando um aumento em 14 dias e diminuição aos 21 dias (n=4). FONTE: DO AUTOR (2010).

4.2 EXPRESSÃO DE QSOX EM CARÓTIDA DE RATO APÓS LESÃO COM CATÉTER BALÃO

A expressão de QSOX na camada neo-íntima de carótida de rato lesada com catéter balão foi analisada e semi-quantificada. A figura 7 mostra que a QSOX é expressa na camada média e adventícia, mas predominantemente na camada neo-íntima. Aos 14 dias, a expressão apresenta-se bastante intensa nesta região. No gráfico da figura 7, observa-se um aumento significativo na expressão de QSOX em 14 dias após a lesão, acompanhando a formação da neo-íntima, onde, em 14 dias, a camada neo-íntima é mais espessa.

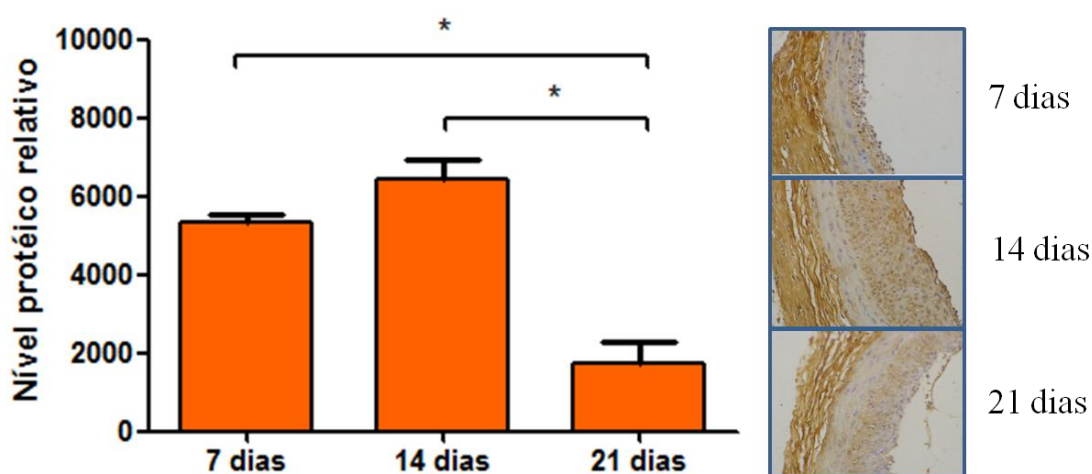


FIGURA 7 – EXPRESSÃO DE QSOX NA NEO-ÍNTIMA APÓS LESÃO POR CATÉTER BALÃO. Ratos Wistar pesando 250 g foram anestesiados e a carótida esquerda foi exposta. Com um catéter balão foi feita a lesão na carótida. Após 1, 7, 14 e 21 dias os animais foram eutanasiados e a carótida coletada e emblocada em parafina. Cortes de 6 μ m foram realizados e submetidos a ensaio de imunohistoquímica utilizando anticorpo anti-QSOX e revelado pela oxidação do DAB. Cada carótida de 7, 14 e 21 dias foi fotografada em 4 campos com aumento de 400x. Em cada campo foram extraídas 6 imagens da neo-íntima. Essas imagens foram submetidas à análise da área de expressão de QSOX utilizando o programa ImagePro-Plus 6.0. As medidas foram analisadas por One-Way ANOVA com pós-teste Bonferroni (n=3) *p<0,05.

FONTE: DO AUTOR (2010)

A marcação artefactual pelo anticorpo secundário está excluída, pois os controles negativos, onde o anticorpo primário foi omitido da reação imunohistoquímica, não apresentam imunomarcação (Figura 8).

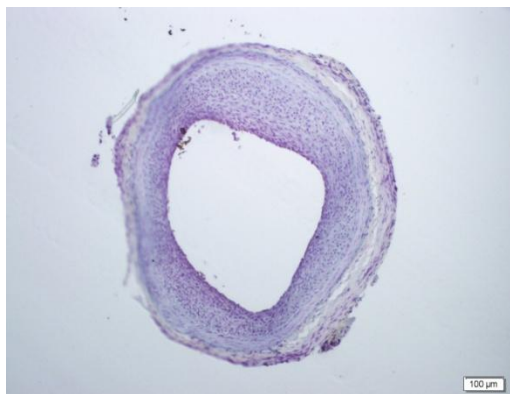


FIGURA 8 – CONTROLE NEGATIVO DA IMUNOMARCAÇÃO. O controle negativo da imunomarcação mostra que não há marcação artefactual do anticorpo secundário, pois a reação foi feita na ausência do anticorpo primário. Contra colora o da reação com hematoxilina, carótida de 14 dias.

FONTE: DO AUTOR (2010).

4.3 EXPRESSÃO DE FIBRONECTINA EM CARÓTIDA DE RATO APÓS LESÃO POR CATÉTER BALÃO

H  uma intensa marcação de fibronectina na neo-íntima em 7 dias, diminuindo significativamente em 14 e 21 dias após a lesão (Figura 9). De fato, a expressão dessa proteína está presente no processo de reestenose. Em coelhos, a expressão de fibronectina em 14 dias   descrita conforme o observado, com uma expressão maior próximo do lúmen (Bauters, Marotte *et al.*, 1995).

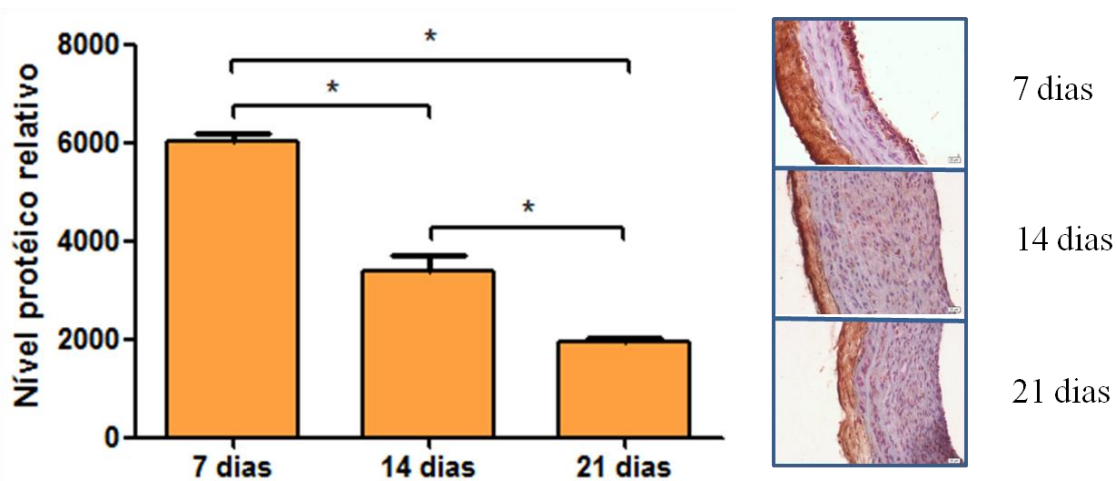


FIGURA 9 – EXPRESSÃO DE FIBRONECTINA NA NEO-ÍNTIMA APÓS LESÃO POR CATÉTER BALÃO. Ratos Wistar pesando 250 g foram anestesiados e a carótida esquerda foi exposta e com um catéter balão foi feita a lesão na carótida. Após 1, 7, 14 e 21 dias os animais foram eutanasiados e a carótida coletada e emblocada em parafina, cortes de 6 μ m foram realizados e submetidos a ensaio de imunistoquímica utilizando anticorpo anti-fibronectina e revelado com a oxidação do DAB. Cada carótida de 7, 14 e 21 dias foi fotografada 4 campos com aumento de 400x, em cada campo foram extraídas 6 imagens da neo-íntima. Essas imagens foram submetidas à análise da área de expressão de fibronectina utilizando o programa ImagePro-Plus 6.0. As medidas foram analisadas por One-Way ANOVA com pós-teste Bonferroni (n=3) *p<0,05.

FONTE: DO AUTOR (2010)

4.4 EFICIÊNCIA DA TRANSFEÇÃO EM CARÓTIDA DE RATO COM GEL PLURÔNICO

Para avaliarmos a influência da QSOX1 no processo de formação da neo-íntima, decidimos suprimir a expressão da QSOX1 neste modelo. Para avaliar a viabilidade deste procedimento, utilizamos carótidas de rato transfectadas com DNA ou RNAi pelo sistema de gel plurônico. Durante as cirurgias em ratos Wistar, foi aplicada à carótida esquerda perivascularmente solução de gel plurônico 30% e 10 μ g do plasmídeo pEGFP-C1 dissolvido neste gel. Como controle negativo foi utilizada carótida não transfectada, ou seja, sem plasmídeo. Para avaliação da eficiência de transfecção do pEGFP-C1 as carótidas foram avaliadas por reação imunistoquímica com marcação com anticorpo anti-GFP (gentilmente doado pelo Instituto Carlos Chagas – Fiocruz, Paraná). A figura 10 A, painel superior, demonstra que o vetor foi devidamente introduzido no tecido pelo gel plurônico, uma vez que foi possível observar uma coloração mais acentuada após a imunistoquímica na carótida transfectada com pEGFP-C1. O controle não transfectado da imunistoquímica não apresentou marcação (Figura 10A - painel inferior). Carótidas de ratos

Wistar também foram transfectadas seguindo o mesmo procedimento já descrito com gel plurônico 30% e, nele dissolvido, 10 μ g RNAi controle negativo “scrambled” conjugado com fluoróforo TYE™563. Estas carótidas foram avaliadas por imunofluorescência e é possível observar na figura 10 B, painel superior, a eficiência da transfecção deste RNAi, uma vez que essas moléculas foram identificadas nas camadas média e adventícia da carótida (marcação em vermelho). A figura inferior 10 B, painel inferior, mostra fotografia da carótida controle, não transfectadas com RNAi controle negativo “scrambled” após imunofluorescência, evidenciando a ausência de marcação. Sendo assim, o gel plurônico permitiu a transfecção tanto de DNA como de RNAi provando a eficiência desta estratégia.

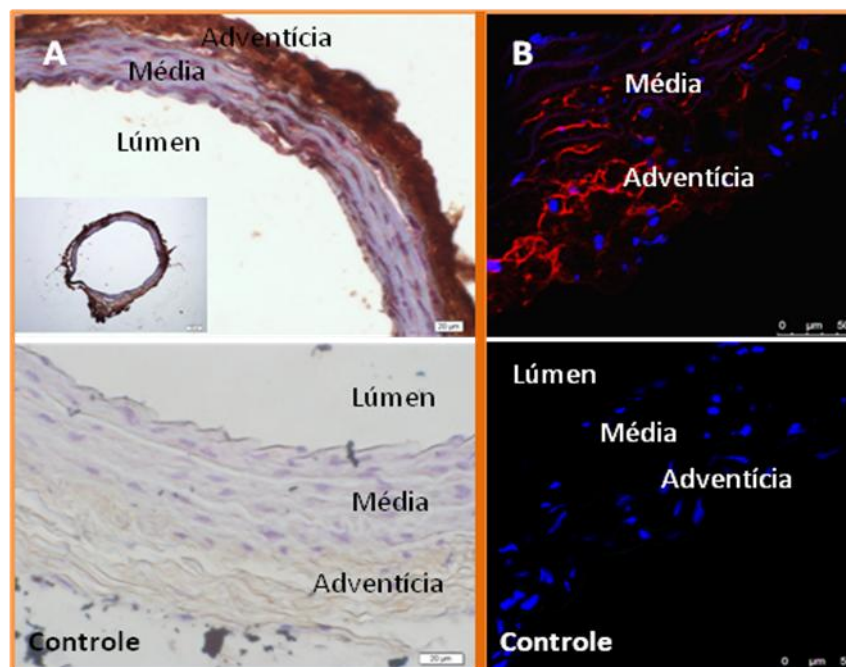


FIGURA 10 – TRANSFEÇÃO DE MOLÉCULA DE DNA E RNA EM CARÓTIDA DE RATO COM GEL PLURÔNICO. **A.** Ratos Wistar pesando 250 g foram anestesiados e a carótida exposta para logo aplicação de 10 μ g de plasmídeo que expressa a proteína EGFP, diluído em 100 μ L de gel plurônico 30%. O gel foi distribuído por toda a região da carótida e após 48 horas o animal foi eutanasiado. **A** carótida coletada foi emblocada em parafina e cortes de 6 μ m foram feitos com posterior reação de imunistoquímica utilizando anticorpo anti-GFP e revelado com a oxidação do DAB. (n=3). Para o controle foi utilizada carótida não transfectada. **B.** O mesmo procedimento cirúrgico foi realizado e 10 μ g de RNAi controle negativo “scrambled” conjugado com fluoróforo TYE e 100 μ L de gel plurônico 30% foi aplicado na carótida. Após 24 horas, o animal foi eutanasiado e as carótidas foram emblocadas e cortes de 6 μ m foram realizados com posterior marcação do núcleo com DAPI. A lâmina selada foi analisada em um microscópio de fluorescência confocal (n=1).

FONTE: DO AUTOR (2010)

4.5 EXPRESSÃO DE QSOX EM NEO-ÍNTIMA DE RATO APÓS LESÃO COM CATÉTER BALÃO E “KNOCKDOWN”

Uma vez determinado que o gel plurônico era capaz de transportar RNAi para as células vasculares em carótida de rato, realizamos experimentos com RNAi para QSOX1 e RNAi controle negativo “scrambled”. Neste caso, a aplicação do gel ocorreu imediatamente após a lesão vascular. Após a reação imunohistoquímica, notou-se uma diminuição da expressão de QSOX após 14 dias de lesão (Figura 11). Houve uma redução média de 55% na expressão de QSOX em animais silenciados (Figura 11 - gráfico). Interessantemente, a imunomarcação para QSOX na neo-íntima do rato tratado com RNAi controle negativo “scrambled” mostrou-se mais difusa e com aspecto mais extracelular, enquanto que no rato tratado com RNAi para QSOX1, a marcação apresentou-se mais perinuclear e menos difusa. O RNAi controle negativo “scrambled” não alterou a expressão de QSOX em 14 dias, se compararmos sua expressão com a expressão de QSOX em carótida de rato apenas lesado, sem transfecção de RNAi alvo ou controle negativo (Figura 11).

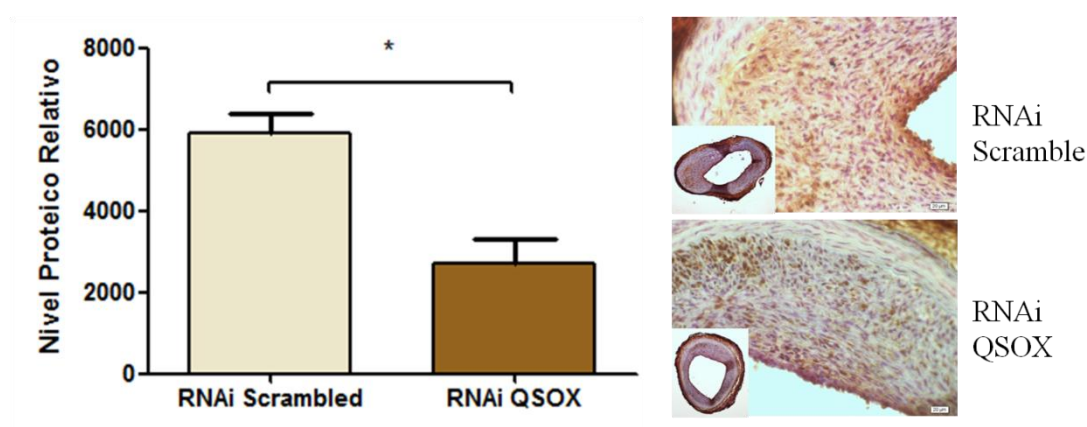


FIGURA 11 – EXPRESSÃO DE QSOX EM NEO-ÍNTIMA DE RATO APÓS TRANSFEÇÃO DE RNAi. Ratos Wistar pesando 250 g foram anestesiados e a carótida esquerda foi exposta. Com um catéter balão foi feita a lesão na carótida. Logo após a lesão, 15 µg de RNAi para QSOX ou “scrambled” foi diluído em 100 µL de gel plurônico 30% e aplicadas diretamente à carótida. Após 7 e 14 dias as carótidas foram coletadas e emblocadas. Cortes de 6 µm foram realizados e submetidos a ensaio de imunohistoquímica utilizando anticorpo anti-QSOX e revelado DAB. Todas as carótidas de 7 e 14 dias foram fotografadas em 4 campos distintos com aumento de 400x, em cada campo foram extraídas 6 imagens da neo-intima. Essas imagens foram submetidas à análise da área de expressão de QSOX utilizando o programa ImagePro-Plus 6.0, as medidas foram analisadas por teste t (n=3) *p<0.05.
FONTE: DO AUTOR (2010)

4.6 MORFOLOGIA DA NEO-ÍNTIMA DE RATO APÓS LESÃO COM CATÉTER BALÃO E “KNOCKDOWN”

Não houve diferença estatística significativa entre as áreas das camadas média e íntima entre os animais transfectados com RNAi para QSOX ou RNAi “scrambled” (Figura 12), o que leva a uma relação de área da íntima/área da média não alterada. Entretanto, a neo-íntima dos animais tratados com RNAi para QSOX apresentou uma mudança morfológica (Figura 13A). À histologia, dois tipos celulares são percebidos na camada neo-íntima: uma primeira camada logo abaixo da camada média, com característica semelhante às células que compõem a camada neo-íntima dos animais controle, e outra camada mais próxima do lúmen com característica fibroblastóide, como de células musculares. Os animais tratados com RNAi controle negativo “scrambled” apresentaram neo-íntimas típicas de animais lesados e sem transfecção (Figura 13B).

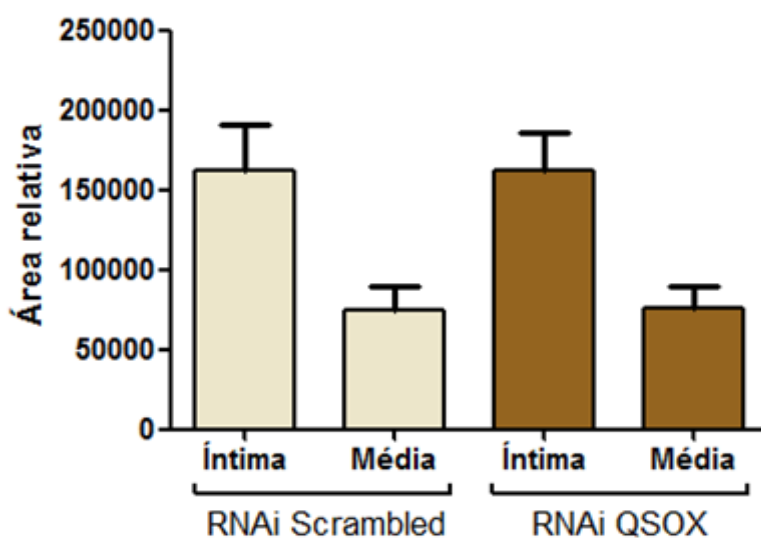


FIGURA 12 – ÁREA ÍNTIMA E MÉDIA DE CARÓTIDA DE RATO LESADA COM CATÉTER BALÃO E RNAi PARA QSOX. Área medida da camada íntima e da camada média de animais lesados com catéter balão e posterior tratamento com RNAi para QSOX ou RNAi “scrambled”. Área medida com o programa ImageJ. A análise estatística foi realizada por One-way ANOVA seguido de pós-teste Bonferroni, não há diferença estatística (n=4).
FONTE: DO AUTOR (2010)

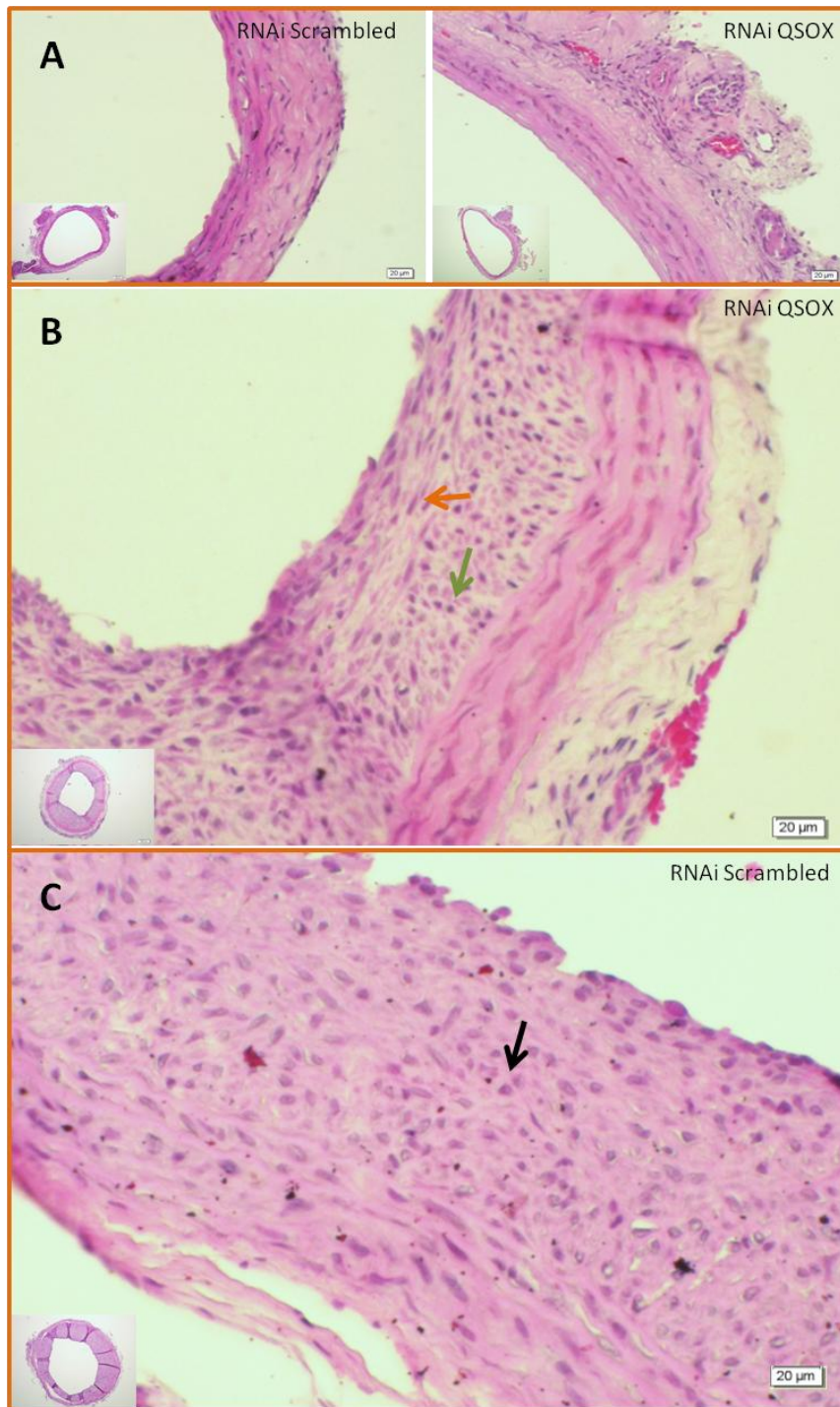


FIGURA 13 – EFEITO MORFOLÓGICO DO “KNOCKDOWN” DE QSOX NA REESTENOSE APÓS 14 DIAS DE LESÃO. Ratos Wistar pesando 250 g foram anestesiados e a carótida esquerda foi exposta. Com um catéter balão foi feita a lesão na carótida. Logo após a lesão, 15 μg de RNAi para QSOX ou RNAi “scrambled” foram diluídos em 100 μL de gel plurônico 30% e aplicadas diretamente à carótida. Após 7 e 14 dias as carótidas foram coletadas e emblocadas. Cortes de 6 μm foram submetidos a coloração com hematoxilina e eosina e analisadas com microscopia de luz. **A.** Em 7 dias não houve diferença entre os tratamentos. **B.** Há uma diferença morfológica nas células silenciadas para QSOX em 14 dias; a seta alaranjada indica células com características musculares diferenciadas. A seta verde indica células arredondadas, característica de células musculares não diferenciadas. **C.** Os animais tratados com RNAi “scrambled” não apresentaram diferença morfológica. A seta preta indica as células com núcleos arredondadas, característica presente em neo-íntima de rato não tratado. FONTE: DO AUTOR (2010)

Outra observação interessante destes cortes foi a celularidade na neo-íntima. As células na neo-íntima dos ratos tratados com RNAi “scrambled” apresentaram-se como esperado, com núcleos arredondados, células mais arredondadas e dispersas. No entanto, na neo-íntima dos ratos tratados com RNAi para QSOX, as células apresentavam-se mais próximas umas das outras. Uma análise semi-quantitativa do número de núcleos mostrou que nos animais tratados com RNAi para QSOX, a neo-íntima tem em média 30% mais células em relação a neo-íntima de ratos tratados com RNAi “scrambled” (figura 14).

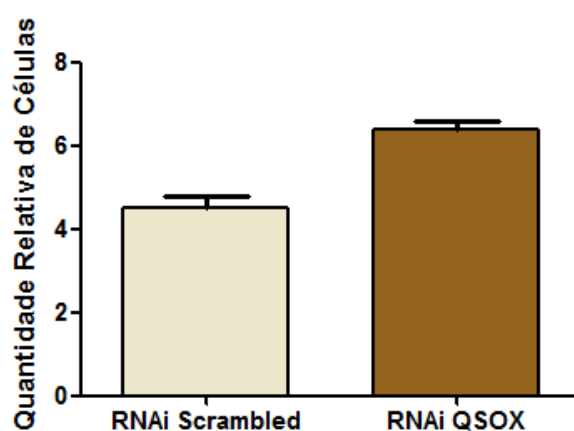


FIGURA 14 – QUANTIDADE RELATIVA DE NÚCLEOS CELULARES NA NEO-ÍNTIMA DE ANIMAIS TRATADOS COM RNAi. Ratos Wistar pesando 250 g, foram submetidos à lesão por catéter balão e logo em seguida foram adicionados diretamente na carótida 15 µg de RNAi para QSOX ou RNAi controle negativo “scrambled”. Após 14 dias, os animais foram ortotansados e cortes histológicos de 6 µm foram submetidos à coloração com hematoxilina e eosina. Foram contados números de núcleos de 72 imagens de cada tratamento de 100x100 pixel com auxílio do programa ImageJ. O tratamento com RNAi para QSOX possui 30% mais células em relação ao controle negativo “scrambled” (n=3).

FONTE: DO AUTOR (2010)

4.7 CARACTERIZAÇÃO DE VSMC

As células de cultura primária de aorta de rato são de fácil obtenção, mas há a necessidade de caracterizá-las como tal, visto que são obtidas através de explantes de aorta de rato. Apesar das culturas terem sido realizadas em placas contendo inibidor de crescimento de fibroblasto, seu crescimento e morfologia são semelhantes às células VSMC. Dessa forma, para avaliarmos se as células obtidas eram musculares, a expressão de α -actina foi analisada por imunofluorescência indireta com anticorpo monoclonal anti- α -actina (Figura 15 A). As células marcadas em vermelho são positivas

para essa proteína, descartando a presença de fibroblasto nas culturas de células. Na figura 15 B observamos o controle negativo (sem anticorpo primário) da reação, evidenciando os núcleos das células corados em azul.

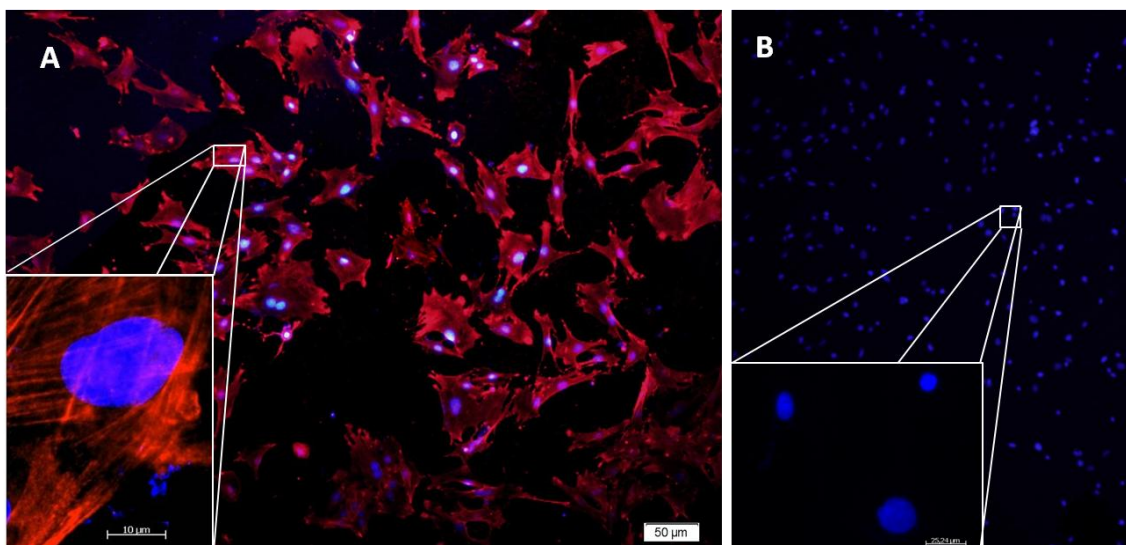


FIGURA 15 – CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULA MUSCULAR LISA DE AORTA DE RATO (VSMC). VSMCs foram obtidas de explantes de aorta de rato e cultivadas com meio DMEM e 20% de SFB em placas de 24 poços com inibidor de fibroblasto. As VSMCs migraram dos explantes e foram transferidas para placas maiores para a realização dos ensaios. **A.** Para confirmar que essas células eram de origem muscular, imunofluorescência utilizando anticorpo anti α -actina foi utilizado. Imagem em destaque com aumento de 630x. **B.** Controle negativo da reação. Imagem em destaque com aumento de 400x.
 FONTE: DO AUTOR (2010)

4.8 TRANSFEÇÃO EM VSMC

Para entendermos os efeitos da QSOX1 na vasculatura, reduzimos nosso modelo experimental à cultura de VSMC. Assim, foram realizados ensaios de “knockdown” e alguns de superexpressão de QSOX em VSMC.

Para verificar a eficiência da transfecção com Oligofectamina, um RNAi controle negativo “scrambled” conjugado com o fluoróforo TYE™563 foi utilizado na concentração de 40 nM. Na figura 16 podemos observar 60% de células positivas para a transfecção em relação ao controle (células submetidas ao mesmo processo de transfecção na ausência de RNAi). A eficiência da transfecção por eletroporação foi verificada pela análise de células positivas para EGFP após transfecção do vetor pEGFP-C1. A análise por citometria de fluxo mostrou que 60% das células também foram positivas para esse método (Figura 16).

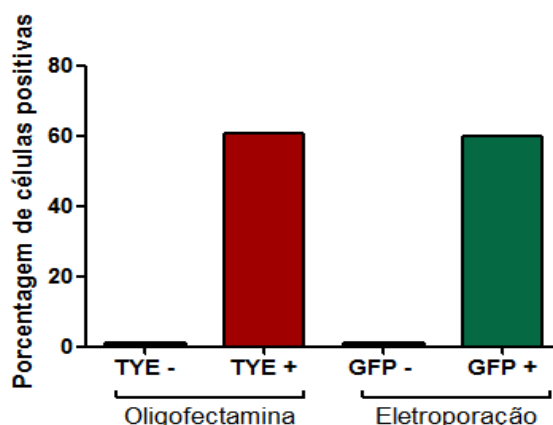


FIGURA 16 – EFICIÊNCIA DE TRANSFEÇÃO EM VSMC POR OLIGOFECTAMINA E ELETROPORAÇÃO. VSMC foram submetidas à transfeção com Oligofectamina utilizando RNAi controle negativo “scrambled” conjugado com fluoróforo TYE (40 nM) obtendo-se após 24 horas 60% das células positivas em relação ao controle negativo. VSMC eletroporadas com plasmídeo contendo o gene da EGFP (10 µg) marcando 60% das células positivas em relação ao controle (células somente eletroporadas). A análise foi realizada por meio de citometria de fluxo após 48 horas de transfeção.

FONTES: DO AUTOR (2010)

4.9 VALIDAÇÃO DOS INICIADORES PARA qPCR

A expressão de RNA mensageiro de QSOX foi avaliada por PCR quantitativo em tempo real. A validação foi feita com células VSMC sem tratamentos. Como normalizador para QSOX o RNAm para “Hypoxanthine Guanine Phospho Ribosyltransferase” (HPRT) foi amplificado.

Primeiramente, a capacidade de um par de iniciadores de amplificar diferentes concentrações do DNA molde foi testada. Para isso, a inclinação da reta do gráfico de “Cycle threshold” (Ct) versus o log da massa do cDNA foi medida. Idealmente, esta inclinação deve ser -3,32; isso significa que a cada 3,32 ciclos o número de *amplicons* aumenta em 10 vezes, durante a fase exponencial de amplificação. Utilizando diferentes concentrações de RNA total (50, 10, 5, 1, 0,5 e 0,1 ng), o par de iniciadores para QSOX mostrou-se com eficiência de 91,6%, calculada pela equação $E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$, onde E é a eficiência. A inclinação da reta para esse iniciador foi de -3,543 (Figura 17 A). Já o par para o gene HPRT mostrou-se eficiente em uma faixa de maior concentração, de 500 a 0,1 ng. A eficiência desse par de iniciador foi de 97,3% com o coeficiente angular (“slope”) de -3,391 (Figura 17 B).

Após isso, verificamos a viabilidade de utilizarmos os 2 pares de iniciadores simultaneamente, isto é, considerando o gene QSOX como alvo e o

gene HPRT como normalizador dos experimentos. Para esse cálculo, a diferença (ΔCt) entre o Ct do alvo e o Ct do normalizador ($Ct_{QSOX} - Ct_{HPRT}$) deve permanecer constante (a inclinação da reta não deve ser entre -0,1 e 0,1) na faixa de concentração de cDNA usada. Obtivemos uma inclinação de 0,0013 (Figura 17 C). Portanto, por meio destes ensaios, concluímos que a quantificação de RNAm de QSOX normalizado pelo RNAm HPRT estava confiável.

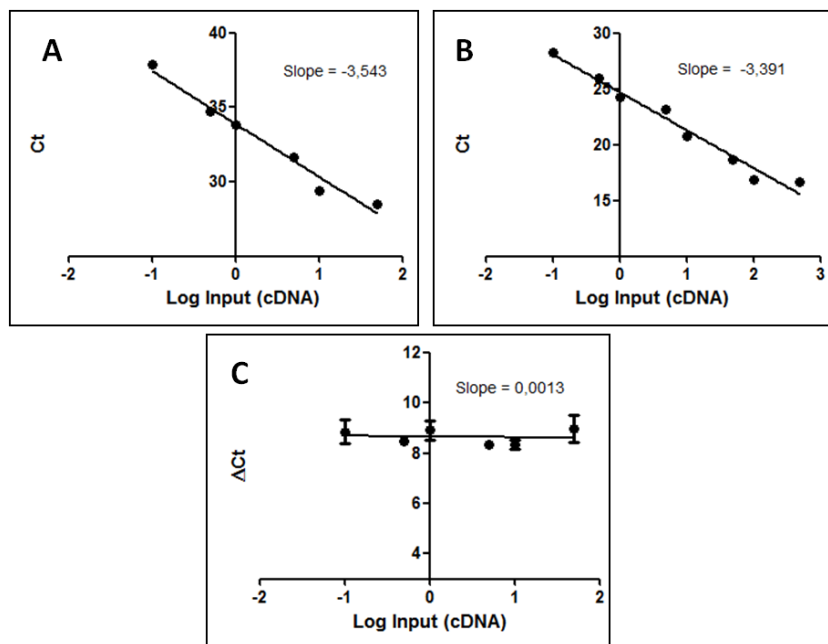


FIGURA 17 – VALIDAÇÃO DOS INICIADORES PELO MÉTODO $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Amplificação do cDNA sintetizado a partir de diferentes concentrações de RNA foi utilizado para validação dos iniciadores. **A.** Eficiência de amplificação do gene alvo (QSOX) e **(B)** normalizador (HPRT) foi realizada utilizando real-time qPCR e SYBR Green. Diluição seriada do cDNA a partir de 1 μ g até 0,1ng de RNA total. **C.** O valor de ΔCt ($Ct_{QSOX} - Ct_{HPRT}$) foi calculado para cada diluição do cDNA. Os valores foram plotados usando análise de regressão linear (n=3).
FONTE: DO AUTOR (2010)

4.10 QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DE RNAm DE QSOX APÓS “KNOCKDOWN” *IN VITRO*

Após validarmos a eficiência dos iniciadores para QSOX e HPRT, avaliamos a eficiência do “knockdown” do RNAm da QSOX pela técnica de RNAi. Para isso, células VSMC foram transfectadas com RNAi para QSOX ou com o RNAi “scrambled”. Após 24, 48 e 72 horas da transfecção, a quantidade relativa de RNAm de QSOX foi analisada. Pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ constatou-se uma diminuição média na expressão do RNAm de QSOX de 70% em 48 horas em

relação ao controle “scrambled” (Figura 18). Todos os experimentos mostraram um retorno da expressão de RNAm de QSOX após 72 horas.

Apesar disso, é difícil mensurar uma real diminuição da proteína apenas medindo os níveis de RNAm. A diminuição da expressão protéica dura em média de 5 a 7 dias, mas isso depende da espécie, do alvo, do tipo de RNAi e da transfecção (Kurreck, 2009).

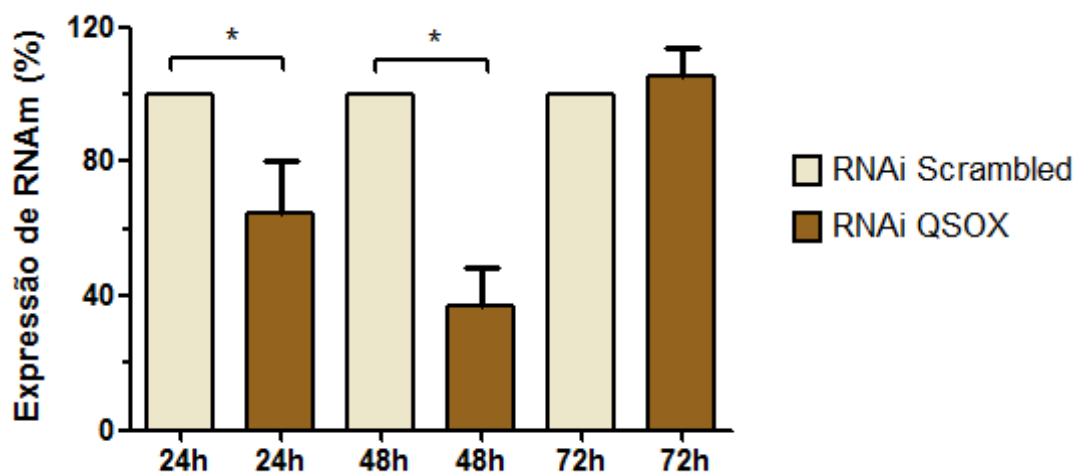


FIGURA 18 – NÍVEL DE RNAm DE QSOX APÓS “KNOCKDOWN”. Células VSMC transfectadas com Oligofectamina e 166 μ M de RNAi para o alvo QSOX ou RNAi “scrambled” foram avaliadas por qPCR com tempos de 24, 48 e 72 horas de transfecção. O RNA total foi extraído e 50 ng foram utilizados para síntese de cDNA. qPCR foi analisado pelo método do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ obtendo aproximadamente 70% de silenciamento em 48 horas. One-way ANOVA seguido por pós-teste Bonferroni foram empregados para análise estatística * $P < 0,05$. FONTE: DO AUTOR (2010).

4.11 QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DE RNAm DE QSOX APÓS SUPEREXPRESSION DE QSOX *IN VITRO*

Assim como para o “knockdown”, foi analisado o nível de expressão de RNAm de QSOX após a superexpressão utilizando plasmídeo com a sequência para QSOX ou seu controle, o vetor vazio (Mock). O RNAm foi analisado após 24, 48 e 72 horas. O resultado de qPCR mostrou um aumento de 600x na expressão de RNAm de QSOX nas primeiras 24 horas em relação ao controle mock (Figura 17). Após 48 horas, o aumento na expressão foi em média de 90x em relação ao controle e, após 72 horas, o aumento foi de 300x (Figura 19). Nas análises de superexpressão utilizamos o mock como controle, pois foi comparada a expressão de RNAm de QSOX nas células eletroporadas com mock e as células apenas submetidas a eletroporação, sem nenhum vetor. Não

houve diferença significativa entre ambas as expressões (dados não mostrados). Dessa forma, a transfecção com o mock foi considerado o melhor controle da superexpressão.

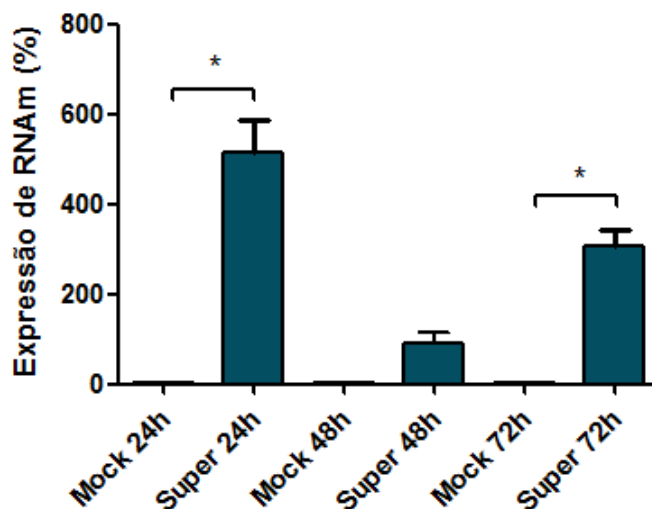


FIGURA 19 – NÍVEL DE EXPRESSÃO DE RNAm APÓS SUPEREXPRESSÃO DE QSOX. Células VSMC eletroporadas com 10 µg de plasmídeo pCR3.1QSOX (Super) ou 10 µg do plasmídeo pCR3.1 vazio (Mock) foram avaliados por qPCR com tempos de 24, 48 e 72 horas de transfecção. O RNA total foi extraído e 50 ng foram utilizados para síntese de cDNA. qPCR foi analisado pelo método do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ obtendo até 500 vezes mais expressão de RNAm de QSOX em relação ao controle Mock em 24 horas. One-way ANOVA seguido por pós-teste Bonferroni foram empregados para análise estatística * $P < 0,05$.

FUNTE: DO AUTOR (2010).

4.12 EFEITO DO "KNOCKDOWN" DE QSOX NA PROLIFERAÇÃO CELULAR

Como a QSOX mostrou-se bastante expressa na neo-íntima de carótidas de rato após lesão com catéter balão, procuramos investigar quais seriam os efeitos dos quais a QSOX estaria participando nesse processo. Portanto, suprimimos a expressão gênica de QSOX e analisamos a proliferação de VSMC. Após 24, 48 e 72 horas as células foram soltas e contadas em citômetro de fluxo (Figura 20). Este foi um experimento único e por isso não possui análise estatística. Apesar de ser apenas 10%, observa-se uma tendência na diminuição na proliferação em 72 horas.

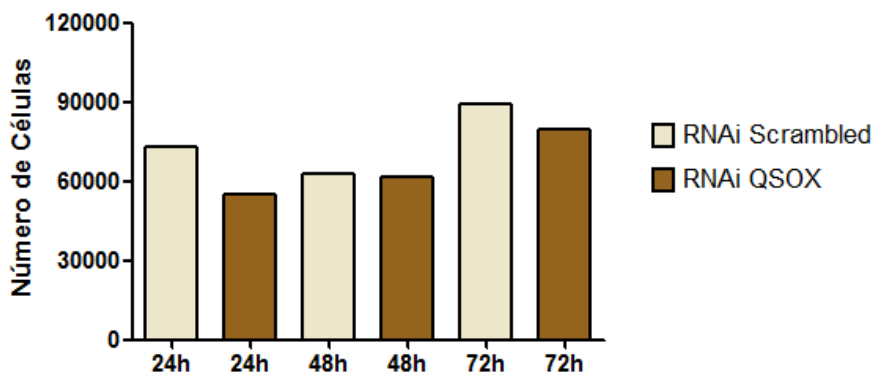


FIGURA 20 – EFEITO DA SUPRESSÃO DA EXPRESSÃO DE QSOX NA PROLIFERAÇÃO CELULAR. Cem mil VSMC foram cultivadas em placas de 6 poços e transfectadas com Oligofectamina e 165 nM de RNAi QSOX ou 165 nM de “scrambled”. Após 24, 48 e 72 horas as células foram soltas e ressuspensas em 700 μ L de meio DMEM e contou-se o número de células por 10 minutos utilizando um citômetro de fluxo. Experimento único. FONTE: DO AUTOR (2010).

4.13 EFEITO DA SUPEREXPRESSÃO DE QSOX NA PROLIFERAÇÃO CELULAR

Assim como no “knockdown”, avaliamos o efeito do aumento da expressão de QSOX na proliferação de VSMC. Quinhentas mil células foram eletroporadas com vetor para superexpressão de QSOX ou o controle mock. Após 24, 48 e 72 horas as VSMC foram soltas e contadas em citômetro de fluxo (Figura 21). Este foi um experimento único e por isso não possui análise estatística. No entanto, observa-se uma tendência no aumento do número de células com superexpressão em 24 e 72 horas.

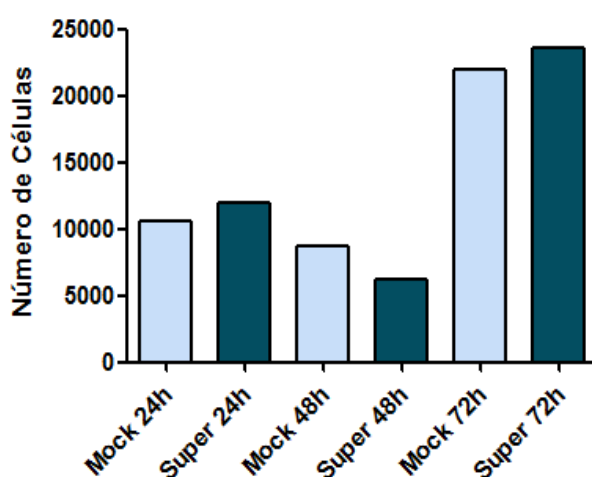


FIGURA 21 – EFEITO DA SUPEREXPRESSÃO DE QSOX NA PROLIFERAÇÃO CELULAR. Cinco milhões de VSMCs foram eletroporadas com 10 μ g do plasmídeo para superexpressão de QSOX (super) ou 10 μ g do plasmídeo vazio (Mock) e plaqueadas em placas de 6 poços.

Após 24, 48 e 72 horas as células foram soltas e ressuspensas em 700 μ L de meio DMEM e contou-se o número de células por 10 minutos utilizando citômetro de fluxo. Experimento único. FONTE: DO AUTOR (2010)

4.14 VIABILIDADE CELULAR APÓS “KNOCKDOWN” DE QSOX *IN VITRO*

A viabilidade celular foi medida pela análise da atividade metabólica por MTT. A figura 22 mostra uma diminuição na viabilidade celular das células transfectadas com RNAi para QSOX após 48 e 72 horas de transfecção, embora não significativa. Sendo RNAi para QSOX 16% menos viável em 72 horas e 13% em 48 horas.

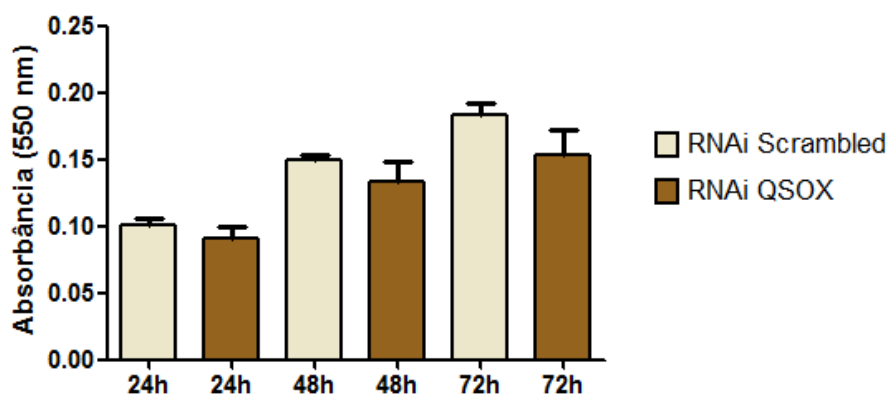


FIGURA 22 – VIABILIDADE CELULAR APÓS “KNOCKDOWN” DE QSOX. A viabilidade celular foi medida com ensaio de MTT. VSMC foram plaqueadas em uma placa de 96 poços e transfectadas com RNAi para QSOX ou RNAi “scrambled”. Após 24, 48 e 72 horas o meio foi retirado e adicionado 100 μ L de solução de MTT e mantidas em estufa por 3 horas. Logo, o meio foi descartado e adicionado 100 μ L de DMSO e a absorbância mensurada em 550nm. Foram realizados três experimentos independentes em octuplicatas e a análise estatística analisada por One-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. FONTE: DO AUTOR (2010).

4.15 VIABILIDADE CELULAR APÓS SUPEREXPRESSION DE QSOX *IN VITRO*

Também para a superexpressão a viabilidade celular foi medida por MTT. O resultado mostrou que há uma tendência em aumentar a viabilidade celular para as que superexpressam QSOX em 24 e 48 e 72 horas, embora não haja diferença estatística em relação ao controle mock (figura 23). Houve um aumento de 16% em 24 horas, 13% em 48 horas e 15% em 72 horas.

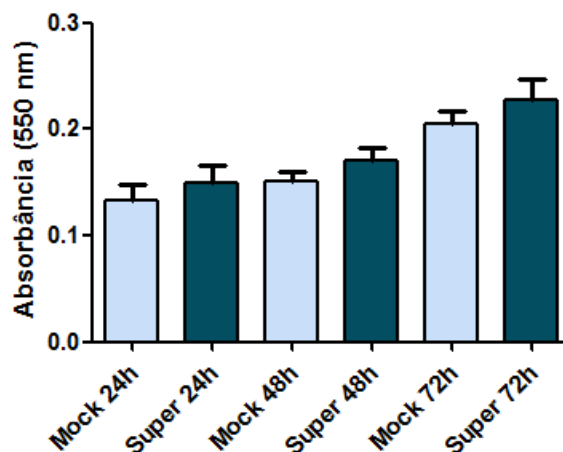


FIGURA 23 – VIABILIDADE CELULAR APÓS SUPEREXPRESSÃO DE QSOX. A viabilidade celular foi medida com ensaio de MTT. VSMC foram eletroporadas com 10 µg de plasmídeo para QSOX ou mock e plaqueadas em uma placa de 96 poços. Após 24, 48 e 72 horas o meio foi retirado e adicionado 100 µL de solução de MTT e mantidas em estufa por 3 horas. Logo, o meio foi descartado e adicionado 100 µL de DMSO e a absorbância mensurada em 550nm. Foram realizados três experimentos independentes em octuplicatas e a análise estatística analisada por One-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. FONTE: DO AUTOR (2010).

4.16 MIGRAÇÃO DE VSMC APÓS “KNOCKDOWN” DE QSOX

Como a formação da neo-íntima depende da migração de células musculares lisas (Casscells, Engler *et al.*, 1994), avaliamos o efeito do “knockdown” da QSOX neste processo. Após 4 horas da transfecção do RNAi para QSOX ou RNAi “scrambled”, a placa foi riscada (“scratched”) e a distância entre as margens do risco foi medida após 24, 48, 72, 96 e 112h. Observa-se que as células transfectadas com RNAi para QSOX migrou menos a partir de 48 h, comparadas com as células transfectadas com RNAi controle negativo “scrambled” (Figura 24). Como foi realizado um único experimento de migração, a análise estatística não pôde ser realizada. Apesar do experimento de migração ter sido realizado sob baixo nível de SFB (1%) para minimizar o efeito de proliferação celular (Grifoni, Gannon *et al.*, 2006), a maior parte dos trabalhos de migração com VSMC são realizados em 24 horas (Sung, Guan *et al.*, 2007; Hinoki, Kimura *et al.*, 2010), mas também pode ser analisado com 48 horas (Ling, Hu *et al.*, 2008) inclusive ensaio com RNA de interferência (Zhu, Sun *et al.*, 2009). Dessa forma, se considerarmos os resultados até 48 horas, houve uma diminuição de 30% na migração de VSMC nas células silenciadas para QSOX.

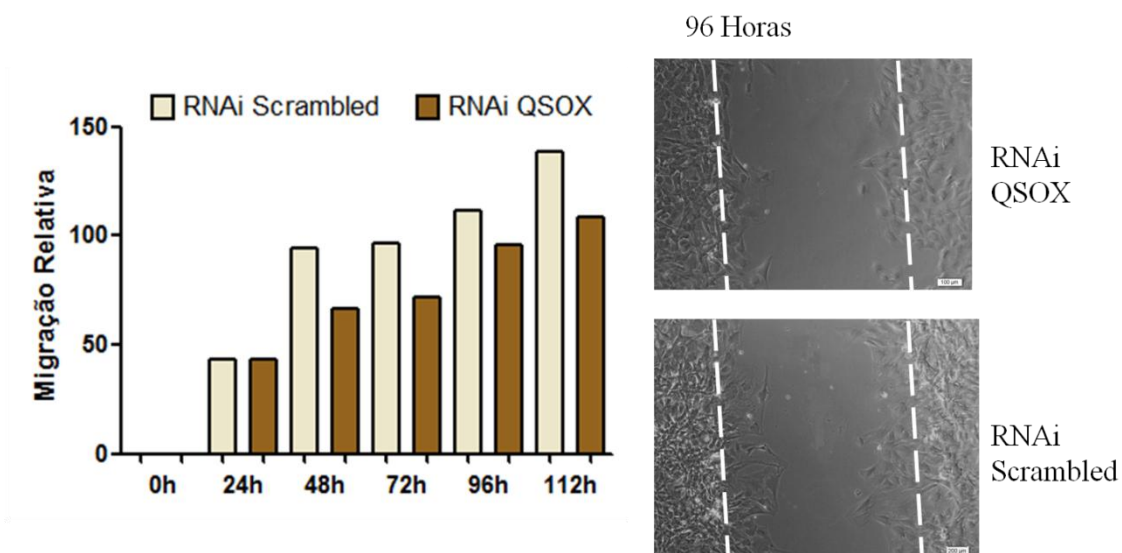


FIGURA 24 – EFEITO DO RNAi PARA QSOX NA MIGRAÇÃO CELULAR. Cinquenta mil VSMCs foram plaqueadas em placa de 24 poços e transfectadas com Oligofectamina e 166 nM de RNAi QSOX ou “scrambled” e após 4 horas do início da transfecção foi feito um “scratch” nas células (tempo 0). Após 24, 48, 72, 96 e 112 horas as células foram fotografadas e a distância de migração foi medida. Experimento único. FONTE: DO AUTOR (2010).

5. DISCUSSÃO

Desde a década de 80, vários trabalhos têm estudado moléculas que participam no processo de reestenose. Morishita e colaboradores (1993) mostraram que a PCNA é importante no processo de reestenose. Esses pesquisadores inibiram completamente a reestenose em rato utilizando a técnica de RNA antisense para PCNA (Morishita, Gibbons *et al.*, 1993). Da mesma maneira, a proteína kinase C (PKC) mostrou-se importante neste processo de reestenose uma vez que a inibição de PKC inibiu a reestenose (Deuse, Koyanagi *et al.*, 2010). Todos os estudos relacionados com a reestenose têm como objetivo inibir clinicamente a formação de neo-íntima (Selvendiran, Kuppusamy *et al.*, 2009). Apesar da quantidade de trabalhos, faltam estudos que possam levar a um completo entendimento da formação dessa camada. Nossos dados *in vivo* mostraram que a QSOX1 pode ser uma proteína participante da formação e/ou estabilização da neo-íntima. Contudo, a supressão da sua expressão não inibiu a hiperplasia intimal. Uma observação interessante foi uma visível diferença morfológica nas células que compõem a neo-íntima de rato após “knockdown” com RNAi para QSOX1.

Estudos do mecanismo de diferenciação das VSMC são difíceis de serem encontrados. Uma possibilidade é que a QSOX de alguma forma possa estar participando do processo de diferenciação celular (como anti-diferenciativa), uma vez que as células presentes no “knockdown” têm características fibroblastóides. Em ratos, nas primeiras horas após a lesão por catéter balão, as VSMC presentes na média que estão em seu estado normal de quiescência, passam a um estado proliferativo (Kato e Periasamy, 1996). Essas células diminuem a expressão de α -actina e há um aumento na expressão de β -actina, logo após a lesão. Em 14 dias de lesão, somente são observadas células não diferenciadas expressando β -actina (Clowes, Clowes *et al.*, 1988). A expressão de RNAm de α -actina só retorna após 60 dias de lesão (Kocher e Gabbiani, 1986) e nossos resultados mostraram células com características diferentes em 14 dias. Para comprovar a participação da QSOX na diferenciação (como anti-diferenciativa), seria interessante fazer ensaios de imunistoquímica para α -actina, um marcador de células contráteis.

Interessante também seria analisar “knockdown” de QSOX em animais lesados com tempo maior que 14 dias.

Outra possibilidade é a QSOX1 não estar atuando diretamente na diferenciação, mas, indiretamente, tanto no dobramento de proteínas como no remodelamento da matriz extracelular. Uma vez que tanto os iniciadores para qPCR quanto o oligo de RNAi, não discriminam entre as duas isoformas de QSOX1, não é possível afirmar qual variante de QSOX está sendo afetada pelo RNAi. Para responder a essa questão seria interessante uma análise de qPCR com iniciadores específicos para cada isoforma e, assim, analisar a porcentagem de “knockdown” de cada isoforma.

Seria interessante uma investigação com a diminuição de algumas proteínas presentes na neo-íntima após 60 dias, como a fibronectina, já que essa proteína é substituída pelo colágeno (Bauters e Isner, 1997).

Outro ponto interessante que pode ser abordado é a origem dessas células. Estudos mais recentes vêm sugerindo que na formação da neo-íntima células endoteliais progenitoras participam ativamente desse processo, uma vez que antígenos de células tronco foram encontrados na neo-íntima (Torsney, Mandal *et al.*, 2007). Células originárias da medula óssea podem ser procuradas em nosso modelo experimental. CD34 e antígeno para células musculares progenitoras podem servir como marcadores. Outro tipo de marcação ainda mais específico seria a marcação do receptor transmembrânico Flt-1 (VEGFR-1) que é específico de células musculares progenitoras e também foi encontrado em VSMC na neo-íntima (Orlandi e Bennett, 2010).

Os estudos obtidos de RNAi para QSOX e de superexpressão de QSOX mostram algumas tendências, e requerem mais experimentos confirmatórios. O RNAi para QSOX induziu uma diminuição na proliferação de VSMC de apenas 10% em 72 horas e a superexpressão de QSOX um aumento de 6,5% em relação aos respectivos controles.

Em se tratando de a QSOX ter um papel na viabilidade celular, as células silenciadas para QSOX tiveram uma tendência a serem mais viáveis

em relação ao controle, e o contrário ocorreu no modelo de superexpressão, onde houve uma diferença de até 15% na viabilidade em 72 horas.

Nosso resultado *in vitro* mostrou que o RNAi para QSOX diminuiu aproximadamente 30% a migração de VSMC. A QSOX realmente pode estar envolvida na migração celular *in vitro*. Estudos mostraram que a peroxiredoxina tipo II (PrxII) que é uma proteína capaz de degradar peróxido de hidrogênio (H_2O_2) à água. O estudo mostrou que a inibição de PrxII aumenta a quantidade de H_2O_2 livre ativando fatores de crescimento como PDGF e EGF e, conseqüentemente, a proliferação e a migração celular. A superexpressão de PrxII diminuiu a quantidade de H_2O_2 livre, diminuindo assim também a proliferação e migração celular, inativando os fatores de crescimento (Choi, Lee *et al.*, 2005). Dessa forma, a quantidade de H_2O_2 parece ser importante na migração celular o que pode colaborar com o nosso resultado de migração, já que o produto da reação da QSOX é peróxido de hidrogênio. De fato, foi relatado que o controle redox está envolvido na migração de VSMC envolvendo espécies reativas de oxigênio (ROS) (San Martin e Griendling, 2010).

Outros experimentos são necessários para elucidarmos melhor o processo de reestenose e, apesar do modelo animal ser bastante utilizado, devemos ter cuidado com determinadas afirmações. Há experimentos que funcionaram muito bem em modelos experimentais como o rato, mas não tiveram o mesmo efeito em células de humanos (Chan, 1994).

6. CONCLUSÃO

- A QSOX é uma proteína abundante na neo-íntima de rato lesado por catéter balão com expressão analisada e presente até o 21º dia.
- Ensaio com RNA de interferência mostraram que a QSOX está envolvida no processo da formação da neo-íntima.
- Novos estudos são necessários para elucidarmos a função da QSOX durante o processo de reestenose.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, F. V.; BONDER, M. Options for management of acute pain in the rat. *Vet Rec* [S.I.], v. 140, n. 21, p. 553-7, May 24 1997.
- ANTWI, K.; HOSTETTER, G.; DEMEURE, M. J.; KATCHMAN, B. A.; DECKER, G. A.; RUIZ, Y.; SIELAFF, T. D.; KOEP, L. J.; LAKE, D. F. Analysis of the plasma peptidome from pancreas cancer patients connects a peptide in plasma to overexpression of the parent protein in tumors. *J Proteome Res* [S.I.], v. 8, n. 10, p. 4722-31, Oct 2009.
- BAULCOMBE, D. RNA silencing. *Curr Biol* [S.I.], v. 12, n. 3, p. R82-4, Feb 5 2002.
- BAUTERS, C.; ISNER, J. M. The biology of restenosis. *Prog Cardiovasc Dis* [S.I.], v. 40, n. 2, p. 107-16, Sep-Oct 1997.
- BAUTERS, C.; MAROTTE, F.; HAMON, M.; OLIVIERO, P.; FARHADIAN, F.; ROBERT, V.; SAMUEL, J. L.; RAPPAPORT, L. Accumulation of fetal fibronectin mRNAs after balloon denudation of rabbit arteries. *Circulation* [S.I.], v. 92, n. 4, p. 904-11, Aug 15 1995.
- BECKER, L.; NESHEIM, M. E.; KOSCHINSKY, M. L. Catalysis of covalent Lp(a) assembly: evidence for an extracellular enzyme activity that enhances disulfide bond formation. *Biochemistry* [S.I.], v. 45, n. 32, p. 9919-28, Aug 15 2006.
- BENAYOUN, B.; ESNARD-FEVE, A.; CASTELLA, S.; COURTY, Y.; ESNARD, F. Rat seminal vesicle FAD-dependent sulfhydryl oxidase. Biochemical characterization and molecular cloning of a member of the new sulfhydryl oxidase/quiescin Q6 gene family. *J Biol Chem* [S.I.], v. 276, n. 17, p. 13830-7, Apr 27 2001.
- BERLINER, J. A.; NAVAB, M.; FOGELMAN, A. M.; FRANK, J. S.; DEMER, L. L.; EDWARDS, P. A.; WATSON, A. D.; LUSIS, A. J. Atherosclerosis: Basic Mechanisms : Oxidation, Inflammation, and Genetics. *Circulation* [S.I.], v. 91, n. 9, p. 2488-2496, May 1, 1995 1995.
- BOHORQUEZ, M.; KOCH, C.; TRYGSTAD, T.; PANDIT, N. A Study of the Temperature-Dependent Micellization of Pluronic F127. *J Colloid Interface Sci* [S.I.], v. 216, n. 1, p. 34-40, Aug 1 1999.
- CARAMORI, P. R.; YAMAMOTO, G. I.; ZAGO, A. J. Postangioplasty restenosis. Physiopathogeny. *Arq Bras Cardiol* [S.I.], v. 69, n. 2, p. 141-50, Aug 1997.
- CASSCELLS, W.; ENGLER, D.; WILLERSON, J. T. Mechanisms of restenosis. *Tex Heart Inst J* [S.I.], v. 21, n. 1, p. 68-77, 1994.

CHAKRAVARTHI, S.; JESSOP, C. E.; WILLER, M.; STIRLING, C. J.; BULLEID, N. J. Intracellular catalysis of disulfide bond formation by the human sulfhydryl oxidase, QSOX1. *Biochem J* [S.I.], v. 404, n. 3, p. 403-11, Jun 15 2007.

CHAN, P. Cell biology of human vascular smooth muscle. *Ann R Coll Surg Engl* [S.I.], v. 76, n. 5, p. 298-303, Sep 1994.

CHEEMA, S. K. *Biochemistry of Atherosclerosis*. 1. ed., 2006.

CHEN, J. P.; YU, S. C.; HSU, B. R.; FU, S. H.; LIU, H. S. Loofa sponge as a scaffold for the culture of human hepatocyte cell line. *Biotechnol Prog* [S.I.], v. 19, n. 2, p. 522-7, Mar-Apr 2003.

CHEN, V. M.; HOGG, P. J. Allosteric disulfide bonds in thrombosis and thrombolysis. *J Thromb Haemost* [S.I.], v. 4, n. 12, p. 2533-41, Dec 2006.

CHOI, M. H.; LEE, I. K.; KIM, G. W.; KIM, B. U.; HAN, Y. H.; YU, D. Y.; PARK, H. S.; KIM, K. Y.; LEE, J. S.; CHOI, C.; BAE, Y. S.; LEE, B. I.; RHEE, S. G.; KANG, S. W. Regulation of PDGF signalling and vascular remodelling by peroxiredoxin II. *Nature* [S.I.], v. 435, n. 7040, p. 347-53, May 19 2005.

CLOWES, A. W.; CLOWES, M. M. Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. IV. Heparin inhibits rat smooth muscle mitogenesis and migration. *Circ Res* [S.I.], v. 58, n. 6, p. 839-45, Jun 1986.

CLOWES, A. W.; CLOWES, M. M.; KOCHER, O.; ROPRAZ, P.; CHAPONNIER, C.; GABBIANI, G. Arterial smooth muscle cells in vivo: relationship between actin isoform expression and mitogenesis and their modulation by heparin. *J Cell Biol* [S.I.], v. 107, n. 5, p. 1939-45, Nov 1988.

CLOWES, A. W.; REIDY, M. A.; CLOWES, M. M. Mechanisms of stenosis after arterial injury. *Lab Invest* [S.I.], v. 49, n. 2, p. 208-15, Aug 1983.

COPPOCK, D. L.; KOPMAN, C.; SCANDALIS, S.; GILLERAN, S. Preferential gene expression in quiescent human lung fibroblasts. *Cell Growth Differ* [S.I.], v. 4, n. 6, p. 483-93, Jun 1993.

COPPOCK, D. L.; THORPE, C. Multidomain flavin-dependent sulfhydryl oxidases. *Antioxid Redox Signal* [S.I.], v. 8, n. 3-4, p. 300-11, Mar-Apr 2006.

DEUSE, T.; KOYANAGI, T.; ERBEN, R. G.; HUA, X.; VELDEN, J.; IKENO, F.; REICHENSPURNER, H.; ROBBINS, R. C.; MOCHLY-ROSEN, D.; SCHREPFER, S. Sustained inhibition of epsilon protein kinase C inhibits vascular restenosis after balloon injury and stenting. *Circulation* [S.I.], v. 122, n. 11 Suppl, p. S170-8, Sep 14 2010.

EL-KAMEL, A. H. In vitro and in vivo evaluation of Pluronic F127-based ocular delivery system for timolol maleate. *Int J Pharm* [S.I.], v. 241, n. 1, p. 47-55, Jul 8 2002.

ELBASHIR, S. M.; LENDECKEL, W.; TUSCHL, T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* [S.I.], v. 15, n. 2, p. 188-200, Jan 15 2001.

ESCOBAR-CHÁVEZ, J. J.; LÓPEZ-CERVANTES, M.; NAÏK, A.; KALIA, Y. N.; QUINTANAR-GUERRERO, D.; GANEM-QUINTANAR, A. Applications of thermoreversible pluronic F-127 gels in pharmaceutical formulations. *J Pharm Pharmaceut Sci* [S.I.], v. 9, n. 3, p. 339-358, 2006.

FARB, A.; KOLODZIE, F. D.; HWANG, J. Y.; BURKE, A. P.; TEFERA, K.; WEBER, D. K.; WIGHT, T. N.; VIRMANI, R. Extracellular matrix changes in stented human coronary arteries. *Circulation* [S.I.], v. 110, n. 8, p. 940-7, Aug 24 2004.

FASS, D. The Erv family of sulfhydryl oxidases. *Biochim Biophys Acta* [S.I.], v. 1783, n. 4, p. 557-66, Apr 2008.

FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M. K.; KOSTAS, S. A.; DRIVER, S. E.; MELLO, C. C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* [S.I.], v. 391, n. 6669, p. 806-11, Feb 19 1998.

GALIS, Z. S.; KHATRI, J. J. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res* [S.I.], v. 90, n. 3, p. 251-62, Feb 22 2002.

GELDERMAN, K. A.; HULTQVIST, M.; HOLMBERG, J.; OLOFSSON, P.; HOLMDAHL, R. T cell surface redox levels determine T cell reactivity and arthritis susceptibility. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 103, n. 34, p. 12831-6, Aug 22 2006.

GLAUDEMANS, A. W.; SLART, R. H.; BOZZAO, A.; BONANNO, E.; ARCA, M.; DIERCKX, R. A.; SIGNORE, A. Molecular imaging in atherosclerosis. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* [S.I.], Mar 20 2010.

GRIFONI, S. C.; GANNON, K. P.; STEC, D. E.; DRUMMOND, H. A. ENaC proteins contribute to VSMC migration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* [S.I.], v. 291, n. 6, p. H3076-86, Dec 2006.

GRUNTZIG, A.; SCHNEIDER, H. J. The percutaneous dilatation of chronic coronary stenoses--experiments and morphology. *Schweiz Med Wochenschr* [S.I.], v. 107, n. 44, p. 1588, Nov 5 1977.

HANDLER, C.; COGHLAN, G. *Living with Coronary Disease* 1. ed.: Springer London, 2007.

HANSSON, G. K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* [S.I.], v. 352, n. 16, p. 1685-95, Apr 21 2005.

HECKLER, E. J.; RANCY, P. C.; KODALI, V. K.; THORPE, C. Generating disulfides with the Quiescin-sulfhydryl oxidases. *Biochim Biophys Acta* [S.I.], v. 1783, n. 4, p. 567-77, Apr 2008.

HELLEBREKERS, D. M.; MELOTTE, V.; VIRE, E.; LANGENKAMP, E.; MOLEMA, G.; FUKS, F.; HERMAN, J. G.; VAN CRIEKINGE, W.; GRIFFIOEN, A. W.; VAN ENGELAND, M. Identification of epigenetically silenced genes in tumor endothelial cells. *Cancer Res* [S.I.], v. 67, n. 9, p. 4138-48, May 1 2007.

HINOKI, A.; KIMURA, K.; HIGUCHI, S.; EGUCHI, K.; TAKAGURI, A.; ISHIMARU, K.; FRANK, G. D.; GERTHOFFER, W. T.; SOMMERVILLE, L. J.; AUTIERI, M. V.; EGUCHI, S. p21-activated kinase 1 participates in vascular remodeling in vitro and in vivo. *Hypertension* [S.I.], v. 55, n. 1, p. 161-5, Jan 2010.

HLAWATY, H.; SAN JUAN, A.; JACOB, M. P.; VRANCKX, R.; LETOURNEUR, D.; FELDMAN, L. J. Inhibition of MMP-2 gene expression with small interfering RNA in rabbit vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* [S.I.], v. 293, n. 6, p. H3593-601, Dec 2007.

HOOBER, K. L.; JONEJA, B.; WHITE, H. B., 3RD; THORPE, C. A sulfhydryl oxidase from chicken egg white. *J Biol Chem* [S.I.], v. 271, n. 48, p. 30510-6, Nov 29 1996.

JAGADEESHA, D. K.; LINDLEY, T. E.; DELEON, J.; SHARMA, R. V.; MILLER, F.; BHALLA, R. C. Tempol therapy attenuates medial smooth muscle cell apoptosis and neointima formation after balloon catheter injury in carotid artery of diabetic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* [S.I.], v. 289, n. 3, p. H1047-53, Sep 2005.

JAJE, J.; WOLCOTT, H. N.; FADUGBA, O.; CRIPPS, D.; YANG, A. J.; MATHER, I. H.; THORPE, C. A flavin-dependent sulfhydryl oxidase in bovine milk. *Biochemistry* [S.I.], v. 46, n. 45, p. 13031-40, Nov 13 2007.

JIANG, X. M.; FITZGERALD, M.; GRANT, C. M.; HOGG, P. J. Redox control of exofacial protein thiols/disulfides by protein disulfide isomerase. *J Biol Chem* [S.I.], v. 274, n. 4, p. 2416-23, Jan 22 1999.

JORDAN, P. A.; GIBBINS, J. M. Extracellular disulfide exchange and the regulation of cellular function. *Antioxid Redox Signal* [S.I.], v. 8, n. 3-4, p. 312-24, Mar-Apr 2006.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. 10. ed., 2004.

KANTOR, B.; ASHAI, K.; HOLMES, D. R., JR.; SCHWARTZ, R. S. The experimental animal models for assessing treatment of restenosis. *Cardiovasc Radiat Med* [S.I.], v. 1, n. 1, p. 48-54, Jan-Mar 1999.

KATOH, Y.; PERIASAMY, M. Growth and differentiation of smooth muscle cells during vascular development. *Trends Cardiovasc Med* [S.I.], v. 6, n. 3, p. 100-6, Apr 1996.

KOCHER, O.; GABBIANI, G. Expression of actin mRNAs in rat aortic smooth muscle cells during development, experimental intimal thickening, and culture. *Differentiation* [S.I.], v. 32, n. 3, p. 245-51, 1986.

KURRECK, J. RNA interference: from basic research to therapeutic applications. *Angew Chem Int Ed Engl* [S.I.], v. 48, n. 8, p. 1378-98, 2009.

LARAGIONE, T.; BONETTO, V.; CASONI, F.; MASSIGNAN, T.; BIANCHI, G.; GIANAZZA, E.; GHEZZI, P. Redox regulation of surface protein thiols: identification of integrin alpha-4 as a molecular target by using redox proteomics. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 100, n. 25, p. 14737-41, Dec 9 2003.

LEVY, R. I.; JESSE, M. J.; MOCK, M. B. Position on percutaneous transluminal coronary angioplasty (PTCA). *Circulation* [S.I.], v. 59, n. 3, p. 613, Mar 1979.

LIBBY, P. Managing the risk of atherosclerosis: the role of high-density lipoprotein. *Am J Cardiol* [S.I.], v. 88, n. 12A, p. 3N-8N, Dec 20 2001.

LING, H. Y.; HU, B.; WANG, B. X.; ZU, X. Y.; FENG, S. D.; OU, H. S.; ZHOU, S. H.; LIAO, D. F. Effects of rosiglitazone on the proliferation of vascular smooth muscle cell induced by high glucose. *Cardiovasc Drugs Ther* [S.I.], v. 22, n. 6, p. 453-60, Dec 2008.

LLOYD-JONES, D.; ADAMS, R. J.; BROWN, T. M.; CARNETHON, M.; DAI, S.; DE SIMONE, G.; FERGUSON, T. B.; FORD, E.; FURIE, K.; GILLESPIE, C.; GO, A.; GREENLUND, K.; HAASE, N.; HAILPERN, S.; HO, P. M.; HOWARD, V.; KISSELA, B.; KITTNER, S.; LACKLAND, D.; LISABETH, L.; MARELLI, A.; MCDERMOTT, M. M.; MEIGS, J.; MOZAFFARIAN, D.; MUSSOLINO, M.; NICHOL, G.; ROGER, V. L.; ROSAMOND, W.; SACCO, R.; SORLIE, P.; THOM, T.; WASSERTHIEL-SMOLLER, S.; WONG, N. D.; WYLIE-ROSETT, J. Heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* [S.I.], v. 121, n. 7, p. e46-e215, Feb 23 2010.

LORENZ, M. W.; MARKUS, H. S.; BOTS, M. L.; ROSVALL, M.; SITZER, M. Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima-media thickness: a systematic review and meta-analysis. *Circulation* [S.I.], v. 115, n. 4, p. 459-67, Jan 30 2007.

MAFFIA, P.; GRASSIA, G.; DI MEGLIO, P.; CARNUCCIO, R.; BERRINO, L.; GARSIDE, P.; IANARO, A.; IALENTI, A. Neutralization of interleukin-18 inhibits neointimal formation in a rat model of vascular injury. *Circulation* [S.I.], v. 114, n. 5, p. 430-7, Aug 1 2006.

MATSUBA, S.; SUGA, Y.; ISHIDOH, K.; HASHIMOTO, Y.; TAKAMORI, K.; KOMINAMI, E.; WILHELM, B.; SEITZ, J.; OGAWA, H. Sulfhydryl oxidase (SOx)

from mouse epidermis: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of recombinant protein in the cultured cells. *J Dermatol Sci* [S.I.], v. 30, n. 1, p. 50-62, Oct 2002.

MOREL, C.; ADAMI, P.; MUSARD, J. F.; DUVAL, D.; RADOM, J.; JOUVENOT, M. Involvement of sulfhydryl oxidase QSOX1 in the protection of cells against oxidative stress-induced apoptosis. *Exp Cell Res* [S.I.], v. 313, n. 19, p. 3971-82, Nov 15 2007.

MORISHITA, R.; GIBBONS, G. H.; ELLISON, K. E.; NAKAJIMA, M.; ZHANG, L.; KANEDA, Y.; OGIHARA, T.; DZAU, V. J. Single intraluminal delivery of antisense cdc2 kinase and proliferating-cell nuclear antigen oligonucleotides results in chronic inhibition of neointimal hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 90, n. 18, p. 8474-8, Sep 15 1993.

MUELLER, R. L.; SANBORN, T. A. The history of interventional cardiology: cardiac catheterization, angioplasty, and related interventions. *Am Heart J* [S.I.], v. 129, n. 1, p. 146-72, Jan 1995.

MULLER, D. W. The role of proto-oncogenes in coronary restenosis. *Prog Cardiovasc Dis* [S.I.], v. 40, n. 2, p. 117-28, Sep-Oct 1997.

MUSARD, J. F.; SALLOT, M.; DULIEU, P.; FRAICHARD, A.; ORDENER, C.; REMY-MARTIN, J. P.; JOUVENOT, M.; ADAMI, P. Identification and expression of a new sulfhydryl oxidase SOx-3 during the cell cycle and the estrus cycle in uterine cells. *Biochem Biophys Res Commun* [S.I.], v. 287, n. 1, p. 83-91, Sep 14 2001.

NAPOLI, C.; LEMIEUX, C.; JORGENSEN, R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* [S.I.], v. 2, n. 4, p. 279-289, Apr 1990.

NIKOL, S.; HUEHNS, T. Y.; HOFLING, B. Molecular biology and post-angioplasty restenosis. *Atherosclerosis* [S.I.], v. 123, n. 1-2, p. 17-31, Jun 1996.

NOFER, J. R.; BRODDE, M. F.; KEHREL, B. E. High density lipoproteins (HDL), platelets and the pathogenesis of atherosclerosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* [S.I.], Mar 12 2010.

ORLANDI, A.; BENNETT, M. Progenitor cell-derived smooth muscle cells in vascular disease. *Biochem Pharmacol* [S.I.], v. 79, n. 12, p. 1706-13, Jun 15 2010.

OSTROWSKI, M. C.; KISTLER, W. S. Properties of a flavoprotein sulfhydryl oxidase from rat seminal vesicle secretion. *Biochemistry* [S.I.], v. 19, n. 12, p. 2639-45, Jun 10 1980.

OSTROWSKI, W. S.; KISTLER, W. S. Properties of a Flavoprotein Sulfhydryl oxidase from rat seminal vesicle secretion. *Biochemistry* [S.I.], v. 19, p. 2639-45, 1980.

PORTES, K. F.; IKEGAMI, C. M.; GETZ, J.; MARTINS, A. P.; DE NORONHA, L.; ZISCHLER, L. F.; KLASSEN, G.; CAMARGO, A. A.; ZANATA, S. M.; BEVILACQUA, E.; NAKAO, L. S. Tissue distribution of quiescin Q6/sulfhydryl oxidase (QSOX) in developing mouse. *J Mol Histol* [S.I.], v. 39, n. 2, p. 217-25, Apr 2008.

RADOM, J.; COLIN, D.; THIEBAULT, F.; DOGNIN-BERGERET, M.; MAIRET-COELLO, G.; ESNARD-FEVE, A.; FELLMANN, D.; JOUVENOT, M. Identification and expression of a new splicing variant of FAD-sulfhydryl oxidase in adult rat brain. *Biochim Biophys Acta* [S.I.], v. 1759, n. 5, p. 225-33, May 2006.

RAJE, S.; THORPE, C. Inter-domain redox communication in flavoenzymes of the quiescin/sulfhydryl oxidase family: role of a thioredoxin domain in disulfide bond formation. *Biochemistry* [S.I.], v. 42, n. 15, p. 4560-8, Apr 22 2003.

REDMOND, T. M. Generation of Knockout Animal Models. *Vision Research Protocols* [S.I.], v. 47, 2001.

RODRIGUEZ, L. G.; WU, X.; GUAN, J. L. Wound-healing assay. *Methods Mol Biol* [S.I.], v. 294, p. 23-9, 2005.

SAHAF, B.; HEYDARI, K.; HERZENBERG, L. A. The extracellular microenvironment plays a key role in regulating the redox status of cell surface proteins in HIV-infected subjects. *Arch Biochem Biophys* [S.I.], v. 434, n. 1, p. 26-32, Feb 1 2005.

SAN MARTIN, A.; GRIENDLING, K. K. Redox control of vascular smooth muscle migration. *Antioxid Redox Signal* [S.I.], v. 12, n. 5, p. 625-40, Mar 1 2010.

SCHWARTZ, S. M.; CAMPBELL, G. R.; CAMPBELL, J. H. Replication of smooth muscle cells in vascular disease. *Circ Res* [S.I.], v. 58, n. 4, p. 427-44, Apr 1986.

SELVENDIRAN, K.; KUPPUSAMY, M. L.; BRATASZ, A.; TONG, L.; RIVERA, B. K.; RINK, C.; SEN, C. K.; KALAI, T.; HIDEK, K.; KUPPUSAMY, P. Inhibition of vascular smooth-muscle cell proliferation and arterial restenosis by HO-3867, a novel synthetic curcuminoid, through up-regulation of PTEN expression. *J Pharmacol Exp Ther* [S.I.], v. 329, n. 3, p. 959-66, Jun 2009.

SONG, H.; ZHANG, B.; WATSON, M. A.; HUMPHREY, P. A.; LIM, H.; MILBRANDT, J. Loss of Nkx3.1 leads to the activation of discrete downstream target genes during prostate tumorigenesis. *Oncogene* [S.I.], v. 28, n. 37, p. 3307-19, Sep 17 2009.

SREEJAYAN, N.; REN, J.; TULIS, D. A. Histological and Morphometric Analyses for Rat Carotid Balloon Injury Model. In: WALKER, J. M. (Ed.).

- Vascular Biology Protocols*: Humana Press, 2008a. p. 31-66. (Methods in Molecular Medicine).
- CLOWES. Rat Carotid Artery Balloon Injury Model. In: WALKER, J. M. (Ed.). *Vascular Biology Protocols*: Humana Press, 2008b. p. 1-30. (Methods in Molecular Medicine).
- STRAUSS, B. H.; CHISHOLM, R. J.; KEELEY, F. W.; GOTLIEB, A. I.; LOGAN, R. A.; ARMSTRONG, P. W. Extracellular matrix remodeling after balloon angioplasty injury in a rabbit model of restenosis. *Circ Res* [S.I.], v. 75, n. 4, p. 650-8, Oct 1994.
- SUNG, H. Y.; GUAN, H.; CZIBULA, A.; KING, A. R.; EDER, K.; HEATH, E.; SUVARNA, S. K.; DOWER, S. K.; WILSON, A. G.; FRANCIS, S. E.; CROSSMAN, D. C.; KISS-TOTH, E. Human tribbles-1 controls proliferation and chemotaxis of smooth muscle cells via MAPK signaling pathways. *J Biol Chem* [S.I.], v. 282, n. 25, p. 18379-87, Jun 22 2007.
- THORPE, C.; COPPOCK, D. L. Generating disulfides in multicellular organisms: emerging roles for a new flavoprotein family. *J Biol Chem* [S.I.], v. 282, n. 19, p. 13929-33, May 11 2007.
- THORPE, C.; HOOBER, K. L.; RAJE, S.; GLYNN, N. M.; BURNSIDE, J.; TURI, G. K.; COPPOCK, D. L. Sulfhydryl oxidases: emerging catalysts of protein disulfide bond formation in eukaryotes. *Arch Biochem Biophys* [S.I.], v. 405, n. 1, p. 1-12, Sep 1 2002.
- TOLOSA, E. M. C. D.; RODRIGUES, C. J.; BEHMER, O. A. *Manual de Técnicas Para Histología Normal e Patológica*. Segunda. ed., 2003.
- TONKIN, A. *Atherosclerosis and Heart Disease*. 1. ed., 2003.
- TORSNEY, E.; MANDAL, K.; HALLIDAY, A.; JAHANGIRI, M.; XU, Q. Characterisation of progenitor cells in human atherosclerotic vessels. *Atherosclerosis* [S.I.], v. 191, n. 2, p. 259-64, Apr 2007.
- TOUCHARD, A. G.; SCHWARTZ, R. S. Preclinical restenosis models: challenges and successes. *Toxicol Pathol* [S.I.], v. 34, n. 1, p. 11-8, 2006.
- TOUTOUZAS, K.; COLOMBO, A.; STEFANADIS, C. Inflammation and restenosis after percutaneous coronary interventions. *Eur Heart J* [S.I.], v. 25, n. 19, p. 1679-87, Oct 2004.
- TULIS, D. A. Rat Carotid Artery Balloon Injury Model. p. 1-30, 2008.
- WANG, L.; ZHENG, J.; BAI, X.; LIU, B.; LIU, C. J.; XU, Q.; ZHU, Y.; WANG, N.; KONG, W.; WANG, X. ADAMTS-7 mediates vascular smooth muscle cell migration and neointima formation in balloon-injured rat arteries. *Circ Res* [S.I.], v. 104, n. 5, p. 688-98, Mar 13 2009.

WITTKE, I.; WIEDEMEYER, R.; PILLMANN, A.; SAVELYEVA, L.; WESTERMANN, F.; SCHWAB, M. Neuroblastoma-derived sulfhydryl oxidase, a new member of the sulfhydryl oxidase/Quiescin6 family, regulates sensitization to interferon gamma-induced cell death in human neuroblastoma cells. *Cancer Res* [S.I.], v. 63, n. 22, p. 7742-52, Nov 15 2003.

ZANATA, S. M.; LUVIZON, A. C.; BATISTA, D. F.; IKEGAMI, C. M.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; CHAVES, D. F.; CARON, L. F.; PELIZZARI, J. V.; LAURINDO, F. R.; NAKAO, L. S. High levels of active quiescin Q6 sulfhydryl oxidase (QSOX) are selectively present in fetal serum. *Redox Rep* [S.I.], v. 10, n. 6, p. 319-23, 2005.

ZHU, L.; SUN, G.; ZHANG, H.; ZHANG, Y.; CHEN, X.; JIANG, X.; KRAUSS, S.; ZHANG, J.; XIANG, Y.; ZHANG, C. Y. PGC-1alpha is a key regulator of glucose-induced proliferation and migration in vascular smooth muscle cells. *PLoS One* [S.I.], v. 4, n. 1, p. e4182, 2009.

ANEXOS



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comitê de Ética em Experimentação Animal
(CEEA)



Nº 412

CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno do CEEA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEEA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".


PROCESSO: 23075.107019/2009-54

APROVADO: 10/11/2009 – R.O. 10/2009

TÍTULO: Efeito da supressão do gene QSOX-1 (quiescina/sulfidril oxidase) na reestenose pós-lesão por cateter-balão em carótidas de rato

AUTORES: Lia Sumie Nakao, Axel Helmut Rulf Cofré

DEPARTAMENTO: Patologia Básica


Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio
Coordenador do CEEA