

FERNANDO GANZAROLLI DE OLIVEIRA

**EFEITOS DO DOADOR DE ÓXIDO NÍTRICO
S-NITROSO-ACETILCISTEÍNA SOBRE A
SINALIZAÇÃO CELULAR DA ANGIOTENSINA II
EM CORAÇÃO E CARDIOMIÓCITOS DE RATOS**

CAMPINAS

2005

FERNANDO GANZAROLLI DE OLIVEIRA

**EFEITOS DO DOADOR DE ÓXIDO NÍTRICO
S-NITROSO-ACETILCISTEÍNA SOBRE A
SINALIZAÇÃO CELULAR DA ANGIOTENSINA II
EM CORAÇÃO E CARDIOMIÓCITOS DE RATOS**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas para a
obtenção do título de Doutor em Clínica Médica,
área de concentração em Clínica Médica.*

Orientador: Prof. Dr. Lício Augusto Velloso

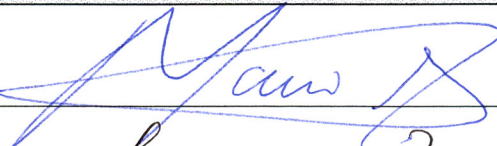
CAMPINAS

2005

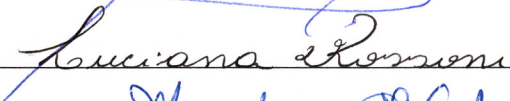
Orientador(a): Prof. Dr. Lício Augusto Velloso

Membros:

1. Prof(a). Dr(a). Márcio Alberto Torsoni



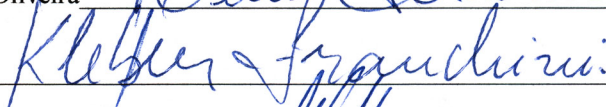
2. Prof(a). Dr(a). Luciana Venturini Rossoni



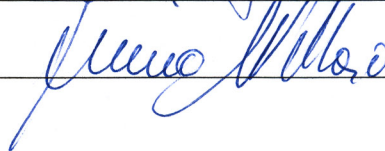
3. Prof(a). Dr(a). Helena Coutinho Franco de Oliveira



4. Prof(a). Dr(a). Kleber Gomes Franchini



5. Prof(a). Dr(a). Lício Augusto Velloso



Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 31/08/2005

DEDICATÓRIA

Para meu filho, Luigi.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Lício agradeço muitíssimo, pela extrema paciência, pela confiança, pelo otimismo, pela maneira tranqüila de me orientar, pela amizade e tanto mais.

À Vivian, que tanto se desdobrou para me ajudar neste trabalho. Sem sua participação eu simplesmente não teria conseguido.

A todo o pessoal do laboratório. Nunca antes trabalhei em ambiente de tanta colaboração mútua, troca de experiências, solidadriedade. De fato, ali, o crescimento de cada um é uma conquista de todos.

Ao Dr. Kleber, que tão gentilmente disponibilizou seu laboratório, as técnicas de cultivo de células e tantos equipamentos e reagentes, além de me ajudar a resolver dúvidas.

Ao meu irmão Marcelo pelas idéias, discussões e incentivo, e à Amedea pela ajuda com o SNAC e outras coisas.

Ao Victor e Thiago, que me deram todo o suporte para poder trabalhar, toleraram meu humor precário quando de meus insucessos e ainda me fizeram rir diante deles.

À minha esposa Carmen, que me incentivou a iniciar o caminho da pós-graduação e a me manter nele, e que sempre tanto me apoiou, ouviu minhas lamúrias e me animou a continuar em frente.

Aos meus pais, a quem devo dos primeiros passos à minha formação acadêmica.

Ao Sr. Luiz e Sr. Józimo e ao Gerson, sempre solícitos em me ajudar.

Por fim, aos inúmeros animais que sacrifiquei para realizar este trabalho.

	<i>Pág.</i>
RESUMO	<i>xxvii</i>
ABSTRACT	<i>xxxi</i>
INTRODUÇÃO	35
Via JAK-STAT na hipertrofia ventricular	40
Vias de ativação das MAPKs	43
Fator de transcrição AP-1	47
Ativação distal (<i>downstream</i>) às MAPKs	47
Controle da fosforilação das MAPKs	52
Papel do Óxido Nítrico como modulador da sinalização celular	53
S-nitrosação.....	57
Modulação via cGMP/PKG.....	60
Regulação transcricional pela via cGMP/PKG.....	60
Regulação pós-transcricional pela via cGMP/PKG.....	62
Alterações no equilíbrio redox.....	63
Papel final do NO como modulador da Angiotensina	64
OBJETIVOS	67

MATERIAIS E MÉTODOS.....	71
Anticorpos e reagentes.....	73
Animais.....	76
Metodologia.....	76
Procedimento cirúrgico e extração dos corações.....	76
Homogeneização e determinação do conteúdo total de proteínas.....	77
Imunoprecipitação e Westernblotting.....	78
Isolamento e cultivo de cardiomiócitos de ratos neonatos.....	79
Quantificação de proteínas pelo método de Lowry.....	81
Preparo da solução de SNAC.....	81
Análise estatística.....	81
RESULTADOS.....	83
Modulação da via Jak/STAT pelo SNAC.....	85
Modulação das MAPKs pelo SNAC.....	85
Fosforilação da proteína c-Jun.....	86
Expressão gênica de c-fos e c-jun.....	87
DISCUSSÃO.....	97
CONCLUSÕES.....	109
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	113
ANEXO.....	137

LISTA DE ABREVIATURAS

AngII	Angiotensina II
ANP	Peptídeo natriurético atrial
AP-1	<i>activator protein-1</i>
ATF	activating transcription factor
cGMP	GMP cíclico
csPDI	Proteína dissulfeto isomerase da superfície celular
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
Domínio SH2	domínio de homologia com Src 2
DTT	Ditiotreitol
ECA	enzima de conversão da angiotensina
ERK	extracelular signal-regulated kinase
GAS	<i>interferon gamma activation site</i>
GSNO	S-nitroso glutathiona
Hsp	heat shock protein
IB	<i>immunoblotting</i>
I.E. genes	<i>immediate early genes</i>
IP	imunoprecipitado

ISGF	<i>interferon-stimulating gene factor</i>
ISRE	<i>interferon alpha–stimulating response element</i>
JAK	Janus kinase
JNK	<i>c-jun N-terminal Kinase</i>
KDa	quilodaltons
LAT	Transportador de L-aminoácidos
L-NAME	N ^G -nitro-L-arginina metil éster
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MEKK	MAPK/ERK kinase kinase
MKP	MAPK fosfatase
NAD(P)H	nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida fosfato
NO	óxido nítrico
NOS	NO sintase
PKC	proteína quinase C
PKG	proteína quinase c-GMP-dependente
PBS	tampão fosfato com solução salina
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sódio
Ser	serina
sGC	Guanilato ciclase solúvel

SH2	<i>src homology 2</i>
SIE	<i>sis-inducing element</i>
SIF	<i>sis-inducing factor</i>
SNAC	S-nitroso acetilcisteína
SNAP	S-nitroso acetilpenicilamina
SNO	nitrosotiol
SOCS	<i>supressor of cytokine signalling</i>
SRE	<i>Serum Response Element</i>
STAT	<i>signal transducers and activator of transcription</i>
TCF	<i>Ternary Complex Factor</i>
Thr	treonina
TPA	tetradecanoylphorbol acetate
TRE	TPA responsive element
Tyr	tirosina

LISTA DE TABELAS

	<i>Pág.</i>
Tabela 1 - Algumas ações mediadas por S-nitrosação envolvendo alteração de afinidade dos elementos AP1 com o sítio de ligação ao DNA.....	59

LISTA DE FIGURAS

	<i>Pág.</i>
Figura 1 - ativação diferencial de ERK e JNK a partir de Rãs.....	44
Figuras 2a e 2b - Regulação da transcrição de c-fos e c-jun em resposta a estímulos extracelulares.....	50
Figura 3 - Algumas modulações na via das MAPKs mediadas por PKG	61
Figura 4 - <i>Western blot</i> de amostras de tecido ventricular de ratos (a) e cultura de cardiomiócitos de ratos neonatos (b) submetidos a imunoprecipitação com anticorpo anti- JAK2 e <i>immunoblotting</i> com anticorpo anti-fosfo-tirosina em condições controle, estímulo com AngII e pré-tratamento com SNAC.....	88
Figura 5 <i>Western blot</i> de amostras de tecido ventricular de ratos (a) e cultura de cardiomiócitos de ratos neonatos (b) submetidos a imunoprecipitação com anticorpo anti- STAT1 e <i>immunoblotting</i> com anticorpo anti-fosfo-STAT1 em condições controle, estímulo com AngII e pré-tratamento com SNAC.....	89
Figura 6 - <i>Western blot</i> de amostras de tecido ventricular de ratos (a) e cultura de cardiomiócitos de ratos neonatos (b) submetidos a imunoprecipitação com anticorpo anti- STAT3 e <i>immunoblotting</i> com anticorpo anti-fosfo-STAT3 em condições controle, estímulo com AngII e pré-tratamento com SNAC.....	90
Figura 7 - <i>Western blot</i> de amostras de tecido ventricular de ratos (a) e cultura de cardiomiócitos de ratos neonatos (b) submetidos a <i>immunoblotting</i> com anticorpo anti-fosfo-ERK1/2 em condições controle, estímulo com AngII e pré-tratamento com SNAC.....	91

Figura 8 -	<i>Western blot</i> de amostras de tecido ventricular de ratos (a) e cultura de cardiomiócitos de ratos neonatos (b) submetidos a <i>immunoblotting</i> com anticorpo anti-fosfo-JNK1/2/3 em condições controle, estímulo com AngII e pré-tratamento com SNAC.....	92
Figura 9 -	<i>Western blot</i> de amostras de tecido ventricular de ratos (a) e cultura de cardiomiócitos de ratos neonatos (b) submetidos a <i>immunoblotting</i> com anticorpo anti-fosfo-p38MAPK em condições controle, estímulo com AngII e pré-tratamento com SNAC.....	93
Figura 10 -	<i>Western blot</i> de amostras de tecido ventricular de ratos (a) e cultura de cardiomiócitos de ratos neonatos (b) submetidos a <i>immunoblotting</i> com anticorpo anti-fosfo-c-Jun em condições controle, estímulo com AngII e pré-tratamento com SNAC.....	94
Figura 11 -	<i>Western blot</i> de amostras de tecido ventricular de ratos (a) e cultura de cardiomiócitos de ratos neonatos (b) submetidos a <i>immunoblotting</i> com anticorpo anti-c-Fos em condições controle, estímulo com AngII e pré-tratamento com SNAC...	95
Figura 12 -	<i>Western blot</i> de amostras de tecido ventricular de ratos (a) e cultura de cardiomiócitos de ratos neonatos (b) submetidos a <i>immunoblotting</i> com anticorpo anti-c-Jun em condições controle, estímulo com AngII e pré-tratamento com SNAC...	96
Figura 13 -	Transporte trans-membrana celular de SNOs mediado pela csPDI.....	101
Figura 14 -	Modelo de captação de SNO mediado por L-cistina, com utilização do sistema LAT.....	102

RESUMO

Angiotensina II (AngII) desempenha um papel importante na gênese da hipertrofia miocárdica. Grande parte do estímulo hipertrófico determinado pela AngII depende da ativação de sinalização intracelular envolvendo membros das famílias de transdutores de sinais *mitogen-activated-protein kinase* (MAPK) e *Janus Kinase* (JAK)/ *signal transducer and activator of transcription* (STAT). Agentes farmacológicos doadores de óxido nítrico (NO) estão sendo objeto de intensa pesquisa, atualmente, pelo seu potencial terapêutico em condições clínicas envolvidas na hipertrofia miocárdica. No presente trabalho, avaliamos a propriedade do S-nitroso-acetilcisteína (SNAC) de modular a transdução de sinal da AngII mediada por membros da família das MAPK e JAK/STAT em coração e cardiomiócitos isolados de ratos. SNAC foi capaz de reverter significativamente a ativação promovida pela AngII na via de sinalização JAK2/STAT1 e 3 em coração e cardiomiócitos. Além disso, SNAC reverteu a ativação por AngII em *cJun-N-terminal Kinase* (JNK)1/2/3. Entretanto, SNAC acentuou o efeito da AngII em Extracellular Regulated Kinase (ERK) 1 e 2. Finalmente, nem AngII nem SNAC exerceram qualquer efeito sobre p38MAPK. Como resultado, houve menor expressão dos *immediate early* genes c-jun e c-fos, bem como menor ativação por fosforilação da proteína c-Jun. Em resumo, o pré-tratamento de ratos e cardiomiócitos isolados com um potente doador de NO afeta a transdução do sinal da AngII resultando na modulação via-específica da expressão de genes precocemente induzidos. Tais resultados oferecem evidências para o efeito direto de um doador de NO sobre a transdução de sinal da AngII e proporcionam bases moleculares para as propriedades anti-hipertróficas desta classe de drogas.

ABSTRACT

Angiotensin II (AngII) plays an important role in the genesis of cardiac hypertrophy. Much of the growth stimulus delivered by AngII depends on the activation of intracellular signaling through members of the mitogen-activated-protein kinase (MAPK) and Janus kinase (JAK)/ *signal transducer and activator of transcription* (STAT) family of signal transducers. Pharmacological agents that act as donors of nitric oxide (NO) are currently under intensive investigation for their beneficial role in clinical conditions that produce cardiac hypertrophy. Here, we evaluated the property of S-nitroso-N-acetyl cysteine (SNAC) to modulate AngII signal transduction through members of the MAPK family and through JAK2/STAT-1 and -3 in heart and isolated cardiomyocytes of rats. SNAC significantly reversed AngII activation of the JAK2/STAT-1 and -3 signaling in heart and cardiomyocytes. In addition SNAC reversed AngII activation of JNK1/2/3. However, SNAC enhanced the effect of AngII on ERK. Finally neither SNAC nor AngII exerted an effect on p-38. As a consequence, there was an abrogation in the enhanced expression of the immediately early genes c-jun and c-fos, as well the phosphorylation of c-Jun. In summary, the treatment of living rats and isolated cardiomyocytes with a potent NO donor affects AngII signal transduction on a pathway specific manner resulting on the modulation of early inducible gene expression. These results provide evidence for a direct effect of a NO donor upon AngII signal transduction, and grant a molecular basis for the anti-hypertrophic properties of this class of drugs.

INTRODUÇÃO

Hipertrofia miocárdica é um processo fundamental de ajuste a sobrecargas hemodinâmicas de pressão ou volume. Embora tal fenômeno seja inicialmente benéfico, uma vez que aumenta o número de unidades contráteis e diminui o estresse da parede ventricular (de acordo com a lei de Laplace), por diversas razões o processo patológico de hipertrofia miocárdica encontra-se relacionado à ocorrência de disfunção diastólica e aumento expressivo de mortalidade, relacionada à isquemia miocárdica e arritmias (KOREN *et al.*, 1991). Durante o desenvolvimento da hipertrofia ventricular, vários eventos específicos são observados nas fibras musculares cardíacas, tais como rápida indução de proto-oncogenes e Hsp genes (“immediate-early” – I.E. genes); alterações quantitativas e qualitativas na expressão gênica e aumento da síntese protéica (RUWHOF e LAARSE, 2000).

A primeira resposta à sobrecarga hemodinâmica é a indução de genes iniciais imediatos (*Immediate early genes*, também referidos como proto-oncogenes), em particular *c-fos*, *c-jun*, e *c-myc*, bem como Hsp genes, como a Hsp70. Estas alterações foram descritas em tecido cardíaco de ratos (KOMURO *et al.*, 1988; IZUMO *et al.*, 1988). Como evento mais tardio, a expressão de diversos genes que codificam as proteínas sarcoméricas sofre alterações para expressar isoformas fetais destas proteínas, como a transição da α -actina para a α -actina esquelética e da miosina de cadeia pesada tipo α para a tipo β (PARKER e SCHNEIDER, 1990; NADAL-GINARD e MAHDAVI, 1989).

O estímulo para induzir hipertrofia cardíaca pode se originar diretamente do estresse mecânico sobre a parede ventricular ou por elevação de fatores neurais ou humorais. Diversos mecanossensores parecem estar implicados como transdutores no processo de hipertrofia miocárdica, tais como as integrinas, o citoesqueleto, fosfolipases e proteína-quinases de membrana, canais iônicos ativados por estiramento e proteínas G (RUWHOF e LAARSE, 2000).

Fatores de crescimento celular e hormônios podem estar envolvidos na hipertrofia ventricular induzida por sobrecarga hemodinâmica. A expressão ou liberação destes fatores têm sido descritas em corações hipertrofiados por sobrecarga hemodinâmica e em células cardíacas hipertrofiadas por estiramento mecânico. Tais fatores incluem a endotelina-1, fator transformador de crescimento- β (TGF- β), fator de crescimento

semelhante à insulina-1 (IGF-1), miotrofina, fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e, de particular importância, angiotensina II (AngII) (SERNERI *et al.*, 1999; SADOSHIMA. *et al.*, 1993; MIYATA *et al.*, 1996). Assim, fibras musculares cardíacas e outros tipos celulares, como fibroblastos cardíacos, células endoteliais e musculares lisas vasculares, podem secretar fatores promotores de crescimento após estímulo mecânico de estiramento, os quais induzem hipertrofia das células musculares cardíacas em um mecanismo autócrino/parácrino (RUWHOF e LAARSE, 2000).

Há dois subtipos principais de receptores de AngII: AT1 e AT2. O uso de bloqueadores específicos para cada um dos subtipos de receptores de AngII demonstra que os efeitos hemodinâmicos e de crescimento celular da AngII são mediados quase exclusivamente pela sub-população AT1 (TIMMERMANS, 1993).

Recentemente, tem-se descrito um novo mecanismo de atuação da AngII na indução de hipertrofia cardíaca, o intrácrino, no qual a mesma agiria intracelularmente, independente de sua ligação ao receptor de membrana (RE, 2003). Assim, BACKER *et al.*(2004) conseguiram induzir hipertrofia em cultura de cardiomiócitos, bem como em camundongos adultos, através da inoculação de vetores adenoviral e plasmídico, respectivamente, construídos para expressar AngII intracelularmente. Tal efeito não foi abolido com o pré-tratamento com o bloqueador AT1 losartan e não foi acompanhado de aumento do nível plasmático de AngII, nem de elevação presssórica.

Também recentemente, foi descrito que o próprio receptor AT1 da AngII pode ser ativado por estiramento, atuando assim como mecanossensor, independente da sua ativação extracelular por AngII (ZOU *et al.*, 2004).

A transdução do estímulo de distensão deve seguir três principais vias de sinalização intracelular envolvidas na resposta hipertrófica induzida pelo estresse mecânico: 1. a via das *mitogen-activated protein kinases* (MAPK); 2. a via das *Janus-associated kinases / signal transducers and activators of transcription* (JAK/STAT); 3. a via da calcineurina fosfatase Cálcio/calmodulina dependente (RUWHOF e LAARSE, 2000). Estas três vias controlam a transcrição gênica e podem estar

envolvidas na modulação da expressão gênica induzida pelo estiramento. Mais recentemente, uma quarta via foi descrita, envolvendo a quinase de adesão focal (Fak) (FRANCHINI *et al.*, 2000; TORSONI *et al.*, 2003; NADRUZ *et al.*, 2005).

Há evidências da existência de um sistema renina-angiotensina local, gerando AngII diretamente no tecido cardíaco (DOSTAL *et al.*, 1992; DANSER *et al.*, 1999). A AngII produzida localmente mostrou-se capaz de induzir hipertrofia em fibras musculares cardíacas (COOK *et al.*, 1995) e hiperplasia em fibroblastos cardíacos (SADOSHIMA e IZUMO, 1993 [a]). Estiramento mecânico das fibras musculares cardíacas induz expressão local de angiotensinogênio e liberação de AngII de grânulos secretórios (SADOSHIMA *et al.*, 1993; MIYATA *et al.*, 1996). Após o estiramento das fibras musculares cardíacas, o aumento de *c-fos*, *Egr-1*, α -actina esquelética, peptídeo atrial natriurético e na síntese protéica é suprimido com o uso de bloqueadores dos receptores AT₁ da AngII (SADOSHIMA *et al.*, 1993; KOJIMA *et al.*, 1994; MIYATA *et al.*, 1996; van WAMEL *et al.*, 2001). Entretanto, foi possível induzir hipertrofia miocárdica em cardiomiócitos de camundongos, bem como nos animais adultos, knockouts para o receptor AT1a, por stress mecânico e sobrecarga hemodinâmica/ infusão de AngII (KUDOH, 1998; HARADA, 1998), demonstrando-se assim que a AngII, embora desempenhando um papel central na indução de hipertrofia miocárdica, não representa um mediador exclusivo desta.

Embora a meia-vida de eliminação da AngII seja extremamente reduzida, da ordem de poucos segundos, uma vez ligando-se ao receptor AT1 (ainda que transitoriamente), ela induz a expressão de vários fatores de transcrição indutíveis, como aqueles da família AP-1, em particular o *c-fos* e *c-jun*, em vários tecidos. Desta forma, a ativação transitória do receptor AT-1 pode resultar em alterações prolongadas na expressão gênica. (BLUME *et al.*, 1999).

O estímulo dos receptores AT₁ da membrana celular das fibras musculares cardíacas pela AngII induz a ativação de diferentes vias de sinalização intracelular. A mais estudada dentre estas é a das MAPKs. *Extracellular signal-regulated kinase* (ERK), *c-Jun NH₂-terminal kinase* (JNK), e *p38 mitogen-activated protein* (MAP) kinase são proteínas serina/treonina quinases pertencentes à superfamília das MAPKs

(NISHIDA e GOTOH, 1993; DAVIS, 1994; KYRIAKIS e AVRUCH, 1996). Estas três MAP quinases têm sido descritas como desempenhando um papel central não apenas na ativação de vários fatores de transcrição, como os da família *activator protein-1* (AP-1), na regulação da expressão de vários genes, e ainda na resposta hipertrófica em fibras musculares *in vitro* (SADOSHIMA e IZUMO, 1993(b); FORCE, 1996; GLENNON, 1996; SUGDEN e CLERK, 1998). Apesar dos estudos sobre a regulação e o papel das MAPKs em células cardíacas de cultura, o papel exato das vias que envolvem as MAPKs na hipertrofia ventricular *in vivo* ainda são mal compreendidos (IZUMI, Y. *et al.*, 2000). Menos estudada é a transmissão intracelular do sinal da AngII pela via JAK/STAT.

Via JAK-STAT na hipertrofia ventricular

As JAKs foram primariamente identificadas como proteínas com atividade tirosina-quinase associadas com a transdução do sinal oriundo de receptores de citocinas. Constituem-se numa família com quatro membros: JAK1, JAK2, JAK3 e Tyk2, com peso molecular entre 120 e 130 kDa (IHLE, 1995). STATs são fatores de transcrição citoplasmáticos que se tornam ativados por fosforilação em resíduos de tirosina. Seu nome origina-se de sua função dual na transdução de sinal citoplasmático e na ativação de transcrição gênica. Sete isoformas de STAT já foram identificadas: STAT1, 2, 3, 4, 5a, 5b e 6 (SCHINDLER e DARNELL, 1995).

Receptores AT1 apresentam características estruturais da superfamília dos receptores transmembrana de sete alças acoplados a proteínas G, diferente, portanto, dos receptores de citocinas ou de fatores de crescimento. Apesar disto, o receptor AT1 pode ativar a via de sinalização JAK-STAT. (ALI *et al.*, 2000).

Em resposta à ligação da AngII ao receptor AT1, JAK2 sofre autofosforilação em seus resíduos de tirosina e estabelece ligação de alta afinidade com o receptor AT1, interação dependente da presença da sequência consensual YIPP do receptor AT1 (ALI *et al.*, 1997). A JAK2 de ratos possui 49 resíduos de tirosina (HARPUR, 1992), sendo 15 deles autofosforiláveis *in vivo* (FENG *et al.*, 1997). Além disso, a JAK2 apresenta a sequência YDKPH, capaz de se ligar ao domínio SH2 da STAT1

(STAH, 1995; SMIT *et al.*, 1996). ALI *et al* (2000) demonstraram que a associação de STAT 1 ao receptor AT1 é criticamente dependente da JAK2. Uma vez autofosforilada, a fosfotirosina da JAK2 liga-se ao domínio SH2 da STAT1, recrutando assim esta última para o complexo receptor-JAK2. Fosforiladas em seus resíduos de tirosina pela JAK2, as STATS constituem dímeros que sofrem translocação para o núcleo, onde se ligam ao DNA, induzindo transcrição gênica.

Embora polêmica, várias linhas de evidência têm relacionado a ativação da via JAK / STAT com a expressão de c-fos. A região promotora de c-fos, localizada distalmente ao SRE, denominada SIE (c-sis-inducible element), é uma região alvo para proteínas STAT (ZHONG *et al.*, 1994). Em células HepG2, o estímulo com citocinas levou à ligação das STAT1 e STAT3 ao sítio de ligação SIE do DNA (YANG *et al.*, 2003).

Complexos ISGF são heterodímeros de STAT 1 e STAT 2 que ativam elementos GAS/ISRE (BLUYSEN *et al*, 1996), e complexos SIF são homodímeros ou heterodímeros de STAT1 e STAT 3 que ativam elementos SIE no promotor gênico para induzir expressão (BHAT *et al*, 1995).

PAN *et al.*(1997) demonstraram que em coração de ratos Wistar a sobrecarga de pressão obtida pela constrição da aorta abdominal ativava precocemente (5 minutos) as JAK 1 e 2 e a Tyk2, e que também rapidamente ocorria fosforilação das STATS 1 e 2 em tirosina (pico em 5 a 15 minutos, e a STAT 3 mais tardiamente, em 60 minutos). Complexos DNA- proteína com GAS/ISRE ocorrem após 5 minutos da ligação aórtica, permanecendo elevados até 60 minutos, diminuindo apenas após duas horas. O curso temporal de ativação do complexo SIF foi claramente alargado, em comparação com aquele obtido para o complexo ISGF. Neste estudo, a incubação do complexo DNA-proteína com anticorpos anti- STAT1 inibiu a formação de complexos SIF e a incubação com anti-STAT3 também inibiu a ligação dos complexos SIF. Tais resultados demonstram que os complexos SIF ativados por sobrecarga de pressão contém STAT 1 e 3; o curso temporal de ativação de GAS/ISRE e SIE corresponde ao curso temporal de fosforilação das STAT 1, 2 e 3. Tanto o inibidor da ECA cilazapril quanto o bloqueador AT1 E4177 suprimem a fosforilação em tirosina da Tyk2, e inibem parcialmente a fosforilação em tirosina da JAK2, mas não da JAK1. A coimunoprecipitação do receptor AT1 com JAK2 e Tyk2 aumenta de forma marcante 15 minutos após a bandagem aórtica.

Utilizando estímulo com fator de crescimento epidérmico em várias culturas de células mutantes, defectivas para JAK1, JAK2 e Tyk2, LEAMAN *et al* (1996) puderam demonstrar que a fosforilação de STAT1 e STAT3 ocorre independente das JAKs, e que a mesma conduz a aumento da expressão de c-fos. Os mesmos autores, em experimentos de transfecção de células HeLa utilizando promotores de c-fos defectivos no elemento SIE, sítio de regulação das STATs, demonstram que o mesmo desempenha um papel minoritário na ativação deste gene, no modelo estudado.

Inúmeras relações do tipo *cross-talk* tem sido descritas entre os sistemas JAK/STAT e as MAPKs (BHAT *et al.*, 1995; WINSTON e HUNTER, 1995; BERNSTEIN e MARRERO, 1996; MARRERO *et al.*, 1997; KODAMA *et al.*, 2000; YANG *et al.*, 2003). Já se havia descrito que citocinas relacionadas à interleucina-6, tal como a LIF (Leukemia Inhibitory Factor) utilizam a proteína gp130 como transdutora de sinalização, e que a mesma ativa, simultaneamente, as vias JAK/STAT e Ras/ MAPKs em cardiomiócitos de rato (KUNISADA *et al.*, 1997). Muito recentemente, utilizando camundongos com restrição da expressão do fator nuclear Kappa-b (NF-Kappa-B), FREUND *et al.* (2005) demonstraram redução na hipertrofia miocárdica induzida pela infusão de AngII nestes animais, evidenciando assim um papel importante do NF-Kappa-B na sinalização da AngII em miocárdio. Em cultura de cardiomiócitos, demonstraram que a atividade de ligação ao DNA de NF-Kappa-B era ativada tanto por estímulo da AngII como por citocinas relacionadas à interleucina-6. A última, sabidamente é liberada pelos fibroblastos cardíacos em resposta à AngII, e desta forma podem participar de um efeito local parácrino na indução de hipertrofia ventricular. Por fim, resultados de experimentos *in vitro* e *in vivo* realizados pelos mesmos autores sugerem um papel para NF-Kappa-B na regulação do receptor gp130.

Analisando a sinalização de citocinas pela via JAK/STAT, estudou-se o mecanismo de desligamento do sinal (*switch off*). A regulação negativa desta via envolve a transcrição, induzida pelos dímeros de STAT ativados, de proteínas da classe SOCS. Uma vez sintetizadas, as SOCS podem ligar-se diretamente à JAK e inibir sua atividade catalítica (CALEGARI *et al.*, 2003; STARR e HILTON, 1999).

Vias de ativação das MAPKs

As MAPK são normalmente ativadas a partir de proteínas Ras, pertencentes à superfamília das GTPases monoméricas (também conhecidas por pequenas proteínas de ligação à GTP). São proteínas de ligação ao nucleotídeo guanosina que funcionam de forma análoga às subunidades α de proteínas G, alternando entre as formas inativa ligada à GDP e ativa ligada à GTP. As proteínas Ras possuem um grupamento lipídico ligado covalentemente, que auxilia no ancoramento da proteína à face citoplasmática da membrana celular, onde ela atua (LOWY & WILLUMSEN, 1993).

Uma característica pouco comum das MAPK é a necessidade de fosforilação de uma treonina e de uma tirosina, separadas por um único aminoácido, para que sua ativação seja completa. A proteína que catalisa essas fosforilações é denominada MAP-quinase-quinase, sendo conhecida como MEK. A própria MAP-quinase-quinase, por sua vez, é ativada por fosforilação catalizada pela primeira quinase do módulo de três componentes, MAP-quinase-quinase-quinase, que na via de sinalização envolvendo Ras em mamíferos é denominada Raf. A Raf quinase é ativada pela Ras ativa (WIDMANN *et al.*, 1999). Em cultura de cardiomiócitos de ratos neonatos, SUMIYO *et al.* (1997) demonstraram que a AngII ativa a JNK (isoformas 46 kDa e 55 kDa). O curso temporal mostrou início em 5 minutos, pico entre 20 e 30 minutos, retorno à condição basal em 120 minutos, num padrão dose-dependente, com máxima ativação observada a 10^{-6} mol/L de AngII. Tal ativação foi completamente inibida pelo bloqueio dos receptores AT1 e mostrou-se criticamente dependente de cálcio e proteína quinase C (PKC). Os autores demonstraram, ainda, que, ao contrário de muitos ligantes que estimulam JNK ou ERK, a AngII estimula simultaneamente as vias JNK e ERK_{1/2} em cardiomiócitos de ratos. YAMAZAKI *et al.* (1995) observaram que o estresse mecânico e a AngII ativam cascatas de proteínas quinases, incluindo MEKK em cardiomiócitos. Foi também demonstrado (SANCHEZ *et al.*, 1994) que a MEKK ativa a JNK (também conhecida como *Stress Activated Protein Kinase* – SAPK) via SAPK/ERK quinase-1. Várias evidências sugerem que Ras desempenha um papel crítico na proliferação e diferenciação celular, por ativação da cascata Raf-1/ ERK, em várias células, inclusive cardiomiócitos (TAKAYA *et al.*, 1992 ; THORBURN *et al.*, 1993). Duas pequenas

proteínas de ligação à GTP da família Rho, denominadas Rac1 e Cdc42, foram descritas como regulatórias da atividade da JNK (COSO *et al.*, 1995; MINDEN *et al.*, 1995). Assim, AngII parece ativar as cascatas Raf-1/ERKs e MEKK/JNKs através de diferentes pequenas proteínas de ligação à GTP. (Fig. 1).

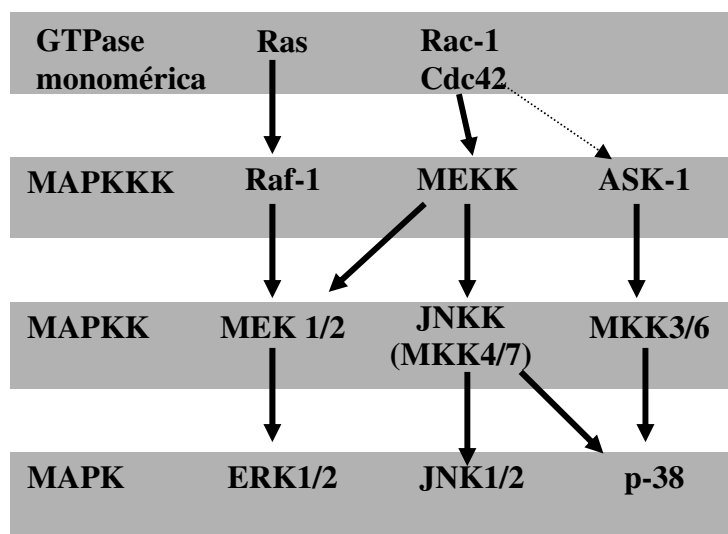


Figura 1 - ativação diferencial de ERK e JNK a partir de Ras (KARIN,1995 ; ROBINSON, 1997).

TAKAHASHI *et al.*(1997), utilizando cultura de células musculares lisas vasculares, observaram ativação das MAPKs mesmo quando havia bloqueio farmacológico da ativação da Ras, e mesmo em células mutantes negativas dominantes para Ha-Ras, evidenciando, desta forma, que a ativação das MAPKs por AngII pode ser efetivada por outras vias, Ras independentes.

As atividades da ERK e JNK cardíacas foram comparadas em ratos SHRSP (*stroke-prone spontaneously hypertensive rats*). Da fase pré-hipertensiva até a fase de hipertrofia miocárdica estabelecida houve aumento significativo da atividade da JNK, comparada com ratos normotensos Wistar-Kyoto (WKY), enquanto a atividade da ERK apresentou aumento discreto (IZUMI *et al.*, 1998). No mesmo trabalho, a administração de inibidor da ECA levou à diminuição da atividade da JNK, mas não da ERK.

Posteriormente, as três MAPKs foram comparadas em ratos SHRSP, em relação a ratos WKY pareados (IZUMI *et al.*, 2000). Novamente, demonstrou-se ativação relevante da JNK no miocárdio destes animais, tanto na fase aguda (6 semanas) como crônica (20 semanas) de desenvolvimento da hipertrofia miocárdica, efeito anulado pela administração de losartan (bloqueador AT1), mas não por hidralazina. O mesmo não se verificou com ERK (apenas discreto aumento de atividade, não bloqueado por losartan, e exacerbado pela hidralazina, por provável ativação adrenérgica reflexa). Com relação à p38, avaliações por Northern blot e Western blot não evidenciaram alteração significativa em seus níveis de RNAm, forma ativa (fosforilada) ou inativa em ventrículo esquerdo, quer na fase aguda ou crônica de indução de hipertrofia. Assim, tomadas em conjunto com observações *in vivo* de que a transferência de um gene mutante inibidor dominante de SEK-1 (ativador imediato da JNK) inibiu a hipertrofia induzida por sobrecarga de pressão em ratos (CHOUKROUN *et al.*, 1999), as evidências apontam para um papel proeminente da JNK no desenvolvimento da hipertrofia miocárdica, ao contrário das outras MAPK. Outro trabalho investigou as diferenças de ativação entre JNK e ERK em ratos Sprague-Dawley submetidos à infusão aguda e crônica de AngII (YANO *et al.*, 1998). Não se observou ativação de JNK, nem de ERK com dose subpressora de AngII (1 ng/Kg/min), ou levemente pressora (10 ng/Kg/min). Já a dose de 100 ng/Kg/min (levando a aproximadamente 40 mmHg de aumento pressórico) aumentou a p46JNK e a p55JNK em 5,2 e 4,5 vezes, respectivamente, no miocárdio do ventrículo esquerdo, enquanto não houve aumento na p42ERK ou p44ERK. Ambas, JNK e ERK foram aumentadas com infusão de AngII na dose de 1000 ng/Kg/min, efeito completamente bloqueado pelo pré-tratamento com um bloqueador AT1. Já na infusão crônica de AngII, a hipertrofia miocárdica foi precedida por ativação significativa da JNK, sem ativação da ERK. Entretanto, apesar de não ativada, ou pouco ativada pela AngII, a ERK apresenta elevada ativação basal *in vivo*. O mesmo estudo evidenciou, ainda, ativação da JNK (mas não da ERK), induzida pela AngII em miocárdio do ventrículo direito. Assim, sugere-se que no processo de hipertrofia miocárdica, a ativação da JNK seja induzida preferencialmente pela AngII, enquanto a ativação da ERK deva depender da sobrecarga hemodinâmica e ativação adrenérgica.

Com relação à p38 MAPK, esta tem como ativadores imediatos as MKK3 e MKK6 (ROBINSON, 1997), além da própria JNKK1, mas não a JNKK2 (WU *et al*, 1997). Foi demonstrado que a sua ativação em cardiomiócitos de ratos transfectados com MKK6 aumenta o tamanho celular, a produção de α -actina esquelética e do peptídeo natriurético atrial, dando suporte a um papel importante da mesma na hipertrofia celular miocárdica (ZECHNER *et al.*, 1997). Utilizando SB-239063AN, um inibidor da p38MAPK, foi possível reduzir a hipertrofia miocárdica induzida pela administração crônica de L-NAME em ratos espontaneamente hipertensos (OLZINSKI *et al.*, 2005).

A p38 MAPK parece estar envolvida na hipertrofia ventricular induzida por stress mecânico (WANG *et al.*, 1998a), sendo sua ativação por AngII mais polêmica. Entretanto, recentemente foi descrita uma nova MAPKKK, a ASK1 (Apoptosis signal-regulating kinase 1), capaz de ativar JNK e p38, levando à hipertrofia miocárdica. A ASK1 foi diretamente ativada por AngII através do receptor AT1, sinalização esta dependente de radicais superóxido (IZUMIYA *et al*, 2003). Também recentemente, TANAKA *et al.* (2005), utilizando uma molécula denominada ATRAP (AngII type 1 receptor-associated protein), que leva à diminuição dos receptores AT1 na superfície celular, conseguiram, através do aumento de sua expressão em cardiomiócitos, bloquear a fosforilação de p-38, bem como a transcrição de c-fos induzida por AngII, evidenciando assim a ativação de p38 pela AngII, mediada por AT1.

Utilizando ratos SHHF (Spontaneously hypertensive heart failure), um modelo animal de hipertensão que mimetiza as respostas humanas de remodelamento ventricular frente à hipertensão arterial (hipertrofia seguida de disfunção sistólica), KACIMI e GERDES (2003) investigaram alterações nas cascatas de sinalização envolvendo as MAPKs. Neste modelo genético, demonstrou-se aumento da expressão de receptores AT1 na fase de indução de hipertrofia ventricular, com retorno à condição basal na fase de dilatação ventricular. Em paralelo, houve aumento de atividade em duas pequenas proteínas de ligação à GTP, Rac-1 e Rho, bem como das MAPKs: ERK1/2, ERK5, JNKs e p38.

Fator de transcrição AP-1

Fatores de transcrição AP-1 são compostos por proteínas da família Fos (c-Fos, FosB, Fra1 e Fra2) e família Jun (c-Jun, JunD e JunB). Elementos Jun podem formar homodímeros ou heterodímeros com qualquer membro da família Fos, bem como com diferentes membros da família ATF de fatores de transcrição, enquanto membros da família c-Fos requerem interação com elementos da família Jun para exercer atividade transcripcional. Os complexos resultantes podem ligar em seqüências de DNA específicas, conhecidas como *tetradecanoyl phorbol acetate* (TPA)-*responsive elements* (TRE) ou sítios AP-1 (MARINISSEN *et al.*, 1999). AP1 regula a expressão de vários genes, por intermédio da ligação às seqüências consensuais de AP1 presentes em suas regiões promotoras (KARIN, 1995). Genes codificantes de proteínas fetais, marcadoras de hipertrofia miocárdica, tais como α -actina esquelética e peptídeo natriurético atrial, possuem uma seqüência AP1 responsiva em sua região promotora (YANO *et al.*, 1998), bem como a β -miosina de cadeia pesada e peptídeo natriurético cerebral (PIKKARAINEN *et al.*, 2003). De particular interesse é a alça de regulação positiva representada pela presença de sítios de elevada afinidade para AP-1 nas regiões promotoras de c-jun (ANGEL *et al.*, 1988) e c-fos (SHENG *et al.*, 1988). Assim, c-Jun e c-Fos, através de associação heterodimérica no complexo AP-1, reforçam suas próprias transcrições, resultando em resposta transcripcional prolongada.

Ativação distal (*downstream*) às MAPKs

As ERKs foram descritas como capazes de fosforilar o fator de transcrição Elk-1 (GILLE *et al.*, 1992) que, assim ativado, liga-se ao elemento sérico de resposta (SRE) em um complexo com o fator sérico de resposta (SRF) dimerizado. O SRE é uma seqüência regulatória que controla a expressão de IE genes, e a ativação da mesma pelo complexo Elk-1/SRF foi descrita como controlando a expressão de c-fos (GILLE *et al.*, 1992; MARAIS *et al.*, 1993; BUCHWALTER *et al.*, 2004). A ativação da ERK conduz a elevada atividade AP-1 via indução de c-fos. Disto resulta aumento da síntese de c-Fos, que após translocação para o núcleo dimeriza-se com o c-Jun

pré-existente, formando complexos AP-1, que são mais estáveis que aqueles formados por homodímeros c-Jun. (KARIN, 1995). Este aumento de estabilidade resulta em maior ligação de AP-1 ao DNA, requerente de dimerização estável.

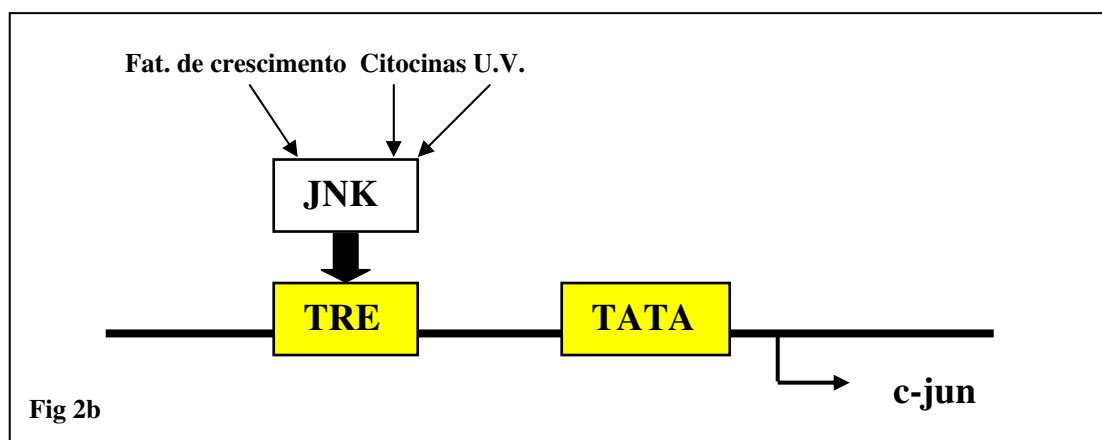
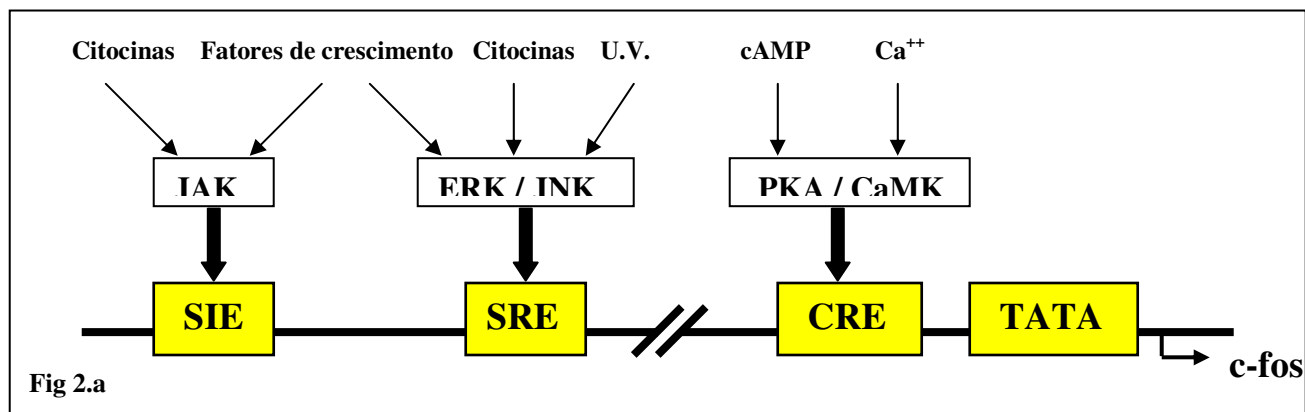
A JNK regula a ativação de AP-1 em dois níveis distintos: aumentando a expressão de c-jun e c-fos e ativando c-Jun por fosforilação de sítios específicos. Foi descrito que não só a ERK, mas também as JNK1 e JNK2 são capazes de fosforilar e ativar o fator complexo ternário/Elk-1, sugerindo seu possível envolvimento na indução de c-fos em determinadas circunstâncias (DENG e KARIN, 1994; CAVIGELLI *et al*, 1995). Os indutores de c-jun atuam por ligação ao sítio c-jun TRE, que difere da sequência TRE consensual pela inserção de um par de bases, e por esta sutil modificação passa a ser mais eficientemente reconhecido por heterodímeros c-Jun/ATF2 do que por complexos AP-1. (KARIN, 1995). ATF2 é uma proteína constitutivamente expressa, bem como c-Jun, em menor proporção. Após ativação das JNKs, tanto c-Jun como ATF2 são rapidamente fosforilados, e desta forma ativam a transcrição de c-jun.(KARIN, 1995).

As atividades de c-Jun, c-Fos e ATF2, tanto pré-existentes como sintetizados após indução, sofrem controle pós-tradução mediante fosforilação. No caso de c-Jun, a fosforilação de um conjunto de sítios localizados próximos à sua região básica inibe a ligação ao DNA de homodímeros c-Jun, mas não de heterodímeros c-Jun/c-Fos (BOYLE *et al*, 1991). Já a fosforilação da c-Jun em Ser-73 e Ser-63, localizadas na extremidade N-terminal, domínio de transativação, potencializa sua atividade transcripcional tanto na forma homodimérica como heterodimérica com c-Fos, e esses domínios são especificamente fosforilados pelas JNKs. As ERKs 1 e 2, ao contrário, apenas podem fosforilar o sítio inibitório, localizado próximo ao domínio de ligação ao DNA, na extremidade C-terminal (KARIN, 1995). Utilizando o modelo de bandagem aórtica em ratos, NADRUZ *et al*,(2004), demonstraram que a mesma era seguida de rápida e transitória (pico em 10 minutos) fosforilação da JNK1 e JNK2, com simultânea translocação apenas da JNK1 fosforilada do citosol para o núcleo dos cardiomiócitos. Ocorreu aumento marcante da expressão de c-Jun no citosol em 10 minutos, e no núcleo entre 10 e 30 minutos após a constrição aórtica. Também em 10 minutos ocorreu aumento de c-Jun fosforilado em Ser-63 na fração nuclear, mas não na fração citosólica.

Simultaneamente ao aumento de c-Jun fosforilado no núcleo, pôde-se verificar aumento da ligação ao sítio de consenso AP1 do DNA, efeito bloqueado com o uso de anticorpo anti c-Jun em ensaio de *supershift*, sugerindo que c-Jun é o principal componente dos complexos AP1. Ainda no mesmo trabalho, o bloqueio farmacológico da JNK aboliu o aumento da expressão e fosforilação de c-Jun.

Da mesma forma que c-Jun, ATF2 também sofre fosforilação em seu domínio de ativação N-terminal pelas JNKs, conduzindo à formação de heterodímeros c-Jun/ATF2 (KARIN, 1995). As p38 MAPKs também conduzem à fosforilação de ATF2 (SUGDEN e CLERK, 1998; RUWHOF e LAARSE, 2000).

A adequada fosforilação de c-Jun pelas JNKs depende do sítio de ancoragem, localizado entre os resíduos 30 e 60 da c-Jun, e, em humanos, a JNK2 demonstrou maior afinidade pelo mesmo que a JNK 1 (KALLUNKI *et al*, 1994). Após a ligação das JNKs ao sítio de ancoragem da c-Jun, as JNKs se dissociam do mesmo e se ligam ao domínio catalítico, resultando na fosforilação de c-Jun, com posterior dissociação das JNKs, que ficam aptas a fosforilar novas moléculas de c-Jun (KARIN, 1995). Um resumo da regulação da transcrição de c-jun e c-fos pode ser visualizado nas figuras 2a e 2b.



Figuras 2a e 2b - Regulação da transcrição de *c-fos* e *c-jun* em resposta a estímulos extracelulares. Modificado a partir de KARIN (1995).

Enquanto a ativação por fosforilação de *c-Jun* é bastante conhecida, a ativação de *c-Fos* aparenta ser mais complexa e pouco compreendida. A seqüência passível de fosforilação, próxima da extremidade N-terminal da *c-Jun*, é conservada no domínio de ativação C-terminal da *c-Fos*, sugerindo que a fosforilação em Thr-232, o homólogo de Ser-73 da *c-Jun*, potencializa a atividade transcripcional de *c-Fos* (KARIN, 1995). Entretanto, o sítio Thr-232 da *c-Fos* não é fosforilado nem pela JNK1 nem pela JNK2, mas por outra MAPK pouco estudada, denominada FRK (Fos-regulating kinase) (DENG e KARIN, 1994). Foi demonstrado, em cultura neuronal de ratos, que a AngII ativa a FRK via PKC e, desta forma, ativa *c-Fos* por fosforilação (HUANG *et al*, 1998). Em cultura celular de fibroblastos de camundongo estimulados por fator de crescimento

derivado das plaquetas, foi demonstrado que a ERK2 ativa a capacidade transcripcional de c-Fos por fosforilação de vários resíduos de aminoácidos na extremidade C-terminal (domínio de transativação) (MONJE *et al.*, 2003). Dentro deste domínio da c-Fos, Thr-232, -331, e -325 e Ser- 374 são alvos prováveis da atividade de ERK. Entretanto, quando cada um destes sítios foi submetido a mutação individualmente, não se observou alteração na capacidade de ativação de c-Fos pela ERK2, porém c-Fos mutante, no qual todos estes sítios foram trocados por alaninas, não se apresentava mais como substrato para a ERK2 *in vitro*, e tal mutação aboliu a resposta do c-Fos ao fator de crescimento derivado das plaquetas (MONJE *et al.*, 2003) . Quando a Thr-232 é preservada como único sítio fosforilável em c-Fos mutante, o mesmo não é ativado eficientemente por ERK2, mas quando Thr-325, Thr-331, e Ser-374 são reintroduzidos no c-Fos mutante, cada uma delas torna-se substrato para ERK2. A Thr-232, bem como Thr-325, e -331 e Ser-374, são individualmente suficientes para promover transcrição gênica quando estimuladas por fator de crescimento derivado das plaquetas ou ERK2, embora em menor intensidade que c-Fos nativa (MONJE *et al.*, 2003).

Recentemente, demonstrou-se que também a p38 MAPK, particularmente as isoformas α e β , pode fosforilar c-Fos, aumentando assim a atividade de AP-1 (TANOS *et al.*, 2005).

Existem quatro isoformas descritas para a p38: α , β , γ , e δ . Em células de câncer de mama humano foi determinado que a isoforma p38 β MAPK é capaz de promover a atividade transcripcional de AP1 através do aumento tanto da expressão como da fosforilação de c-Jun, enquanto as isoformas p38 γ e p38 δ exercem regulação negativa sobre a expressão de c-Jun (PRAMANIK *et al.*, 2003). A ativação da p38 MAPK também leva à fosforilação de seu substrato distal, a Hsp27 (McMULLEN *et al.*, 2005), e o alelo dominante da Hsp27 de ratos espontaneamente hipertensos foi relacionado a um aumento de 6% na massa ventricular esquerda, independente da pressão arterial (HAMET *et al.*, 1996).

No modelo de remodelação ventricular induzida por infarto do miocárdio conduzido em camundongos, foi possível reduzir a hipertrofia miocárdica pela administração de um inibidor da p38 MAPK (SC-409), na mesma proporção que aquela

obtida pelo uso do inibidor da ECA enalapril. A co-administração dos dois agentes não se mostrou mais eficiente do que cada um deles isoladamente, sugerindo a participação da ativação da p38, mediada por estímulo da AngII, na hipertrofia miocárdica neste modelo animal (LIU *et al.*, 2005).

GATA4 é um fator de transcrição nuclear do tipo dedo de zinco, da família GATA, criticamente envolvido no controle da expressão gênica cardíaca durante o desenvolvimento embriogênico e também na hipertrofia ventricular (TENHUNEN *et al.*, 2004). A expressão aumentada de GATA4 em camundongos transgênicos, isoladamente, foi suficiente para promover hipertrofia miocárdica (LIANG *et al.*, 2001). Em tecido cardíaco de ratos submetidos a estresse mecânico, foi demonstrado que havia ativação de GATA4 via ERK1/2 e p38MAPK, mas não pela JNK (TENHUNEN *et al.*, 2004). Independente de seu papel na constituição de AP1, c-Fos foi descrito como co-fator em proteínas GATA, potencializando sua habilidade em transativar promotores alvo via sítios de ligação a GATA (McBRIDE, 2003).

Controle da fosforilação das MAPKs

A atividade das MAPKs é intensamente regulada. Um dos principais mecanismos envolvidos em sua regulação é a desfosforilação das mesmas pelas MAPK fosfatases (MKPs). As MAPKs podem ser inativadas por sua desfosforilação quer na posição treonina ou na posição tirosina. Assim, elas podem ser inativadas por proteínas tirosina-fosfatases ou serina/treonina fosfatases, embora o papel biológico destas na inativação das MAPKs seja desconhecido (PEARSON *et al.*, 2001). Por outro lado, uma extensa família de proteínas fosfatases duais tem sido descrita, capaz de desfosforilar as MAPKs em ambas as posições (tirosina e treonina), levando à sua completa inativação, e dentre elas destacam-se as denominadas MAPK fosfatases (MKP), de reconhecida importância biológica (CAMPS *et al.*, 2000). O estímulo celular a partir de fatores de crescimento, citocinas ou oncogenes, bem como pelas próprias MAPKs fosforiladas, leva à expressão aumentada das MKPs (CAMPS *et al.*, 2000). A ligação das mesmas a sítios específicos das MAPKs fosforiladas, através da porção amino-terminal das MKPs,

determina a ativação do domínio catalítico das mesmas, com subsequente desfosforilação dual das MAPKs. As MAPKs inativadas se dissociam, deixando as MKPs livres para inativação de outras MAPKs (CAMPS *et al.*, 2000). As MKP-1 e MKP-3 são expressas em tecido cardíaco e inativam ERK1/2, JNKs e p38 MAPK (CAMPS *et al.*, 2000).

Utilizando células endoteliais transfectadas para expressão aumentada de MEK6, McMULLEN *et al.* (2005) obtiveram fosforilação aumentada da p38 MAPK e, conseqüentemente, da Hsp27. Nesta condição, ocorreu inibição da fosforilação da ERK quando estimulada por fator de crescimento endotelial vascular ou integrinas. A fosforilação aumentada da p38 MAPK também resultou em aumento da expressão da MAPK fosfatase-1 (MKP-1). Entretanto, por efeito de inibição competitiva por excesso de substrato (p38 MAPK), a atividade da ERK1/2 permaneceu inalterada. Este estudo evidencia as complexas relações de *cross-talk* existentes entre as MAPKs. Utilizando cultura de células mutantes, *knockout* para JAK2, SANDBERG *et al.* (2004) demonstraram que a JAK2, ao contrário do que estudos prévios evidenciavam, não só não participa da fosforilação da ERK2, pelo estímulo de AngII, como ativa a expressão da MKP-1, que inativa a ERK2 em 30 minutos. Estes resultados exemplificam algumas interações regulatórias do tipo *cross-talk* existentes entre as MAPKs e a via JAK/STAT, neste caso através da MKP-1. Estudando a proliferação de fibroblastos cardíacos induzida pela AngII, STAWOWY *et al.* (2003) demonstraram que o pré-tratamento destas células com lipopolissacárides inativa este efeito. Esta inibição era mediada pela indução de MKP-1, e tal efeito foi abolido pelo bloqueio da proteína quinase C (PKC), mas não pelo bloqueio de ERK1/2. Também foi demonstrado que a proteína fosfatase 2B (Calcineurina), regulada pela concentração de cálcio intracelular, desfosforila a Elk-1 na fosfoserina 383, sítio no qual a fosforilação pelas MAPKs exerce contribuição crítica para a atividade transcripcional de Elk1 (TIAN e KARIN, 1999)

Papel do Óxido Nítrico como modulador da sinalização celular

O óxido nítrico é um radical livre gasoso, com meia vida de depuração bastante curta (3 a 5 segundos), sofrendo rápida metabolização para nitrito e nitrato, em presença de oxigênio (FERRARI *et al.*, 1998). NO é sintetizado a partir da L-arginina por três

isoformas da enzima NO sintase (NOS), expressadas como constitutivas (cNOS) neuronal (tipo I) ou endotelial (tipo III), ou indutível (iNOS), tipo II. A iNOS é encontrada principalmente no miocárdio, hepatócitos, neutrófilos e ocasionalmente nas células endoteliais, e é induzida por citocinas e endotoxinas (NATHAN e XIE, 1994). As NOSs oxidam o nitrogênio da guanidina terminal da L-arginina para formar NO e L-citrulina (MICHEL e FERON, 1997).

O NO atravessa rapidamente as membranas celulares e exerce várias ações dependentes da dose nas células alvo. A síntese de NO pelas células endoteliais é estimulada pelo *shear stress* (forças de cisalhamento, diretamente dependentes do débito cardíaco e pressão arterial). Embora esteja implicado em ações pleiotrópicas, o NO age, em parte, por ativação da fração solúvel da guanilato ciclase, aumentando assim a conversão intracelular de GTP em GMP cíclico, que seria seu segundo mensageiro. O aumento de GMP cíclico, por sua vez, diminui a concentração citosólica de cálcio, levando, na musculatura lisa vascular, à vasodilatação e, no miocárdio, a efeito inotrópico negativo (FERRARI *et al.*, 1998; OPIE, 2001). Nas células endoteliais, a principal isoenzima expressa é a cNOS tipo III (ou ecNOS), cuja atividade é regulada pela concentração intracelular de cálcio e nucleotídeos cíclicos; a ecNOS produz quantidade relativamente modesta de NO e constitui um sistema altamente auto-regulado, intimamente ligado ao controle local do tônus vasomotor. Ocasionalmente, o endotélio também pode expressar a iNOS, que produz NO em larga escala, de maneira não regulada, ainda que por tempo limitado (FERRARI *et al.*, 1998). A observação de efeitos discrepantes do óxido nítrico em alguns modelos experimentais tem sugerido que o mesmo possa agir de maneira bidirecional e dose-dependente em algumas vias intracelulares de sinalização; assim, pequenas concentrações de NO tem sido implicadas em efeito inotrópico positivo e em supressão da apoptose, enquanto doses excessivas apresentam efeito inotrópico negativo e estimulam a apoptose (OPIE, 2001).

A reatividade do NO para oxigênio, metais de transição coordenadores de proteínas e tióis coloca o NO em posição proeminente em diversos papéis fisiológicos e fisiopatológicos. Particularmente o processo de nitrosação de grupamentos tiol nos resíduos de cisteína de inúmeras proteínas, processo denominado S-nitrosação, tem sido

considerado, dado o número crescente de evidências neste sentido, um mecanismo pós-tradução de controle da atividade protéica tão relevante como a fosforilação (LANE *et al.*, 2001).

Mais de uma centena de proteínas de várias classes são reconhecidas como substrato para S-nitrosação, e em vários tecidos têm sido identificadas proteínas S-nitrosadas em condições basais, e aumento da S-nitrosação das mesmas acoplado à ativação de todas as isoformas de NOSs (estimuladas por cálcio, fatores de crescimento, citocinas, hormônios e múltiplos ligantes) tem estabelecido a importância deste tipo de reação na modulação fisiológica de várias vias de sinalização celular (HARE e STAMLER, 2005).

A síntese de S-nitrosotióis em sistemas biológicos requer a presença de um receptor de elétron, geralmente o oxigênio, de acordo com as reações a seguir :

- a. $2 \text{ NO} + \text{O}_2 \rightarrow 2 \text{ NO}_2$, seguido de
- b. $\text{NO}_2 + \text{NO} \rightarrow \text{N}_2 \text{O}_3 = {}^+ \text{ON} \dots \text{NO}_2^-$
- c. ${}^+ \text{ON} \dots \text{NO}_2^- + \text{RSH} \rightarrow \text{RSNO} + \text{HNO}_2$ (onde R é o substrato a ser nitrosado)

(GASTON *et al.*, 2003)

Dada a extrema labilidade e fácil inativação por ferro heme e não heme, oxigênio, radicais superóxido e outras espécies bioquímicas, é provável que algumas espécies moleculares intermediárias sirvam para estabilizar ou transferir NO do sítio de produção para aquele onde exercerão sua atividade biológica (por exemplo, das células endoteliais vasculares para as musculares lisas vasculares) (SCHARFSTEIN *et al.*, 1994). A formação constitutiva de nitrosotióis *in vivo* representa uma maneira de modular a ação do NO, aumentando sua duração, diminuindo sua reatividade e aumentando sua especificidade. Assim, proteínas tais como albumina, glutatona e hemoglobina são constitutivamente nitrosadas e podem participar de reações de transnitrosação, em que o aduto NO é transferido de uma molécula para outra, ou mesmo servir como doadoras de NO em condições específicas em que o grupamento NO pode ser clivado da molécula na sua forma radical, difundindo-se então no sítio de bioatividade (GASTON *et al.*, 2003).

SCHARFSTEIN *et al.* (1994) investigou como os adutos NO do “reservatório tampão” representado pela albumina plasmática poderiam migrar para o meio intracelular, onde exerceriam sua ação. Administrando SNO-albumina a coelhos, observou-se que o tempo decorrido para ocorrer o efeito fisiológico mediado pelo NO (no caso a redução pressórica) era bastante reduzido quando se procedia previamente à administração endovenosa de L-cisteína ou N-acetil-L-cisteína, assim como a duração deste efeito. Também foi possível demonstrar a ocorrência *in vivo* de doação do aduto NO da albumina para a L-cisteína (transnitrosação), estabelecendo-se, deste modo, o papel dos tióis de baixo peso molecular (SNO-L-cisteína e SNO-N-acetil-L-cisteína - SNAC) no transporte dos adutos NO para o ambiente intracelular.

A estabilidade das proteínas SNO pode ser comprometida no citosol pois as mesmas, em contato com glutathione tendem a ser rapidamente denitrosadas por esta, em reação de transnitrosação, e a S-nitrosoglutationa resultante, por sua vez, pode ser enzimaticamente denitrosada. Assim, para proteger os SNO de degradação redutiva ou transnitrosativa, eles podem ser estocados em membranas, em dobraduras protéicas lipofílicas, vesículas e espaços intersticiais (GASTON *et al.*, 2003). A ativação da caspase durante o processo de apoptose fornece um exemplo de como este tipo de seqüestro pode ser utilizado em processos de sinalização celular. Estas enzimas são, normalmente, seqüestradas no espaço intermembrana das mitocôndrias em estado S-nitrosado (inativo). Diante de estímulos apoptóticos, estas enzimas são liberadas no citosol, onde sofrem rápida denitrosação, tornando-se desta forma ativadas (MANNICK *et al.*, 1999).

Várias enzimas foram descritas como responsáveis pelo catabolismo dos nitrosotióis. Assim, a D-glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase [GDFDH, também referida como álcool desidrogenase III (ADH III)] é uma enzima universalmente expressa capaz de denitrosar o GSNO; a Cu/Zn superóxido dismutase pode catalizar a decomposição de nitrosotióis de baixo peso molecular, bem como a gama-glutamyl transferase, dentre outras. Estas enzimas podem regular as concentrações de nitrosotióis em diversos compartimentos biológicos, modular as ações do NO e proteger as células do estresse nitrosativo (GASTON *et al.*, 2003).

As vias de sinalização envolvendo AngII e NO sofrem regulação mútua por vários mecanismos. De modo geral, NO pode ser considerado fisiologicamente como um contra-regulador das ações da AngII, e desbalanços entre os dois sistemas têm sido implicados na disfunção endotelial envolvida na fisiopatologia de várias doenças, como insuficiência cardíaca, hipertensão arterial, disfunção endotelial, aterosclerose e hipertrofia miocárdica (YAN *et al.*, 2003).

Através da infusão por seis dias de AngII em ratos Wistar, pôde-se verificar que a mesma induzia a expressão de NOS1 e NOS3 no miocárdio, mesmo em dose subpressora, sugerindo ação direta da mesma neste fenômeno, como parte de um mecanismo regulatório por retroalimentação negativa (TAMBASCIA *et al.*, 2001). GOHLKE *et al.* (1998) demonstraram estimulação da síntese de NO em aorta de ratos pela AngII, efeito mediado por receptores AT2 e bradicinina. Já SAITO *et al.* (1996) haviam demonstrado em células endoteliais que a AngII estimula a produção de NO via receptores AT1, por ativação da eNOS, dependente de Ca^{2+} /calmodulina. Entretanto, foi demonstrado em aorta de rato, *in vivo*, que a AngII aumenta tanto mRNA como a expressão protéica da eNOS, mas diminui a produção de NO (MOLLNAU *et al.*, 2002). Os autores demonstraram que a AngII desacopla a eNOS, que passa a produzir ânions superóxido, mais do que NO. Como será discutido mais adiante, ânions superóxido inativam o NO.

Por fim, ICHIKI *et al.* (1998) demonstraram, em células musculares lisas vasculares, que o uso de SNAP suprime a expressão de mRNA para receptores AT1 em 90%, e o número destes receptores em 60%, após 24 horas. Além deste tipo de interação, o óxido nítrico pode modular as vias de sinalização celular alterando a função e expressão de proteínas por vários mecanismos distintos, descritos a seguir:

1 - S-nitrosação:

S- nitrosação consiste na formação de adutos de NO nos grupamentos sulfidrila (SH) livres nos resíduos de cisteína das proteínas ou peptídeos. As reações de S-nitrosação determinam modificações fisiológicas ou fisiopatológicas bastante específicas na função de

proteínas, à semelhança dos processos de fosforilação. A atividade da proteína pode ser aumentada (exemplo da p21Ras) ou diminuída (como citado para as caspases) por S-nitrosação. (GASTON *et al.*, 2003). Tais reações podem ocorrer por exposição de motivos redox-ativos ao NO oriundo das NOSs locais ou resultar de transnitrosação a partir de moléculas SNO de baixo peso molecular, ou doadoras de NO (GASTON *et al.*, 2003). O processo de S-nitrosação costuma ser bastante específico. Como exemplo, das 50 cisteínas reduzidas presentes em cada subunidade do receptor ryanodine 1 (RyR1) do músculo esquelético, apenas uma (Cys³⁶³⁵) é seletivamente S-nitrosada, e tal reação representa uma modulação NO-mediada e calmodulina-dependente que aumenta a atividade deste canal iônico. Já a nitrosação excessiva do RyR1 em outras cisteínas pode reduzir sua atividade (SUN *et al.*, 2001).

O sítio passível de S-nitrosação nas proteínas é identificado classicamente como um motivo consensual ácido-base revelado na estrutura primária, consistindo em XYCZ, onde X pode ser Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn ou Gln; Y pode ser Lys, Arg, His, Asp ou Glu; e Z pode ser Asp or Glu. Acredita-se que o elemento mais importante da sequência sejam os resíduos Asp/Glu seguindo a cisteína (BROILLET, 2000). Foi demonstrado, entretanto, que o motivo ácido-base para a S-nitrosação da cisteína pode advir da estrutura terciária, ou de interações proteína-proteína (GASTON *et al.*, 2003). Também tem sido descrito que compartimentos hidrofóbicos na proteína ou entre as proteínas podem constituir um “motivo hidrofóbico” para a S-nitrosação, onde NO e O₂ se encontram de maneira concentrada (SUN *et al.*, 2001).

A S-nitrosação tem sido descrita como mecanismo de modulação de elementos participantes das vias de transmissão do sinal da AngII em alguns estudos. PARK *et al.* (2000), estudando cultura de células microgliciais de rato, observaram que o aumento endógeno da produção de NO (estimulado pela adição ao meio de IFN- γ) ou pela adição de SNAP, suprime a ativação da JNK-1, efeito revertido pela adição do agente tiol redutor DTT. A substituição da Cisteína 116 por serina também reverte o bloqueio da JNK1 *in vivo* e *in vitro*. O uso de um bloqueador da guanilato ciclase não reverteu o bloqueio da JNK1 pelo NO. A dosagem de NO por fluorimetria, no lavado de imunoprecipitação da JNK-1, indicador da S-nitrosação *in vivo*, evidenciou que o aumento da produção endógena

de NO acarretava aumento da S-nitrosação da JNK-1, o que possivelmente explica a sua inibição. A atividade fosfotransferase da JNK 2 também mostrou-se inibida por mecanismo de S-nitrosação *in vitro* (SO *et al.*, 1998).

LANDER *et al.* (1996), utilizando cultura de células T humanas, estudou a modulação da via ras/MAPKs através do uso de NO gasoso, SNAP e nitroprussiato de sódio. Demonstrou que tais agentes aumentavam a atividade da ERK1/2, da p38MAPK e da JNK, e que tal efeito devia-se ao aumento da atividade *upstream* das proteínas Ras (p21ras, Rac1 e Cdc42). Posteriormente, o mesmo autor identificou a S-nitrosação da cisteína 118 da p21ras como o mecanismo ativador da mesma (LANDER *et al.*, 1997).

Um resumo de algumas ações mediadas por S-nitrosação envolvendo alteração de afinidade dos elementos AP-1 com o DNA pode ser vista na tabela 1, retirada de MARSHAL *et al.*(2000).

Tabela 1 - Algumas ações mediadas por S-nitrosação envolvendo alteração de afinidade dos elementos AP1 com o sítio de ligação ao DNA (retirado de MARSHAL *et al.*, 2000).

Célula / tecido	Fonte NO	concentração	estímulo	efeito	Mecanismo proposto
Fibroblastos e céls. granulares cerebelares de camundongo	SNAP	1-5 mM	Nenhum	↓ Ligação AP-1	S-nitrosação em AP-1
Fibroblastos de ratos	SNAP/ GSNO	0,1 mM	Nenhum	↑ Ativação AP-1	↑ Transcrição jun B e c-fos
Céls. Granulares cerebelares de ratos	SNAP	0,05- 0,2 mM	NMDA	↓ Ativação AP-1	↓ Transcrição de c-fos
Heterodímero c-Fos/c-Jun <i>in vitro</i>	NO	0,2-0,8 mM	N.E.	↓ Ligação ao DNA	S-nitrosação c-jun e c-fos
Homodímero c-Jun <i>in vitro</i>	DEA/NO	0,1-1 Mm	N.E.	↓ Ligação ao DNA	S-glutationização De um tiol c-jun

2 - Modulação via cGMP/PKG

Há três sistemas contra-regulatórios da ação hipertrófica da AngII que convergem para a síntese de cGMP: NO, peptídeos natriuréticos (atrial e cerebral) e receptores AT2 da AngII (BOOZ, 2005).

GMP cíclico (cGMP) é gerado por guanilato-ciclase solúveis (sGCs) citoplasmáticas, que, por sua vez, são ativadas por NO, bem como por receptores guanilato-ciclases (rGCs), que são estimulados por peptídeos natriuréticos. Proteínas efectoras distais ao cGMP incluem as proteínas quinase c-GMP-dependentes (PKG) I e II, canais iônicos regulados por nucleotídeos cíclicos e as fosfodiesterases, que hidrolisam cGMP e cAMP. PKG é o maior alvo intracelular da cGMP, mas elevadas concentrações desta podem determinar ativação cruzada das proteínas-quinase cAMP-dependentes (PKA). PKG I é altamente expressa em cardiomiócitos (PILZ e CASTEEL, 2003). Camundongos recombinantes nos quais se deletou o receptor de ANP (guanilil ciclase A) apenas no miocárdio, desenvolveram hipertrofia miocárdica mesmo em níveis tensionais um pouco inferiores ao normal (HOLTWICK *et al.*, 2003). O bloqueio da fosfodiesterase 5^A, enzima que inativa cGMP, pode ser obtido pela droga sildenafil, popularizada pelo seu uso no tratamento da disfunção erétil (patologia na qual ocorre diminuição da síntese de NO nos corpos cavernosos penianos). Em dois modelos animais, aquele obtido pela administração de isoproterenol a ratos (HASAN e KETAT, 2005) e o camundongo submetido à bandagem aórtica (TAKIMOTO *et al.*, 2005), a administração de sildenafil mostrou-se capaz de prevenir, ou prevenir e reverter a hipertrofia miocárdica, respectivamente, e tal efeito foi relacionado ao aumento do nível de cGMP no miocárdio.

2.1 - Regulação transcripcional pela via cGMP/PKG

Utilizando cultura de células mesangiais, CALLSEN *et al.* (1998), observaram que a incubação com uma mistura de citocinas (indutoras de NOS) promovia ativação bifásica da ERK1/2 (rapidamente, em 5 a 15 minutos) e tardiamente (em 15 a 24 h). O uso

de L-NAME bloqueou a fase de ativação tardia. Usando o doador de NO GSNO, verificou-se que a ativação precoce era suprimida pelo uso de um agente bloqueador da guanilato ciclase solúvel, e podia ser mimetizada pelo uso de um análogo da cGMP. Ao contrário, a fase de ativação tardia mostrou-se independente da ativação da cGMP. Demonstrou-se que a ativação tardia era dependente da inibição, pelo NO, das MAPK fosfatases. Assim, num mesmo modelo experimental foi possível demonstrar dois distintos mecanismos de ativação da ERK1/2 pelo NO, através da via cGMP (em analogia com cAMP, que também ativa ERK1/2 via B-Raf), e por S-nitrosação das MAPK-fosfatases, inibindo sua ação.

O aumento de cGMP intracelular pode levar ao incremento ou diminuição de cada uma das 3 MAPKs, dependendo do tipo celular envolvido e das condições do meio. Um resumo destas ações pode ser observado na figura 3. (PILZ e CASTEEL, 2003).

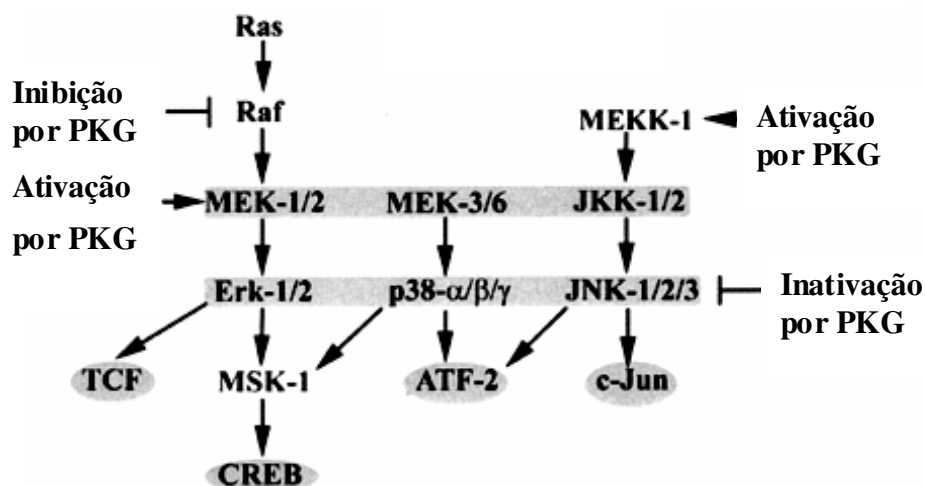


Figura 3 - Algumas modulações na via das MAPKs mediadas por PKG (retirado de PILZ e CASTEEL, 2003).

SILBERBACH *et al.* (1999) demonstraram que o aumento de cGMP intracelular mediado por ANP conduz a maior ativação de ERK1/2, mas não p38 nem JNK, e que tal elevação se deve à ativação de MEK1/2 e não Raf-1. Também OLIVEIRA *et al.* (2003), usando doadores de NO em células endoteliais vasculares de coelho, observaram

ativação da via p21Ras-Raf-1 kinase-MEK-ERK1/2, dependente de cGMP. Por outro lado, em células com estímulo mitogênico, pode ocorrer inibição da ERK1/2 por cGMP/PKG, mediada pela fosforilação de serina 43 de Raf-1 (efeito direto da PKG), impedindo a interação Ras-Raf, ou mesmo pela ativação direta da MPK-1 pela PKG (SUHASINI *et al.*, 1998). Em cultura de cardiomiócitos de ratos, a síntese protéica estimulada por norepinefrina foi acentuada pelo bloqueio da síntese de NO com L-NAME e inibida pela adição de SNAP ou cGMP. No mesmo experimento, verificou-se que a adição de cGMP inibe o aumento de mRNA de c-fos induzido por norepinefrina (CALDERONE *et al.*, 1998).

2.2 - Regulação pós-transcricional pela via cGMP/PKG

Regulação da expressão gênica em nível pós-transcricional inclui regulação do splicing de pré-mRNA, bem como controle sobre estabilidade e tradução dos mRNA. A PKG foi capaz de fosforilar o *splicing factor 1* (SF1) *in vitro* e *in vivo*, inibindo assim sua capacidade de cortar adequadamente o pré-mRNA, tornando-o funcionalmente ativo (WANG *et al.*, 1999). Entretanto, as implicações funcionais deste mecanismo são ainda desconhecidas.

Os mRNA codificantes de proteínas regulatórias, tais como os dos fatores de crescimento, cujas taxas de produção necessitam se alterar rapidamente, costumam ser instáveis, ou seja, são rapidamente degradados. Estes, em geral, carregam em sua extremidade 3'-UTR (não codificante) seqüências AU, que aceleram a sua degradação. A estabilidade de alguns mRNA é regulada pela proteína HuR, que se liga a estas seqüências AU, aumentando sua meia-vida. O aumento de cGMP, em aorta de ratos, diminui tanto a expressão de HuR como sua ligação ao mRNA, conduzindo assim a um mecanismo de controle pós-transcricional de aumento da instabilização de mRNA (KLOSS *et al.*, 2003). Por outro lado, o cGMP pode aumentar a estabilidade do mRNA. Em células TPH-1 e monócitos humanos estimulados por lipopolissacárides, o NO causou estabilização do mRNA da interleucina 8, e este efeito foi dependente da ativação da cGMP e, em parte, da ativação de p38 (MA *et al.*, 2004).

3 - Alterações no equilíbrio redox

AngII, através dos receptores AT1, é capaz de ativar NAD(P)H oxidases, que por sua vez produzem espécies reativas de oxigênio no meio intracelular, tais como peróxido de hidrogênio e ânion superóxido. A ativação das NAD(P)H oxidases é bifásica: uma fase rápida (30 segundos) é dependente de ativação da proteína quinase C, e a fase posterior (pico em 30 minutos) depende de ativação de Rac (SESHIAH *et al.*, 2002). Há evidências que a produção de ânions superóxido participe da cadeia de sinalização da AngII responsável pela indução de hipertrofia miocárdica (sinalização redox). Cardiomiócitos de rato estimulados com AngII tiveram sua resposta hipertrófica atenuada pela adição ao meio de vários antioxidantes. Também se obteve tal atenuação com incorporação de superóxido dismutase, mas não catalase, às células, sugerindo que esta sinalização seja mediada por superóxido, e não peróxido de hidrogênio (NAKAGAMI *et al.*, 2003). Ratos transgênicos que superexpressam a subunidade p22(phox) da NAD(P)H oxidase em células musculares lisas vasculares desenvolvem hipertrofia vascular espontânea, bem como mostraram resposta hipertrófica vascular aumentada pela infusão de AngII, em relação a animais controle (WEBER *et al.*, 2005). Em cultura de fibroblastos cardíacos, o uso do tiol antioxidante N-acetil cisteína, bem como um inibidor da NAD(P)H oxidase ou mesmo oligonucleotídeo *antisense* para p22(phox) inibiu significativamente a ativação de ERK1/2, JNK e p38MAPK, mas não JAK2, induzidas por AngII (SANO *et al.*, 2001). A produção e os efeitos das espécies reativas de oxigênio e do NO são inter-relacionados de diversas maneiras. Em neutrófilos, NO se mostrou capaz de inibir a produção de ânions superóxido mediada por NAD(P)H oxidase (CLANCY *et al.*, 1992). Também a xantina-oxidase miocárdica, produtora de espécies reativas de oxigênio (EROs) mostrou ser modulada por NO (SAAVEDRA *et al.*, 2002). Tanto NO como EROs competem quimicamente por ligações químicas em grupamentos sulfidríla das cisteínas, de modo que a ligação com um deles pode modular a subsequente reação com o outro (HARE e STANLER, 2005). Nos baixos níveis fisiológicos de produção de NO e EROs, NO pode agir como antioxidante ou interruptor de reações radicalares em cadeia, bem como os EROs podem aumentar a especificidade do NO por determinados sítios de S-nitrosação. Já em níveis mais elevados, como aqueles gerados por AngII, ocorre reação de superóxido com NO, inativando o último, e gerando peroxinitrito,

agente altamente oxidante e citotóxico (HARE e STANLER, 2005). O próprio peroxinitrito foi descrito como ativador direto da fosforilação de Raf-1, MEK-1 e ERK1/2 (ZHANG *et al.*, 2000).

Por um mecanismo diferente, qual seja, oxidação direta de substrato, o NO também mostrou modular a via JAK/STAT. A ativação das JAKs é crucial para a propagação da resposta proliferativa iniciada por várias citocinas. A proliferação de várias linhagens celulares é modulada por mediadores do estresse oxidativo como NO e reagentes tiol redox. DUHÉ *et al.* (1998) demonstraram que o NO e outros tiois oxidantes podem inibir a atividade autoquinase da JAK2 do rato, *in vitro*, presumivelmente pela oxidação de ditiois para dissulfetos na JAK2. A forma reduzida da JAK2 é a mais ativa, sendo a JAK2 oxidada inativa. O pré-tratamento com NO de células quiescentes Ba/F3 também inibiu a ativação *in vivo* da JAK2 deflagrada pelo estímulo da interleucina-3. Os mesmos autores observaram, ainda, que a atividade autoquinase da JAK3 é inibida *in vivo* pelo uso de doadores de NO, explicando, desta forma, os efeitos imunossupressivos do NO e de outros tióis oxidantes.

Papel final do NO como modulador da Angiotensina

Conforme exposto acima, verifica-se que o NO, por diversos mecanismos, desempenha ações modulatórias em vários níveis da sinalização da AngII, alguns deles aparentemente contraditórios e, provavelmente, dose ou tecido dependentes. A ação final do mesmo em processos de hipertrofia e proliferação celular, entretanto, tem sido consistentemente antagônica à da AngII:

HOU *et al.* (1995) demonstraram que a inibição da NO sintase em ratos levou a uma resposta exagerada frente a pequenas doses de AngII, resultando em rápida e acentuada fibrose cardíaca. TOSHIKAZU *et al.* (1997), utilizando um doador de NO (SNAP) em cultura de fibroblastos cardíacos de rato, demonstraram inibição da replicação celular (avaliada pela captação de timidina) induzida pela AngII, de maneira dose-dependente. RITCHIE *et al.* (1998) estudaram o efeito hipertrófico da AngII em

cultura de cardiomiócitos isolados, ou em co-cultura com células endoteliais. Verificaram que em co-cultura apenas, a bradicinina inibia a incorporação de [³H]fenilalanina, efeito dependente da eNOS. O mesmo foi verificado pela adição, em cultura isolada de cardiomiócitos, de doadores de NO. No modelo de cultura de cardiomiócitos estimulados por norepinefrina, CALDERONE *et al.* (1998) verificaram diminuição da incorporação de [³H]leucina quando tratadas com peptídeo natriurético atrial (ANP) ou SNAP, em padrão dose-dependente, e aumento de sua incorporação com o uso de N^G-monometil-L-arginina, um inibidor da NOS. Tanto o ANP como SNAP elevaram os níveis intracelulares de cGMP, e o efeito supressor de hipertrofia desses agentes foi mimetizado pelo tratamento das células com o análogo de cGMP 8-bromo-cGMP. Mais ainda, em cardiomiócitos o 8-bromo-cGMP atenuou o aumento de m-RNA de c-fos induzido pelo estímulo α_1 -adrenérgico. No modelo de infarto por ligadura da artéria descendente anterior em camundongos, SCHERRER-CROSBIE *et al.* (2001) verificaram maior hipertrofia ventricular no músculo remanescente (remodelamento pós-infarto, que envolve ativação de AngII) em animais knockout para a NOS3 em relação a controles pareados, apesar dos primeiros apresentarem pressão arterial mais elevada que os últimos. WOLLERT *et al.* (2002) investigaram o papel da proteína quinase dependente de c-GMP (PKG) no efeito anti-hipertrófico do NO. O tratamento de cardiomiócitos de ratos com SNAP (250 micromol/L) ou um análogo de cGMP seletivo para PKG (8-pCPT-cGMP) ativaram a PKG endógena tipo I e atenuaram modestamente a resposta hipertrófica à norepinefrina. A transferência por vetor adenoviral do gene da PKG tipo I beta levou à completa supressão da resposta hipertrófica induzida por norepinefrina, quando tratadas com SNAP na mesma concentração, demonstrando assim que o efeito anti-hipertrófico do NO em cardiomiócitos (estimulados por norepinefrina) é mediado pela ativação da via cGMP/PKG, bem como da via cGMP/PKG independente.

No modelo de infarto por ligadura da artéria descendente anterior em ratos, SMITH *et al.* (2005) investigaram o efeito da transferência por vetor viral da eNOS no remodelamento cardíaco pós infarto. Observaram redução em vários parâmetros de hipertrofia (peso e diâmetro do ventrículo esquerdo, comprimento dos cardiomiócitos), bem como indicadores de função sistólica, fibrose e apoptose. Tais efeitos foram acompanhados não só do aumento do NO e cGMP citosólicos, como de expressiva redução

da atividade de NAD(P)H oxidase, formação de ânions superóxido, TGF-beta1 (transforming growth factor), ativação da JNK, translocação nuclear de NF-kappa B e atividade da caspase-3.

TTZHAN e PAN (2000) estudaram os efeitos do NO na hipertrofia celular em cultura de cardiomiócitos de rato. O conteúdo total de proteína (índice da hipertrofia dos cardiomiócitos) apresentou aumento significativo cinco dias após o tratamento com AngII, e o mesmo era inibido pela adição de SNAP ao meio de cultura. A AngII induziu a expressão de c-fos, enquanto a L-arginina inibiu tal efeito. O efeito da L-arginina, por sua vez, foi bloqueado pela adição de L-NAME (inibidor da NO sintase). SNAP também inibiu a expressão de c-fos após adição de AngII. Assim, demonstrou-se que o NO inibe a resposta hipertrófica e a expressão do proto-oncogene c-fos em cardiomiócitos induzidos por AngII.

Assim, a resposta hipertrófica estimulada pela AngII em células musculares cardíacas é modulada pelo NO. A ação deste em bloquear a expressão de genes *i.e.* (c-jun e c-fos) pode ocorrer por bloqueio em vários níveis da cadeia de sinalização intracelular da AngII, envolvendo mecanismos distintos. As diversas alterações mediadas pelo NO diante de estímulo da AngII ocorridas nas duas vias principais de ativação inicial do processo de hipertrofia miocárdica (JAK/STAT e das MAPKs), bem como a resultante final deste processo na indução de *i.e.* genes não é descrita na literatura, sendo assim objetivo do presente trabalho.

OBJETIVOS

Avaliar o efeito do pré-tratamento com o doador de óxido nítrico SNAC no padrão de ativação de etapas iniciais e intermediárias envolvendo duas vias de sinalização intracelular controladas por AngII, JAK/STAT e MAPKs, em coração e cardiomiócitos isolados de ratos.

MATERIAIS E MÉTODOS

1 - Anticorpos e reagentes

Foram utilizados anticorpos da Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA):

SC#7229 coelho, policlonal) contra JAK-2

SC#7988 (ovelha, policlonal) contra p-STAT 1

SC#464 (camundongo, monoclonal) contra STAT 1

SC#7993 (ovelha, policlonal) contra p-STAT 3

SC#483 (coelho, policlonal) contra STAT 3

SC#7383 (camundongo, monoclonal) contra p-ERK1/2

SC#6254 (camundongo, monoclonal) contra p-JNK1/2

SC#7973 (coelho, monoclonal) contra p-p38

SC#253 e 7202 (coelho, policlonal) contra c-Fos

SC#1694 (coelho, policlonal) contra c-Jun

SC#822 (camundongo, monoclonal) contra p-c-Jun

SC#508 (camundongo, monoclonal) contra fosfo-tirosina

Reagentes para determinação das proteínas totais (Biureto), SDS/PAGE e immunoblotting da Bio-Rad (Richmond, CA). PMSF, aprotinina, dithiothreitol (DTT), Triton X-100, Tween20, glicerol, AngII e BSA (Fraction V) da Sigma Chemical CO (St. Louis, MO, USA). Proteína A-Sepharose 6MB da Pharmacia (Uppsala, Sweden), Proteína A/G plus agarose (Santa Cruz, CA; SC#203), ¹²⁵I-Protein A da Amersham Corp. (Aylesbury, UK) e membranas de nitrocelulose (BA85; 0,2mm) da empresa Schleicher and Schuell. Anestésico tipental sódico da Cristália. Angiotensina II humana liofilizada da Calbiochem (Biosciences, Inc, La Jolla, CA)

Soluções empregadas em experimentos de Western blot e cultura de cardiomiócitos:

- Solução tampão de extração: Utilizada para homogeneização do tecido cardíaco e extração de proteínas. Composta de: 100 mM Trisma base, pH 7.5, 10 mM EDTA, 100 mM pirofosfato de sódio, 100 mM NaF, 10 mM Na_3VO_4 , 2 mM PMSF diluído em álcool etílico, 1% Triton X-100 e 0,1 mg/ml aprotinina. Esta solução foi preparada em gelo e nele mantida durante todo o experimento. Na_3VO_4 e PMSF foram acrescentados ao tampão somente no momento de uso.
- Tampão de Laemmli (5x): Utilizada para armazenar, em freezer, as proteínas extraídas e sua posterior aplicação no gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para eletroforese. Composta de: 0.1 % Azul de Bromofenol, 1 M fosfato de sódio, pH 7.0, 50% glicerol e 10% SDS.
- Solução tampão para lavagem do imunoprecipitado: Utilizada para lavagem das amostras após incubação com proteína A-sepharose 6 MB. Composta de: 100 mM Trisma base, 10 mM EDTA, 2 mM Na_3VO_4 e 0.5% Triton X-100. Esta solução foi preparada em gelo e nele mantida durante todo o processo de lavagem das amostras.
- Solução tampão para SDS-PAGE, gel da fase de resolução “Resolving”: Utilizada para confecção do gel de resolução. Composta de: 4 mM EDTA, 2% SDS e 750 mM Trisma base, pH 8.9 (ajustado com HCl).
- Solução tampão para SDS-PAGE, gel da fase de empilhamento “Stacking”: Utilizada para confecção do gel onde ocorre o empilhamento das proteínas. Composta de: 4 mM EDTA, 2% SDS e 50 mM Trisma base, pH 6.7 (ajustado com ácido fosfórico).
- Solução tampão para eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE): Utilizada na eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Composta de: 200 mM Trisma base, 1.52 M glicina, 7.18 M EDTA e 0.4% SDS. Para uso, a solução foi diluída 1:4.

- Solução tampão para transferência: Utilizada na transferência das proteínas separadas no SDS-PAGE para a membrana de nitrocelulose. Composta de: 25 mM Trisma base, 192 mM glicina, 20% Metanol e 0.02% SDS para facilitar a eluição de proteínas de alto peso molecular. Mantido à 4°C.
- Solução basal: Solução utilizada no manuseio da membrana de nitrocelulose após a transferência. Composta de: 150 mM NaCl, 10 mM Trisma base e 0.02% Tween 20.
- Solução bloqueadora: Utilizada para incubar a membrana de nitrocelulose após a transferência a fim de diminuir ligações inespecíficas. Composta de: 5% BSA dissolvido em solução basal.
- Solução de anticorpo: Solução contendo anticorpos específicos para marcação de proteínas transferidas para a membrana de nitrocelulose. Composta de: 3% BSA dissolvido em solução basal mais os anticorpos utilizados nos experimentos na diluição estabelecida.
- Solução de Iodo (^{125}I): Solução que permite a visualização das bandas em autoradio-grafia. Composta de: 1% BSA dissolvido em solução basal mais 2 μCi de proteína A marcada com ^{125}I .
- Solução Tampão de Stripping: Composta de: 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.1 M β -mercaptoetanol, uréia, 0.1 mg/ml BSA.
- Tampão ADS estéril: 4,36 g N-2 hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES, pH 7,35), 6,80 g NaCl, 1 g /D-glucose, 0,40 g NaH_2PO_4 , 0,10 g MgSO_4 , 0,02 g vermelho de fenol.
- Tampão de digestão para extração de cardiomiócitos ventriculares de ratos neonatos: Tampão ADS 100mL, 15000 U.I. de collagenase tipo II, 12,5 mg de pancreatina.

- Solução de Lowry para quantificação de proteínas:

-solução A: 2% Na₂CO₃; NaOH 0,1N

-solução B₁: CuSO₄ 1%

-solução B₂: NaK tartarato 2%

-solução C: para cada 1 mL de solução A, adicionar 100µL de solução B₁ e 100µL de solução B₂.

2 - Animais

Foram utilizados ratos machos (*Rattus norvegicus*, variedade albina) da cepa Wistar-Hannover, provenientes do biotério central da UNICAMP, com 6 a 8 semanas de idade. Permaneceram acomodados em gaiolas coletivas, em número máximo de 6 animais por unidade, mantidos em ambiente silencioso com ciclo luminoso de 12 horas mantido artificialmente, alimentados com ração comercial para roedores (Nuvilab CR-1) da Nuvital, oferecida ad libitum, assim como água. Os animais foram mantidos em jejum por 12 horas antes dos experimentos, recebendo apenas água.

Para o preparo da cultura de cardiomiócitos, foram utilizados ratos Wistar com um dia de vida.

3 - Metodologia

3.1 - Procedimento cirúrgico e extração dos corações

Os animais foram anestesiados com Tiopental sódico (5mg/100g de peso), via intraperitoneal, e utilizados após 10-15 minutos, assim que constatada a perda do reflexo corneano. A cavidade abdominal foi aberta para a exposição da veia cava inferior, através da qual receberam soro fisiológico 0,9% ou AngII 10⁻⁶M (20 µL) e/ou SNAC 0,8 µmol/ Kg. Após os tempos determinados, a cavidade torácica foi aberta para retirada da porção apical do coração, que foi lavado em soro fisiológico (S.F.) e homogeneizado.

Os animais foram submetidos a 3 condições de tratamento:

- Controle: Receberam apenas injeções de soro fisiológico;
- AngII: receberam apenas injeção de AngII e S.F;
- SNAC/AngII: receberam 1 dose de SNAC (SNAC 0,8 μ mol/ Kg), seguida, após 10 minutos, da injeção de AngII;

Em cada um dos grupos, foram sacrificados animais nos seguintes tempos:

10 minutos para determinação da fosforilação de JAK2;

10 minutos para determinação da fosforilação de JNK, ERK e p38

20 minutos para determinação da fosforilação de c-Jun

30 minutos para determinação de c-Fos e fosforilação da STAT-1

120 minutos para determinação de c-Jun e fosforilação da STAT 3;

3.2 - Homogeneização e determinação do conteúdo total de proteínas

O material extraído conforme descrição do item 1 foi submetido a homogeneização em tampão de extração a 4°C, utilizando um homogeneizador Politron PTA 20S (modelo PT 10/35; Brinkmann Instruments, Westbury, NY), operado em velocidade máxima por 30 segundos. No final da extração, foi adicionado Triton X-100 1% em todas as amostras e mantidas em gelo. Após 40 minutos, os materiais extraídos e homogeneizados foram submetidos à centrifugação. Utilizou-se a velocidade de 11.000 rpm por 20 minutos a 4°C para remover o material insolúvel, e o sobrenadante foi utilizado para o ensaio. Parte deste foi utilizada para dosagem do conteúdo protéico total pelo método colorimétrico de Biureto (BRADFORD, 1976), enquanto a outra parte foi submetida à imunoprecipitação e imunoblotting com anticorpos específicos.

3.3 - Imunoprecipitação e Western Blot

Após determinação da concentração protéica total, o sobrenadante, contendo 5 mg de proteína total, foi imunoprecipitado com os anticorpos específicos overnight a 4°C. O imunoprecipitado foi separado após incubação com proteína A sepharose 6MB por duas horas a 4°C.

Após isso, as amostras foram centrifugadas a 11000 rpm, a 4°C por 2 horas e submetidas a lavagem com tampão de lavagem por 3 vezes, centrifugando a 11000 rpm por 5 minutos cada, a 4°C. A seguir, as proteínas precipitadas foram tratadas com tampão de Laemmli contendo 100 mmol/L de ditioneitol (DTT) e aquecidas em água fervente por 5-10 minutos e submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS-PAGE em aparelhos de eletroforese Bio-Rad miniatureslab gel apparatus (Mini-protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, Ca). O SDS-PAGE foi submetido inicialmente a diferença de potencial de 30 volts até a passagem da linha demarcada pela fase de empilhamento (stacking) e 90 volts até o final do gel de resolução (resolving). A eletrotransferência das proteínas do gel para a membrana foi realizada em 120 minutos a 120 V em aparelho miniaturizado de transferência da Bio-Rad, como descrito por TOWBIN *et al.*(1979). A ligação dos anticorpos a proteínas não específicas foi reduzida por pré-incubação da membrana por 120 minutos com tampão de bloqueio à temperatura ambiente. A membrana de nitrocelulose foi incubada overnight com anticorpos específicos diluídos em solução para anticorpo e então lavada por 5 minutos, por 3 vezes, com solução basal. Após, a membrana foi incubada com 5µCi de [¹²⁵I] Proteína A (30 µCi/µg) em solução de Iodo por duas horas à temperatura ambiente e lavada novamente por 5 minutos, 3 vezes, como descrito. A [¹²⁵I] Proteína A ligada aos anticorpos específicos foi detectada e quantificada por auto-radiografia em filmes KodaK XAR (Eastman Kodak, Rochester, NY). Para isto, o cassete contendo a membrana, o filme e o intensificador (Cronex Lightning Plus - DuPont, Wilmington, DE) foram mantidos em freezer à temperatura de -80°C e após 12-120 horas o filme foi revelado de modo convencional. As bandas identificadas na auto-radiografia foram quantificadas por densitometria óptica. Para tal, foi utilizado um scanner de mesa ColorPage HR6X (Genius) e o programa Scion Image (Scioncorp). Para o *immunoblotting* simples, não precedido de imunoprecipitação, quantidades iguais de proteínas (200 µg) foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE conforme descrito anteriormente.

3.4 - Isolamento e cultivo de cardiomiócitos de ratos neonatos

Os miócitos ventriculares de ratos Wistar neonatos foram extraídos de acordo com o protocolo modificado de KIM *et al.* (1995). Foram utilizados ratos com 1 a 2 dias de vida, sacrificados por decapitação. Os corações foram retirados rapidamente da cavidade torácica e lavados em tampão ADS, onde os ventrículos foram separados das valvas e átrios. Após nova lavagem em tampão ADS para remoção do sangue, os ventrículos foram cortados em fragmentos pequenos, imersos em tampão de digestão e incubados a 37° C, em agitador orbital a 200 rpm por 20 minutos. Após este período, o sobrenadante foi colocado em tubo Falcon estéril, ao qual foi adicionado 1 mL de soro fetal bovino (SFB-Gibco) para interromper a reação de digestão. Após centrifugação de 5 minutos a 3000 rpm, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuspensionado em 2 mL de SFB e pré-plaqueado em placa de Petri de vidro estéril. A mesma foi mantida a 37°C em estufa contendo atmosfera controlada com 5% de CO₂. O pré-plaqueamento visa diminuir a contaminação com fibroblastos, já que estes, em relação aos cardiomiócitos, aderem mais rapidamente à placa de Petri. Assim, é possível obter uma suspensão mais enriquecida de cardiomiócitos. A reação de digestão, centrifugação e pré-plaqueamento foram repetidas de 5 a 6 vezes. Ao final da última digestão, todo o sobrenadante da placa de pré-plaqueamento foi centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de células foi ressuspensionado em tampão ADS e submetido então à separação de fases em um gradiente de Percoll descontínuo (densidades: 1,060 / 1,086 g/mL) e centrifugado a 3000 rpm, 30 minutos a 37°C, utilizando centrífuga com aceleração e desaceleração mínimas. A banda contendo os cardiomiócitos foi recuperada e as células lavadas com tampão ADS. O precipitado foi ressuspensionado em 3-5 ml de meio de plaqueamento (meio DMEM, 10% de soro de cavalo, 5% SFB, 0,5% de penicilina e estreptomicina, 100µM BrdU [5-Bromodeoxiuridina], pH 7,2±0,2). O acréscimo de soro fetal bovino e BrdU inibem a proliferação de fibroblastos. A viabilidade dos cardiomiócitos foi determinada pelo teste de exclusão do azul de Tripan (PHILLIPS, 1973), e as células viáveis foram contadas em câmara de Newbauer. A concentração de células foi determinada pela fórmula:

$$\text{Número de células/ml} = \frac{\text{nº de células contadas}}{\text{nº de campos contados}} \times \text{fator de diluição} \times 10000$$

Somente as células não coradas pelo azul de Tripán foram contadas. O fator de diluição foi calculado de acordo com o volume da solução de azul de Tripán adicionado ao meio DMEN com as células para contagem. O último fator da fórmula é o fator de correção da câmara. As células foram plaqueadas em placas de cultura de 35 mm, recobertas com gelatina 0,1% em densidade final de $75 - 80 \times 10^4$ células/placa, em 2mL. As células foram mantidas por 48 horas em condições padrão (37°C, 5% CO₂) e, após este período, o meio de plaqueamento foi substituído pelo meio de manutenção (DMEN com 0,5% de penicilina e estreptomicina) pelo menos 24 horas antes do experimento. Nestas condições de cultura, a maioria das células mantinha batimentos espontâneos à microscopia óptica.

As placas designadas para tratamento com AngII receberam a mesma em concentração final de 10^{-6} Mol/L, e aquelas designadas para tratamento com SNAC receberam o mesmo, 10 minutos antes da adição de AngII, na concentração final de 10^{-5} Mol/L. Os tempos de extração para cada amostra foram os mesmos descritos para extração em animais.

Para preparação de extratos totais e imunoprecipitação, as células foram lavadas com tampão PBS pH 7,4 e removidas das placas de cultivo em tampão de extração e lisadas pela passagem em agulha ultrafina. Após 30 minutos de incubação em gelo, os homogenatos foram centrifugados a 4°C, 11000 rpm, por 20 minutos para remover o material insolúvel, e o sobrenadante foi utilizado para os ensaios. A determinação do conteúdo protéico total do sobrenadante foi feita pelo método de Lowry modificado.

3.5 - Quantificação de proteínas pelo método de Lowry

O método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951) modificado foi escolhido por ser mais sensível e preciso em amostras com baixa concentração protéica, e cada amostra foi analisada em triplicata. Neste método, a cada 1 mL de solução C foram adicionados 10µL

de amostra, e os tubos de ensaio foram incubados por 10 minutos à temperatura ambiente, protegidos da luz. Após este período, adicionou-se 50 µL de *Folin Cicauteau*, e as amostras foram incubadas por mais 30 minutos, protegidas da luz. Procedeu-se, então, à leitura em espectrofotômetro a 660 nm. Para o cálculo de concentração protéica, foi feita uma curva padrão de albumina bovina (Sigma), variando concentrações de 0,5 µg/µL a 5,5 µg/µL, e os valores de absorbância das amostras foram comparados para se obter a concentração de proteínas correspondente.

3.6 - Preparo da solução de SNAC

A solução de SNAC foi preparada imediatamente antes de cada experimento, conservada sob refrigeração e protegida da luz, para evitar sua decomposição. Foi obtida pela reação equimolar de NaNO₂ com N-acetil-L-cisteína, ocorrida no escuro, durante 15 minutos, à temperatura ambiente. Preparou-se uma solução a $2,4 \times 10^{-2}$ mol/L, diluída em seguida em tampão PBS pH7,4 na proporção 1:10, resultando, portanto, em concentração de $2,4 \times 10^{-3}$. Desta solução, adicionou-se 200µL em cada placa de cultura contendo 1,8 mL de meio DMEM, resultando assim em concentração final na placa de $2,4 \times 10^{-4}$ mol/L. Para os animais, administrou-se a solução $2,4 \times 10^{-3}$, diluída em tampão PBS pH 7,4, na dose de 1µL para cada 3 g de animal, resultando em dose de 0,8µM/kg de animal.

3.7 - Análise estatística

Os resultados submetidos à análise estatística estão representados como média $\pm$ erro padrão dos valores. As diferenças entre as médias dos valores foram avaliadas pela análise de variância de uma via (*one way ANOVA*) para variáveis não-paramétricas, utilizando o programa Instat. Foram considerados estatisticamente significantes valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

DISCUSSÃO

Modulação da via Jak/STAT pelo SNAC

Em amostras de tecido cardíaco de rato, bem como em cultura de cardiomiócitos, submetidos à imunoprecipitação com anticorpo anti-Jak-2 no tempo de 10 minutos após a administração de AngII, e submetidas a *immunoblotting* com anticorpo anti-fosfotirosina, observamos que houve aumento significativo da fosforilação em tirosina de Jak-2 pelo estímulo da AngII (149% e 173%, respectivamente, em animais e em cultura de cardiomiócitos). O pré-tratamento com SNAC determinou atenuação significativa desta resposta à AngII nos animais (fosforilação de 101,5% em relação ao grupo controle), bem como em cultura de cardiomiócitos (fosforilação de 110% em relação ao grupo controle). (Figura 4). Conforme esperado a partir deste resultado, observamos aumento da fosforilação das STATs 1 e 3 nos tempos de 30 e 120 minutos, respectivamente, a partir do estímulo com AngII (aumento de fosforilação da STAT 1 de 213% e 172%, respectivamente em animal e cardiomiócitos, e aumento de fosforilação da STAT 3 de 164% e 142,5%, respectivamente em animal e cardiomiócitos), e atenuação significativa deste efeito pelo pré-tratamento com SNAC (fosforilação da STAT 1 de 154% e 110%, respectivamente em animal e cardiomiócitos (figura 5), e da STAT 3 de 113% e 105%, respectivamente em animais e cardiomiócitos (figura 6). Assim, a via Jak/STAT, ativada pela AngII, mostrou ser modulada negativamente pelo doador de NO SNAC.

Modulação das MAPKs pelo SNAC

Houve aumento da fosforilação tanto da ERK42 (176% e 162,5% em relação ao controle, respectivamente em animais e cardiomiócitos), como da ERK 44 (158% e 183%, respectivamente em animal e cardiomiócitos) após 10 minutos do estímulo da AngII, como determinado pelo *immunoblotting* com anticorpos contra ERK 1/2 fosforilada. O pré-tratamento com SNAC determinou aumento adicional da fosforilação da ERK 42 (226% e 186% em relação ao controle, respectivamente em animais e cardiomiócitos), bem como da ERK 44 (181% e 236%, respectivamente em animal e cardiomiócitos). Quanto ao aumento adicional da fosforilação de ERK 1 e 2 observado com o pré-tratamento com SNAC, só houve significância estatística nos experimentos em animais, havendo apenas tendência idêntica nos estudos conduzidos em culturas de cardiomiócitos.(figura 7).

O anticorpo por nós utilizado para *immunoblotting* da JNK identifica a fração JNK1 em 46 kDa e as frações JNK 2 e 3 em 54 kDa, e as duas bandas foram avaliadas independentemente. Observamos aumento estatisticamente significativo da fosforilação da JNK 1 (fosforilação de 166% e 173,3 %, respectivamente em animais e cardiomiócitos, em relação ao grupo controle) e JNK 2/3 (fosforilação de 205% e 191,3 %, respectivamente em animais e cardiomiócitos, em relação ao grupo controle) após 10 minutos do estímulo com AngII. Tal efeito foi significativamente reduzido pelo pré-tratamento com SNAC, tanto na JNK1 (fosforilação de 117% e 125,5%, respectivamente em animais e cardiomiócitos, em relação ao grupo controle), como nas JNK2/3 (fosforilação de 125,5% e 123%, respectivamente em animais e cardiomiócitos, em relação ao grupo controle). Com exceção da JNK 2/3 em cultura de cardiomiócitos, em todas as demais situações o grupo tratado com SNAC / AngII apresentou fosforilação das JNKs sem diferença estatística em relação ao grupo controle (figura 8).

No caso da p38, ao contrário das demais MAPKs, nem o grupo tratado com AngII (fosforilação de 110,3% e 95,2%, respectivamente em animais e cardiomiócitos, em relação ao grupo controle), nem aquele que recebeu SNAC seguido de AngII (fosforilação de 124,6% e 90,4%, respectivamente em animais e cardiomiócitos, em relação ao grupo controle) apresentou mudança significativa da fosforilação, conforme determinado pelo immunoblotting com anticorpo anti-p-38 MAPK (Figura 9).

Assim, das três MAPKs envolvidas na sinalização da AngII em vias de hipertrofia miocárdica, apenas a JNK 1/2/3 mostrou ser negativamente modulada pelo SNAC; As ERK1/2 apresentaram aumento da fosforilação induzida pela AngII com o pré-tratamento por SNAC, e a p-38 sequer apresentou aumento significativo de fosforilação após estímulo com AngII nas condições experimentais descritas.

Fosforilação da proteína c-Jun

A fosforilação de c-Jun na serina 63 foi avaliada por immunoblotting com anticorpo específico contra c-Jun fosforilado nesta posição. No tempo de 20 minutos após o estímulo com AngII, determinamos a fosforilação de c-Jun constitutivo, pois a síntese de

novo c-Jun só será relevante após duas horas. Observamos, em miocárdio ventricular de ratos, aumento significativo da fosforilação de c-Jun em 20 minutos após o estímulo com AngII (160,7% em relação ao grupo controle), e abolição deste efeito pelo pré-tratamento com SNAC (112% em relação ao grupo controle), consistente com os efeitos observados nas JNKs (Figura 10)

Expressão gênica de c-fos e c-jun

A transcrição de c-fos foi avaliada pelo immunoblotting de tecido cardíaco e cardiomiócitos com anticorpo anti- c-Fos. Observamos aumento expressivo da proteína c-Fos em 30 minutos após o estímulo com AngII (fosforilação de 165,6% e 184,5%, respectivamente em animais e cardiomiócitos, em relação ao grupo controle), efeito abolido pelo pré-tratamento com SNAC (fosforilação de 92,8% e 96%, respectivamente em animais e cardiomiócitos, em relação ao grupo controle). (Figura 11).

Da mesma forma, a transcrição de c-jun, avaliada em 120 minutos após o estímulo com AngII, foi determinada em animal e cultura celular, através do immunoblotting com anticorpo anti c-Jun. Observamos aumento significativo de sua expressão após o estímulo com AngII (fosforilação de 168,3% e 168,8%, respectivamente em animais e cardiomiócitos, em relação ao grupo controle), e redução deste efeito pelo pré-tratamento com SNAC (fosforilação de 127,3% e 116,3%, respectivamente em animais e cardiomiócitos, em relação ao grupo controle). (Figura 12). Desta forma determinamos as modulações negativas do SNAC não só pós-traducionais em c-Jun, mas também transcricionais, nos constituintes do fator de transcrição AP-1.

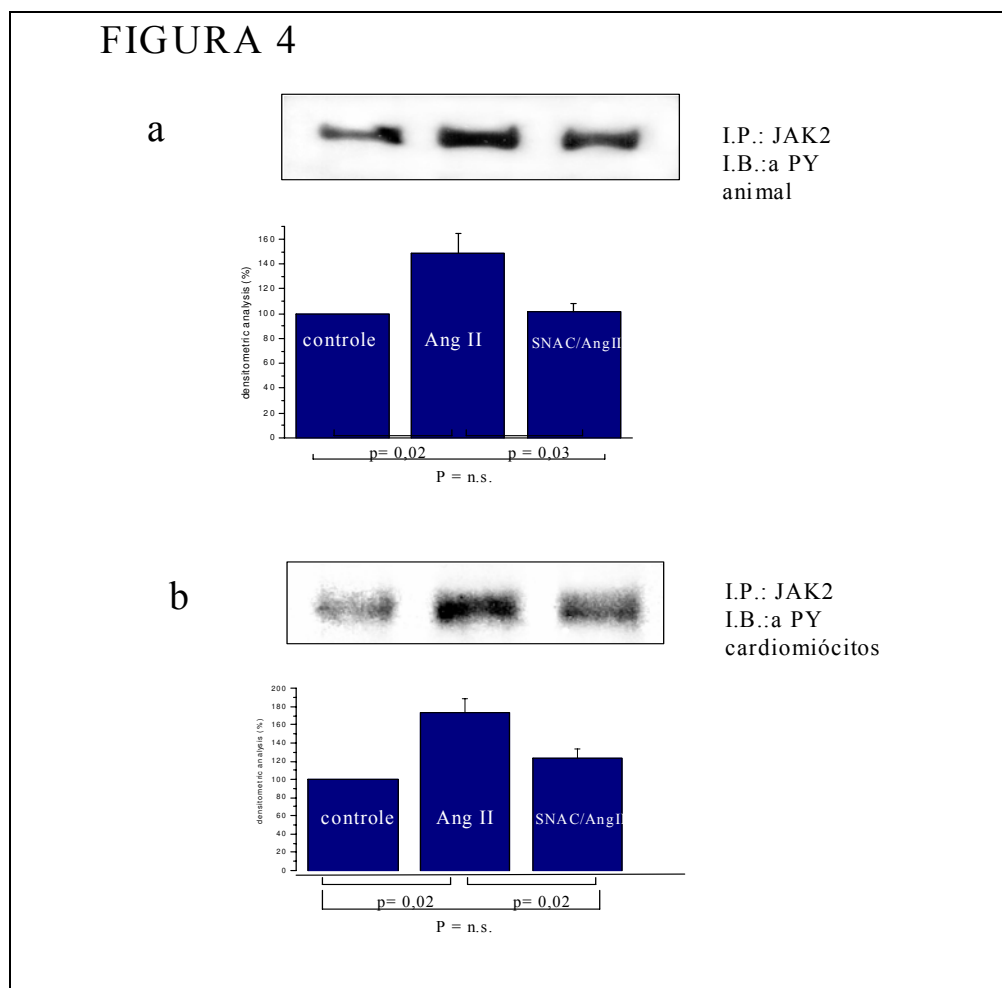


Figura 4 - Amostras de tecido ventricular de ratos (a) e cardiomiócitos de ratos neonatos em cultura de células (b) foram submetidas a imunoprecipitação com anticorpo anti- JAK2 e *immunoblotting* com anticorpo anti-fosfo-tirosina. Os valores obtidos a partir de densitometria óptica das bandas referem-se à porcentagem em relação ao grupo controle, expressos como média de 4 experimentos $\pm$ erro. AngII refere-se ao grupo estimulado com AngII; SNAC/AngII refere-se ao grupo pré-tratado com SNAC e estimulado com AngII. Foi considerado significativo valor de $p < 0,05$. (ANOVA).

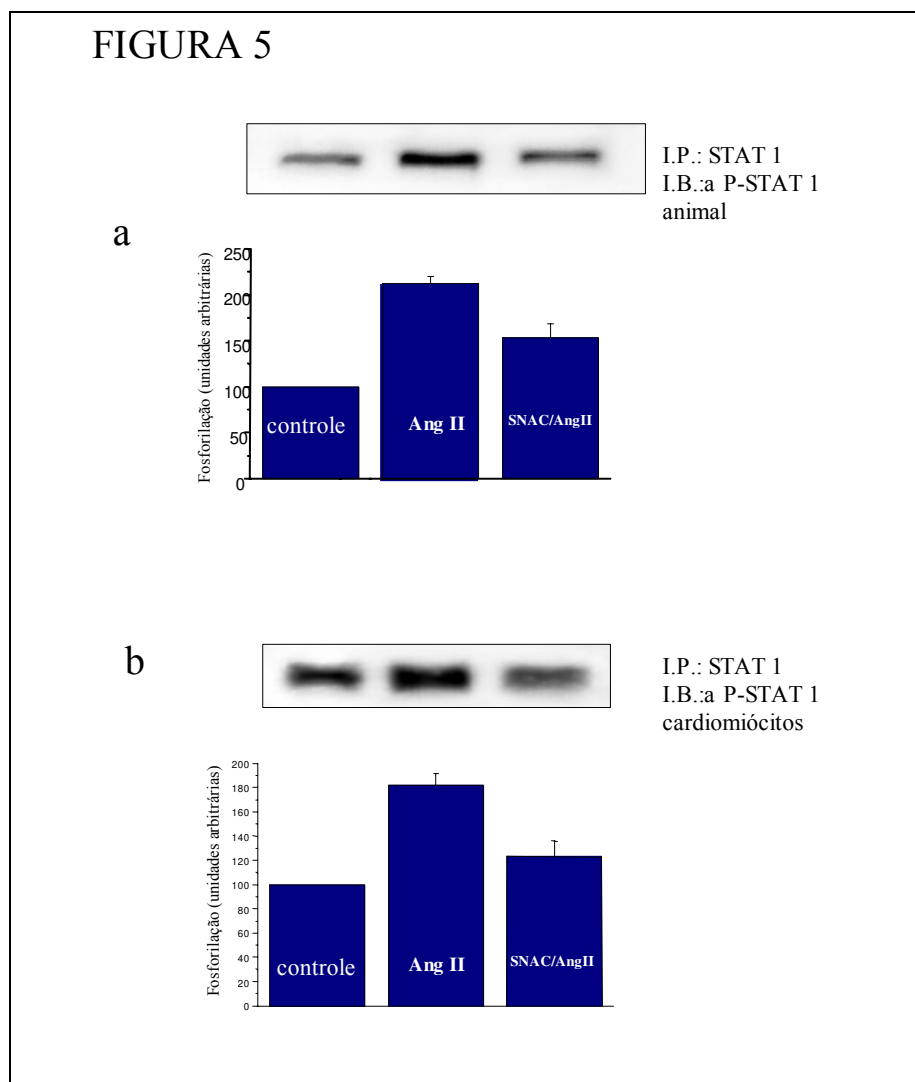


Figura 5 - Amostras de tecido ventricular de ratos (a) e cardiomiócitos de ratos neonatos em cultura de células (b) foram submetidas a imunoprecipitação com anticorpo anti- STAT1 e *immunoblotting* com anticorpo anti-fosfo-STAT1. Os valores obtidos a partir de densitometria óptica das bandas referem-se à porcentagem em relação ao grupo controle, expressos como média de 4 experimentos $\pm$ erro. AngII refere-se ao grupo estimulado com AngII; SNAC/AngII refere-se ao grupo pré-tratado com SNAC e estimulado com AngII. Foi considerado significativo valor de $p < 0,05$. (ANOVA).

FIGURA 6

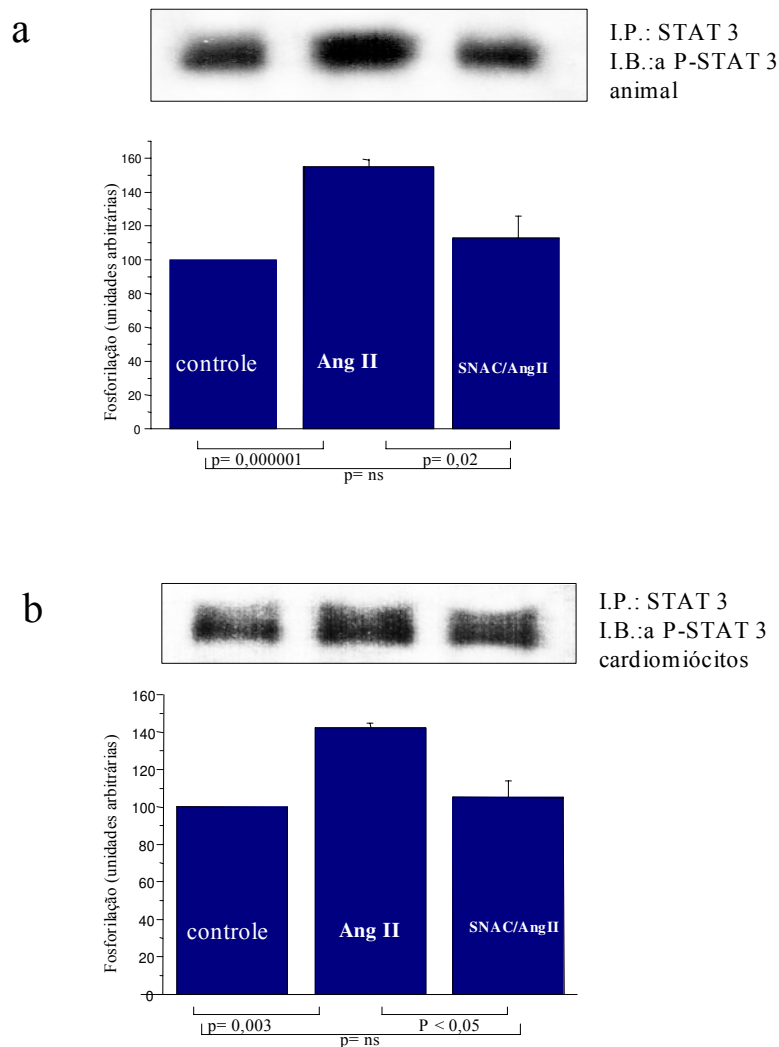


Figura 6 - Amostras de tecido ventricular de ratos (a) e cardiomiócitos de ratos neonatos em cultura de células (b) foram submetidas a imunoprecipitação com anticorpo anti- STAT3 e *immunoblotting* com anticorpo anti-fosfo-STAT3. Os valores obtidos a partir de densitometria óptica das bandas referem-se à porcentagem em relação ao grupo controle, expressos como média de 4 experimentos $\pm$ erro. AngII refere-se ao grupo estimulado com AngII; SNAC/AngII refere-se ao grupo pré-tratado com SNAC e estimulado com AngII. Foi considerado significativo valor de $p < 0,05$. (ANOVA).

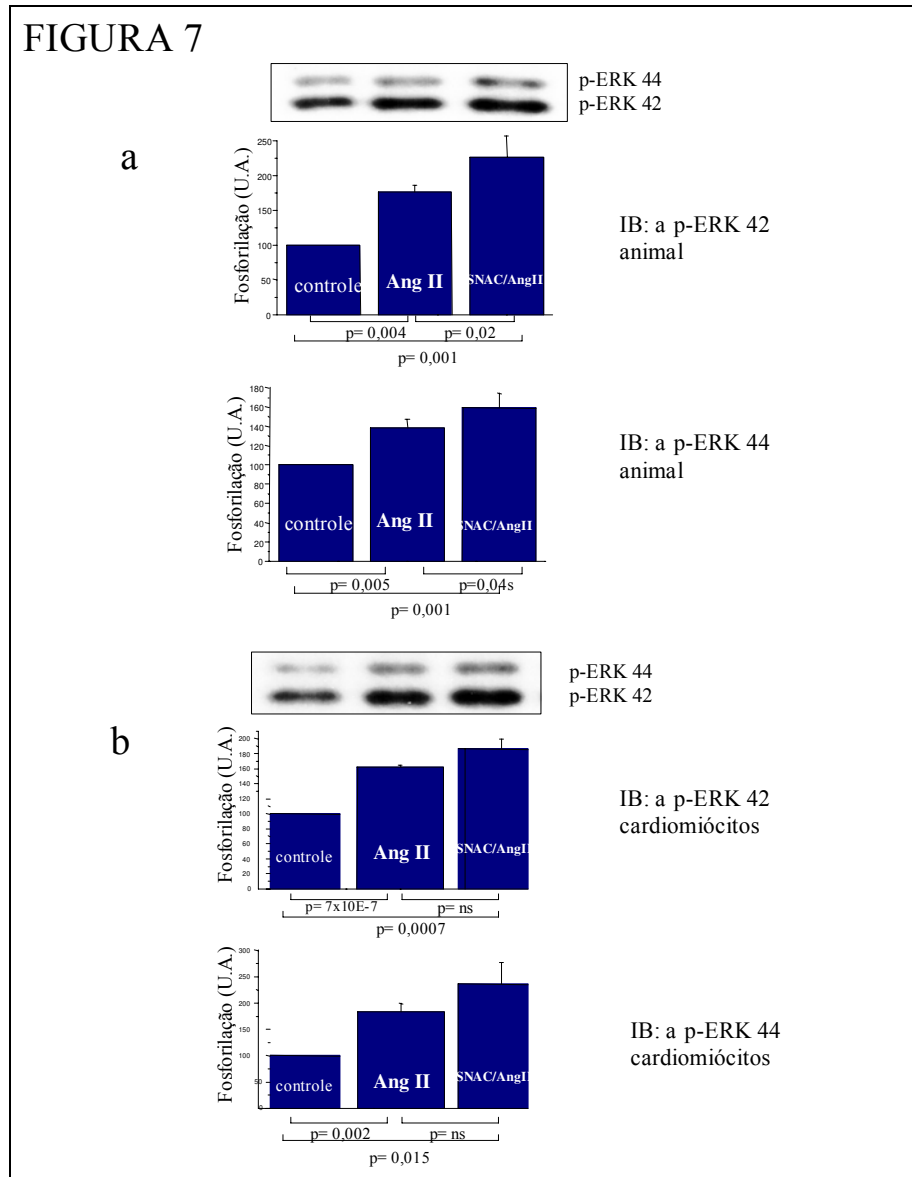


Figura 7 - Amostras de tecido ventricular de ratos (a) e cardiomiócitos de ratos neonatos em cultura de células (b) foram submetidas a *immunoblotting* com anticorpo anti-fosfo-ERK 42/44. Foram realizadas análises independentes para a banda ERK 42 (gráficos superiores) e ERK 44 (gráficos inferiores). Os valores obtidos a partir de densitometria óptica das bandas referem-se à porcentagem em relação ao grupo controle, expressos como média de 4 experimentos $\pm$ erro. AngII refere-se ao grupo estimulado com AngII; SNAC/AngII refere-se ao grupo pré-tratado com SNAC e estimulado com AngII. Foi considerado significativo valor de $p < 0,05$. (ANOVA).

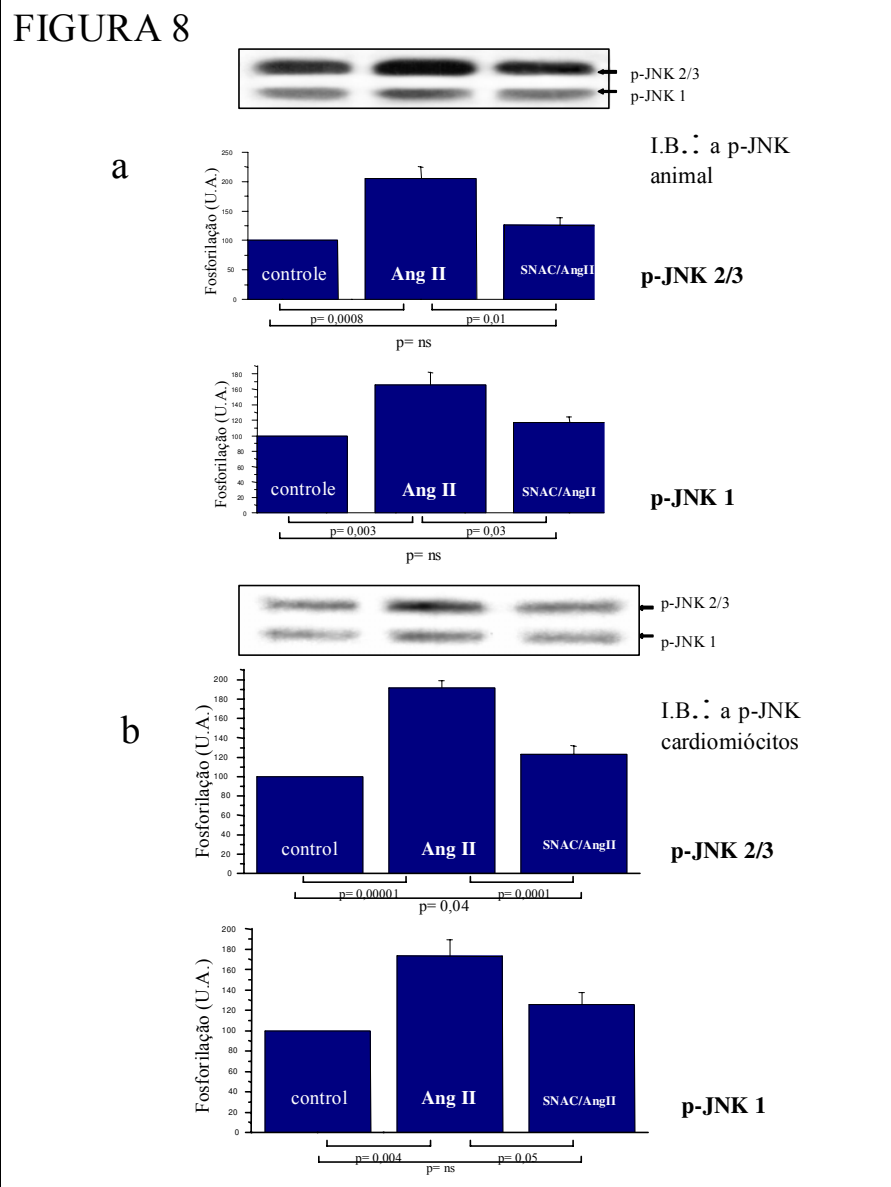


Figura 8 - Amostras de tecido ventricular de ratos (a) e cardiomiócitos de ratos neonatos em cultura de células (b) foram submetidas a *immunoblotting* com anticorpo anti-fosfo-JNK 1/2/3. Foram realizadas análises independentes para a banda JNK 2/3 (gráficos superiores) e JNK 1 (gráficos inferiores). Os valores obtidos a partir de densitometria óptica das bandas referem-se à porcentagem em relação ao grupo controle, expressos como média de 4 experimentos $\pm$ erro. AngII refere-se ao grupo estimulado com AngII; SNAC/AngII refere-se ao grupo pré-tratado com SNAC e estimulado com AngII. Foi considerado significativo valor de $p < 0,05$. (ANOVA).

FIGURA 9

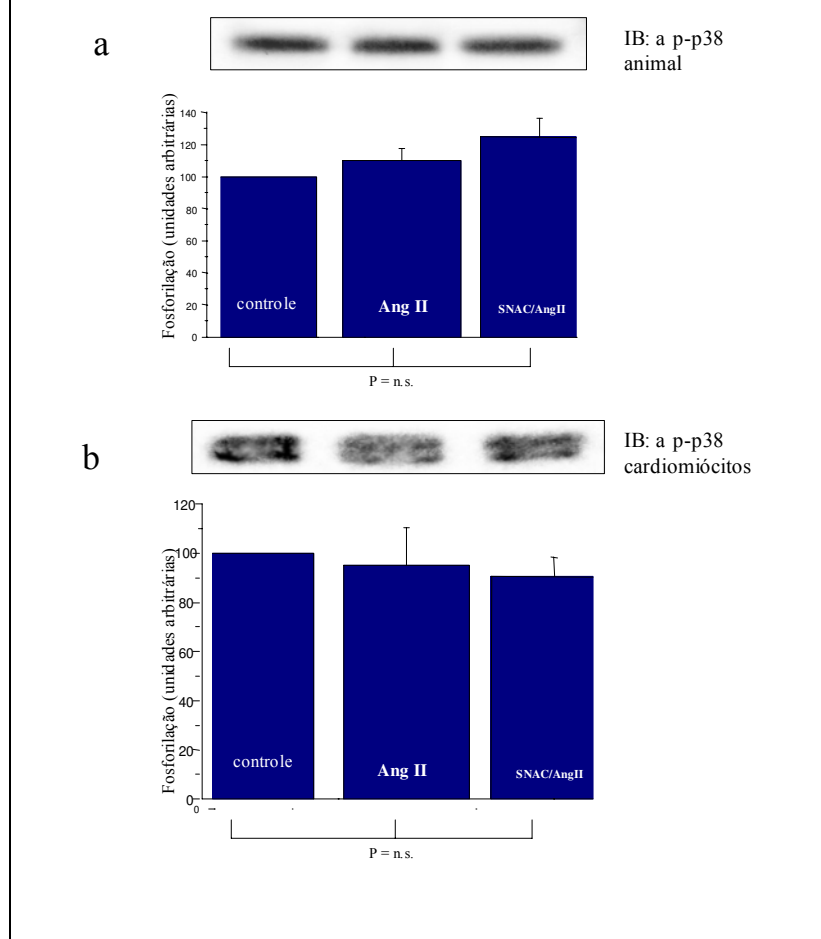


Figura 9 - Amostras de tecido ventricular de ratos (a) e cardiomiócitos de ratos neonatos em cultura de células (b) foram submetidas a *immunoblotting* com anticorpo anti-fosfo-p38 MAPK. Os valores obtidos a partir de densitometria óptica das bandas referem-se à porcentagem em relação ao grupo controle, expressos como média de 6 experimentos $\pm$ erro. AngII refere-se ao grupo estimulado com AngII; SNAC/AngII refere-se ao grupo pré-tratado com SNAC e estimulado com AngII. Foi considerado significativo valor de $p < 0,05$. (ANOVA).

FIGURA 10

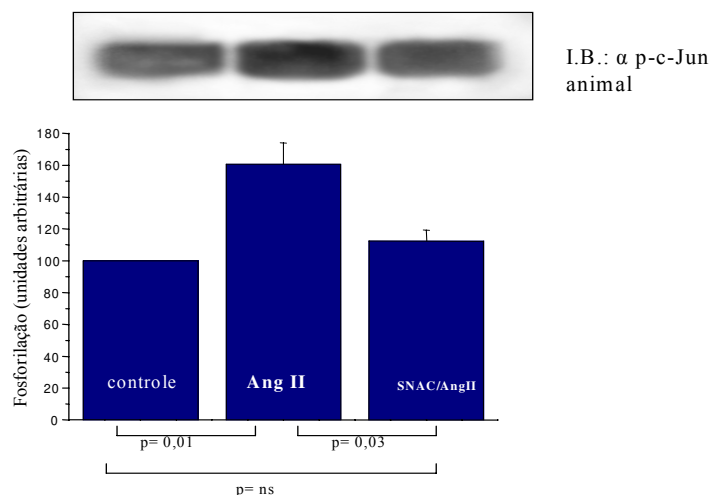


Figura 10 - Amostras de tecido ventricular de ratos foram submetidas a *immunoblotting* com anticorpo anti-fosfo-c-Jun. Os valores obtidos a partir de densitometria óptica das bandas referem-se à porcentagem em relação ao grupo controle, expressos como média de 4 experimentos $\pm$ erro. AngII refere-se ao grupo estimulado com AngII; SNAC/AngII refere-se ao grupo pré-tratado com SNAC e estimulado com AngII. Foi considerado significativo valor de $p < 0,05$. (ANOVA).

FIGURA 11

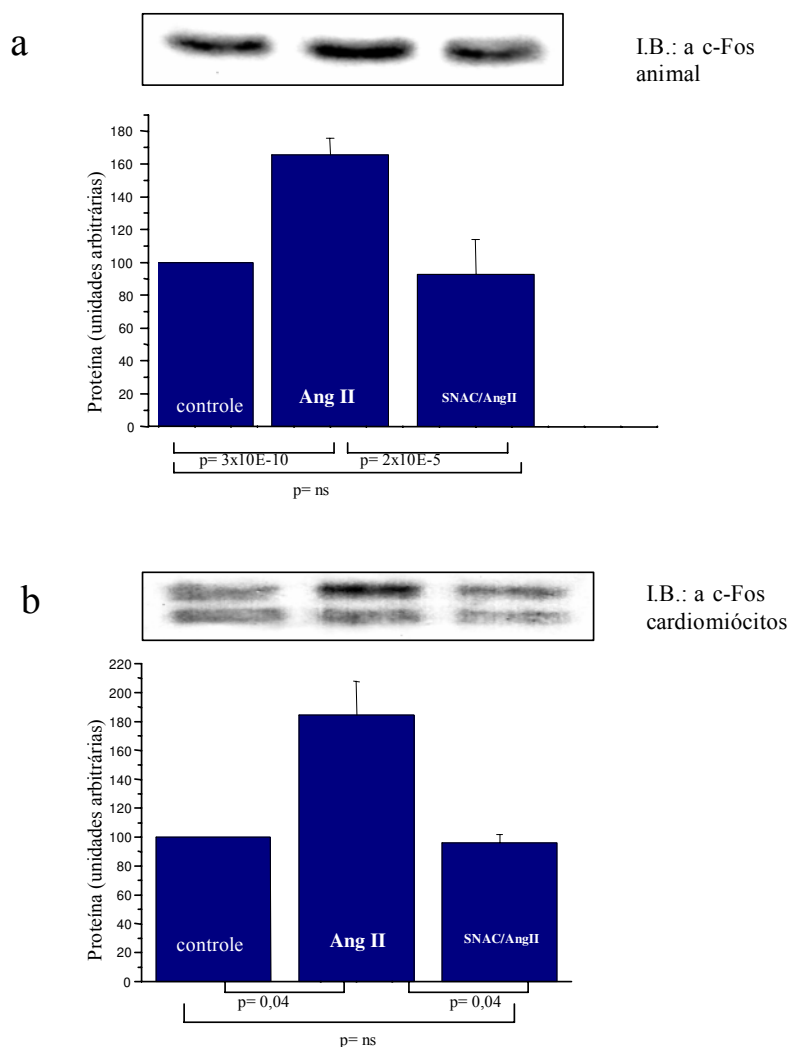


Figura 11 - Amostras de tecido ventricular de ratos (a) e cardiomiócitos de ratos neonatos em cultura de células (b) foram submetidas a *immunoblotting* com anticorpo anti-c-Fos. Os valores obtidos a partir de densitometria óptica das bandas referem-se à porcentagem em relação ao grupo controle, expressos como média de 4 experimentos (cardiomiócitos) e 7 experimentos (animais) $\pm$ erro. AngII refere-se ao grupo estimulado com AngII; SNAC/AngII refere-se ao grupo pré-tratado com SNAC e estimulado com AngII. Foi considerado significativo valor de $p < 0,05$. (ANOVA).

FIGURA 12

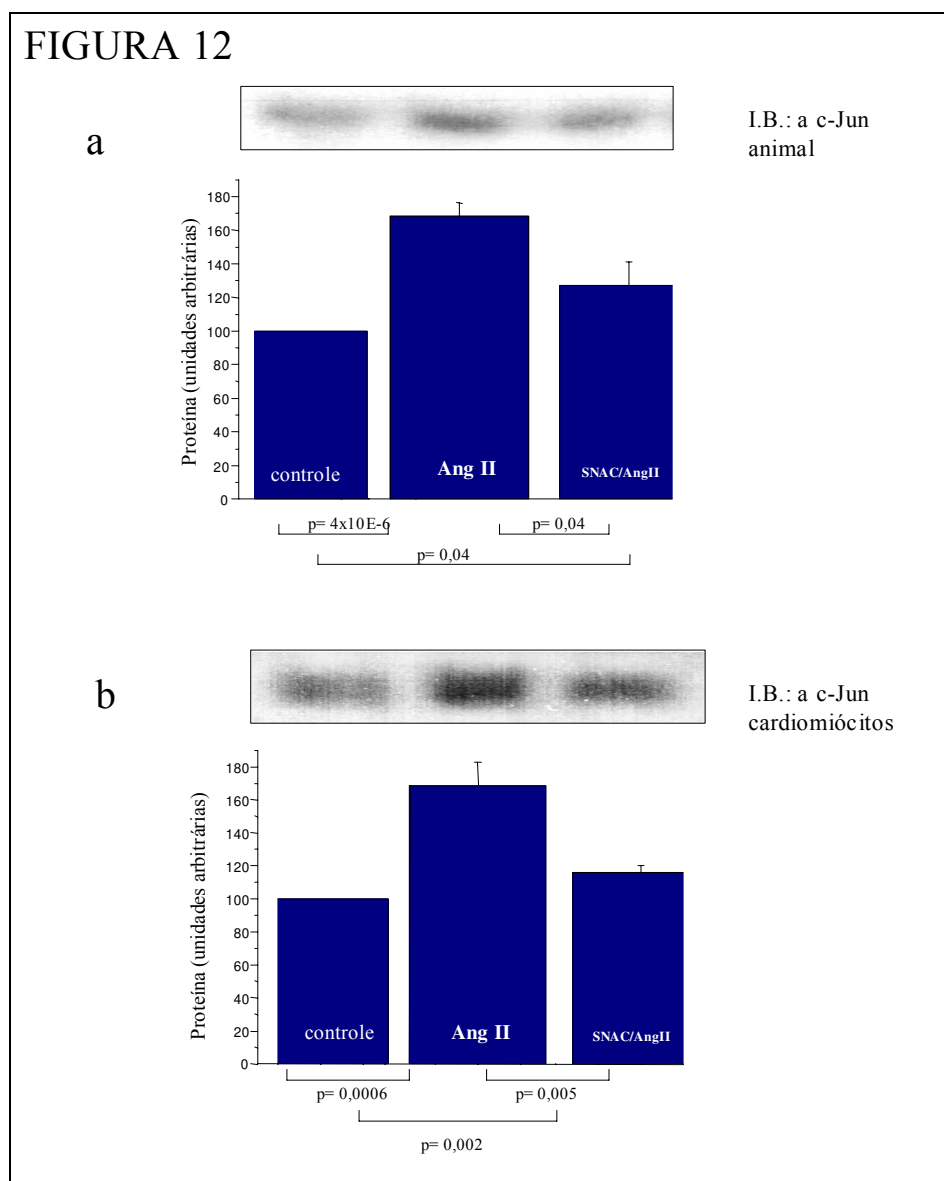


Figura 12 - Amostras de tecido ventricular de ratos (a) e cardiomiócitos de ratos neonatos em cultura de células (b) foram submetidas a *immunoblotting* com anticorpo anti-c-Jun. Os valores obtidos a partir de densitometria óptica das bandas referem-se à porcentagem em relação ao grupo controle, expressos como média de 4 experimentos $\pm$ erro. AngII refere-se ao grupo estimulado com AngII; SNAC/AngII refere-se ao grupo pré-tratado com SNAC e estimulado com AngII. Foi considerado significativo valor de $p < 0,05$. (ANOVA).

Evidências acumuladas durante os últimos anos têm creditado aos S-nitrosotíóis (SNOs) o papel de intermediários fisiológicos do gás radicalar NO. Conforme discutido previamente, as ações fisiológicas do NO devem ser mediadas predominantemente pelos SNOs, devido à maior estabilidade e especificidade destes (STAMLER *et al*, 1992a; SCHARFSTEIN *et al.*, 1994; MANNICK *et al.*, 1999; GASTON *et al.*, 2003; MULLER *et al*, 2002; RICARDO *et al*, 2002). Utilizando células RAW 264.7 tratadas com lipopolissacárides para ativação da NOS indutível, detectou-se a formação de 17.4 +/- 1.0 pmol/mg de proteína de SNOs no meio intracelular, com lento decaimento, ao longo de horas. Sabe-se que a formação de SNOs endógenos é dependente da formação de NO e não de nitrito (ZHANG e HOGG, 2004 a). Também utilizando cultura de células RAW 264.7, acrescentou-se GSNO/L-cistina ao meio (com conseqüente formação de S-nitroso-L-cisteína), o que levou à formação de SNOs intracelulares em níveis muito mais elevados do que os observados pela indução da iNOS (na faixa de nmol/mg de proteína). Quando se procedeu ao mesmo experimento na presença do scavenger de NO oxyMb (100 µM) não se verificou redução da produção de S-nitrosotíóis intracelulares, sugerindo, desta forma, que o uso de S-nitrosotíóis leva à formação de S-nitrosotíóis intracelulares sem a liberação de NO, apenas por reações de transnitrosação, diferindo, neste aspecto, da síntese de NO pelas NOSs (ZHANG e HOGG, 2004 b). S-nitroso albumina é descrita como a forma mais abundante na qual o NO existe em circulação, bem como o maior reservatório plasmático de NO (STAMLER *et al*, 1992b). Já a glutatona é o tiol não protéico mais abundante encontrado endogenamente, e provavelmente o maior reservatório de SNOs (na forma GSNO) de baixo peso molecular (ASKEW *et al*, 1995, RICARDO *et al*, 2002). L-cisteína é a precursora da glutatona, e tem sido descrita como intermediária (na forma S-nitroso-L-cisteína) em várias reações de transnitrosação com outros transportadores de NO (RICARDO *et al*, 2005). N-acetil-L-cisteína (NAC), um produto endógeno da L-cisteína, é também um efetivo precursor e estimulador da síntese de glutatona, e pode ser rapidamente nitrosado, resultando em SNAC (ARUOMA *et al*, 1989). A reação de S-nitrosação de tíóis endógenos é considerada necessária não só para a ação do NO gerado pelas NOSs (IGNARRO *et al*, 1981), como essencial para a ação vasodilatadora de drogas como os nitratos orgânicos (nitroglicerina, mono e dinitrato de isossorbida, entre outros), levando à

formação de nitrosotióis intermediários, o que justifica, ao menos parcialmente, o conhecido fenômeno de tolerância aos nitratos. O uso contínuo de nitratos orgânicos conduz rapidamente à tolerância farmacológica, reversível após um período livre da administração da droga ou por suplementação de compostos sulfidrílicos, particularmente NAC (MEHRA *et al*, 1994). Entende-se que os grupamentos sulfidrílicos dos tióis endógenos, ao sofrer S-nitrosação pelos nitratos orgânicos, com posterior liberação do NO para outros sítios (como a sGC), resultam oxidados e dimerizados, indisponíveis, portanto, para novas reações (STAMLER e LOSCALZO, 1991; ABRAMS, 1991; IGNARRO, 2002). De fato, o fenômeno clássico de tolerância efetivamente não ocorre quando se faz uso prolongado de nitrosotióis em ratos (MILLER *et al*, 2000). HENRY *et al* (1989) investigaram a ação aguda e prolongada do NO, de SNAC e SNAP em anéis isolados de artérias coronárias bovinas. Embora os três compostos tenham levado à resposta de vasodilatação, a duração da mesma com o uso de SNAC foi de duas a três vezes mais prolongada em relação aos outros agentes. Quando se administrou concomitantemente NAC e NO, ou NAC e SNAP, ocorreu redução do pico de efeito e prolongamento da ação, e a análise por cromatografia líquida de alta resolução evidenciou formação de SNAC *in vivo*. Ainda no mesmo estudo, verificou-se que a indução de tolerância à nitroglicerina não impedia a ação do SNAC ou do NO, embora a superperfusão com SNAC tenha levado a um outro tipo de tolerância, de menor relevância, determinada, provavelmente, por atenuação da resposta da guanilato ciclase. Alguns doadores de óxido nítrico, como nitroprussiato de sódio e SNOs de baixo peso molecular, em particular o SNAC, causam vasodilatação prolongada *in vitro* (após remoção da droga por lavagem extensiva) e *in vivo* (após eliminação da droga) (ALENCAR *et al*, 2003a). É improvável que tais efeitos prolongados sejam atribuíveis primariamente à ativação da sGC pelo NO radical, que possui meia-vida biológica muito curta e cuja ligação ao grupamento heme da guanilato ciclase se faz de maneira reversível (BUTLER *et al*, 1995). De fato, tais efeitos prolongados só ocorrem com agentes capazes de promover S-nitrosação de resíduos de cisteína, como é o caso do SNAC e SNAP (confirmado por imunquímica com anticorpo anti s-nitroso-cisteína), mas inexistem com agentes que apenas liberam NO radical, como o óxido de 2-(N,N-dietilamino)-díazenolato (DEA-NO), confirmado por *spin trapping* (ALENCAR *et al*, 2003a ; ALENCAR *et al*, 2003b). Em outro trabalho, a perfusão de ratos com solução de GSNO levou à detecção de

espécies nitrosadas em tecidos (inclusive coração), com apenas moderada elevação dos níveis teciduais de nitrito/nitrato, sugerindo transferência direta de NO^+ sem o envolvimento de NO livre (S-N transnitrosação), ao contrário do observado para o DEA-NO (BRYAN *et al.*, 2004). O mecanismo pelo qual os doadores de NO atravessavam a membrana celular era desconhecido. S-nitrosotiois são drogas que espontaneamente liberam NO^+ e podem ganhar acesso ao compartimento intracelular pela ação catalítica da enzima dissulfito isomerase (csPDI) ligada à membrana celular (Figura 13) e reações de transnitrosação associadas (RAMACHANDRAN *et al.*, 2001).

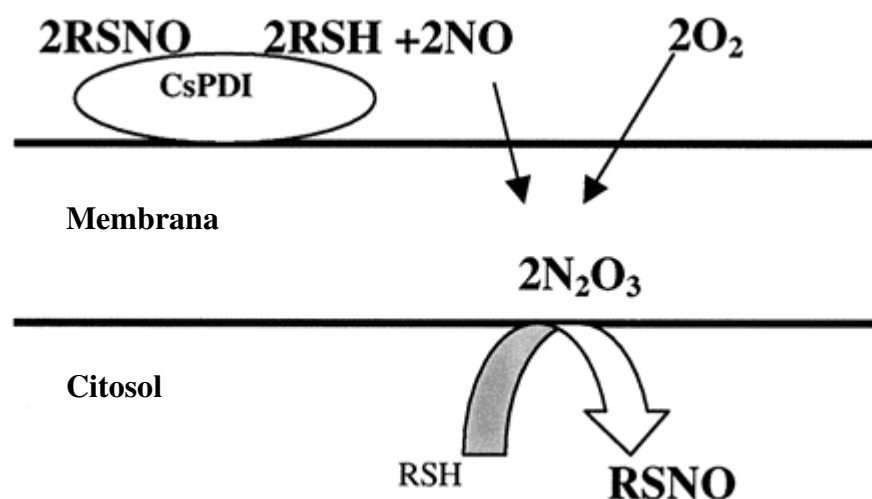


Figura 13 - Transporte trans-membrana celular de SNOs mediado pela csPDI (retirado de RAMACHANDRAN *et al.*, 2001)

Mais recentemente, tem sido descrita a participação do sistema de transporte de L-aminoácidos como importantes mediadores da incorporação de SNOs pelas células. Nessa hipótese, a L-cisteína recebe o aduto NO de um doador de NO (como o GSNO) em uma reação de transnitrosação, e na forma de S-nitroso-L-cisteína é captada do meio extracelular pelos transportadores de L-aminoácidos (particularmente LAT1 e LAT2) e liberada no meio intracelular, onde pode transferir o aduto NO para outras espécies (LI e WHORTON, 2005). O uso deste sistema depende do nitrosotiol utilizado. O efeito do GSNO já é bastante conhecido, bem como a nitrosocisteína. No caso do SNAP, entretanto,

o acréscimo de cistina ao meio celular não aumentou significativamente sua captação, sugerindo que ele não utilize este sistema para liberar adutos NO no interior da célula, talvez por inibir diretamente o sistema de transporte de aminoácidos, como é o caso do glutamato (ZHANG e HOGG, 2004b). Não há dados sobre o SNAC quanto à sua incorporação por este sistema, mas sabe-se que L-cisteína é modificada por vários adutos, como metilmercúrio-cisteína e a própria s-nitroso-L-cisteína, de forma que é bastante provável que o SNAC se utilize deste sistema. O uso do sistema LAT está representado na figura 14.

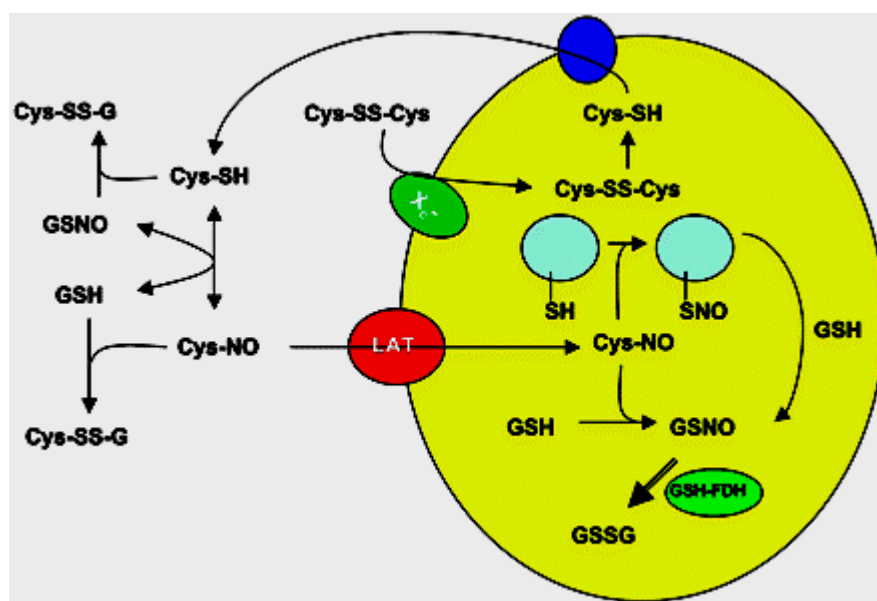


Figura 14 - Modelo de captação de SNO mediado por L-cistina, com utilização do sistema LAT (retirado de ZHANG e HOGG, 2004 b).

Do exposto conclui-se que os agentes S-nitrosantes (termo mais apropriado que doadores de óxido nítrico), representados pelos nitrosotióis de baixo peso molecular, constituem os principais mediadores biológicos das ações do NO.

No presente trabalho, escolhemos usar o SNAC devido à sua solubilidade em água, bem como por ser um nitrosotiol de baixo peso molecular de ocorrência endógena, além de ser o agente de duração mais prolongada. Já o SNAP, principal agente usado em

pesquisas, não é solúvel em meio aquoso e não ocorre naturalmente, além de ter duração de ação mais curta. Embora não possamos excluir totalmente a possibilidade de os efeitos do SNAC por nós observados serem atribuíveis a características próprias deste composto, ou de seus metabólitos (NAC ou NAC dimerizado), a literatura tem evidenciado sistematicamente que os variados efeitos fisiológicos obtidos com SNAC, SNAP ou GSNO, cGMP dependentes ou independentes, são superponíveis e representativos da ação do NO. Conforme discutido por ZHANG e HOGG (2004 b), as mudanças bioquímicas que ocorrem após exposição das células aos S-nitrosotiois são distintas daquelas observadas com NO gerado endogenamente, e não dependem da liberação de NO pelos nitrosotiois. Claramente, os eventos deflagrados ou modulados pelos SNOs não podem ser automaticamente atribuídos à formação de NO. Porém, concluem os autores, SNOs mimetizam vários dos efeitos de sinalização distal mediada pelo NO. Finalizando, entendemos que os resultados por nós observados com o uso do SNAC são representativos da ação intracelular de SNOs, e, portanto, da ativação distal pelo NO. Outro motivo para melhor entender os efeitos celulares dos SNOs é o seu potencial para uso terapêutico em várias situações (IGNARRO *et al*, 2002). Como exemplo podemos citar o estudo que avaliou o efeito hipotensor do SNAC em ratos conscientes (RICARDO *et al*, 2002) que evidenciou, em ratos normotensos e hipertensos por bloqueio da NOS com L-NAME, que o efeito hipotensor do SNAC foi mais potente e prolongado que o do nitroprussiato de sódio, sem o inconveniente deste último, que consiste na geração do metabólito tóxico tiocianato, o que limita seu uso clínico. Evidenciaram, ainda, que o pré-tratamento com azul de metileno (bloqueador da via cGMP dependente), levou a uma pequena atenuação do seu efeito, sugerindo assim, que o SNAC tenha ações cGMP dependentes e independentes.

No presente estudo, evidenciamos alterações evidentes na sinalização celular da AngII em miocárdio de ratos, nas vias JAK/STAT e naquelas envolvendo MAPKs, bem como atenuação da expressão dos I.E. genes c-fos e c-jun e da ativação pós-transcricional de c-Jun por fosforilação, através do pré-tratamento com o SNO SNAC. Os experimentos conduzidos em ratos necessitaram confirmação em cultura de células a fim de evitar interferência de fatores hemodinâmicos, tais como hipotensão, bem como regulação parácrina mediada por fibroblastos ou ativação paralela por catecolaminas liberadas em situação de estresse do animal.

A modulação observada na via JAK/STAT coincide com a expectativa teórica que se depreende da literatura. Conforme discutido previamente, tanto NO como SNOs podem levar à oxidação dos ditióis das JAKs, tornando-as, desta forma, incapazes de sofrer autofosforilação, e, portanto, inativas. Sem a intermediação da JAK2, não é possível a fosforilação das STATS por estímulo da AngII. Assim, os resultados por nós obtidos estão de acordo com a literatura e são coerentes nesta via. A inibição da fosforilação das STAT 1 e 3, por nós observada, não havia sido previamente descrita, bem como a inativação da JAK2 nas condições do nosso experimento (em tecido cardíaco, com estímulo da AngII e pré-tratamento com SNAC).

Quanto aos resultados obtidos na via das MAPKs, faz-se necessária análise individual. A literatura descreve inibição da fosforilação da JNK1 (PARK *et al.* 2000) e da JNK2 (SO *et al.*, 1998) por mecanismo de S-nitrosação, o que é concordante com nossos resultados. Independente de considerações mecanísticas, SMITH *et al.* (2005) demonstraram menor ativação das JNKs em miocárdio de ratos, durante o remodelamento pós infarto (sabidamente mediado pela AngII) pela transferência, por vetor viral, do gene da eNOS. Além disso, o resultado por nós obtido é coerente com a observação, em nosso trabalho, da menor ativação por fosforilação da proteína c-Jun. Este efeito, também inédito na literatura, deve ser decorrente da menor ativação das JNKs, embora não possamos descartar também a participação de modulação direta pelo SNAC em c-Jun, interferindo com sua fosforilação. Com respeito às ERKs 1 e 2, os experimentos conduzidos em animal evidenciaram um aparente paradoxo, já que o pré-tratamento com SNAC levou a exacerbação da fosforilação das mesmas induzida pela AngII. O mesmo resultado foi verificado em cultura de cardiomiócitos, embora sem alcançar significância estatística para o número de experimentos realizados (n=4). Diante da expectativa teórica de inibição da sinalização da AngII pelo NO, e considerando o papel da ERK1 e 2 nesta sinalização, poderíamos esperar que o SNAC inibisse a fosforilação de ERK1 e 2. Entretanto, como citado anteriormente, LANDER *et al.* (1996), demonstraram que tanto SNAP como NO ou nitroprussiato de sódio aumentam a atividade da ERK1/2, da p38MAPK e da JNK, e que tal efeito se deve ao aumento da atividade *upstream* das proteínas Ras (p21ras, Rac1 e Cdc42). Posteriormente, o mesmo autor identificou a S-nitrosação da cisteína 118 da p21ras como o mecanismo ativador da mesma (LANDER *et al.*, 1997). CALLSEN *et al.* (1998),

observaram que a indução de NOS promove ativação bifásica da ERK1/2 (rapidamente, em 5 a 15 minutos) e tardiamente (em 15 a 24 h). No mesmo trabalho pode-se demonstrar que a ativação precoce depende da via cGMP, e a tardia decorre de inativação, por S-nitrosação, de MAPK-fosfatases. Também OLIVEIRA *et al.* (2003), usando doadores de NO em células endoteliais vasculares de coelho, observaram ativação da via p21Ras-Raf-1 kinase-MEK-ERK1/2, dependente de cGMP. Por fim, um mecanismo que pode participar do efeito observado deriva de relações de *cross-talk* com a via JAK/STAT, já que SANDBERG *et al.* (2004) demonstraram que a JAK2, ativada pelo estímulo de AngII, ativa a expressão da MKP-1, que inativa a ERK2 em 30 minutos. Como o uso do SNAC inibiu a ativação da JAK2, disso pode ter resultado uma menor atividade da MKP-1, embora seja discutível se tal efeito já seria perceptível no tempo de 10 minutos. Com relação à ativação distal à ERK, sabe-se que a fosforilação de ERK1 e 2 leva à fosforilação do fator de transcrição Elk-1 (GILLE *et al.*, 1992) que, assim ativado, liga-se ao elemento sérico de resposta (SRE) em um complexo com o fator sérico de resposta (SRF), e o SRE é uma seqüência regulatória que controla a expressão de c-fos (GILLE *et al.*, 1992; MARAIS *et al.*, 1993; BUCHWALTER *et al.*, 2004). Há uma aparente contradição entre este conceito e a constatação, no presente trabalho, de menor expressão de c-fos obtida pelo pré-tratamento com SNAC. Ocorre que a região promotora de c-fos também compreende uma seqüência SIE, ativada por STATs, e a ativação das mesmas foi inibida pelo uso de SNAC. Podemos especular que a maior ligação ao sítio SRE, isoladamente, não seja capaz de aumentar a expressão de c-fos. Mais importante, conforme citado na introdução, também as JNK1 e JNK2 são capazes de fosforilar e ativar o fator complexo ternário/Elk-1, sugerindo seu possível envolvimento na indução de c-fos em determinadas circunstâncias (DENG e KARIN, 1994; CAVIGELLI *et al.*, 1995).

A via Raf-1/MEK/ERK pode ser ativada por vários estímulos hipertróficos, porém há evidências conflitantes na literatura quanto ao papel deste módulo de sinalização. A construção de células transfectadas para expressão ativa de Ras, Raf-1, ou MEK pode induzir atividade transcripcional na região promotora de ANP, β -miosina de cadeia pesada, α -actina esquelética (THORBURN *et al.*, 1993; THORBURN *et al.*, 1994a; THUERAUF e GLEMBOTSKI, 1997). Em contraste, THORBURN *et al.* (1994 b) relataram que o aumento da expressão de Raf-1 ou ERK não é capaz de conduzir à organização sarcomérica

típica da hipertrofia, bem como POST *et al* (1996) verificaram que a inibição farmacológica de MEK não suprimiu a alteração sarcomérica induzida por fenilefrina, nem a expressão de ANP. Tais achados sugerem que a ativação de ERK isoladamente não é suficiente para a indução de hipertrofia miocárdica e que o papel desta via deve ser distinto para cada tipo de estímulo (KODAMA *et al*, 2000). Finalmente, SILBERBACH *et al* (1999), estudando a ação anti-hipertrófica do ANP em cardiomiócitos, encontraram ativação da ERK mediada pela ativação de cGMP como mecanismo anti-hipertrófico do ANP. A hipertrofia induzida por fenilefrina sofreu atenuação pelo ANP. A ERK (mas não a JNK ou p38) foi ativada pela fenilefrina, bem como pelo ANP, e a administração de ambos ao meio de cultura levou a um efeito aditivo, de forma similar ao encontrado no presente trabalho em relação ao efeito aditivo da AngII e SNAC na ativação de ERK. O uso de análogos da cGMP mimetizou a ação do ANP. Depreendemos, assim, que os dados por nós obtidos neste trabalho encontram ressonância na literatura. Com relação à p38, sua ativação pela AngII é dependente de sinalização redox, via geração de superóxido pela NAD(P)H oxidase (WENZEL *et al*, 2001). Como discutido previamente, embora desempenhe um papel no processo de hipertrofia miocárdica, há dúvidas sobre sua relevância neste processo quando por estímulo da AngII. IZUMI *et al* (2000), estudando as fases aguda e crônica de desenvolvimento de hipertrofia miocárdica em ratos SHRSP (*stroke-prone spontaneously hypertensive rats*), comparados a ratos normotensos Wistar-Kyoto (WKY), encontrou ativação apenas da JNK, e não da ERK ou p38. Sabe-se que neste modelo animal existe participação fisiopatológica da AngII, visto que a hipertrofia (e ativação da JNK) são prevenidas pelo bloqueio dos receptores AT1. Embora o resultado do presente trabalho, qual seja, a não ativação de p38 pela AngII (sem modulação pelo uso de SNAC) não encontre respaldo na literatura, tampouco se encontram na literatura evidências inequívocas da ativação da p38 pela AngII em cardiomiócitos. PALM-LEIS *et al* (2004) demonstraram acentuada fosforilação de p-38 estimulada pela AngII, com pico em 2 minutos e duração de até 24 horas, em cardiomiócitos de ratos Sprague-Dawley. Também AOKI *et al* (2000), estimulando cardiomiócitos de ratos Wistar com AngII ou fenilefrina, evidenciaram aumento da fosforilação de p38 pela AngII com início em 2 minutos, pico de ação em 5 minutos e manutenção da ativação por mais de 1 hora, porém a magnitude deste efeito foi muito mais

evidente com estímulo pela fenilefrina, que é o principal ativador da p38. Outros trabalhos foram desenvolvidos com diferentes tecidos ou células, e seus resultados não podem ser generalizados para as condições do presente estudo. Uma possível falha em nosso trabalho poderia ser representada por ativação basal inesperada no grupo controle, por exemplo, por estresse dos animais durante o início do procedimento, antes da anestesia, com ativação adrenérgica. Tal hipótese, entretanto, não explica os resultados obtidos em cultura de cardiomiócitos. Ainda com relação ao papel desempenhado pela ativação de p38 em cardiomiócitos, é interessante citar o trabalho de WANG *et al*(1998b), no qual a ativação simultânea de JNKs pela MKK7 e da p38 pela MKK6 induziu uma resposta citopática com supressão da indução de hipertrofia obtida pela ativação isolada da MKK7/JNK.

Por fim, o resultado por nós encontrado na atividade transcripcional dos I.E. genes c-jun e c-fos são coerentes com os demais resultados, acima discutidos. ZHAN e PAN (2000) já haviam descrito inibição da expressão de c-fos pela AngII através do pré-tratamento de cardiomiócitos com SNAP. Quanto aos dados por nós obtidos em relação à expressão de c-jun, são inéditos na literatura.

O objetivo do presente trabalho foi investigar a modulação do SNAC em etapas iniciais e intermediárias da sinalização da AngII em vias envolvidas no processo de hipertrofia ventricular. Não avaliamos etapas mais tardias, como expressão de proteínas sarcoméricas de padrão fetal ou ANP, nem parâmetros morfológicos ou incorporação de [³H]fenilalanina ou de [³H]leucina. Entretanto, até o nível onde nos propusemos a investigar, os achados são coerentes com uma provável ação anti-hipertrofica mediada pelo SNAC, no modelo estudado. A menor expressão de c-fos e c-jun, bem como menor ativação do último, sugerem menor atividade transcripcional nos sítios de consenso AP1.

CONCLUSÕES

Nas condições experimentais descritas, tanto em miocárdio ventricular como em cardiomiócitos de ratos, podemos concluir:

- A AngII leva ao aumento de fosforilação da JAK2, STAT1 e STAT3, JNKs, ERK1 e 2 e c-Jun, além de aumentar a transcrição de c-jun e c-fos.
- O pré-tratamento com o doador de óxido nítrico SNAC inibe a fosforilação de JAK2, STAT1 e STAT3, JNK1 e 2/3 e de c-Jun, mas promove aumento adicional da fosforilação de ERK1 e 2 promovido pela AngII. O pré-tratamento com SNAC também determina menor transcrição dos I.E. genes c-jun e c-fos. Não houve alteração na fosforilação de p38 com AngII nem com pré-tratamento com SNAC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMS, J. Interactions between organic nitrates and thiol groups. **Am J Med.** 91:106S-12S, 1991.

ALENCAR, J.L.; LOBYSHEVA, I.; CHALUPSKY, K.; GEFFARD, M.; NEPVEU, F.; STOCLET, J.C. S-nitrosating nitric oxide donors induce long-lasting inhibition of contraction in isolated arteries. **J Pharmacol Exp Ther.** 307:152-9, 2003a.

ALENCAR, J.L.; LOBYSHEVA, I.; GEFFARD, M.; SARR, M.; SCHOTT, C.; SCHINI-KERTH, V.B. Role of S-nitrosation of cysteine residues in long-lasting inhibitory effect of nitric oxide on arterial tone. **Mol Pharmacol.** 63:1148-58, 2003b.

ALI, M. S.; SAYESKI, P. P.; DIRKSEN, L. B.; HAYZER, D. J.; MARRERO, M. B.; BERNSTEIN, K. E.- Dependence on the Motif YIPP for the Physical Association of JAK2 Kinase with the Intracellular Carboxyl Tail of the Angiotensin II AT₁ Receptor. **J. Biol. Chem.** 272: 23382-23388, 1997

ALI, M.S.; SAYESKI, P.P.; BERNSTEIN, K.E. - JAK2 Acts as Both a STAT1 Kinase and as a Molecular Bridge Linking STAT1 to the Angiotensin II AT₁ Receptor. **J. Biol. Chem.**, 275: 15586-15593, 2000.

ANGEL, P.; HATTORI, K.; SMEAL, T.; KARIN, M. - The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1. **Cell.**, 55:875-85, 1988.

AOKI, H.; RICHMOND, M.; IZUMO, S.; SADOSHIMA, J. Specific role of the extracellular signal-regulated kinase pathway in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy *in vitro*. **Biochem J.** 347:275-84, 2000.

ARUOMA, O.I.; HALLIWELL, B.; HOEY, B.M.; BUTLER, J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. **Free Radic Biol Med.** 6:593-7, 1989.

ASKEW, S.C.; BUTLER, A.R.; FLITNEY, F.W.; KEMP, G.D.; MEGSON, I.L. Chemical mechanisms underlying the vasodilator and platelet anti-aggregating properties of S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine and S-nitrosoglutathione. **Bioorg Med Chem.** 3:1-9, 1995.

BAKER, K.M.; CHERNIN, M.I.; SCHREIBER, T.; SANGHI, S.; HAIDERZAIDI, S.; BOOZ, G.W.; DOSTAL, D.E.; KUMAR, R. - Evidence of a novel intracrine mechanism in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. **Regul Pept**, 120:5-13, 2004.

BERNSTEIN, K.E.; MARRERO, M.B. - The Importance of Tyrosine Phosphorylation in Angiotensin II Signaling. **Trends Cardiovasc Med** ,6:179-87, 1996.

BHAT, G.J.; THEKKUMUKARA, T.J.; THOMAS, W.G.; CONRAD, K.M.; BAKER, K.M. - Activation of the STAT pathway by angiotensin II in T3CHO/AT1A cells: cross-talk between angiotensin II and interleukin-6 nuclear signaling. **J Biol Chem.** 270:19059-19065, 1995.

BLUME, A.; HERDEGEN, T.; UNGER, T. –Angiotensin peptides and inducible transcription factors. **J. Mol. Med.**, 77: 339-357, 1999.

BLUYSSSEN, H.A.R.; DURBIN, J.E.; LEVY, D.E. - ISGF3gp48, a specificity switch for interferon activated transcription factors. **Cytokine Growth Factor Rev.**,7:11-17, 1996.

BOOZ, G.W. - Putting the brakes on cardiac hypertrophy: exploiting the NO-cGMP counter-regulatory system. **Hypertension**, 45:341-6, 2005.

BOYLE, W.J.; SMEAL, T.; DEFIZE, L.H.K.; ANGEL, P.; WOODGETT, J.R.; KARIN, M. *et al.* – Activation of protein kinase C decreases phosphorylation of c-Jun at sites that negatively regulate its DNA-binding activity. **Cell**, 64: 573-84, 1991.

BRADFORD, M.M. - A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, 72: 248-254, 1976.

BROILLET, M.-C. - A Single Intracellular Cysteine Residue Is Responsible for the Activation of the Olfactory Cyclic Nucleotide-gated Channel by NO. **J Biol Chem**, 275: 15135-41, 2000.

BRYAN, N.S.; RASSAF, T.; MALONEY, R.E.; RODRÍGUEZ, C.M.; SAIJO, F.; RODRIGUEZ, J.R. *et al.* Cellular targets and mechanisms of nitros(yl)ation: an insight into their nature and kinetics *in vivo*. **Proc Natl Acad Sci U S A**.101:4308-13, 2004.

BUCHWALTER, G.; GROSS, C.; WASYLYK, B. - Ets ternary complex transcription factors. **Gene**, 324:1-14, 2004.

BUTLER, A.R.; FLITNEY, F.W.; WILLIAMS, D.L. NO, nitrosonium ions, nitroxide ions, nitrosothiols and iron-nitrosyls in biology: a chemist's perspective. **Trends Pharmacol Sci**. 16:18-22, 1995.

CALDERONE, A.; THAIK, C.M.; TAKAHASHI, N.; CHANG, D.L.; COLUCCI, W.S. - Nitric oxide, atrial natriuretic peptide, and cyclic GMP inhibit the growth-promoting effects of norepinephrine in cardiac myocytes and fibroblasts. **J Clin Invest**, 101:812-8, 1998.

CALEGARI, V.C.; BEZERRA, R.M.; TORSONI, M.A.; TORSONI, A.S.; FRANCHINI, K.G.; SAAD, M.J.; VELLOSO, L.A. - Suppressor of Cytokine Signaling 3 Is Induced by Angiotensin II in Heart and Isolated Cardiomyocytes, and Participates in Desensitization. **Endocrinology**, 144:4586-96, 2003.

CALLSEN, D.; PFEILSCHIFTER, J.; BRUNE, B. Rapid and delayed p42/p44 mitogen-activated protein kinase activation by nitric oxide: the role of cyclic GMP and tyrosine phosphatase inhibition. **J Immunol**. 161:4852-8, 1998.

CAMPS, M.; NICHOLS, A.; ARKINSTALL, S. - Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function. **FASEB J** 14:6-16, 2000.

CAVIGELLI, M.; DOLFI, F.; CLARET, F.X.; KARIN, M. - Induction of c-fos expression through JNK-mediated TCF/Elk-1 phosphorylation. **EMBO J**, 14: 5957-64, 1995.

CHOUKROUN, G.; HAJJAR, R.; FRY, S.; del MONTE, F.; HAQ, S.; GUERRERO, J.L.; PICARD, M.; ROSENZWEIG, A.; FORCE, T. - Regulation of cardiac hypertrophy *in vivo* by the stress-activated protein kinases/ c-junNH(2)-terminal kinases. **J.Clin. Invest.**, 104: 391-398, 1999.

CLANCY, R.M.; LESZCZYNSKA-PIZIAK, J.; ABRAMSON, S.B. - Nitric oxide, an endothelial cell relaxation factor, inhibits neutrophil superoxide anion production via a direct action on the NADPH oxidase. **J Clin Invest**, 90:1116-21, 1992.

COOK, J.L.; BHANDARU, S.; GIARDIAN, J.F.; CALYCOMB, W.C.; RE, R.N. – Identification and antisense inhibition of a renin-angiotensin system in transgenic cardiomyocytes. **Am. J. Physiol.**, 268: H1471-H1482, 1995.

COSO, O.A.; CHIARIELLO, M.; YU, J.C.; TERAMOTO, H.; CRESPO, P.; XU, N.; MIKI, T.; GUTKIND, J.S. – The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. **Cell.**, 81: 1137-1146, 1995.

DANSER, A.H.J.; SARIS, J.J.; SCHUIJT, M.P.; van KATZ, J.P. – Is there a local renin-angiotensin system in the heart? **Cardiovasc. Res.**, 44:252-265, 1999.

DAVIS, R.J.- MAPKs: new JNK expands the group. **Trends Biochem. Sci.**, 19:470–473, 1994.

DENG, T.; KARIN, M. - c-Fos transcriptional activity stimulated by H-Ras-activated protein kinase distinct from JNK and ERK. **Nature**, 371: 171-5, 1994.

DOSTAL, D.E.; ROTHBLUM, K.N.; CHERNIN, M.I.; COOPER, G.R.; BAKER, K.M. – Intracardiac detection of angiotensinogen and renin: a localized renin-angiotensin system in neonatal rat heart. **Am. J. Physiol.**, 263: C838-C850, 1992.

DUHÉ, R.J.; EVANS, G.A.; ERWIN, R.A.; KIRKEN, R.A.; COX, G.W; FARRAR, W.L. - Nitric oxide and thiol redox regulation of Janus kinase activity. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, 95:126-131, 1998.

FENG, J. B.; WHITTHUHN, A.; MATSUDA, T.; KOHLHUBER, F.; KERR, I. M.; IHLE, J. N. - Activation of JAK2 catalytic activity requires phosphorylation of Y1007 in the kinase activation loop. **Mol. Cell. Biol.**, 17: 2497-2501, 1997.

FERRARI, R.; BACHETTI, R.F.; AGNOLETTI, L.; COMINI, L.; CURELLO, S. – Endothelial function and dysfunction in heart failure. **Eur Heart J**, 19 (Suppl G): G41-7, 1998.

FORCE, T.; POMBO, C.M.; AVRUCH, J.A.; BONVENTRE, J.V.; KYRIAKIS, J.M. - Stress-activated protein kinases in cardiovascular disease. **Circ. Res.**, 78:947–953, 1996.

FRANCHINI, K.G.; TORSONI, A.S.; SOARES, P.H.; SAAD, M.J. - Early activation of the multicomponent signaling complex associated with focal adhesion kinase induced by pressure overload in the rat heart. **Circ Res.** 87:558-65, 2000.

FREUND, C.; SCHMIDT-ULLRICH, R.; BAURAND, A.; DUNGER, S.; SCHNEIDER, W.; LOSER, P. *et al.* - Requirement of nuclear factor-kappaB in angiotensin II- and isoproterenol-induced cardiac hypertrophy *in vivo*. **Circulation**, 111:2319-25, 2005.

GASTON, B.M.; CARVER, J.; DOCTOR, A.; PALMER, L. - S-Nitrosylation Signaling in Cell Biology. **Molecular Interventions**, 3:253-63, 2003.

GILLE, H.; SHARROCKS, A.; SHAW, P. – Phosphorylation of p62^{TCF} by MAP Kinase stimulates ternary complex formation at c-Fos promoter. **Nature**, 358: 414-417, 1992.

GLENNON, P.E.; KADDOURA, S.; SALE, E.M.; SALE, G.J.; FULLER, S.J.; SUGDEN, P.H. - Depletion of mitogen-activated protein kinase using an antisense oligodeoxynucleotide approach downregulates the phenylephrine-induced hypertrophic response in rat cardiac myocytes. **Circ. Res.**, 78:954–961, 1996.

GOHLKE, P.; PEES, C.; UNGER, T. - AT2 receptor stimulation increases aortic cyclic GMP in SHRSP by a kinin-dependent mechanism. **Hypertension**, 31: 349–355, 1998.

HAMET, P.; KAISER, M.A.; SUN, Y.; PAGE, V.; VINCENT, M.; KREN, V. *et al.* - HSP27 locus cosegregates with left ventricular mass independently of blood pressure. **Hypertension**, 28:1112-7, 1996.

HARADA, K.; KOMURO, I.; SHIOJIMA, I.; HAYASHI, D.; KUDOH, S.; MIZUNO, T. - Pressure overload induces cardiac hypertrophy in angiotensin II type 1A receptor knockout mice. **Circulation**, 97:1952-9, 1998.

HARE, J.M.; STAMLER, J.S. - NO/redox disequilibrium in the failing heart and cardiovascular system. **J Clin Invest.** 115: 509-17, 2005.

HARPUR, A. G.; ANDREWS, A.-C.; ZIEMIECKI, A.; ASTON, R. R.; AND WILKS, F. F.- JAK2, a third member of the JAK family of protein tyrosine kinases. **Oncogene**, 7: 1347-1353, 1992.

HASSAN, M.A.H.; KETAT, A.F. - Sildenafil citrate increases myocardial cGMP content in rat heart, decreases its hypertrophic response to isoproterenol and decreases myocardial leak of creatine kinase and troponin T. **BMC Pharmacol**, 5:10, 2005.

HENRY, P.J.; DRUMMER, O.H.; HOROWITZ, J.D. S-nitrosothiols as vasodilators: implications regarding tolerance to nitric oxide-containing vasodilators. **Br J Pharmacol**. 98:757-66, 1989.

HOLTWICK, R.; van EICKELS, M.; SKRYABIN, B.V.; BABA, H.A.; BUBIKAT, A.; BEGROW, F. *et al.* - Pressure-independent cardiac hypertrophy in mice with cardiomyocyte-restricted inactivation of the atrial natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A. **J Clin Invest**, 111:1399–1407, 2003.

HOU, J.; KATO, H.; COHEN, R.A.; CHOBANIAN, A.V.; BRECHER, P.- Angiotensin II-induced cardiac fibrosis in the rat is increased by chronic inhibition of nitric oxide synthase. **J Clin Invest.**, 96:2469-2477, 1995.

HUANG, X.C.; DENG, T.; SUMNERS, C. - Angiotensin II stimulates activation of Fos-regulating kinase and c-Jun NH2-terminal kinase in neuronal cultures from rat brain. **Endocrinology**, 139:245-51, 1998.

ICHIKI, T.; USUI, M.; KATO, M.; FUNAKOSHI, Y.; ITO, K.; EGASHIRA, K. *et al.* - Downregulation of angiotensin II type 1 receptor gene transcription by nitric oxide. **Hypertension**, 31:342-8, 1998.

IGNARRO, L.J.; LIPPTON, H.; EDWARDS, J.C.; BARICOS, W.H.; HYMAN, A.L.; KADOWITZ, P.J. *et al.* Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. **J Pharmacol Exp Ther**. 218:739-49, 1981.

IGNARRO, L.J. After 130 years, the molecular mechanism of action of nitroglycerin is revealed. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 99:7816-7, 2002.

IGNARRO, L.J.; NAPOLI, C.; LOSCALZO, J. Nitric oxide donors and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide: an overview. **Circ Res**. 90:21-8, 2002.

IHLE, J.N. – Cytokine receptor signalling. **Nature.**, 337: 591-594, 1995.

IZUMI, Y.; KIM, S.; ZHAN, Y.; NAMBA, M.; YASUMOTO, H.; IWAO, H. - Important Role of Angiotensin II-Mediated c-Jun NH₂-Terminal Kinase Activation in Cardiac Hypertrophy in Hypertensive Rats. **Hypertension.**, 36: 511- 524 , 2000.

IZUMI, Y.; KIM, S.; MURAKAMI, T.; YAMANAKA, S.; IWAO, H. – Cardiac mitogen-activated protein kinase activities are chronically increased in stroke-prone hypertensive rats. **Hypertension.**, 31: 50-56, 1998.

IZUMIYA, Y.; KIM, S.; IZUMI, Y.; YOSHIDA, K.; YOSHIYAMA, M.; MATSUZAWA, A. *et al.* - Apoptosis signal-regulating kinase 1 plays a pivotal role in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and remodeling. **Circ Res**, 93:874-83, 2003.

IZUMO, S.; NADAL-GINARD, B.; MAHDAVI, V. –Protooncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 85: 339-343, 1988.

KACIMI, R.; GERDES, A.M. - Alterations in G protein and MAP kinase signaling pathways during cardiac remodeling in hypertension and heart failure. **Hypertension**, 41:968-772003.

KALLUNKI, T.; SU, B.; TSIGELNY, I.; SLUSS, H.K.; DÉRIJARD, B.; MOORE, G., *et al.* – JNK2 contains a specificity-determining region responsible for efficient c-Jun binding and phosphorylation. **Genes & Dev**, 8: 2996-3007, 1994.

KARIN, M. – The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. **J Biol Chem**, 28: 16483-6, 1995.

KIM, N.N.; VILLARREAL, F.J.; PRINTZ, M.P.; LEE, A.A.; DILLMANN, W.H. - Trophic effects of angiotensin II on neonatal rat cardiac myocytes are mediated by cardiac fibroblasts. **Am J Physiol**. 269:E426-37, 1995.

KLOSS, S.; FURNEAUX, H.; MULSCH, A. - Post-transcriptional regulation of soluble guanylyl cyclase expression in rat aorta. **J Biol Chem**, 278:2377-83, 2003.

KODAMA, H.; FUKUDA, K.; PAN, J.; SANO, M.; TAKAHASHI, T.; KATO, T. *et al.* - Significance of ERK cascade compared with JAK/STAT and PI3-K pathway in gp130-mediated cardiac hypertrophy. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 279:H1635-44, 2000.

KOJIMA, M.; SHIOGIMA, I.; YAMAZAKI, T.; KOMURO, I.; ZOU, Z.; WANG, Y. *et al.* - Angiotensin II receptor antagonist TCV-116 induces regression hypertensive left ventricular hypertrophy *in vivo* and inhibits the intracellular signaling pathway of stretch-mediated cardiomyocyte hypertrophy *in vitro*. **Circulation.**, 89: 2204-2221, 1994.

KOMURO, I.; KURABAIYASHI, M.; TAKAKU F.; YAZAKI, Y. -Expression of cellular oncogenes in myocardium during the developmental stage and pressure-overload hypertrophy of the heart. **Circ. Res.**, 62: 1075-1079, 1988.

KOREN, M.J.; DEVEREUX, R.B.; CASALE, P.N.; SAVAGE, D.D.; LARAGH, J.H. - Relation of left ventricular mass and geometry to morbidity and mortality in uncomplicated essential hypertension. **Ann. Intern. Med.**, 114: 345-352, 1991.

KUDOH, S.; KOMURO, I.; HIROI, Y.; ZOU, Y.; HARADA, K.; SUGAYA, T., *et al.* - Mechanical stretch induces hypertrophic responses in cardiac myocytes of angiotensin II type 1a receptor knockout mice. **J Biol Chem.**, 273:24037-43, 1998.

KUNISADA, K.; HIROTA, H.; FUJIO, Y.; MATSUI, H.; TANI, Y.; YAMAUCHI-TAKIHARA, K. *et al.* - Activation of JAK-STAT and MAP kinases by leukemia inhibitory factor through gp130 in cardiac myocytes. **Circulation**, 94:2626-32, 1996.

KYRIAKIS, J.M.; AVRUCH, J.- Sounding the alarm: protein kinase cascades activated by stress and inflammation. **J Biol Chem.**, 271:24313–24316, 1996.

LANDER, H.M.; JACOVINA, A.T.; DAVIS, R.J.; TAURAS, J.M. - Differential activation of mitogen-activated protein kinases by nitric oxide-related species. **J Biol Chem**, 271:19705-9, 1996.

LANDER, H.M.; HAJJAR, D.P.; HEMPSTEAD, B.L.; MIRZA, U.A.; CHAIT, B.T.; CAMPBELL, S. *et al.* - A molecular redox switch on p21(ras). Structural basis for the nitric oxide-p21(ras) interaction. **J Biol Chem**, 272:4323-6, 1997.

LANE, P.; HAO, G.; GROSS, S.S. - S-nitrosylation is emerging as a specific and fundamental posttranslational protein modification: head-to-head comparison with O-phosphorylation. **Sci STKE**, 86:RE1, 2001.

LEAMAN, D.W.; PISHARODY, S.; FLICKINGER, T.W.; COMMANE, M.A.; SCHLESSINGER, J.; KERR, I.M. *et al.* - Roles of JAKs in activation of STATs and stimulation of c-fos gene expression by epidermal growth factor. **Mol Cell Biol**, 16: 369-75, 1996.

LI, S.; WHORTON, A.R. Identification of stereoselective transporters for S-nitroso-L-cysteine: role of LAT1 and LAT2 in biological activity of S-nitrosothiols. **J Biol Chem**. 280:20102-10, 2005.

LIANG, Q.; DE WINDT, L. J.; WITT, S. A.; KIMBALL, T. R.; MARKHAM, B. E.; MOLKENTIN, J. D. - The transcription factors GATA4 and GATA6 regulate cardiomyocyte hypertrophy *in vitro* and *in vivo*. **J Biol Chem**, 276: 30245-53, 2001.

LIU, Y.H.; WANG, D.; RHALEB, N.E.; YANG, X.P.; XU, J.; SANKEY, S.S. *et al.* - Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase protects the heart against cardiac remodeling in mice with heart failure resulting from myocardial infarction. **J Card Fail**, 11:74-81, 2005.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. - Protein measurement with the folin phenol reagent. **J Biol Chem**, 193: 265-275, 1951.

LOWY, D.R.; WILLUMSEN, B.M. - Function and regulation of RAS. **Ann. Rev. Biochem.**, 62: 851-891, 1993.

MA, P.; CUI, X.; WANG, S.; ZHANG, J.; NISHANIAN, E.V.; WANG, W. *et al.* - Nitric oxide post-transcriptionally up-regulates LPS-induced IL-8 expression through p38 MAPK activation. **J Leukoc Biol**, 76:278-87, 2004.

- MANNICK, J.; HAUSLADEN, A.; LIU, L.; HESS, D.; ZENG, M.; MIAO, Q. *et al.* - Fas-induced caspase denitrosylation. **Science**, 284: 651– 4, 1999.
- MARAIS, R.; WYNNE, J.; TREISMAN, R. – The SRF accessory protein ELS-1 contains a growth factor regulated transcription domains. **Cell**, 73: 381-93, 1993.
- MARINISSEN, M.J.; CHIARIELLO, M.; PALLANTE, M.; GUTKIND, J.S. - A network of mitogen-activated protein kinases links G protein-coupled receptors to the c-jun promoter: a role for c-Jun NH2-terminal kinase, p38s, and extracellular signal-regulated kinase 5. **Mol Cell Biol**, 19:4289-301, 1999.
- MARSHALL, H.E.; MERCHANT, K.; STAMLER, J.S. - Nitrosation and oxidation in the regulation of gene expression. **FASEB J**, 14:1889-900, 2000.
- McBRIDE, K.; CHARRON, F.; LEFEBVRE, C.; NEMER, M. - Interaction with GATA transcription factors provides a mechanism for cell-specific effects of c-Fos. **Oncogene**, 22: 8403-12, 2003.
- McMULLEN, M.E.; BRYANT, P.W.; GLEMBOTSKI, C.C.; VINCENT, P.A.; PUMIGLIA, K.M. - Activation of p38 has opposing effects on the proliferation and migration of endothelial cells. **J Biol Chem**. 2005 Mar 24; [Epub ahead of print]
- MEHRA, A.; SHOTAN, A.; OSTRZEGA, E.; HSUEH, W.; VASQUEZ-JOHNSON, J.; ELKAYAM, U. Potentiation of isosorbide dinitrate effects with N-acetylcysteine in patients with chronic heart failure. **Circulation**. 89:2595-600, 1994.
- MICHEL, T.; FERON, O. - Nitric oxide synthases: Which, where, how and why? **J. Clin. Invest** 100:2146-52, 1997.
- MILLER, M.R.; ROSEBERRY, M.J.; MAZZEI, F.A.; BUTLER, A.R.; WEBB, D.J.; MEGSON, I.L. Novel S-nitrosothiols do not engender vascular tolerance and remain effective in glyceryltrinitrate-tolerant rat femoral arteries. **Eur J Pharmacol**. 408:335-43, 2000.
- MINDEN, A.; LIN, A.; CLARET, F.X.; ABO, A.; KARIN, M. – Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. **Cell.**, 81: 1147-1157, 1995.

MIYATA, S.; HANEDA,T.; OSAKI, J.;KIKUCHI,K. – Renin-angiotensin system in stretch-induced hypertrophy of cultured neonatal rat heart cells. **Eur J Pharmacol**, 307: 81-88, 1996.

MOLLNAU, H.; WENDT, M.; SZOCS, K.; LASSEGUE, B.; SCHULZ, E.; OELZE, M. *et al.* - Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. **Circ Res**, 90: E58–E65, 2002.

MONJE, P.; MARINISSEN, M.J.; GUTKIND, J.S. - Phosphorylation of the carboxyl-terminal transactivation domain of c-Fos by extracellular signal-regulated kinase mediates the transcriptional activation of AP-1 and cellular transformation induced by platelet-derived growth factor. **Mol Cell Biol**, 23:7030-43, 2003.

MULLER, B.; KLESCHYOV, A.L.; ALENCAR, J.L.; VANIN, A.F.; STOCLET, J.C. Nitric oxide transport and storage in the cardiovascular system. **Ann NY Acad Sci**. 912: 131-139, 2002.

NAKAGAMI, H.; TAKEMOTO, M.; LIAO, J.K. - NADPH oxidase-derived superoxide anion mediates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. **J Mol Cell Cardiol**, 35:851-9, 2003.

NADAL-GINARD, B.; MAHDAVI, V. – Molecular basis of cardiac performance: plasticity of myocardium generated through protein isoform switches. **J. Clin. Invest.**, 84: 1693-1700, 1989.

NADRUZ, W. JR; KOBARG, C.B.; KOBARG, J.; FRANCHINI, K.G.- c-Jun is regulated by combination of enhanced expression and phosphorylation in acute-overloaded rat heart. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 286:H760-7, 2004.

NADRUZ, W. JR.; CORAT, M.A.; MARIN, T.M.; GUIMARÃES PEREIRA, G.A., FRANCHINI, K.G. - Focal adhesion kinase mediates MEF2 and c-Jun activation by stretch: Role in the activation of the cardiac hypertrophic genetic program. **Cardiovasc Res**. 2005 Jun 13; [Epub ahead of print]

NATHAN, C.; XIE, Q. – Regulation of biosynthesis of nitric oxide. **J Biol Chem**, 269: 13725-8, 1994.

NISHIDA, E.; GOTOH, Y. - The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways. **Trends Biochem Sci.**,18:128–131, 1993.

OLIVEIRA, C.J.; SCHINDLER, F.; VENTURA, A.M.; MORAIS, M.S.; ARAI, R.J.; DEBBAS, V. *et al.* - Nitric oxide and cGMP activate the Ras-MAP kinase pathway-stimulating protein tyrosine phosphorylation in rabbit aortic endothelial cells. **Free Radic Biol Med**, 35:381-96, 2003.

OLZINSKI, A.R.; McCAFFERTY, T.A.; ZHAO, S.Q.; BEHM, D.J.; EYBYE, M.E.; MANISCALCO, K; *et al.* - Hypertensive target organ damage is attenuated by a p38 MAPK inhibitor: role of systemic blood pressure and endothelial protection. **Cardiovasc Res**, 66:170-8, 2005.

OPIE, L.H. – Mechanisms of cardiac contraction and relaxation. *in* **Heart disease – a textbook of cardiovascular medicine (Brauwald E, Zipes DP, Libby P) 6th edition**: 443-78, 2001.

PALM-LEIS, A.; SINGH, U.S.; HERBELIN, B.S.; OLSOVSKY, G.D.; BAKER, K.M.; PAN, J. Mitogen-activated protein kinases and mitogen-activated protein kinase phosphatases mediate the inhibitory effects of all-trans retinoic acid on the hypertrophic growth of cardiomyocytes. **J Biol Chem**. 279:54905-17, 2004.

PAN, J.; FUKUDA, K.; KODAMA, H.; MAKINO, S.; TAKAHASHI, T.; SANO, M.; HORI, S.; OGAWA, S. - Role of Angiotensin II in Activation of the JAK/STAT Pathway Induced by Acute Pressure Overload in the Rat Heart. **Circ Res.**;81:611-617, 1997.

PARK, H.S.; HUH, S.H.; KIM, M.S.; LEE, S.H.; CHOI, E.J. - Nitric oxide negatively regulates c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase by means of S-nitrosylation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 97: 14382-14387, 2000.

PARKER, T.G.; SCHNEIDER, M.D. – Peptide growth factors can provoke “fetal” contractile protein gene expression in rat cardiac myocytes. **J. Clin. Invest.**, 85: 507-514, 1990.

PEARSON, G.; ROBINSON, F.; GIBSON, T.B.; XU, B.E.; KARANDIKAR, M.; BERMAN, K. *et al.* - Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions. **Endocr Rev** 22: 153–183, 2001.

PHILLIPS, H.J. Dye exclusion tests for cell viability. In: **Tissue culture**: Methods and applications (ed. P.F. KRUSE, JR E M.K. PATENSON, JR.), New York, Academic Press, 1973, p. 406-8.

PIKKARAINEN, S.; TOKOLA, H.; MAJALAHTI-PALVIAINEN, T.; KERKELA, R.; HAUTALA, N.; BHALLA, S.S. - GATA-4 is a nuclear mediator of mechanical stretch-activated hypertrophic program. **J Biol Chem**, 278: 23807-16, 2003.

PILZ, R.B.; CASTEEL, D.E. - Regulation of Gene Expression by Cyclic GMP. **Circ Res**, 93:1034-46, 2003.

POST, G.R.; GOLDSTEIN, D.; THUERAUF, D.J.; GLEMBOTSKI, C.C.; BROWN, J.H. Dissociation of p44 and p42 mitogen-activated protein kinase activation from receptor-induced hypertrophy in neonatal rat ventricular myocytes. **J Biol Chem** 271: 8452-7, 1996.

PRAMANIK, R.; QI, X.; BOROWICZ, S.; CHOUBEY, D.; SCHULTZ, R.M.; HAN, J.; *et al.* - p38 isoforms have opposite effects on AP-1-dependent transcription through regulation of c-Jun. The determinant roles of the isoforms in the p38 MAPK signal specificity. **J Biol Chem**, 278: 4831-9, 2003.

RAMACHANDRAN, N.; ROOT, P.; JIANG, X.M.; HOGG, P.J.; MUTUS, B. Mechanism of transfer of NO from extracellular S-nitrosothiols into the cytosol by cell-surface protein disulfide isomerase. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 98:9539-44, 2001.

RE, R.N. - Intracellular renin and the nature of intracrine enzymes. **Hypertension**, 42:117-22, 2003.

RITCHIE, R.H.; SCHIEBINGER, R.J.; LAPOINTE, M.C.; MARSH, J.D. - Angiotensin II-induced hypertrophy of adult rat cardiomyocytes is blocked by nitric oxide. **Am J Physiol**, 275:H1370-4, 1998.

ROBINSON, M.J.; COBB, M.H. - Mitogen-activated protein kinase pathways. **Curr Opin Cell Biol**, 9:180-6, 1997.

RUWHOF C, VAN DER LAARSE A. - Mechanical stress-induced cardiac hypertrophy: mechanisms and signal transduction pathways. **Cardiovasc Res**, 47: 23-37, 2000.

SAAVEDRA, W.F.; PAOLOCCI, N.; ST JOHN, M.E.; SKAF, M.W.; STEWART, G.C.; XIE, J.S. *et al.* - Imbalance between xanthine oxidase and nitric oxide synthase signaling pathways underlies mechanoenergetic uncoupling in the failing heart. **Circ Res**, 90:297-304, 2002.

SADOSHIMA, J.; IZUMO, S. - Mechanical stretch rapidly activates multiple signal transduction pathways in cardiac myocytes: potential involvement of an autocrine/paracrine mechanism. **EMBO J**, 12:1681–1692, 1993 (b)

SADOSHIMA, J.; IZUMO, S. – Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT₁ receptor subtype. **Circ Res**, 73: 413-423, 1993.(a)

SADOSHIMA, J.; XU, Y.; SLAYTER, H.S.; IZUMO, S. – Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes. **Cell**, 75: 977-984, 1993.

SAITO, S.; HIRATA, Y.; EMORI, T.; IMAI, T.; MARUMO, F. - Angiotensin II activates endothelial constitutive nitric oxide synthase via AT₁ receptors. **Hypertens Res**, 19: 201–206, 1996.

SANCHEZ, I.; HUGHES, T.R.; MAYER, J.B.; YEE, K.; WOODGETT, R.J.; AVRUCH, J.; KYRIAKIS, M.J.; ZON, I.L. – Role of SAPK/ERK kinase-1 in the stress-activated pathway regulating transcription factor c-Jun. **Nature.**, 372: 794-798, 1994.

SANDBERG, E.M.; MA, X.; VONDERLINDEN, D.; GODENY, M.D.; SAYESKI, P.P.- JAK2 tyrosine kinase mediates angiotensin II-dependent inactivation of ERK2 via induction of mitogen-activated protein kinase phosphatase 1. **J Biol Chem**. 279:1956-67, 2004.

SANO, M.; FUKUDA, K.; SATO, T.; KAWAGUCHI, H.; SUEMATSU, M.; MATSUDA, S. *et al.* - ERK and p38 MAPK, but not NF-kappaB, are critically involved in reactive oxygen species-mediated induction of IL-6 by angiotensin II in cardiac fibroblasts. **Circ Res**, 89: 661-9, 2001.

SCHARFSTEIN, J.S.; KEANEY JR, J.F.; SLIVKA, A.; WELCH, G.N.; VITA, J.A.; STAMLER, J.S. *et al.* - *In vivo* transfer of nitric oxide between a plasma protein-bound reservoir and low molecular weight thiols. **J Clin Invest**. 94: 1432-9, 1994.

SCHERRER-CROSBIE, M.; ULLRICH, R.; BLOCH, K.D.; NAKAJIMA, H.; NASSERI, B.; ARETZ, H.T. *et al.* - Endothelial nitric oxide synthase limits left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. **Circulation**. 104:1286-91, 2001.

SCHINDLER, C.; DARNELL, J.D.J.- Transcriptional responses to polypeptide ligands: The JAK/STAT pathway. **Annu. Rev. Biochem.**, 64:621-651, 1995.

SERNERI, G.G.; MODESTI, P.A.; BODDI, M.; CECIONI, I.; PANICCIA, R.; COPPO, M.; GALANTI, G.; SIMONETTI, I.; VANNI, S.; PAPA, L.; BANDINELLI, B.; MIGLIORINI, A.; MODESTI A, MACCHERINI M, SANI G, TOSCANO M. - Cardiac growth factors in human hypertrophy. Relations with myocardial contractility and wall stress. **Circ. Res.**, 85: 57-67, 1999.

SESHIAH, P.N.; WEBER, D.S.; ROCIC, P.; VALPPU, L.; TANIYAMA, Y.; GRIENDLING, K.K. - Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. **Circ Res**, 91: 406-13, 2002.

SHENG, M.; DOUGAN, S.T.; MCFADDEN, G.; GREENBERG, M.E. - Calcium and growth factor pathways of c-fos transcriptional activation require distinct upstream regulatory sequences. **Mol Cell Biol**. 8:2787-96, 1988.

SILBERBACH, M.; GORENC, T.; HERSHBERGER, R.E.; STORK, P.J.; STEYGER, P.S.; ROBERTS, C.T. Jr. - Extracellular Signal-regulated Protein Kinase Activation Is Required for the Anti-hypertrophic Effect of Atrial Natriuretic Factor in Neonatal Rat Ventricular Myocytes. **J Biol Chem**, 274: 24858-64, 1999.

SMIT, L. S.; MEYER, D. J.; BILLESTRUP, N.; NORSTEDT, G.; SCHWARTZ, J.; CARTER-SU, C. - The role of the growth hormone (GH) receptor and JAK1 and JAK2 kinases in the activation of Stats 1, 3, and 5 by GH. **Mol. Endocrinol.**,5:519-533, 1996.

SMITH, R.S. Jr; AGATA, J.; XIA, C.F.; CHAO, L.; CHAO, J. - Human endothelial nitric oxide synthase gene delivery protects against cardiac remodeling and reduces oxidative stress after myocardial infarction. **Life Sci**, 76:2457-7, 2005.

SO, H.S.; PARK, R.K.; KIM, M.S.; LEE, S.R.; JUNG, B.H.; CHUNG, S.Y. *et al.* - Nitric oxide inhibits c-Jun N-terminal kinase 2 (JNK2) via S-nitrosylation. **Biochem Biophys Res Commun** 247:809-13, 1998.

STAHL, N.; FARRUGGEL, T. J.; BOULTON, T. G.; ZHONG, Z.; DARNELL, J. E., JR.; ANCOPOULOS, G. D. - Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. **Science**, 267: 1349-1353, 1995.

STAMLER, J.S.; LOSCALZO, J. The antiplatelet effects of organic nitrates and related nitroso compounds *in vitro* and *in vivo* and their relevance to cardiovascular disorders. **J Am Coll Cardiol**. 18:1529-36, 1991.

STAMLER, J.S.; SIMON, D.I.; OSBORNE, J.A.; MULLINS, M.E.; JARAKI, O.; MICHEL, T. *et al.* S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 89:444-8, 1992a.

STAMLER, J.S.; JARAKI, O.; OSBORNE, J.; SIMON, D.I.; KEANEY, J.; VITA, J. *et al.* Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 89:7674-7, 1992b.

STARR, R.; HILTON, D.J. – Negative regulation of the JAK/STAT pathway. **BioEssays**, 21: 47-52, 1999.

STAWOWY, P.; GOETZE, S.; MARGETA, C.; FLECK, E.; GRAF K - LPS regulate ERK1/2-dependent signaling in cardiac fibroblasts via PKC-mediated MKP-1 induction. **Biochem Biophys Res Commun**, 303:74-80, 2003.

SUGDEN, P.H.; CLERK, A. - 'Stress-responsive' mitogen-activated protein kinases (c-Jun N-terminal kinases and p38 mitogen-activated protein kinases) in the myocardium. **Circ. Res.**, 83:345–352, 1998.

SUHASINI, M.; LI, H.; LOHMANN, S.M.; BOSS, G.R.; PILZ, R.B.- Cyclic-GMP-dependent protein kinase inhibits the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway. **Mol Cell Biol**, 18: 6983–94, 1998.

SUMIYO, K.; KOMURO, I.; MIZUNO, T.; YAMAZAKI, T.; ZOU, Y.; SHIOGIMA, I.; TAKEKOSHI, N.; YAZAKI, Y. – Angiotensin II stimulates c-Jun NH₂-terminal kinase in cultured cardiac myocytes of neonatal rats. **Circ. Res.** 80: 139-146, 1997.

SUN, J.; XIN, C.; EU, J.; STAMLER, J.; MEISSNER, G. - Cysteine-3635 is responsible for skeletal muscle ryanodine receptor modulation by NO. **Proc Natl Acad Sci USA**, 98: 11158– 62, 2001.

TAKAHASHI, T.; YASUHIRO, K.; MASANORI, O.; HIKARU, U.; AKIRA, T.; MITSUHIRO, Y. - Angiotensin II Stimulates Mitogen-activated Protein Kinases and Protein Synthesis by a Ras-independent Pathway in Vascular Smooth Muscle Cells. **J Biol Chem**, 272: 16018–16022, 1997.

TAKAYA, S.; NAKAFUKU, M.; KAZIRO, Y. – Function of Ras as a molecular switch in signal transduction. **J. Biol. Chem.** 267: 24149-24152.

TAKIMOTO, E.; CHAMPION, H.C.; LI, M.; BELARDI, D.; REN, S.; RODRIGUEZ, E.R. *et al.* - Chronic inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase 5A prevents and reverses cardiac hypertrophy. **Nat Med**, 11:214-22, 2005.

TAKIZAWA, T.; GU, M.; CHOBANIAN, A.V.; BRECHER, P. - Effect of Nitric Oxide on DNA Replication Induced by Angiotensin II in Rat Cardiac Fibroblasts. **Hypertension**, 30:1035-1040, 1997.

TAMBASCIA, R.C.; FONSECA, P.M.; CORAT, P.D.; MORENO, H. Jr; SAAD, M.J.; FRANCHINI, K.G. - Expression and distribution of NOS1 and NOS3 in the myocardium of angiotensin II-infused rats. **Hypertension**, 37:1423-8, 2001.

TANAKA, Y.; TAMURA, K.; KOIDE, Y.; SAKAI, M.; TSURUMI, Y.; NODA, Y. *et al.* - The novel angiotensin II type 1 receptor (AT1R)-associated protein ATRAP downregulates AT1R and ameliorates cardiomyocyte hypertrophy. **FEBS Lett**, 579:1579-86, 2005.

TANOS, T.; MARINISSEN, M.J.; LESKOW, F.C.; HOCHBAUM, D.; MARTINETTO, H.; GUTKIND, J.S. *et al.* - Phosphorylation of c-Fos by members of the p38 MAPK family. Role in the AP-1 response to UV light. **J Biol Chem**, 280:18842-52, 2005.

TENHUNEN, O.; SARMAN, B.; KERKELA, R.; SZOKODI, I.; PAPP, L.; TOTH, M. *et al.* - Mitogen-activated protein kinases p38 and ERK 1/2 mediate the wall stress-induced activation of GATA-4 binding in adult heart. **J Biol Chem**, 279: 24852-60, 2004.

THORBURN, A.; THORNBURN, J.; CHEN, S.Y.; POWERS, S.; SHUBEITA, H.E.; FERAMISCO, J.R.; CHIEN, K.R. - HRas-dependent pathways can activate morphological and genetic markers of cardiac muscle cell hypertrophy. **J. Biol. Chem.** 268: 2244-2249, 1993.

THORBURN, J.; MCMAHON, M.; THORBURN, A. Raf-1 kinase activity is necessary and sufficient for gene expression changes but not sufficient for cellular morphology changes associated with cardiac myocyte hypertrophy. **J Biol Chem** 269: 30580-6, 1994a.

THORBURN, J.; FROST, J.A.; THORBURN, A. Mitogen-activated protein kinases mediate changes in gene expression, but not cytoskeletal organization associated with cardiac muscle cell hypertrophy. **J Cell Biol** 126: 1565-72, 1994b .

THUERAUF, D.J.; GLEMBOTSKI, C.C. Differential effects of protein kinase C, Ras, and Raf-1 kinase on the induction of the cardiac B-type natriuretic peptide gene through a critical promoter-proximal M-CAT element. **J Biol Chem** 272: 7464-72, 1997.

TIAN, J.; KARIN, M. - Stimulation of Elk1 Transcriptional Activity by Mitogen-activated Protein Kinases Is Negatively Regulated by Protein Phosphatase 2B (Calcineurin). **J Biol Chem**, 274: 15173-80, 1999.

TIMMERMANS, P. B.; WONG, P. C.; CHIU, A. T.; HERBLIN, W. F.; BENFIELD, P.; CARINI, D. J.; LEE, R. J.; WEXLER, R. R.; SAYE, J. A. M.; SMITH, R. D. - Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. **Pharmacol. Rev.** 45: 205-251, 1993.

TORSONI, A.S.; CONSTANCIO, S.S.; NADRUZ, W. JR.; HANKS, S.K.; FRANCHINI, K.G. - Focal adhesion kinase is activated and mediates the early hypertrophic response to stretch in cardiac myocytes. **Circ Res.** 93:140-7, 2003.

TOWBIN, H.; SRAEHLIN, J.; GORDON, J. - Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets, procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 76: 4350-4354, 1979.

van WAMEL, A.J.; RUWHOF, C.; van der VALK-KOKSHOM, L.E.; SCHRIER, P.I.; van der LAARSE, A. - The role of angiotensin II, endothelin-1 and transforming growth factor-beta as autocrine/paracrine mediators of stretch-induced cardiomyocyte hypertrophy. **Mol Cell Biochem.** 218:113-24, 2001.

WANG, X.; BRUDERER, S.; RAFI, Z.; XUE, J.; MILBURN, P.J.; KRAMER, A. *et al.* - Phosphorylation of splicing factor SF1 on Ser20 by cGMP-dependent protein kinase regulates spliceosome assembly. **EMBO J**, 18:4549-59, 1999.

WANG, Y.; HUANG, S.; SAH, V.P. - Cardiac muscle hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family. **J Biol Chem**, 273: 2161-8, 1998a.

WANG, Y.; SU, B.; SAH, V.P.; BROWN, J.H.; HAN, J.; CHIEN, K.R. Cardiac hypertrophy induced by mitogen-activated protein kinase kinase 7, a specific activator for c-Jun NH₂-terminal kinase in ventricular muscle cells. **J Biol Chem**, 273: 5423-6, 1998b.

WEBER, D.S.; ROCIC, P.; MELLIS, A.M.; LAUDE, K.; LYLE, A.N.; HARRISON, D.G. *et al.* - Angiotensin II-induced hypertrophy is potentiated in mice overexpressing p22phox in vascular smooth muscle. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 288:H37-42, 2005.

WENZEL, S.; TAIMOR, G.; PIPER, H.M.; SCHLUTER, K.D. Redox-sensitive intermediates mediate angiotensin II-induced p38 MAP kinase activation, AP-1 binding activity, and TGF-beta expression in adult ventricular cardiomyocytes. **FASEB J.** 15:2291-3, 2001.

WIDMANN,C.; GIBSON, S.; JARPE, B.; JOHNSON, G.I. – Mitogen-activationprotein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. **Physiol. Rev.**, 79: 143-180, 1999.

WINSTON, L.A.; HUNTER, T. - JAK2, Ras, and Raf are required for activation of extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase by growth hormone. **J Biol Chem**, 270:30837-40, 1995.

WOLLERT, K.C.; FIEDLER, B.; GAMBARYAN, S.; SMOLENSKI, A.; HEINEKE, J.; BUTT, E. *et al.* - Gene transfer of cGMP-dependent protein kinase I enhances the antihypertrophic effects of nitric oxide in cardiomyocytes. **Hypertension**. 39:87-92, 2002.

WU, Z.; WU, J.; JACINTO, E.; KARIN, M.- Molecular cloning and characterization of human JNKK2, a novel Jun NH2-terminal kinase-specific kinase. **Mol Cell Biol**, 17: 7407-16, 1997.

YAMAZAKI, T.; KOMURO, I.; KUDOH, S.; ZOU, Y.; SHIOJIMA, I.; MIZUNO, T.; TAKANO, H.; HIROI, Y.; UEKI, K.; TOBE, K.; KADOWAKI, T.; NAGAI, R.; YAZAKI, Y. – Mechanical stress activates protein kinase cascade of phosphorylation in neonatal rat cardiac myocytes. **J. Clin. Invest.**, 96: 438-446, 1995.

YAN, C.; KIM, D.; AIZAWA, T.; BERK, B.C. - Functional interplay between angiotensin II and nitric oxide: cyclic GMP as a key mediator. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 23:26-36, 2003.

YANG, E.; LERNER, L.; BESSER, D.; DARNELL, J.E.Jr. - Independent and cooperative activation of chromosomal c-fos promoter by STAT3. **J Biol Chem**, 278:15794-9, 2003.

YANO, M.; KIM, S.; IZUMI, Y.; YAMANAKA, S.; IWAO, H. - Differential activation of cardiac c-jun amino-terminal kinase and extracellular signal-regulated kinase in angiotensin II-mediated hypertension. **Circ Res**, 83: 752-60, 1998.

ZECHNER, D.; THUERAUF, D.J.; HANFORD, D.S.; McDONOUGH, P.M.; GLEMBOTSKI, C.G. – A role for the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in myocardial cell growth, sarcomeric organization, and cardiac-specific gene expression. **J. Cell. Biol.**, 139: 115-127, 1997.

ZHAN, C.D.; PAN, J.Y. – Nitric oxide inhibits the expression of proto-oncogene c-fos induced by angiotensin II and endothelin-1 in cardiomyocytes. **Sheng Li Xue Bao**, 52: 450-454, 2000.

ZHANG, P.; WANG, Y.Z.; KAGAN, E.; BONNER, J.C. - Peroxynitrite targets the epidermal growth factor receptor, Raf-1, and MEK independently to activate MAPK. **J Biol Chem**, 275: 22479-86, 2000.

ZHANG, Y.;HOGG, N. Formation and stability of S-nitrosothiols in RAW 264.7 cells. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**. 287:L467-74, 2004a.

ZHANG, Y.;HOGG, N. The mechanism of transmembrane S-nitrosothiol transport. **Proc Natl Acad Sci U S A**.101:7891-6, 2004b.

ZHONG, Z.; WEN, Z.; DARNELL, J.E., Jr. - Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. **Science** 264: 95-8, 1994.

ZOU, Y.; AKAZAWA, H.; QIN, Y.; SANO, M.; TAKANO, H.; MINAMINO, T., *et al.* - Mechanical stress activates angiotensin II type 1 receptor without the involvement of angiotensin II. **Nat Cell Biol**.,6:499-506, 2004.

ANEXO

Elsevier Editorial System(tm) for Nitric Oxide

Manuscript Draft

Manuscript Number: NOX-05-194

Title: The Nitric Oxide Donnor S-Nitroso-N-Acetylcysteine Modulates Angiotensin II
Signal Transduction on a Pathway Specific Fashion

Article Type: Regular Article

Section/Category:

Keywords: Heart, Signal Transduction, Hypertension

Corresponding Author: Dr. Licio Velloso, MD, PhD

Corresponding Author's Institution: State University of Campinas

First Author: Fernando G de Oliveira, MD, PhD

Order of Authors: Fernando G de Oliveira, MD, PhD; Vivian C Calegari; Marcelo G de
Oliveira, PhD; Licio Velloso, MD, PhD

Manuscript Region of Origin:

The Nitric Oxide Donor S-Nitroso-N-Acetylcysteine is a Pathway-Specific modulator of Angiotensin II Signal Transduction

Fernando G. de Oliveira¹, Vivian C. Calegari¹, Marcelo G. de Oliveira², Lício A. Velloso¹

1 Department of Internal Medicine, State University of Campinas, UNICAMP, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brazil

2 Institute of Chemistry, State University of Campinas, UNICAMP, C.P. 6154, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brazil

Address all correspondence to:

Licio A. Velloso

DCM – FCM – UNICAMP

13083-970, Campinas SP

Brazil

lavelloso@fcm.unicamp.br

Abstract

Angiotensin II (Ang II) plays an important role in the genesis of cardiac hypertrophy. Much of the growth stimulus delivered by Ang II depends on the activation of intracellular signaling through members of the mitogen-activated-protein kinase (MAPK) and Janus kinase (JAK) family of signal transducers. Pharmacological agents that act as nitric oxide (NO) donors are currently under intense investigation for their beneficial roles in clinical conditions that produce cardiac hypertrophy. Here, we evaluated the ability of *S*-nitroso Nacetylcysteine (SNAC) in modulating Ang II signal transduction through members of the MAPK family and through JAK2/STAT-1 and STAT-3 in heart and isolated cardiomyocytes of rats. SNAC significantly reversed Ang II activation of the JAK2/STAT-1 and -3 signaling in heart and cardiomyocytes. In summary, the treatment of living rats and isolated cardiomyocytes with a potent NO donor affects Ang II signal transduction on a pathway specific manner resulting in the modulation of early inducible gene expression. These results provide evidence for a direct effect of SNAC upon Ang II signal transduction. The anti-hypertrophic property of this class of drugs is discussed on a molecular basis.

Introduction

Myocardial hypertrophy is a response to hemodynamic overload and is an outcome of several clinical conditions. More than an adaptation that precedes cardiac failure, it represents an independent risk factor for cardiac morbidity and mortality [1]. Angiotensin II (Ang II) is known to play an important role in this pathophysiological process [2, 3]. By signaling mostly through the AT1 receptor, Ang II can activate distinct signaling pathways that modulate cell growth. Two important pathways that connect Ang II signaling to growth are the mitogen-activated protein kinase (MAPK) and the Janus associated kinase/signal transducer and activator of transcription (JAK/STAT) pathways. The early genetic response to Ang II in cardiac myocytes includes the transcription of a number of immediate early (IE) genes, such as *c-fos*, *c-myc*, *c-jun*, and early growth response gene-1 (Egr-1) [4]. C-jun N-terminal kinase (JNK), extracellular signal-regulated kinase (ERK), and p38 are subfamilies of the MAPK family of serine/threonine kinases that participate on Ang II induced gene expression [5]. In parallel, activation of STAT1 and STAT3 by Ang II is also capable of inducing early gene expression [6,7].

Nitric oxide (NO), generated by cell type-specific NO synthases (NOSs), has classically been characterized as a freely diffusible intercellular messenger that functions in target cells to subserve NOS-dependent signaling [8]. There is a large body of evidence regarding the functional interaction between Ang II and NO, determined by the mutual regulation of Ang II and NO signaling pathways at different levels [9]. Indeed, NO may act as an important counter-regulatory agent of the Ang II actions. NO-based modification of proteins is associated to the S-nitrosation of cysteine residues as well as to the coordination of NO to heme groups (nitrosilation) [10]. More than a hundred proteins of all classes are substrates for S-nitrosation and the ubiquitous effects exerted by NO in cells are conveyed in large part by this mechanism of protein regulation [11]. The thiol groups of cysteine residues of proteins can be S-nitrosated by NO in the presence of dioxygen (O₂). However, in vivo, the most probable mechanism involved is transnitrosation, where NO can be transferred from the SNO moiety of a low molecular mass peptide (or of a protein) to the thiol moiety of the target protein. S-nitrosothiols (RSNOs) have already been identified as endogenous NO carriers and donors in mammals and may be involved in NO signal

transduction pathways [12, 13]. Among them, S-nitroso-*N*-acetylcysteine (SNAC) is a spontaneous NO donor with confirmed vasodilator activity [14-16]. In this work, we demonstrate that SNAC modulates Ang II signal transduction through the JAK/STAT and MAPK signaling pathways in the heart and isolated cardiomyocytes of rats.

Materials and Methods

Animals. Male Wistar rats, 1–2 days old for cardiomyocyte preparation or 6-8 weeks old (150-200 g) for the remaining experiments, from the State University of Campinas Animal Breeding Center were used in the experiments. The adult rats were allowed access to standard rodent chow and water *ad libitum*. Food was withdrawn 12 h before the experiments. Rats were anesthetized by i.p. injection of sodium amobarbital (15 mg/kg body weight), and the experiments were initiated after the loss of corneal and pedal reflexes. All experiments were conducted according to the principles and procedures described by NIH Guidelines for the Care and Use of Experimental Animals and were approved by the State University of Campinas Ethical Committee.

Antibodies and chemicals. Mouse monoclonal anti-phospho-JNK (Thr-183; Tyr- 185) (sc 6254)1, anti-JNK1 (sc-1648), anti-phospho-c-jun (Ser-63) (sc-822), anti-phospho- ERK1/2 (Tyr-204)(sc-7383), anti-phospho-tyrosine (sc-508), and anti-STAT1 (sc-464); rabbit polyclonal anti-JAK2 (cs-7229), anti-c-jun (sc-1694), anti-c-fos (sc-253 and sc- 7202), anti-ERK 2 (sc-153), anti-phospho-p38 (Tyr-182) (sc-7973), anti-p38 (sc-7149) and anti STAT3 (sc-483); and goat polyclonal anti-phospho-STAT1 (Tyr-701)(sc-7988), and anti-phospho STAT3 (Tyr-705)(sc-7993) antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Anti-mouse and anti-goat IgG antibodies were from Sigma Aldrich Corp. (St. Louis, MO, USA). Reagents for SDS-PAGE and immunoblotting were obtained from Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA). HEPES, phenylmethylsulfonylfluoride, aprotinin, dithiothreitol, Triton X-100, Tween 20, glycerol, pancreatin, Ang II, and BSA (fraction V) were obtained from Sigma-Aldrich Corp. Neomycin was purchased from Life Technologies, Inc. (Geneticin G418, Grand Island, NY, USA). Protein A-Sepharose 6MB

and Percoll (density, 1.131 g/ml) were obtained from Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden). [125 I] protein A, and nitrocellulose membranes were obtained from Amersham Pharmacia Biotech (Little Chalfont, UK). Chemicals, culture media, and sera used in myocyte preparation and culture were purchased from Life Technologies, Inc. Sodium amobarbital was obtained from Eli Lilly & Co. (Indianapolis, IN, USA). Aqueous SNAC stock solution was prepared by reacting equimolar (1.0×10^{-2} mol L $^{-1}$) N-acetyl-L-cysteine (NAC) (Sigma) and sodium nitrite solutions. The final solution was stirred at room temperature for 15 min protected from light with aluminium foil. SNAC solutions were diluted in phosphate buffer saline solution, pH 7.4 and used immediately after synthesis. Reaction yield was measured spectrophotometrically based on the molar absorption coefficient of SNAC at 550 nm and was greater than 98%. All the solutions were prepared using analytical grade water from a Millipore Milli-Q Gradient filtration system.

Cell Cultures. Ventricular cardiac myocytes were prepared by enzymatic disaggregation as described previously [17]. Hearts from neonatal (1–3 d old) Wistar rats were excised, and the ventricles were minced and suspended in sterile ADS buffer [4.36 g HEPES, free acid (pH 7.35), 6.8 g NaCl, 1.0 g D-glucose, 0.4 g KCl, 0.14 g NaH 2 PO 4 ·H 2 O, 0.1 g MgSO 4 - anhydrous, and 0.02 g phenol red]. Tissue was then subjected to multiple enzymatic digestions at 37 °C using a mixture of collagenase and pancreatin. Four or five successive digestions were performed, each lasting 20 min. The solution obtained during each digestion was transferred to a sterile tube containing 1.0 mL newborn calf serum and centrifuged. The pellets obtained were re-suspended in newborn calf serum. To separate myocytes from other cells, the suspension was layered onto a discontinuous Percoll density gradient consisting of two phases (densities: 1.060 / 1.086 g/mL). After washing to remove traces of Percoll, the myocytes were cultured in DMEM containing 5% fetal calf serum, 10% horse serum, and 100 UI penicillin-streptomycin/mL. The cells were plated at the concentration of 8.0×10^4 on plates previously coated with 0.1% gelatin. Cardiomyocytes viability was determined by the dye exclusion of trypan blue.

SNAC/Ang II treatment and tissue extraction. The abdominal cavity was opened, the vena cava was exposed, and 0.02 ml saline (0.9% NaCl), with or without 10^{-6} mol L $^{-1}$ Ang II was injected. Some rats received SNAC (0.8 μ mol/kg iv) 10 min before the Ang II. At various

time intervals (10 minutes for determination of JAK2, JNK, ERK and p38 phosphorylation; 20 minutes for determination of c-Jun phosphorylation; 30 minutes for determination of c-Fos expression and STAT-1 phosphorylation; 120 minutes for determination of c-Jun expression and STAT3 phosphorylation), the tips of the ventricles were excised, washed in extraction buffer and immediately homogenized in approximately 5 volumes solubilization buffer at 4°C [1% Triton X-100, 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 100 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 10 mM EDTA, 10 mM sodium vanadate, 2.0 mM phenylmethylsulfonylfluoride, and 0.1 mg aprotinin/ml] with a Polytron PTA 20S generator (model PT 10/35; Brinkmann Instruments, Westbury, NY) operated at maximum speed for 30 sec. For cell studies the cardiomyocytes were plated at a density of 8.0×10^4 /plate and were exposed to Ang II at final concentration 10^{-5} M (time as stated above) and SNAC (10^{-4} M, loaded 10 min before the Ang II). After stimulation, the cells were washed twice in ice cold PBS and scraped into ice-cold solubilization buffer (as for heart extraction). The various time intervals used were chosen to achieve maximum activation or expression of the target proteins evaluated, and were based on time courses referred in the literature.

Protein analyses by immunoblotting. Insoluble material was removed by centrifugation for 25 min at 11,000 rpm in a 70.Ti rotor (Beckman, Fullerton, CA) at 4° C. The protein concentration of the supernatants was measured by the Bradford dye-binding method [18] for samples obtained from rats and by the Lowry method [19] for those obtained from cell culture. Both measurements were performed in triplicate. Aliquots of the resulting supernatants containing 5.0 mg total protein were used for immunoprecipitation with anti cfos, anti-JAK2 (10 µL, anti-STAT1 (15 µL) or anti-STAT3 (15 µL), antibodies at 4 °C overnight, followed by the addition of protein A-Sepharose 6MB for 2 h. The pellets were washed three times in ice-cold buffer [0.5% Triton X-100, 100 mM Tris (pH 7.4), 10 mM EDTA, and 2.0 mM sodium vanadate]. After washing, the pellets were re-suspended in Laemmli's sample buffer containing 100 mM dithiothreitol and heated in a boiling water bath for 5 min. The samples were subjected to SDS-PAGE (8%, 10% or 12% bisacrylamide) in a Bio-Rad miniature lab gel apparatus (Bio-Rad Laboratories). Electrotransfer of proteins from the gel to the nitrocellulose membrane was performed for 90 min at constant voltage (120 V) in a Bio-Rad miniature

transfer apparatus (Mini- Protean) as described by Towbin *et al* [20]. The nitrocellulose membranes were preincubated in blocking buffer (5% nonfat dry milk, 10 mM Tris, 150 mM NaCl, and 0.02% Tween 20) for 2 h. The nitrocellulose blots were then incubated with the appropriate antibody diluted in blocking buffer (3% BSA instead of nonfat dry milk) overnight at 4° C and washed for 15 min with the blocking buffer without nonfat dry milk. The blots were subsequently incubated with 2.0 mCi [¹²⁵I] protein A in 10 ml blocking buffer for 2 h at room temperature and washed again as described above for 15 min. [¹²⁵I] Protein A bound to the antibodies was detected by autoradiography using pre-flashed Kodak XAR film with Cronex Lightning Plus intensifying screens (Eastman Kodak, Rochester, NY) at -70 °C for 24–72 h. Band intensities were quantified by digital densitometry (Scion Image software, Scion Corp., Frederick, MD) of the developed autoradiographies. For simple immunoblotting experiments (not preceded by immunoprecipitation), 0.25 mg total protein from heart or cardiomyocyte extracts was separated by SDS-PAGE (8%, 10% or 12% bisacrylamide), transferred to nitrocellulose membranes, and blotted with the appropriate antibodies (anti-c-Fos, anti-c-Jun, anti-phospho-c-Jun, anti-ERK and phospho-ERK, anti- JNK and phospho JNK or anti-p38 and phospho-p38)[21].

Data presentation and statistical analysis. The results are expressed as the mean ± SEM of the indicated number of experiments, as appropriate. The blots are presented as percentage comparisons of bands in autoradiographies and were quantified by densitometry using Scion Image software. The ANOVA test for non-parametric samples was used for statistical analysis. The level of significance was set at $P < 0.05$.

Results

SNAC prevents Ang II – induced activation of signal transduction through JAK2/STAT1 and –3 in heart and cardiomyocytes. A single dose of Ang II promotes a 1.5 fold increase of JAK2 tyrosine phosphorylation in the heart of living rats (Fig. 1A), this is followed by the tyrosine phosphorylation STAT1 (2.1 fold) (Fig. 1C) and STAT3 (1.5 fold) (Fig. 1E). Similar results are observed when isolated cardiomyocytes are acutely exposed to Ang II,

which promoted increases of 1.7-, and 1.4-fold increase of tyrosine phosphorylation of JAK2 (Fig. 1B), STAT1 (Fig. 1D) and STAT3 (Fig. 1F), respectively. The pre-treatment of rats or isolated cardiomyocytes with SNAC was sufficient to completely prevent the effects Ang II upon this signaling pathway. The levels of non-phosphorilated proteins (JAK 2, STAT1 and STAT3) showed no significant changes.

SNAC modulates Ang II signal transduction through members of the MAPK family. A single dose of Ang II promotes the tyrosine phosphorylation of ERK1 and ERK2 (1.7-fold and 1.3-fold, respectively) (Fig. 2A and 2B) and the threonine183/tyrosine 185 phosphorylation of JNK-1 and -2/3 in heart (Fig 2C) and in isolated cardiomyocytes (Fig. 2D) (1.7-fold and 1.9-fold, respectively). The pre-treatment with SNAC significantly prevented the effect of Ang II upon JNK1 and 2/3 in heart (Fig. 2C) and in isolated cardiomyocytes (Fig. 2D). Conversely, the effect of SNAC on Ang II-induced tyrosine phosphorylation of ERK1 and ERK2 was the opposite. Thus, the pre-treatment of SNAC produced a tendency of increase of Ang II-induced ERK1/2 tyrosine phosphorylation in cardiomyocytes, which was confirmed by a significant enhancement of this effect in the heart (Fig. 2A and 2B). Surprisingly, no significant modulation of p-38 molecular activation status was obtained by either Ang II or SNAC-Ang II treatment in heart and cardiomyocytes (Fig 2E and 2F). The level of non-phosphorilated protein (JNK, ERK and p38) showed no changes.

SNAC prevents the stimulatory effect of Ang II on early inducible gene expression and activation. The activation of signal transduction through members of the MAPK signaling pathway can lead to the phosphorylation and activation of c-Jun and c-Fos. Here we observed that Ang II was capable of inducing the serine phosphorylation of c-Jun (1.6-fold) (Fig. 3) in heart. The pre-treatment of rats with SNAC reversed the effect of Ang II upon c-Jun phosphorylation (Fig. 3). In addition, a single dose of Ang II induced the expression of c-Fos (1.6-fold and 1.8-fold) and c-Jun (1.6-fold and 1.7-fold) in heart (Fig. 4A and 5A) and cardiomyocytes (Fig. 4 B and 5B), respectively. The pre-treatment with SNAC prevented the stimulatory effect of Ang II on c-Fos and c-Jun, both in heart and isolated cardiomyocytes (Fig. 4 and 5).

Discussion

In addition to its well known roles in the control of vascular tonus, and in the immune and nervous systems, there are substantial evidences that NO inhibits the growth promoting effects of Ang II [9, 22-24]. However, little is know about the participation of NO in the regulation of initial and intermediary steps of Ang II signaling pathways. Cumulative evidences have credited to endogenous, low molecular weight, RSNOs the mediation of many physiological actions of NO. These may proceed by cyclic guanosine 3,5- monophosphate (cGMP)-dependent and cGMP-independent mechanisms. The former involves coordination of NO to the heme group of guanylate cyclase, which activates the conversion of GTP into cGMP. The later, involves the direct activation or inactivation of proteins through S-nitrosative modifications via transnitrosation reactions and is emerging as post-translational signaling mechanism head-to-head with O-phosphorylation [25 – 27] It is known that the use of exogenous SNOs, such as SNAC, leads to an intracellular formation of other SNOs [28]. This is dependent on transnitrosation reactions and does not lead to the formation of NO [29].

The two cGMP-independent nitrosative modifications of proteins by RSNOs can be summarized as: the primary nitrosation of cysteine residues of proteins (PCys-SH, were P is the protein), generating an S-nitrosated protein (PCysSNO) (Eq. 1.) and the subsequent decomposition of the S-nitrosated proteins, yielding their corresponding dimmers (PCysSSCysP)(Eq. 2.)



In addition to these processes, NO, RSNOs and other reactive nitrogen species(RNS) can signal through redox events and coordinative interactions with metals. Currently, a number of synthetic NO-donors are under evaluation for their possible beneficial effects for the treatment of cardiovascular diseases [12, 14]. The results obtained with the i.v. administration of SNAC in the present work can be analyzed on the basis of two distinct intracellular growth-related signaling pathways activated by Ang II: The JAK/STAT and

MAPK pathways. Of particular interest, JNK1 and JNK2 activities have been reported to be negatively modulated by a mechanism of S-nitrosation [30,31]. The effects of cGMP are mainly mediated through cGMP-dependent protein kinase (PKG) [9]. Increased intracellular cGMP can lead to increased or decreased activity of all three MAP kinase pathways, depending on cell type and growth conditions, and the changes in MAP kinase activity may explain the effects of cGMP on many genes involved in cell proliferation, differentiation, or apoptosis [32]. Finally, NO can oxidize vicinal dithiols (a pair of spatially proximal thiols), within proteins to the disulfide state, producing redox regulation of these proteins. Eq. 2 represents one of the possible mechanisms of inactivation of JAK2 kinase activity, once studies in vitro point to the oxidation of vicinal thiols with formation of a sulfur bridge as the cause of its inactivation [33]. The reduced form of JAK2 is the most active form, and the oxidized JAK2 form is inactive [33]. In this study we have observed that in heart of living rats and in isolated cardiomyocytes SNAC consistently reverses the effects of Ang II in activating the signal transduction through the JAK2/STAT1-STAT3 signaling pathway. SNAC exerted similar effect on the Ang II induced activation of JNK. Conversely, acting on ERK signaling pathway SNAC potentiated the effects of Ang II. The effects of SNAC upon these early and intermediate steps of signal transduction were accompanied by an inhibition of Ang II induced phosphorylation of c-Jun and upon the expression of c-Jun and c-Fos. Surprisingly, neither Ang II nor SNAC produced any significant effect on p38, which is known to be activated by Ang II through superoxide production. Activation of p38 in myocardium and its role in the hypertrophic process remain controversial. Palm-Leis *et al* [34] demonstrated phosphorylation in Sprague-Dawley rats by Ang II stimulation. A similar result was obtained by Aoki *et al* [35], using Wistar cardiomyocytes. Izumi *et al* [36] examined the in vivo role of the angiotensin II type 1 (AT1) receptor in cardiac MAP kinase activities during both the onset and development of cardiac hypertrophy in stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP). In both the acute and chronic phases of cardiac hypertrophy in SHRSP, cardiac JNK activities were significantly increased compared with those observed in normotensive rats. Conversely, there was no prominent increase in cardiac ERK or p38 activities in SHRSP. Losartan, an AT1 receptor antagonist, prevented the onset of cardiac hypertrophy and retarded the progression of cardiac hypertrophy in

SHRSP, being accompanied by the reduction of JNK activity and activator protein-1 (AP-1) activity in SHRSP. Wang et al [37] documented that p38 MAP kinase activities are induced during the onset of *in vivo* hypertrophy in an experimental pressure overload model. In cultured cardiomyocytes, activation of the p38 pathway induces several independent characteristic features of myocyte hypertrophy, including an increase in cell surface area, enhanced sarcomeric organization, and expression of an embryonic marker gene, atrial natriuretic factor (ANF). These authors concluded that activation of p38 MAPK activities during hypertrophy, and the opposing effects of hypertrophy and cell death mediated by the two members of p38 MAPK family suggest a potential role of the p38 pathway in the onset of hypertrophy and heart failure. It has also being demonstrated that specific activation of the JNK pathway in cardiac myocytes induces characteristic features of hypertrophy, including an increase in cell size, elevated expression of ANF, and induction of sarcomere organization. In contrast, co-activation of both JNK, by MAP Kinase Kinase 7 (MKK-7) and p38 (by MKK3 or MKK6) in cardiomyocytes led to an induction of cytopathic responses and suppression of hypertrophic responses [38].

Other works have shown that in rat cardiomyocytes, Ang II induces a rapid phosphorylation of JAK2 and Tyk2, but not of JAK1, and to induce the phosphorylation of STAT1, STAT2 and STAT3 [6]. The time course for STAT1 and STAT3 phosphorylation in rat cardiomyocytes stimulated by AngII, described by Kodama et al. [6], showed maximum activation at 30 and 120 min., respectively. These times were used as a basis to establish the time intervals, after which STAT1 and STAT3 were analyzed, while JAK2 was analyzed after 10 min, based on a previous work [21]. Interestingly, activated STAT3 accumulates at the *c-fos* promoter and the activation of STAT3 alone induces *c-fos* mRNA production [39]. Thus, we believe these phenomena may contribute for part of the effects of Ang II upon c-Fos herein described.

JNK1/2 phosphorylates c-Jun at putative regulatory amino-terminal serine residues and increases its transcriptional activity [4]. c-Jun is one of the major components of the transcription factor AP-1, which consists of homodimers c-Jun/c-Jun or heterodimers c-Jun/c-Fos. AP-1 regulates the expression of many genes that possesses a tetradecanoylphorbol acetate responsive element (TRE) in their promoter regions, which include c-Fos, c-Jun, ANP, skeletal α -actin and heavy chain β -miosin [4]. In this

respect, the fact that SNAC is capable of abrogating Ang II-induced c-Jun phosphorylation is in accordance with the effect of SNAC on JNKs phosphorylation. ERK1/2 phosphorylates c-Fos and Elk-1 transcription factors. The late, once activated, binds to serum response element (SRE) in a complex with the serum response factor (SRF). SRE is a regulatory sequence, which controls the expression of I.E. genes, including c-Fos [4]. In face of the contra-regulatory action of NO on Ang II signaling, and considering the role of ERK 1/2 in that signaling pathway, the theoretical expectation was that SNAC would inhibit the effect of Ang II on ERK phosphorylation. Surprisingly, we found the effect of SNAC to be the opposite of that. It has been previously shown that the *S*-nitrosation of the cysteine 118 of p21ras leads to an increased phosphorylation of downstream proteins, including ERK 1/2 [40]. ERK activation by NO was described also to occur by c-GMP-dependent mechanisms, and by *S*-nitrosation of MAPK-phosphatases (MKP) [41]. Finally, ERK 1/2 activation may result from a cross-talk mechanism with the JAK/STAT pathway [42]. There are many controversies about the role of ERK 1/2 on hypertrophic pathways. Despite the fact that several hypertrophic stimulus are known to activate the Raf-1/MEK/ERK pathway, with ERK activation leading to c-Fos activation, Silberbach et al [43] demonstrated that ANF, which has recognized anti-hypertrophic action, induces the activation of ERK, and is mimicked by cGMP analogs, suggesting that ANF-induced ERK activation involves the guanylyl cyclase activity of the ANF receptor. These data suggest that there is an important linkage between cGMP signaling and the mitogen-activated protein kinase cascade, and that selective ANF activation of ERK is required for the antihypertrophic action of ANF. ANF induces a rapid increase of ERK phosphorylation and *in vitro* kinase activity. Phenylephrine (PE) also increases ERK activity, and the combined effect of ANF and PE appears to be additive, which provides, by analogy, a basis for our findings on the potentiation effect of SNAC on Ang II. We suspect that it may be due to the activation of cGMP, and thus, leading to an additive activation on ERK. In this case, ANG II expression might be increased via cGMP signal transduction pathway.

It is important to state that we cannot exclude that the effects herein observed are representative of the pharmacological characteristics of this compound or its metabolites. However, the current literature has systematically evidenced that the

physiological effects observed with the treatment with SNAC and other RSNOs are overlapping with, and representative of the actions of NO [13, 44-47]. In addition, and despite the fact the biochemical changes observed in cells exposed to RSNOs may be, in some instances, distinct from those observed by NO generated endogenously, RSNOs can mimic the downstream signaling initiated by NO [24].

In conclusion, the present study reveals that the treatment of living animals and isolated cardiomyocytes with SNAC promotes a pathway specific regulation of the Ang II signal transduction. These results provide a molecular basis for the effects of this class of drugs upon Ang II signal transduction on cardiac tissues.

Acknowledgements. This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

- [1] D.Levy, R.J. Garrison, D.D. Savage, W.B. Kannel, W.P. Castelli, Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study, *N. Engl. J. Med.* 322 (1990) 1561-1566.
- [2] K. Lindpaintner, D. Ganten, The cardiac renin-angiotensin system: an appraisal of present experimental and clinical evidence, *Circ. Res.* 68 (1991) 905-921.
- [3] H. Schunkert, V.J. Dzau, S.S. Tang, A.T. Hirsch, C.S. Apstein, B.H. Lorell, Increased rat cardiac angiotensin converting enzyme activity and mRNA expression in pressure overload left ventricular hypertrophy: effect on coronary resistance, contractility, and relaxation, *J. Clin. Invest.* 86 (1990) 1913-1920.
- [4] S. Kudoh, I. Komuro, T. Mizuno, T. Yamazaki, Y. Zou, I. Shiojima, N. Takekoshi, Y. Yazaki, Angiotensin II stimulates c-Jun NH2-terminal kinase in cultured cardiac myocytes of neonatal rats, *Circ. Res.* 80 (1997) 139-46.
- [5] R.M. Touyz, C. Berry, Recent advances in angiotensin II signaling, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35 (2002) 1001-1015.
- [6] H. Kodama, K. Fukuda, J. Pan, S. Makino, M. Sano, T. Takahashi, S. Hori, S. Ogawa, Biphasic activation of the JAK/STAT pathway by angiotensin II in rat cardiomyocytes, *Circ. Res.* 82 (1998) 244-50.
- [7] H. El-Adawi, L. Deng, A. Tramontano, S. Smith, E. Mascareno, K. Ganguly, R. Castillo, N. El-Sherif, The functional role of the JAK-STAT pathway in post-infarction remodeling, *Cardiovasc.Res.* 57 (2003) 129-38.
- [8] A.J. Gow, Q. Chen, D.T. Hess, B.J. Day, H. Ischiropoulos, J.S. Stamler, Basal and stimulated protein S-nitrosylation in multiple cell types and tissues, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 9637-9640.
- [9] C. Yan, D. Kim, T. Aizawa, B.C. Berk, Functional Interplay Between Angiotensin II and Nitric Oxide - Cyclic GMP as a Key Mediator, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23 (2003) 26-36.

- [10] Y. Zhang, N. Hogg, S-Nitrosothiols: cellular formation and transport, *Free Radic. Biol. Med.* 38 (2005) 831-82005.
- [11] J.M. Hare, J.S. Stamler, NO/redox disequilibrium in the failing heart and cardiovascular system, *J. Clin. Invest.* 115 (2005) 509-517.
- [12] L.J. Ignarro, C. Napoli, J. Loscalzo, Nitric oxide donors and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide: an overview, *Circ. Res.* 90 (2002) 21-8.
- [13] L.J. Ignarro, H. Lipton, J.C. Edwards, W.H. Baricos, A.L. Hyman, P.J. Kadowitz, C.A. Gruetter, Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 218 (1981) 739-49.
- [14] K.F. Ricardo, S.M. Shishido, M.G. de Oliveira, M.H. Krieger, Characterization of the hypotensive effect of S-nitroso-N-acetylcysteine in normotensive and hypertensive conscious rats, *Nitric Oxide* 7 (2002) 57-66.
- [15] J.L. Alencar, I. Lobysheva, K. Chalupsky, M. Geffard, F. Nepveu, J.C. Stoclet, S-nitrosating nitric oxide donors induce long-lasting inhibition of contraction in isolated arteries, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 307 (2003) 152-9.
- [16] A.B. Seabra, A. Fitzpatrick, J. Paul, M.G. de Oliveira, R. Weller, Topically applied S nitrosothiol-containing hydrogels as experimental and pharmacological nitric oxide donors in human skin, *Br. J. Dermatol.* 151 (2004) 977-83.
- [17] N.N. Kim, F.J. Villarreal, M.P. Printz, A.A. Lee, W.H. Dillmann, Trophic effects of angiotensin II on neonatal rat cardiac myocytes are mediated by cardiac fibroblasts, *Am. J. Physiol.* 269 (1995) E426–E437.
- [18] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [19] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265-275.

- [20] H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 4350–4354.
- [21] V.C. Calegari, R.M. Bezerra, M.A. Torsoni, A.S. Torsoni, K.G. Franchini, M.J. Saad, L.A. Velloso, Suppressor of cytokine signaling 3 is induced by angiotensin II in heart and isolated cardiomyocytes, and participates in desensitization, *Endocrinology* 144 (2003) 4586-96.
- [23] R.H. Ritchie, R.J. Schiebinger, M.C. LaPointe, J.D. Marsh, Angiotensin II-induced hypertrophy of adult rat cardiomyocytes is blocked by nitric oxide, *Am. J. Physiol.* 275 (1998) H1370-4.
- [24] A. Calderone, C.M. Thaik, N. Takahashi, D.L. Chang, W.S. Colucci, Nitric oxide, atrial natriuretic peptide, and cyclic GMP inhibit the growth-promoting effects of norepinephrine in cardiac myocytes and fibroblasts, *J. Clin. Invest.* 101 (1998) 812-8.
- [25] R.S. Smith Jr, J. Agata, C.F. Xia, L. Chao, J. Chao, Human endothelial nitric oxide synthase gene delivery protects against cardiac remodeling and reduces oxidative stress after myocardial infarction, *Life Sci.* 76 (2005) 2457-7.
- [26] J.S. Stamler, D.I. Simon, J.A. Osborne, M.E. Mullins, O. Jaraki, T. Michel, D.J. Singel, J. Loscalzo, S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 89 (1992) 444-8.
- [27] B.M. Gaston, J. Carver, A. Doctor, L.A. Palmer, S-Nitrosylation Signaling in Cell Biology, *Molecular Interventions* 3 (2003) 253-63.
- [28] A. Ami, A.A. Deora, H.M. Lander, Role of Nitric Oxide and Other Radicals in Signal Transduction, in: L.J. Ignarro (Ed), *Nitric Oxide Biology and Pathobiology*, Academic Press, San Diego (2000) pp.251-263.
- [29] J.L. Alencar, I. Lobysheva, K. Chalupsky, M. Geffard, F. Nepveu, J.C. Stoclet, S-nitrosating nitric oxide donors induce long-lasting inhibition of contraction in isolated arteries, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 307 (2003) 152-9.

- [30] J.L. Alencar, I. Lobysheva, M. Geffard, M. Sarr, C. Schott, V.B. Schini-Kerth, Role of S-nitrosation of cysteine residues in long-lasting inhibitory effect of nitric oxide on arterial tone, *Mol. Pharmacol.* 63 (2003) 1148-58.
- [31] H.S. So, R.K. Park, M.S. Kim, S.R. Lee, B.H. Jung, S.Y. Chung, C.D. Jun, H.T. Chung, Nitric oxide inhibits c-Jun N-terminal kinase 2 (JNK2) via S-nitrosylation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247 (1998) 809-13.
- [32] H.S. Park, S.H. Huh, M.S. Kim, S.H. Lee, E.J. Choi, Nitric oxide negatively regulates c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase by means of S-nitrosylation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000) 14382-14387.
- [33] R.B. Pilz, D.E. Casteel, Regulation of Gene Expression by Cyclic GMP, *Circ. Res.* 93 (2003) 1034-46.
- [34] R.J. Duhé, G.A. Evans, R.A. Erwin, R.A. Kirken, G.W. Cox, W.L. Farrar, Nitric oxide and thiol redox regulation of Janus kinase activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 95 (1998) 126-131.
- [35] A. Palm-Leis, U.S. Singh, B.S. Herbelin, G.D. Olsovsky, K.M. Baker, J. Pan, Mitogen-activated protein kinases and mitogen-activated protein kinase phosphatases mediate the inhibitory effects of all-trans retinoic acid on the hypertrophic growth of cardiomyocytes, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 54905-17.
- [36] H. Aoki, M. Richmond, S. Izumo, J. Sadoshima, Specific role of the extracellular signal-regulated kinase pathway in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy *in vitro*, *Biochem. J.* 347 (2000) 275-84.
- [37] Y. Izumi, S. Kim, Y. Zhan, M. Namba, H. Yasumoto, H. Iwao, Important Role of Angiotensin II-Mediated c-Jun NH2-Terminal Kinase Activation in Cardiac Hypertrophy in Hypertensive Rats, *Hypertension* 36 (2000) 511- 524.
- [38] Y. Wang, S. Huang, V.P. Sah, Cardiac muscle hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38mitogen-activated protein kinase family, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 2161-8.

- [39] Y. Wang, B. Su, V.P. Sah, J.H. Brown, J. Han, K.R. Chien, Cardiac hypertrophy induced by mitogen-activated protein kinase kinase 7, a specific activator for c-Jun NH2-terminal kinase in ventricular muscle cells, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 5423-6.
- [40] E. Yang, L. Lerner, D. Besser, J.E. Darnell Jr, Independent and cooperative activation of chromosomal c-fos promoter by STAT3, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 15794-9.
- [42] H. M. Lander, D.P. Hajjar, B.L. Hempstead, U.A. Mirza, B.T. Chait, S. Campbell, L.A. Quilliam, A molecular redox switch on p21(ras). Structural basis for the nitric oxide p21(ras) interaction, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 4323-6.
- [43] D. Callsen, J. Pfeilschifter, B. Brune, Rapid and delayed p42/p44 mitogen-activated protein kinase activation by nitric oxide: the role of cyclic GMP and tyrosine phosphatase inhibition, *J. Immunol.* 161 (1998) 4852-8.
- [44] E.M. Sandberg, X. Ma, D. VonDerLinden, M.D. Godeny, P.P. Sayeski, JAK2 tyrosine kinase mediates angiotensin II-dependent inactivation of ERK2 via induction of mitogen activated protein kinase phosphatase 1, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 1956-67.
- [45] M. Silberbach, T. Gorenc, R.E. Hersherberger, P.J. Stork, P.S. Steyger, C.T. Roberts Jr, Extracellular Signal-regulated Protein Kinase Activation Is Required for the Anti hypertrophic Effect of Atrial Natriuretic Factor in Neonatal Rat Ventricular Myocytes, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 24858-64.
- [46] N.S. Bryan, T. Rassaf, R.E. Maloney, C.M. Rodriguez, F. Saijo, J.R. Rodriguez, M. Feelisch, Cellular targets and mechanisms of nitros(yl)ation: an insight into their nature and kinetics *in vivo*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 101 (2004) 4308-13.
- [47] J.S. Scharfstein, J.F. Keaney Jr, A. Slivka, G.N. Welch, J.A. Vita, J.S. Stamler, J. Loscalzo, *In vivo* transfer of nitric oxide between a plasma protein-bound reservoir and low molecular weight thiols, *J. Clin. Invest.* 94 (1994) 1432-9.
- [48] Y. Zhang, N. Hogg, The mechanism of transmembrane S-nitrosothiol transport, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 101 (2004) 7891-6.
- [49] P.J. Henry, O.H. Drummer, J.D. Horowitz, S-nitrosothiols as vasodilators: implications regarding tolerance to nitric oxide-containing vasodilators, *Br. J. Pharmacol.* 98 (1989) 757-66.

Figure legends

Figure 1. *Effect of SNAC on Ang II signal transduction through JAK/STAT.* Living rats or cardiomyocytes in culture were treated with saline, angiotensin II (Ang II) or SNAC plus Ang II (SNAC/Ang II) according to the methods described in the text. Total protein extracts were prepared from heart (A, C and E) or cardiomyocytes (B, D and F). Immunoprecipitation (IP) assays were performed using anti-JAK2 (A and B), -STAT1 (C and D) or -STAT3 (E and F) antibodies and the immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted (IB) with antiphosphotyrosine (PY) and JAK2(A and B), -phospho-STAT1 (p-STAT1) and STAT1 (C and D) or -phospho-STAT3 (p-STAT3) and STAT3 (E and F) antibodies. Specific bands were analyzed by densitometry. In all experiments n = 4-6 determinations.

Figure 2. *Effect of SNAC on Ang II signal transduction through MAPK.* Living rats or cardiomyocytes in culture were treated with saline, angiotensin II (Ang II) or SNAC plus Ang II (SNAC/Ang II) according to the methods described in the text. Total protein extracts were prepared from heart (A, C and E) or cardiomyocytes (B, D and F) and 0.25 mg protein were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted (IB) with anti-phospho-ERK (p-ERK) and ERK (A and B), -phospho-JNK (P-JNK) and JNK (C and D) or -phospho-p38 (P-p38) and p38 (E and F) antibodies. Specific bands were analyzed by densitometry. In A and B the upper graphs present the densitometric analysis of the band corresponding to ERK 44 and the lower graphs present the densitometric analysis of the band corresponding to ERK 42. In C and D the upper graphs present the densitometric analysis of the band corresponding to JNK 2/3 and the lower graphs present the densitometric analysis of the band corresponding to JNK 1. In all experiments n = 4 determinations.

Figure 3. *Effect of SNAC on Ang II-induced c-Jun phosphorylation in heart.* Living rats were treated with saline, angiotensin II (Ang II) or SNAC plus Ang II (SNAC/Ang II) according to the methods described in the text. Total protein extracts were prepared and 0.25 mg protein were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted (IB) with anti-phospho-c-Jun (p-c-Jun) antibody. Specific bands were analyzed by densitometry. N = 4 determinations.

Figure 4. *Effect of SNAC on Ang II – induced c-Fos expression.* Living rats or cardiomyocytes in culture were treated with saline, angiotensin II (Ang II) or SNAC plus Ang II (SNAC/Ang II) according to the methods described in the text. Total protein extracts were prepared from heart (A) or cardiomyocytes (B) and 0.25 mg protein were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted (IB) with anti-c-Fos antibody. Specific bands were analyzed by densitometry. In all experiments n = 4 determinations.

Figure 5. *Effect of SNAC on Ang II – induced c-Jun expression.* Living rats or cardiomyocytes in culture were treated with saline, angiotensin II (Ang II) or SNAC plus Ang II (SNAC/Ang II) according to the methods described in the text. Total protein extracts were prepared from heart (A) or cardiomyocytes (B) and 0.25 mg protein were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted (IB) with anti-c-Jun antibody. Specific bands were analyzed by densitometry. In all experiments n = 4 determinations.

Figures

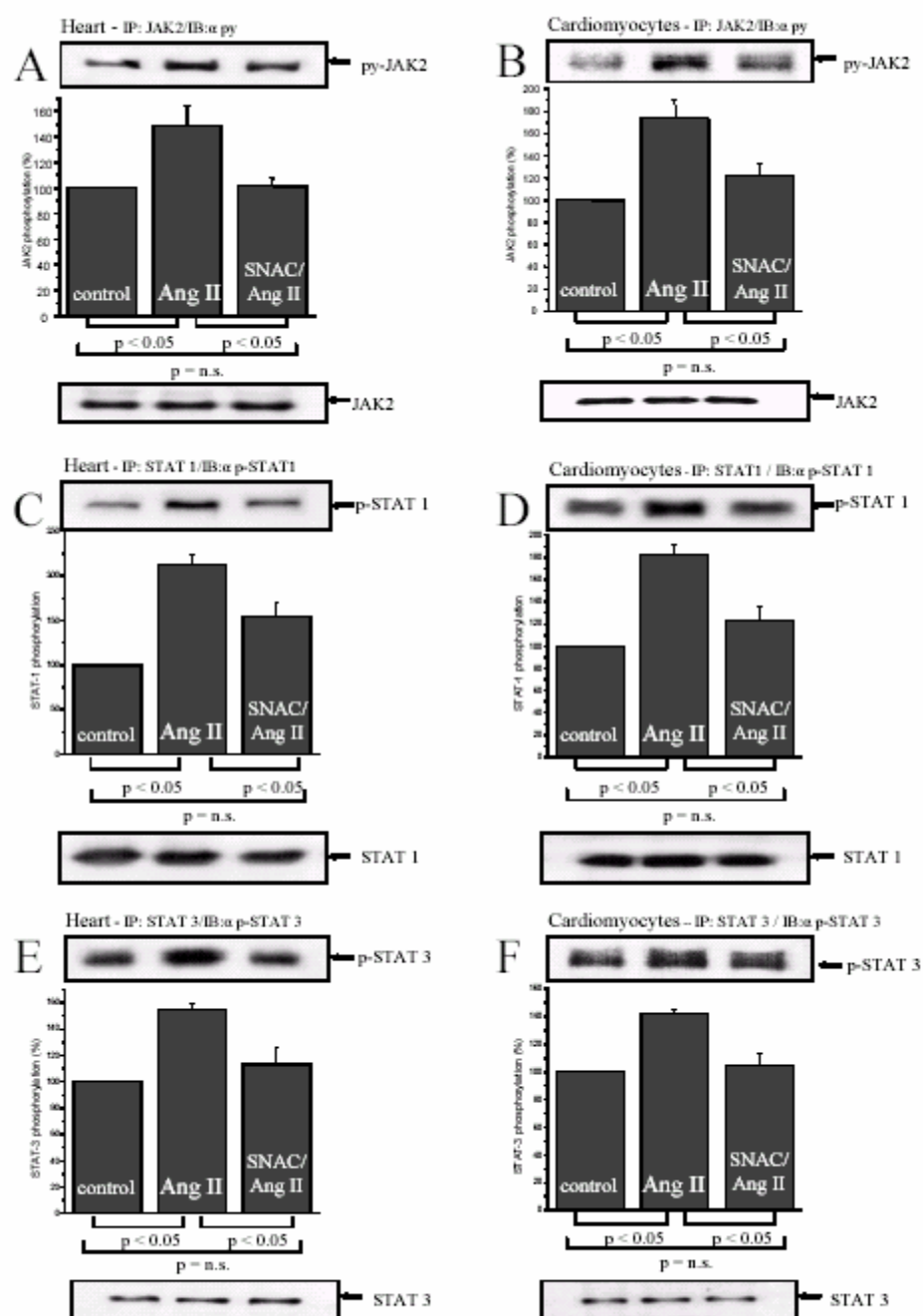


FIGURE 1

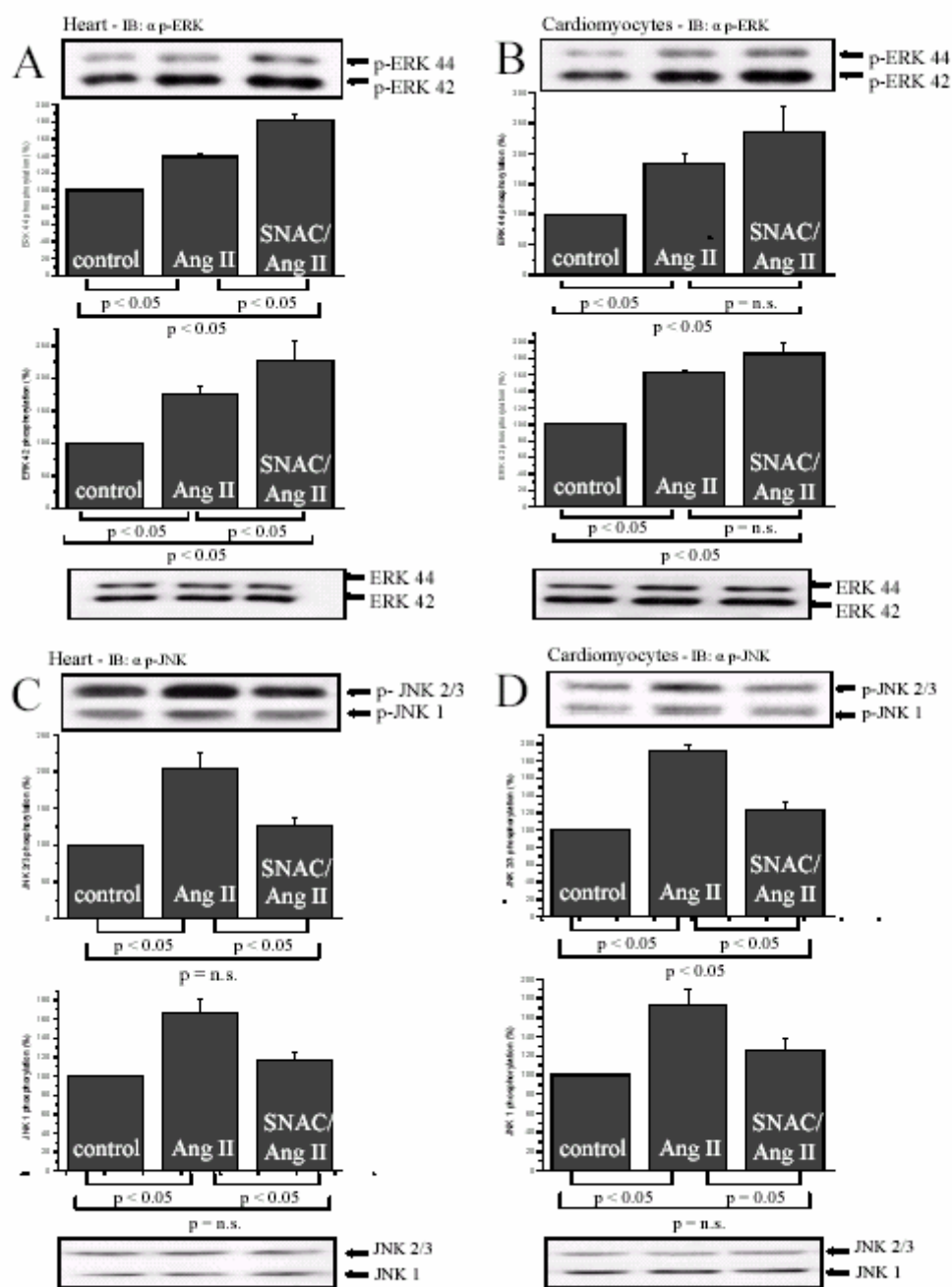


FIGURE 2a

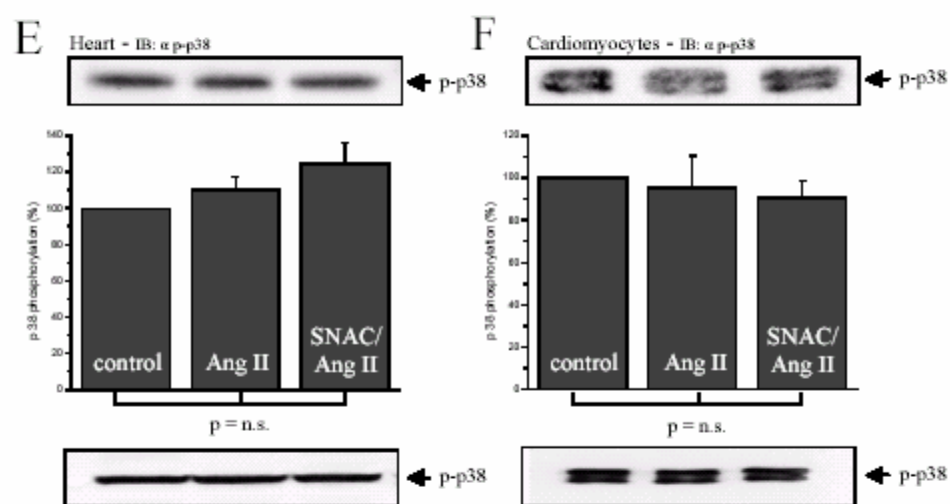


FIGURE 2b

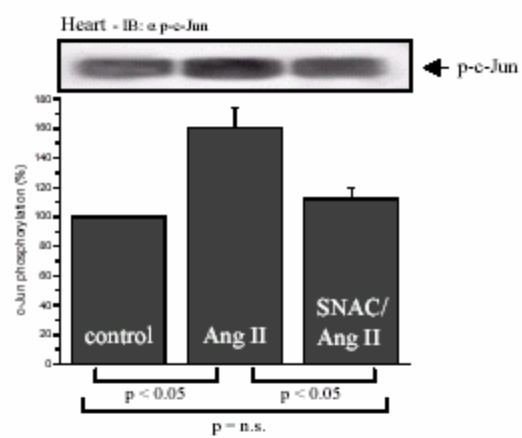


FIGURE 3

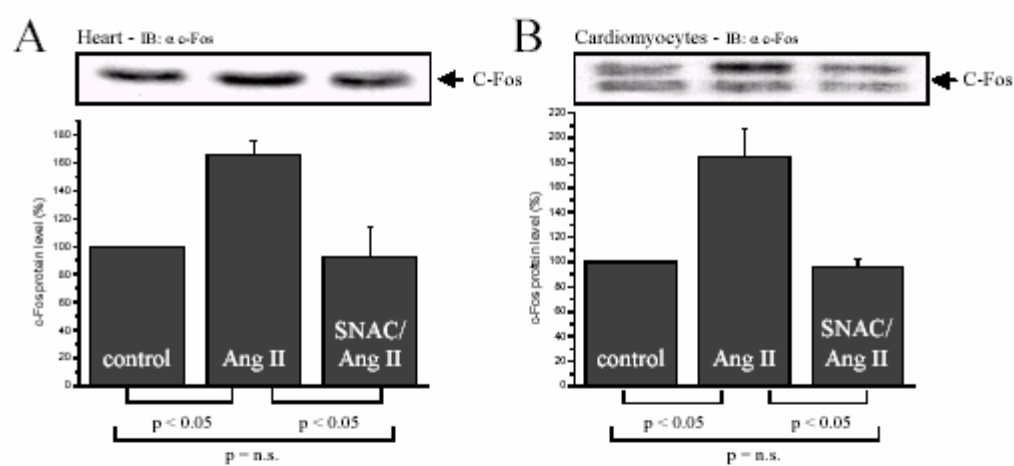


FIGURE 4

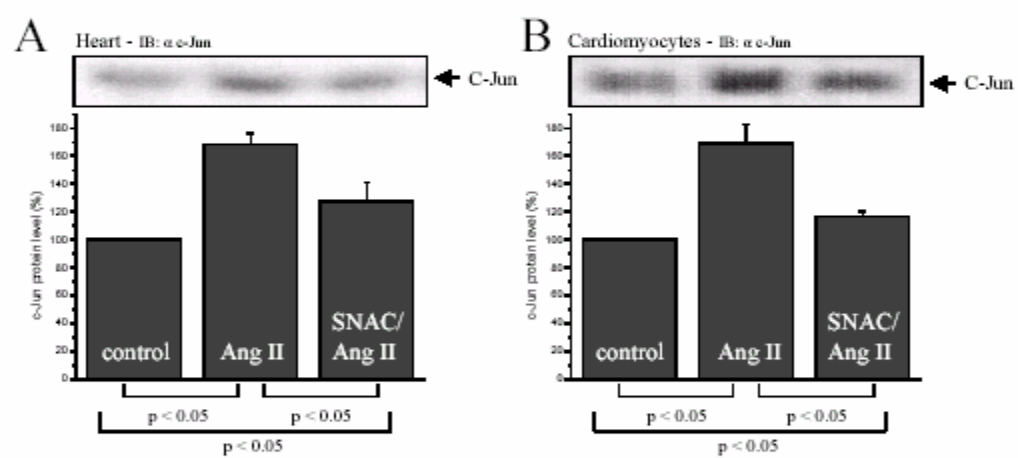


FIGURE 5

