

Fernando Garcez Porto

**Dissulfeto isomerase de proteínas (PDI)-A1 peri/epicelular: um novo alvo
terapêutico potencial no aneurisma de aorta**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Programa de Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Francisco Rafael
Martins Laurindo

**São Paulo
2022**

Fernando Garcez Porto

**Dissulfeto isomerase de proteínas (PDI)-A1 peri/epicelular: um novo alvo
terapêutico potencial no aneurisma de aorta**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Programa de Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Francisco Rafael
Martins Laurindo

**São Paulo
2022**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Porto, Fernando Garcez

Dissulfeto isomerase de proteínas (PDI)-Al
peri/epicelular : um novo alvo terapêutico
potencial no aneurisma de aorta / Fernando Garcez
Porto. -- São Paulo, 2022.

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

Programa de Cardiologia.

Orientador: Francisco Rafael Martins Laurindo.

Descritores: 1.Aneurisma dissecante 2.Isomerases
de dissulfetos de proteínas 3.Isoquercetina
4.Aneurisma da aorta torácica 5.Biomecânica vascular
6.Aneurisma da aorta abdominal

USP/FM/DBD-301/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedico essa tese aos meus pais, Pedro Vezzosi Porto e Viviane Beatriz Garcez Porto, os quais sempre batalharam para possibilitar minha caminhada até aqui, para que saibam que nada disso seria possível sem eles. Essa conquista também é de vocês!

Agradecimentos

Ao Prof. Francisco Laurindo pela orientação e mentoria ao longo de todo o desenvolvimento desse trabalho. Por toda a paciência e atenção dedicadas a este trabalho e a minha formação. Por ser um orientador completo, que além de seus conselhos valiosos, tornou-se um grande exemplo, no qual pretendo me espelhar para alcançar meus objetivos.

A Carol por todo apoio e amizade, desde o começo do meu Doutorado, todas as conversas fossem elas científicas ou só um bate papo, experimentos e discussões produtivas. Obrigado por fazer eu me sentir em casa, mesmo tão longe de casa.

A Percília, Patrícia e Júlia por toda ajuda no desenvolvimento e execução dos protocolos animais. Obrigado por emprestarem dias inteiros da atenção e esforço para que esse trabalho fosse possível.

A Tiphany e Leonardo pelas discussões científicas, novas ideias, e ajuda com experimentos importantes para esse trabalho. Muito Obrigado!

A equipe do Laboratório de Biologia Vascular, Victor, João, Leonora, Daniela, Arruda, Luciana e Laura que sempre estiveram presentes na minha trajetória, dispostos a ajudar todas as vezes em que precisei.

Aos demais colegas do Laboratório de Biologia Vascular, por todos os momentos compartilhados, dicas e discussões importantes que ajudaram na evolução desse trabalho, e na minha evolução como pesquisador.

A Beatriz, que apesar de ter ficado por pouco tempo, foi uma excelente aluna de iniciação científica, e sua ajuda foi de grande importância.

Aos meus pais Pedro e Viviane, que sempre me apoiaram e torceram pelo meu sucesso. Obrigado por fazerem o possível e o impossível por mim todos os dias.

Aos meus familiares por todo apoio e torcida, para que fosse possível a concretização dessa etapa importante da minha vida.

A minha companheira Vanessa, por toda amizade, carinho e dedicação. Por sempre me lembrar o quanto sou capaz e me tranquilizar nos momentos mais difíceis.

A Deus, por sempre me guiar pelo melhor caminho, e mostrar as coisas que eu realmente preciso em minha vida.

Este trabalho foi financiado pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo); Processo 2017/11410-6 (bolsa de doutorado); Projeto FAPESP 2013/07937-8 (CEPID de Processos Redox em Biomedicina – Redoxoma).

Padronização

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª. Ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com “List of journals indexed in Index Medicus”.

Sumário

1. Introdução.....	1
1.1 Aneurisma e dissecção aórtica: uma perturbação na mecano-sinalização redox.....	1
1.2 Remodelamento vascular e sua regulação redox.....	3
1.3 Vias redox de sinalização celular.....	4
1.4 Proteína dissulfeto Isomerase (PDIA1).....	5
1.5 Modelo transgênico de superexpressão de PDIA1 em camundongos.....	9
1.6 Estratégias para inibição da PDIA1.....	10
2. Objetivos.....	12
2.1 Objetivo geral.....	12
2.2 Objetivos específicos.....	12
3. Materiais e métodos.....	13
3.1 Nomenclatura dos segmentos aórticos.....	13
3.2 Modelos experimentais.....	13
3.2.1 Indução de doença aórtica em camundongos transgênicos que superexpressam PDIA1.....	13
3.2.2 Modelo de inibição de lisil oxidase de dissecção aórtica em camundongos C57BL/6 N-tac.....	14
3.3 Administração de isoquercetina (IQ).....	14
3.4 Análise ecocardiográfica <i>in vivo</i>	15
3.5 Histopatologia dos segmentos aórticos.....	15
3.6 Propriedades viscoelásticas da aorta.....	16
3.7 Ensaio de Diclorofluoresceína.....	17
3.8 PCR em tempo real.....	18
3.9 Análise estatística.....	18
4. Resultados.....	19
4.1 Superexpressão de PDIA1 em modelo transgênico protege contra dissecção aórtica.....	19
4.2 Redução nas taxas de quebras de fibras elásticas em camundongos com superexpressão de PDIA1.....	21

4.3 Exposição à isquercetina (IQ) aumenta as taxas de mortalidade por dissecção aórtica em modelo de inibição da lisil oxidase.....	23
4.4 Aortas torácicas de camundongos expostos a IQ ou BAPN exibem modos distintos de falha biomecânica.....	26
4.5 A exposição a BAPN e IQ aumenta a oxidação intracelular em VSMCs cultivadas.....	29
4.6 Resposta ao estresse do retículo endoplasmático (ER) em aortas de camundongos expostos a BAPN e IQ.....	31
5. Discussão.....	33
6. Conclusão.....	38
7. Dados Suplementares.....	39
8- Referências.....	46

Lista de abreviaturas

PDIA1	Proteína disulfeto isomerase A1
IQ	Isoquercetina
VSMC	Célula Muscular Lisa Vascular
MEC	Matriz Extracelular
AAA	Aneurisma de aorta abdominal
AATD	Aneurisma de aorta torácica e dissecação
NOX	NADPH oxidase
RE	Retículo Endoplasmático
ERAD	Degradação de proteínas associadas ao retículo endoplasmático
TgPDIA1	Camundongo transgênico que superexpressa PDIA1
GRAS	Generally recognised as safe
FDA	Food and drug administration
WT	Wild-type
ANGII	Angiotensina II
BAPN	Beta-aminopropionitrila
H2DCFDA	2,7diclorofluoresceína diacetato
DCF	Diclorofluoresceína
PBS	Tampão fosfato salino
RFU	Unidade relativa de fluorescência
PCR	Reação de cadeia de polimerase
VE	Ventrículo esquerdo
UPR	Unfolded Protein Response (resposta a proteínas mal-enoveladas)

Lista de símbolos

µl-	microlitro
mg-	miligrama
µM-	micromolar
g-	grama
kg-	kilograma
M-	molar
mM-	milimolar
nM-	nanomolar
min-	minuto
h-	hora
RFU-	unidade relativa de fluorescência

Lista de figuras

Figura 1. Estrutura geral da Proteína Dissulfeto Isomerase A1 (PDIA1).....	7
Figura 2. Taxas reduzidas de mortalidade por ruptura aórtica em camundongos TgPDIA1 versus controle no modelo de dissecação aórtica induzido por BAPN + AngII.....	21
Figura 3. Análise de quebra de fibras elásticas e deposição de colágeno em camundongos TgPDIA1 versus WT no modelo de dissecação aórtica induzido por BAPN + AngII.....	22
Figura 4. Isoquercetina (IQ) aumenta a mortalidade relacionada à ruptura aórtica no modelo de dissecação induzido por BAPN.....	25
Figura 5. Análise histológica de aortas de camundongos expostos a BAPN, IQ ou sua combinação.....	26
Figura 6. Análise da viscoelasticidade aórtica por meio da tensão desenvolvida em resposta ao estiramento progressivo.....	28
Figura 7. Efeitos do estiramento progressivo em diferentes modalidades de falha mecânica.....	29
Figura 8. Análise da oxidação intracelular em VSMCs.....	31
Figura 9. Expressão de marcadores de resposta a proteínas mal enoveladas (UPR).....	32
Figura suplementar 1. Estrutura química de alguns dos principais análogos da quercetina.....	39
Figura suplementar 2. Esquema da divisão dos segmentos aórticos utilizados no presente estudo, com a respectiva nomenclatura.....	39
Figura suplementar 3. Dados ecocardiográficos dos diâmetros aórticos no modelo de dissecação aórtica induzido por BAPN em camundongos C57BL6..	40
Figura suplementar 4. Dados ecocardiográficos mostrando os diâmetros do ramo aórtico principal e do ventrículo esquerdo no modelo de dissecação aórtica induzido por BAPN em camundongos C57BL6.....	41
Figura suplementar 5. Dados ecocardiográficos do diâmetro aórtico no modelo de dissecação aórtica induzido por BAPN + AngII em camundongos de selvagem WT e TgPDIA1 (fundo FVB).....	42

Figura suplementar 6. Dados ecocardiográficos representando os diâmetros do ramo aórtico principal e do ventrículo esquerdo no modelo de dissecação aórtica induzido por BAPN + AngII em camundongos de selvagem WT e TgPDIA1 (fundo de FVB).....	43
Figura suplementar 7. Análise histológica de aortas de camundongos expostos a BAPN ou à combinação de BAPN + AngII.....	44
Figura suplementar 8. Quantificação da análise histológica de aortas de camundongos expostos a BAPN ou à combinação de BAPN + AngII.....	45

Lista de tabelas

Tabela 1. Taxas médias de dissecção aórtica com ou sem ruptura em camundongos WT e TgPDIA1 expostos a BAPN + AngII.....	20
Tabela 2. Taxas médias de dissecção aórtica com ou sem ruptura em camundongos expostos a BAPN, IQ ou BAPN+IQ.....	24

RESUMO

Porto FG. *Dissulfeto isomerase de proteínas (PDI)-A1 peri/epicelular*. um novo alvo terapêutico potencial no aneurisma de aorta [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

A sinalização redox está envolvida na fisiopatologia do aneurisma/dissecção da aorta. Proteínas Dissulfeto Isomerasas e seu protótipo PDIA1 são proteínas tiol redox presentes principalmente no retículo endoplasmático. Seu pool de superfície celular e extracelular regula de maneira redox dependente processos como trombose, remodelamento do citoesqueleto e ativação de integrinas, os quais são mecanismos envolvidos na doença aórtica. Aqui investigamos o papel da PDIA1 na dissecção aórtica. Inicialmente, avaliamos o desfecho em um modelo de aneurisma/dissecção da aorta em camundongos transgênicos com superexpressão de PDIA1 usando um modelo de exposição de 28 dias ao inibidor de lisil oxidase BAPN na água de beber associado a infusão de angiotensina-II através de uma bomba osmótica implantável. Em um segundo protocolo, avaliamos os efeitos do inibidor da PDIA1 isoquercetina (IQ) na dissecção de aorta em camundongos expostos ao BAPN por 28 dias. A superexpressão de PDIA1 em camundongos transgênicos de fundo FVB foi associada a cerca de 50% ($p=0,022$) de redução nas taxas de mortalidade por ruptura da aorta abdominal e proteção contra quebras de fibras elásticas na aorta torácica. Por outro lado, a exposição ao inibidor de PDIA1, IQ em camundongos C57BL/6 aumentou marcadamente as taxas de mortalidade relacionadas à dissecção da aorta torácica, de cerca de 18% para 50% em 28 dias ($p = 0,019$). A ruptura das fibras elásticas e a deposição de colágeno também se mostraram aumentadas nas aortas desses camundongos. Em paralelo, um ensaio de viscoelasticidade, avaliando a tensão vascular em resposta a estiramento progressivo indicou que a IQ promoveu uma falha biomecânica do tipo dúctil quando comparada as aortas controle ou aortas de camundongos expostos a BAPN, os quais demonstraram um padrão súbito de falha. Os efeitos induzidos pela IQ parecem não estarem associados a efeitos antioxidantes inespecíficos ou estresse do retículo endoplasmático. Em ambos os modelos, a análise

ecocardiográfica avaliando os camundongos sobreviventes sugeriu que a ruptura aórtica estava dissociada da dilatação progressiva. Em resumo, nossos dados indicam um papel protetor da PDIA1 contra a dissecação/ruptura da aorta e potencialmente revela um novo mecanismo integrativo que acopla a homeostase redox e a biomecânica no remodelamento vascular.

Descritores: Aneurisma dissecante; Isomerasas de dissulfetos de proteínas; Isoquercetina; Aneurisma da aorta torácica; Biomecânica vascular; Aneurisma da aorta abdominal.

ABSTRACT

Porto FG. *Protein disulfide isomerase (PDI)-A1 peri/epicellular: a new potential therapeutic target on aortic aneurysm* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2022.

Redox signaling is involved in the pathophysiology of aortic aneurysm/dissection. Protein Disulfide Isomerases and their prototype PDIA1 are thiol redox proteins present mainly in the endoplasmic reticulum. Its cell surface and extracellular pool redox-dependently regulates processes such as thrombosis, cytoskeletal remodeling and integrin activation, which are mechanisms involved in aortic disease. Here we investigate the role of PDIA1 in aortic dissection. We initially evaluated the outcome in an aortic aneurysm/dissection model in transgenic mice overexpressing PDIA1 using a 28-day exposure model to the BAPN lysyl oxidase inhibitor in drinking water associated with an angiotensin-II infusion by implantable osmotic pump. In a second protocol, we evaluated the effects of PDIA1 inhibitor isoquercetin (IQ) on aortic dissection in mice exposed to BAPN for 28 days. Overexpression of PDIA1 in transgenic FVB background mice was associated with about 50% ($p=0.022$) reduction in mortality rates from abdominal aortic rupture and protection against elastic fiber breaks in the thoracic aorta. On the other hand, exposure to the PDIA1 inhibitor, IQ in C57BL/6 mice markedly increased mortality rates related to thoracic aortic dissection, from about 18% to 50% at 28 days ($p = 0.019$). The breakdown of elastic fibers and collagen deposition were also shown to be increased in the aortas of these mice. In parallel, a viscoelasticity assay, evaluating vascular tension in response to progressive stretching, indicated that IQ promoted a ductile-type of biomechanical failure when compared to control aortas or aortas from mice exposed to BAPN, which demonstrated a sudden pattern of failure. IQ-induced effects appear not to be associated with nonspecific antioxidant effects or endoplasmic reticulum stress. In both models, echocardiographic analysis evaluating surviving mice suggested that aortic rupture was dissociated from progressive dilatation. In summary, our data indicate a protective role of PDIA1 against aortic dissection/rupture and potentially reveal a new integrative

mechanism that couples redox homeostasis and biomechanics in vascular remodeling.

Descriptors: Aneurysm, Dissecting; Protein disulfide-isomerases; Isoquercetin; Aortic aneurysm, thoracic; Vascular biomechanics; Aortic aneurysm, abdominal.

1- Introdução

1.1 Aneurisma e dissecação aórtica: uma perturbação na mecanossinalização redox

O aneurisma vascular é caracterizado pela dilatação anormal de um vaso sanguíneo associada ao enfraquecimento estrutural e biomecânico da parede vascular, podendo ter diversas etiologias. No aneurisma, o maior ponto de lesão/degradação ocorre na parte externa do vaso, podendo levar à ruptura vascular e morte (1). A definição formal de aneurisma consiste em uma dilatação arterial de ao menos 50% do seu tamanho original. Além da definição clássica, existem outras definições, como por exemplo, aumento de diâmetro maior ou igual a 30mm, no caso do aneurisma de aorta abdominal em humanos, ou uma relação entre o aumento do diâmetro e a área corporal (2, 3). Aneurismas de aorta têm substancial morbimortalidade, associada à sua expansão, dissecação e ruptura. A dissecação, por sua vez, consiste em uma ruptura na camada interna da aorta, permitindo que o sangue penetre e separe as camadas interna e média da parede vascular, podendo levar a choque hemodinâmico, ruptura vascular e morte (4). A ruptura do aneurisma aórtico leva a aproximadamente 175.000 mortes por ano no mundo (5), enquanto no Brasil estima-se um número de óbitos de 10532 (considerando o ano de 2019), com cerca de 4.86 mortes a cada 100 mil habitantes. Nesse sentido, o aneurisma/dissecação de aorta é um problema clínico desafiador, e até o momento não possui outras terapias eficazes além das cirúrgicas, esta última estando associada a altos riscos para o paciente (6, 7). Desta forma, pode-se dizer que a doença aórtica como um todo consiste em uma necessidade terapêutica que atualmente não está contemplada. Em boa parte, esta lacuna decorre do fato de que seus mecanismos fisiopatológicos são ainda insuficientemente compreendidos (8).

O aneurisma/dissecção de aorta pode ser visto como uma forma extrema de um remodelamento vascular expansivo mal-adaptativo causado por processos simultâneos de inflamação e desequilíbrio de mecano-sinalização. Estes processos relacionam-se estreitamente a uma disfunção da unidade contrátil composta por células musculares lisas vasculares (VSMC) e matriz extracelular (MEC), culminando na perda da capacidade de geração de força por VSMCs (9, 10). Nos aneurismas da aorta abdominal (AAAs), esse remodelamento associa-se principalmente a um padrão pró-inflamatório, não particularmente diferente daquele encontrado, por exemplo, na aterosclerose vascular (11). Este aspecto é relativamente distinto do caso do aneurisma e dissecção da aorta torácica (AATD), em que um importante fator patogênico subjacente consiste em uma mecano-sinalização perturbada (12, 13), embora inflamação também esteja presente (14).

Na Síndrome de Marfan, uma síndrome genética com presença de aneurisma aórtico, as terapias com losartana ou betabloqueadores diminuem a taxa de dilatação aórtica, mas não previnem a dissecção (15), indicando que os dois eventos podem ter até certo ponto mecanismos fisiopatológicos complementares e distintos. Apesar dessas especificidades, alguns mecanismos em comum permeiam a história natural da doença aórtica. Um desses mecanismos integrativos é o estresse redox, tendo em vista a importância dos processos redox na maioria dos aspectos de sinalização e inflamação em células vasculares. Em modelos experimentais de AAA, antioxidantes como a vitamina E, quercetina, resveratrol e apigenina, bem como a superexpressão de catalase dirigida especificamente à VSMC, são capazes de inibir a doença aórtica (1). Outras evidências, ainda que preliminares, sugerem que NADPH oxidases (da família Nox), óxido nítrico sintases desacopladas (16) e mieloperoxidase (17) estão envolvidas no AAA. Na Síndrome de Marfan, processos oxidativos (18), disfunção mitocondrial (19), assim como a geração excessiva de óxido nítrico (20) parecem contribuir para sua fisiopatologia. Nosso grupo tem proposto que processos que acoplam a homeostase tensional mecânica à regulação redox podem ser considerados um mecanismo central do remodelamento vascular (21), como discutido a seguir.

1.2 Remodelamento vascular e sua regulação redox

O conceito de remodelamento vascular está no cerne da história natural de aneurismas e dissecções vasculares. A arquitetura dos vasos sanguíneos é continuamente modificada sob diversos estímulos fisiológicos ou patológicos, um processo conhecido como remodelamento vascular, resultante da contínua reestruturação da parede vascular por mecanismos como hiperplasia da camada intimal, mudanças na função endotelial, na estrutura do colágeno extracelular, da elastina, além de proliferação e migração de VSMCs (22). A terminologia "remodelamento vascular" é utilizada de modo bastante confuso na literatura; alguns autores utilizam o termo em senso lato como qualquer alteração da estrutura vascular. No entanto, em senso estrito, remodelamento vascular designa alterações da arquitetura vascular que modificam o calibre total do vaso, compreendido como a área total circunscrita pela lâmina elástica externa (21). Com efeito, a extensão e o tipo de remodelamento são os principais determinantes do calibre do lúmen vascular em condições (fisi)patológicas, podendo ser de caráter expansivo, em que há aumento na área total do vaso, ou constritivo, em que há diminuição na área total do vaso (21, 23). Isto é, a redução do lúmen vascular em doenças não decorre meramente de um processo obstrutivo por neo-formação ou debris tecidual, mas sim de um processo dinâmico em que o remodelamento vascular interage com esta neocamada, podendo potencializar (se constritivo) ou tamponar (se expansivo) seus efeitos obstrutivos.

Assim, remodelamento vascular, que é um processo intrinsecamente adaptativo, pode ao mesmo tempo, contribuir para a fisiopatologia de diversas doenças cardiovasculares (24). O entendimento de mecanismos responsáveis pelo remodelamento vascular é, portanto, de grande relevância e pode gerar implicações terapêuticas. O remodelamento vascular é dependente de interações complexas entre fatores hemodinâmicos, substâncias vasoativas, citocinas inflamatórias, elementos figurados do sangue e organização da morfoestrutura celular, particularmente do citoesqueleto e da matriz extracelular, processos esses intrinsecamente associados à gênese do

aneurisma aórtico (1, 24). No entanto, fatores que orquestram de modo coordenado estas complexas interações são ainda pouco estabelecidos e constituem-se em potenciais alvos terapêuticos prioritários para modulação do calibre vascular. Nosso grupo propôs e tem trabalhado com a hipótese de que vias de sinalização redox possam exercer tal função coordenadora. Por conseguinte, mecanismos redox envolvidos em aneurismas incluem as diversas vias de sinalização redox interligadas à disfunção da mecanosinalização no contexto do modelo "mecanobiológico-redox" de remodelamento vascular (21). Desta forma, a conexão entre aneurismas vasculares e remodelamento vascular mal-adaptativo envolve vias redox de sinalização celular.

1.3 Vias redox de sinalização celular

Sinalização redox é a transdução de sinais celulares em que o elemento integrativo são reações de transferência de elétrons envolvendo intermediários radicalares ou não radicalares constituídos por espécies reativas de oxigênio e elementos a eles relacionados. O conceito de sinalização redox modificou profundamente o perfil da biomedicina redox a partir da década de 80-90, indicando que estresse oxidativo transcende a definição de um simples desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes capaz de gerar toxicidade e lesão biomolecular. Ao contrário, estresse oxidativo pode ser visto primariamente como um desequilíbrio ou perda de compartimentalização da sinalização redox celular (25). As implicações deste conceito são cruciais quanto ao desenvolvimento e uso de abordagens antioxidantes, bem como ao desenho de biomarcadores de estresse oxidativo (26).

Os mecanismos envolvidos na sinalização redox estão em contínua evolução e há ainda uma série de desafios conceituais e práticos para entender, por exemplo, como certas espécies oxidantes como peróxido de hidrogênio são capazes de ativar alvos celulares específicos (27). Parte desta especificidade tem sido associada à presença de grupos redox-sensíveis em proteínas, cujos principais exemplos são metais redox-ativos e grupos tiol proteicos presentes essencialmente em cisteínas reativas. Cisteínas têm a

capacidade de mudar seu estado redox de uma forma reduzida (CysSH) para uma forma oxidada (i.e., dissulfeto, CysS-S), frequentemente envolvendo vários estados intermediários de oxidação (28). Entretanto, há importantes restrições do ponto de vista de cinética química (particularmente baixas constantes de velocidade de reação), bem como do ponto de vista biológico (particularmente compartimentalização celular) à oxidação direta e específica de cisteínas redox por intermediários oxidantes (29). Certas tiol-proteínas, como por exemplo, peroxirredoxinas ou certas glutathiona-peroxidases, têm altas constantes de reação com peróxido de hidrogênio e podem assim ser rapidamente oxidadas por peróxido de hidrogênio e transmitir o dissulfeto a proteínas interatoras (30, 31). Isto é, a sinalização redox pode depender em boa parte de certas proteínas adaptadoras, no caso sensores redox como peroxirredoxinas.

Um outro modelo de tiol-proteínas com potencial capacidade adaptadora neste contexto, menos estudado sob este ângulo, são proteínas com efeitos locais de modulação de alvos redox por meio de interações diretas que podem inclusive envolver mecanismos tipo chaperona. Este é caso de proteínas da superfamília da tioredoxina, um dos mais importantes grupos de tiol-proteínas envolvidas em homeostase e sinalização celular. Membros desta família contém um domínio tioredoxina cuja principal característica é um enovelamento específico (5 folhas β cercadas por 4 hélices α). Ainda, estes domínios usualmente exibem um motivo redox-ativo com a sequência Cys-X-X-Cys, conhecido como motivo tioredoxina, em que X representa um aminoácido não especificado, capaz de influenciar potencial redox e cinética de reação da proteína contendo este motivo (32). Um dos principais subgrupos pertencentes à super-família das tioredoxinas são as proteínas da família da Proteína Dissulfeto Isomerase (PDI), abordadas em nosso estudo.

1.4 Proteína dissulfeto Isomerase (PDIA1)

PDIs são ditiol-dissulfeto oxido redutases com atividade chaperona. A função canônica de PDIs é introduzir (oxidar), reduzir ou isomerizar corretamente ligações dissulfeto durante o enovelamento proteico no lúmen do

retículo endoplasmático (RE) (33, 34). As proteínas clientes de PDIs são tipicamente destinadas à secreção e inserção em membrana plasmática, correspondendo a 1/3 de todas as proteínas celulares (33).

A PDIA1 (55kDa, frequentemente designada apenas como PDI, codificada pelo gene P4HB) é o membro fundador da família de tiol isomerases composta por mais de 21 membros. As PDIs variam em tamanho e estrutura de domínios, bem como expressão, localização subcelular e função. A PDIA1, o paradigma da família, tem 4 domínios tiorredoxina ordenados na sequência **a-b'-a'**. A localização no RE é proporcionada por um peptídeo de sinal N-terminal (17 aminoácidos) (35), assim como pelo domínio C-terminal contendo o motivo KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) de recuperação para o RE. A proteína tem o formato de uma ferradura retorcida, contendo os domínios a e a' em cada um de seus braços. Os domínios a e a' contêm os motivos ditiol catalíticos redox-ativos (Cys-Gly-His-Cys). Os domínios b e b' formam a base da ferradura e são cataliticamente inativos e ricos em resíduos hidrofóbicos envolvidos na ligação da PDIA1 a substratos, assim como na atividade chaperona da PDIA1, que per se é independente dos motivos tiol-redox da proteína (32, 34, 36) (Figura 1). A sequência parcialmente desestruturada do x-linker, entre os domínios a' e b', confere importante mobilidade à proteína. Além de regular a afinidade a distintos substratos ou ligantes, tal mobilidade é responsável pela modulação redox da arquitetura da PDIA1. A PDIA1 reduzida tem estrutura mais compacta, enquanto a PDIA1 oxidada exhibe conformação preferencialmente aberta, capaz de expor domínios de ligação a substratos e aumentar a atividade chaperona (34, 37).

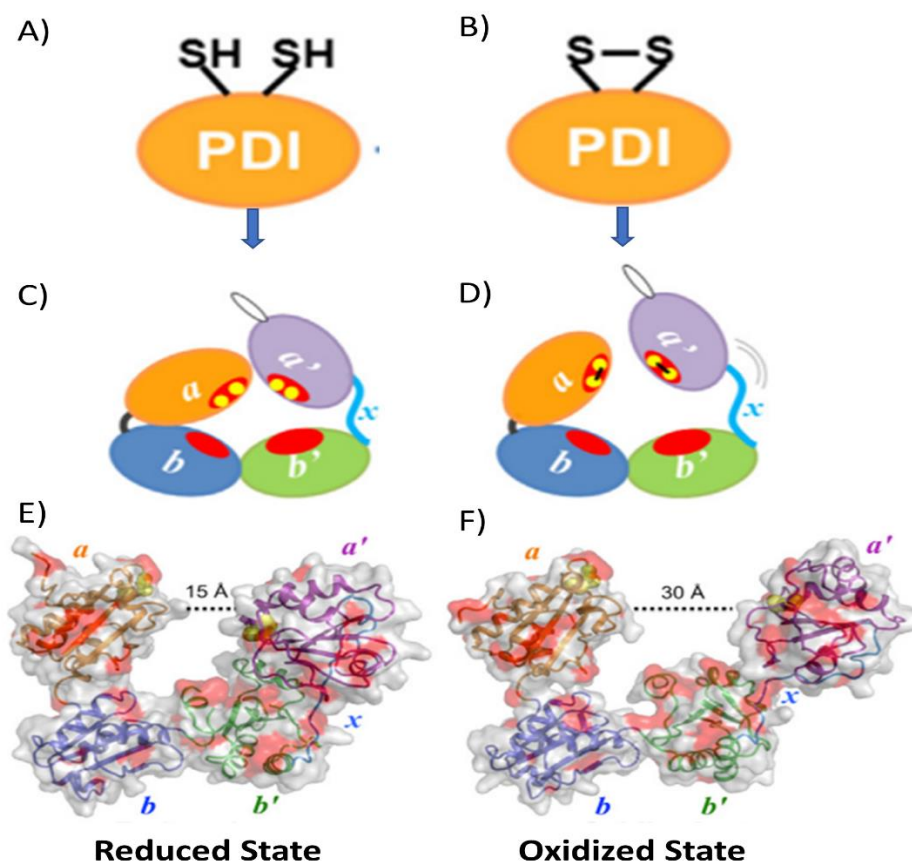


Figura 1: Esta figura foi adaptada de Wang; Wang *et al.*, 2015 (37) e demonstra a estrutura geral da Proteína Dissulfeto Isomerase A1. (A) PDIA1 reduzida, evidenciando a presença de tióis livres nos seus sítios catalíticos a e a'. (B) PDIA1 oxidada, evidenciando a formação de pontes dissulfeto nos seus sítios catalíticos a e a'. (C) Composição estrutural da PDIA1 reduzida demonstrando o posicionamento de seus domínios tiorredoxina a-b-b'-a', assim como a sequência desestruturada x-linker (D) Composição estrutural da PDIA1 oxidada demonstrando o posicionamento de seus domínios tiorredoxina a-b-b'-a', assim como a sequência desestruturada x-linker (E) Estrutura cristalina da PDIA1 mostrando a forma geral adotada pela proteína em seu estado reduzido. (F) Estrutura cristalina da PDIA1 mostrando a forma geral adotada pela proteína em seu estado oxidado.

A PDIA1 é uma proteína abundantemente expressa no lúmen do RE, com meia-vida alta (ca. 96h) e tem expressão ubíqua em diferentes tecidos e tipos celulares (33, 34). Inúmeras evidências indicam a existência de um pool extracelular de PDIA1 proporcionado por secreção ativa da proteína na ausência de lesão celular (28, 38). Embora este pool seja quantitativamente menor (<2%) que o pool intracelular (39), ele exerce importantes funções como trombose (40), ativação plaquetária (41), controle da entrada de vírus na célula

(42), ativação de metaloproteinases (38) e controle fino de mecanoadaptação (43).

Uma condição que aumenta a expressão de PDIA1 é o estresse sustentado do RE, embora a PDIA1 não tenha em seu promotor um elemento responsivo à *unfolded protein response* (35, 44). Além do efeito no enovelamento redox, PDIA1 e PDIs em geral contribuem para a homeostase proteica celular por promover o transporte retrógrado de proteínas irreversivelmente mal-enoveladas para degradação citosólica pelo sistema ubiquitina-proteasoma, um processo conhecido como “degradação de proteínas associada ao RE” (ERAD). Ainda, PDIA1 pode induzir retenção de certas proteínas, particularmente as grandes e complexas, no lúmen do ER para seu adequado processamento. Esta atividade, por nós denominada "holdase-like", contribui para o controle de qualidade da fibrilina-1 e protege a matriz extracelular contra efeitos da mutação dessa proteína na Síndrome de Marfan (45).

Estudos continuados do nosso laboratório caracterizaram vários efeitos adicionais de PDIA1 relacionados ao seu possível papel em sinalização redox. Em particular, descrevemos a regulação pela PDIA1 dos complexos Nox NADPH oxidases, as principais fontes enzimáticas dedicadas à geração de oxidantes (46; 47). PDIA1 age como possível adaptadora da ativação do complexo NADPH oxidase em células musculares lisas vasculares (48), bem como macrófagos (49), células endoteliais e neutrófilos (34). Experimentos de perda de função da PDI (48) com antagonistas farmacológicos, anticorpos neutralizantes, oligonucleotídeos antisense e RNA de interferência (50) evidenciaram de modo consistente que a PDI sustenta funcionalmente a oxidase, e particularmente sua ativação por angiotensina II ou fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (51). PDIA1 tem papel essencial migração de VSMC, ativação de RhoGTPase (51) e reorganização do citoesqueleto (21). PDIA1 interage física e funcionalmente com a subunidade p47phox da Nox1 (52). A superexpressão aguda de PDIA1 desencadeia a migração de VSMC, enquanto sua superexpressão sustentada se associa à mudança para um fenótipo diferenciado (53).

Como citado anteriormente, um pool específico extracelular de PDIA1 - presente na superfície celular e secretado - foi bem caracterizado, é capaz de atuar como mediador tiol-redox de diversos processos complexos (34, 38). Mostramos previamente que PDIA1 peri/epitelial (pecPDI) é um mediador do remodelamento vascular durante o reparo a uma lesão mecânica (43). Ainda em VSMCs, o pool extracelular de PDIA1 promove o ajuste fino e direcionado de processos de mecanoadaptação, incluindo distribuição organizada de força, persistência da migração e organização do citoesqueleto de actina (54). Juntos, tais efeitos da PDIA1 sugerem seu envolvimento com vários mecanismos envolvidos na fisiopatologia da dissecção e aneurisma de aorta, a saber, fenótipo das VSMC, regulação mecanobiológica, sinalização dependente de matriz extracelular proteção contra o estresse do RE (34). Estresse do RE é outro mecanismo reconhecidamente envolvido com progressão de doença aórtica (55).

Considerando tais efeitos da PDIA1, a principal pergunta a ser abordada no presente estudo é o efeito da PDIA1 na progressão do aneurisma / dissecção de aorta. Para isso, utilizaremos duas estratégias, cujos princípios serão descritos a seguir.

1.5 Modelo transgênico de superexpressão de PDIA1 em camundongos

Dado o potencial envolvimento da PDIA1 em diversos pontos comuns relacionados ao aneurisma/dissecção aórtica, nosso grupo desenvolveu um modelo de camundongo transgênico, em um fundo genético FVB, capaz de superexpressar constitutivamente a PDIA1 (TgPDIA1) (53). A escolha por este tipo de ferramenta se deve ao fato de que a deleção genética de PDIA1 é letal ainda na fase embrionária e mesmo em sua forma heterozigota tende a promover importante estresse do RE. Os camundongos TgPDIA1 não têm fenótipo global obviamente diferente dos controles e mostram reprodução e desenvolvimento dentro dos limites da normalidade. Camundongos TgPDIA1 exibem variáveis ecocardiográficas similares aos camundongos selvagens de mesmo fundo e apresentam pressão arterial basal normal. No entanto, as VSMCs de artérias de condutância (carótidas e aorta) exibem marcadores de

diferenciação aumentados como calponina e exibem maior expressão de Nox4 (comumente associada à diferenciação de VSMC) e menor expressão de Nox1 (comumente associada ao fenótipo sintético-proliferativo de VSMC). É interessante notar que neste mesmo estudo a superexpressão sustentada de PDIA1 em VSMC cultivadas por meio de vetor viral induzível por tetraciclinas promoveu um desvio tardio do fenótipo das VSMCs para um fenótipo mais diferenciado, com maior expressão de Nox4 e produção de peróxido de hidrogênio (53).

1.6 Estratégias para inibição da PDIA1

Um dos efeitos da PDIA1 que tem impulsionado o desenvolvimento de inibidores é o seu papel na trombose vascular. É bem aceito que tiol isomerases extracelulares incluindo algumas PDIs exercem um papel crítico na formação de trombos. Inúmeros estudos comprovaram que a liberação extracelular dessas PDIs é um sinal de lesão vascular que estimula a agregação plaquetária e formação de fibrina (41, 56, 57). Os mecanismos envolvem efeitos tiol-redox na modulação da sinalização de integrinas, fatores de coagulação e proteínas plasmáticas (58). Estudos recentes (59) mostraram que PDI é liberada extracelularmente por lesões do endotélio vascular como um sinal desencadeante de ativação plaquetária e trombose e tem ação redutase de tiol em alvos específicos como a vitronectina, sendo também capaz de se associar a proteínas como vários fatores do complemento, alfa2-macroglobulina, proteína S, glicoproteína rica em histidina, trombospondina 1 e pró-trombina. Inibição da pecPDI bloqueia a progressão da trombose em inúmeros modelos de lesão, com diferentes localizações (57).

Esses resultados levaram à busca por inibidores da pecPDI, e muitas moléculas identificadas, apesar de sua capacidade inibitória, possuem baixa potência e especificidade quanto ao efeito em tiol isomerases (60). Em estudos mais abrangentes abordando uma biblioteca de compostos bioativos, foram identificados vários flavonoides derivados da quercetina, por exemplo quercetina-3-rutinosídeo e isoquercetina (IQ), como potentes inibidores da pecPDI (61). A IQ é um composto flavonóide e, como tal, tem efeitos

antioxidantes e outros efeitos pleiotrópicos adicionais (62). Em paralelo, é bem caracterizada como um inibidor da atividade da PDIA1, particularmente de sua porção extracelular. A IQ mostrou-se capaz de inibir a geração de trombos arteriais dependente de PDIA1 (61) e mitigar a evidência de aumento da ativação da cascata de coagulação em pacientes com câncer em risco de trombose venosa (63). Sabe-se que a IQ se liga à PDIA1 afetando a mobilidade de seu domínio de ligação x não estruturado, levando a inibição da atividade enzimática, de forma semelhante ao seu análogo quercetina-3-rutinosídeo (rutina) (64). Suas estruturas químicas são mostradas na figura suplementar 1 e são bem semelhantes, porém a IQ exibe melhor absorção oral (64). Além disso, tanto a rutina quanto a isoquercetina são encontradas em frutas, vegetais, chás e grãos, e deste modo são abundantemente disponíveis como suplementos nutricionais, com mínima toxicidade reportada (65). De fato, tais propriedades conferem a esta família de compostos a classificação GRAS ("generally recognized as safe") da Food and Drug Administration (FDA), o que torna dispensável a realização de extensos estudos pré-clínicos de toxicidade, facilitando uma eventual futura aplicação translacional do composto à prática clínica.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Investigar os efeitos da inibição farmacológica e superexpressão da PDIA1 no aneurisma e dissecção aórtica.

2.2 Objetivos específicos:

a) Avaliar efeitos da inibição farmacológica da pecPDI na progressão do aneurisma/dissecção da aorta torácica (AATD) em camundongos submetidos à inibição da lisil-oxidase com BAPN, avaliando alterações ecocardiográficas in vivo, estrutura histopatológica, produção de oxidantes, propriedades viscoelásticas e expressão de proteínas associadas ao estresse do retículo endoplasmático.

b) Avaliar os efeitos da superexpressão da PDIA1 utilizando camundongos transgênicos que superexpressam a PDI, submetidos a BAPN na água de beber e a uma bomba osmótica implantável de angiotensina II, para desenvolvimento do aneurisma/dissecção aórtica. Avaliando alterações ecocardiográficas in vivo e estrutura histopatológica desses camundongos.

3 Materiais e Métodos

3.1 Nomenclatura dos segmentos aórticos

Ao longo deste documento, os segmentos aórticos foram designados do modo ilustrado na figura suplementar 2.

3.2 Modelos experimentais

Este estudo foi realizado de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e Federação das Universidades de Bem-Estar Animal e foi aprovado pelo comitê de ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (processo 838/2017).

3.2.1 Indução de doença aórtica em camundongos transgênicos que superexpressam PDIA1

Utilizamos um modelo transgênico de superexpressão de PDIA1 previamente desenvolvido por nosso grupo (discutido à Introdução desta tese) (TgPDIA1), no qual a PDIA1 tem superexpressão constitutiva e ubíqua (53). Este modelo foi estabelecido em camundongos de fundo genético FVB. Um total de 34 camundongos, com 8 semanas de idade, foi utilizado, dos quais 13 eram controles de genótipo selvagem (WT) e 21 TgPDIA1. O inibidor da lisil oxidase beta-amino propionitrilo (BAPN) foi administrado na água potável na dose de 1g/kg/dia durante 28 dias (66), com cálculos assumindo que o consumo médio de água de um camundongo é de 5ml/dia. O BAPN foi administrado em associação com uma infusão de angiotensina II (AngII) durante 28 dias, iniciada juntamente com o BAPN. A AngII foi administrada por meio de uma bomba osmótica (Alzet), implantada por via subcutânea na região dorsal próxima ao pescoço do camundongo. A avaliação ecocardiográfica inicial foi realizada em todos os camundongos. No 28^o dia de tratamento, os

camundongos sobreviventes foram submetidos à avaliação ecocardiográfica e posteriormente eutanasiados para coleta da aorta. Todos os camundongos foram checados ao menos duas vezes ao dia e aqueles que morreram antes do término dos 28 dias de exposição passaram por exame macroscópico assim que identificado o óbito.

3.2.2 Modelo de inibição de lisil oxidase de dissecção aórtica em camundongos C57BL/6 N-tac

A dissecção aórtica foi induzida experimentalmente em camundongos WT C57BL/6Ntac (empresa Taconic) de 3 semanas de idade pelo uso de BAPN, administrado em água potável na dose de 1g/kg/dia durante 4 semanas, conforme descrito anteriormente (66). Além disso, os camundongos receberam isoquercetina (IQ) ou veículo (v. item 3.3). Portanto, o desenho experimental envolveu 4 grupos: 1) Fenótipo selvagem (WT) (WT, controle, n=12); 2) Camundongos WT tratados com IQ (n=8); 3) Camundongos expostos a BAPN (n=22); 4) Camundongos expostos a BAPN + tratamento com IQ (n=24). A avaliação ecocardiográfica inicial foi realizada em todos os camundongos. No 28º dia de tratamento, os camundongos sobreviventes foram submetidos à avaliação ecocardiográfica e posteriormente eutanasiados para coleta da aorta. Os camundongos foram acompanhados com a mesma frequência descrita no protocolo anterior.

3.3 Administração de isoquercetina (IQ)

O uso de IQ como um inibidor de PDIA1 capaz de se ligar a regiões específicas desta proteína foi bem documentado anteriormente na literatura (61); Zwicker *et al.*, 2019), como discutido à Introdução. IQ exibe permeabilidade de membrana limitada e boa biodisponibilidade após administração oral (61, 64, 67). A IQ foi administrada por gavagem na dose de 5,8 mg/kg/dia (em dose única), usando DMSO como veículo, pois a IQ é pouco solúvel em água (61). Os camundongos tratados com BAPN que não receberam IQ, receberam apenas o seu veículo DMSO (n=22). Os cálculos

usados para definir as doses administradas em nosso protocolo foram derivados de estudos de administração aguda, que investigaram os efeitos de 5,0 mg/kg quercetina-3-rutinosídeo (61), corrigindo para a pequena diferença na IC50s da IQ. É importante notar que a IQ foi diluída diariamente a partir de uma solução estoque em 100% de DMSO, a qual foi diluída 20x imediatamente antes da administração, atingindo uma concentração final de 5% de DMSO.

3.4 Análise ecocardiográfica in vivo

A análise ecocardiográfica foi realizada por meio de um sistema de ultrassom (VEVO 2100–Visual Sonics - Canadá) com sonda de 35 MHz, disponível na rede premium da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). A aquisição das imagens e respectivas medidas foram realizadas por operadores experimentados de acordo com as recomendações do Comitê de Padronização da Sociedade Americana de Ecocardiografia. Os camundongos foram sedados com mistura inalatória de isoflurano a 2% e submetidos a exame ecocardiográfico no dia 0 e no vigésimo oitavo dia de protocolo. Além dos parâmetros cardíacos, foram mensurados o diâmetro interno da aorta ascendente, arco aórtico, aorta descendente e fragmento de aorta abdominal, entre o diafragma e a artéria renal esquerda, nas fases diastólica e sistólica. O diâmetro interno do fragmento proximal do tronco braquiocefálico, artérias carótida comum esquerda e subclávia foram mensurados na fase sistólica. Essas medidas foram adaptadas de: (68, 69, 70). Todas as análises quantitativas foram realizadas às cegas para os grupos.

3.5 Histopatologia dos segmentos aórticos

A estrutura histopatológica de segmentos da aorta torácica e abdominal foi avaliada com foco na estrutura geral e análise qualitativa/quantitativa das quebras de fibras elásticas e grau de acúmulo de colágeno. Os segmentos arteriais foram removidos após serem perfundidos in situ a pressões fisiológicas com PBS e formalina tamponada a 4%. Em seguida, os segmentos aórticos foram imersos em formol tamponado a 4% por 24 h, incluídos em

parafina e cortados em fatias de 3 μ m de espessura. Foram utilizadas colorações de hematoxilina-eosina (HE), Picrosirius (para análise de colágeno) e Verhoeff-van Gieson (para análise de fibras elásticas). A quantificação do colágeno foi realizada por meio de microscopia óptica, medindo-se a área de deposição de colágeno ajustada à área total do vaso. Para uma análise mais detalhada, o tecido corado com Picrosirius foi observado por microscopia confocal, em que as fibras de colágeno foram acessadas por laser de 546 nm (vermelho) e a autofluorescência das fibras elásticas acessada por laser de 488 nm (azul) sob imersão em água, objetiva de 63 X, utilizando um microscópio confocal de disco giratório a laser invertido (Zeiss cell observator SD). Todos os parâmetros foram medidos usando o software Image J (NIH) conforme descrito previamente (43). A quantificação de rupturas de fibras elásticas foi realizada por contagem visual de rupturas de fibras, ajustadas para a área total do vaso, adquirida também pelo software Image J.

3.6 Propriedades viscoelásticas da aorta

Essa análise foi realizada com o equipamento Multi Wire Myograph 620M (DMT). Os valores de estresse foram normalizados pelo peso seco dos anéis aórticos (43). A responsividade à tensão vascular isométrica foi testada em diferentes condições de estiramento progressivo. A estabilidade a curto prazo (5 min) foi mantida em banho de órgão com solução de Krebs sem cálcio, suplementada com 3 mM EDTA e 100 μ M nitroprussiato de sódio. Os anéis foram estabilizados a uma tensão de 0,1g e incrementos em série de 50 μ m cada foram realizados, com registro contínuo da tensão desenvolvida ao longo de 20 segundos. O experimento foi continuado até a ruptura do anel aórtico. Para análise quantitativa, foram definidos dois pontos diferentes de falha de tensão: falha que denominamos “inicial” (em que a resposta de tensão parou de aumentar durante o estiramento progressivo) e falha que denominamos “avançada” (em que a resposta de tensão começou a diminuir durante o estiramento progressivo).

3.7 Ensaio de Diclorofluoresceína (DCF)

Este ensaio foi realizado em cultura primária de células do músculo liso vascular da aorta de coelho, plaqueadas a uma concentração de 2×10^5 células por câmara. Vinte e quatro horas após o plaqueamento, as células foram privadas de soro por 12 horas, seguidas por incubação com 250 μM de BAPN ou veículo por 24 h; esta concentração foi adaptada de Li et al. (2019) (71). Em alguns casos, nas últimas 4 horas de incubação, as células foram expostas a estiramento cíclico com as seguintes especificações: grau de estiramento de 2%, 60 ciclos por minuto, utilizando o sistema Automated Cell Stretching System STB-1400 da marca Strex. Na última hora de incubação, 10 μM de isoquercetina ou veículo foram adicionados à câmara. Após 24 h de incubação, as células foram lavadas com PBS, adicionando em seguida 2,7diclorofluoresceína diacetato (H₂DCFDA) (Invitrogen -Thermo) a uma concentração de 10 μM (72).

Como controle positivo paralelo, H₂O₂ foi adicionado em concentração final de 300 μM . As células permaneceram incubadas com a sonda (DCF) por 30 minutos, depois foram lavadas novamente com tampão fosfato salino (PBS) e finalmente incubadas com 250 μL de PBS, raspadas sob este tampão e coletadas. Deste material, 150 μL foram usados para leitura de fluorescência a 520 nm excitação / 485 nm de emissão. A quantificação proteica foi realizada pelo kit BCA (Thermofisher) e os resultados expressos em Unidade relativa de fluorescência (RFU)/mg proteína. Os grupos experimentais de células foram: Controle negativo (células apenas); DCF (células + sonda); DCF + estiramento (células + sonda + estiramento); IQ (células + sonda + IQ); IQ + estiramento (células + sonda + IQ + estiramento); BAPN (células + sonda + BAPN); BAPN + estiramento (células + sonda + BAPN + estiramento); BAPN + IQ (células + sonda + BAPN + isoquercetina); BAPN + IQ + estiramento (células + sonda + BAPN + isoquercetina + estiramento) e controle positivo (células + sonda + H₂O₂) (72).

3.8 PCR em tempo real

O RNA total foi extraído com Trizol (Invitrogen) e transcrito de maneira reversa usando Super Script II e primers aleatórios. Real-time RT-PCR foi realizada usando Platinum SYBR Green qPCR super Mix-UDG (Invitrogen) em um sistema Step One Plus™ Real-Time PCR. Todas as reações foram acompanhadas por um controle negativo e as comparações realizadas usando o valor delta do limiar do ciclo (Ct). Os resultados foram expressos como “Fold Change” (medida de expressão gênica) usando a fórmula ($2^{\Delta\Delta Ct}$), de acordo com o guia Applied Biosystems (73). Primers para GRP94, CHOP, ATF4, ATF6 e BIP foram usados como descrito anteriormente (73). HPRT foi usado como um normalizador.

3.9 Análise estatística

Todos os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média. As curvas de sobrevivência foram estimadas usando análise de sobrevivência de Kaplan-Meier por comparação log-rank e teste de Gehan-Breslow-Wilcoxon. As comparações entre TgPDIA1 e camundongos selvagens foram analisadas pelo teste T. Para o modelo de camundongo C57BL6, utilizamos ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey. A análise comparando as falhas iniciais e finais nos 4 grupos experimentais foi realizada por ANOVA de duas vias seguida do teste post-hoc de Tukey. Todas as análises foram realizadas usando GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA). O nível de significância considerado foi de 5%.

4- Resultados

4.1 Superexpressão de PDIA1 em modelo transgênico protege contra dissecação aórtica

Para testar o efeito da PDIA1 na evolução da doença aórtica, utilizamos um modelo transgênico de superexpressão sistêmica constitutiva de PDIA1 (TgPDIA1), recentemente desenvolvido e validado por nosso grupo (vide tópico 1.5) (53). Submetemos camundongos de genótipo selvagem e TgPDIA1 com 8 semanas de idade a um protocolo de indução de aneurisma/dissecação da aorta. Uma vez que os camundongos TgPDIA1 foram criados a partir do fundo genético FVB, que é mais resistente ao desenvolvimento de aneurisma/dissecação da aorta (66), realizamos estudos preliminares para validação do modelo e confirmamos que a exposição de camundongos WT ou TgPDIA1 ao BAPN sozinho não levou a dissecações (dados não mostrados).

Assim, recorremos a um protocolo em que BAPN foi administrado concomitantemente a uma infusão de AngII (1000ng/kg/min) por 28 dias por meio de uma bomba osmótica (ver Métodos). Este modelo foi modificado a partir de estudos prévios da literatura mostrando que a administração oral de BAPN por 28 dias combinada a uma infusão aguda de AngII induziu dissecação de aorta torácica em camundongos FVB (66). Nosso protocolo, por sua vez, foi capaz de induzir dissecação da aorta abdominal em média em 50% dos camundongos WT ao longo dos 28 dias, associada a evidência de doença na aorta torácica (Tabela 1). A análise de sobrevivência de Kaplan-Meier, utilizando comparação por log-rank e teste de Gehan-Breslow-Wilcoxon, mostrou diminuição significativa na mortalidade decorrente de dissecação/ruptura aórtica em camundongos TgPDIA1 vs. WT, com taxas médias de 50% (WT) e 25% (TgPDIA1) no período de 28 dias (Tabela 1 e Figura 2).

A análise ecocardiográfica dos camundongos sobreviventes mostrou que os camundongos TgPDIA1 tinham um diâmetro menor do segmento do arco

aórtico em comparação aos camundongos WT (Figura 2B), enquanto a análise das outras porções da aorta torácica, bem como da aorta abdominal, não mostrou diferenças de diâmetro entre TgPDIA1 e WT (Figura 2C e Figura Suplementar 5). Estes resultados indicam que este modelo foca particularmente na dissecação de aorta, com menor formação de aneurisma. A nomenclatura dos segmentos aórticos utilizada neste trabalho é ilustrada na Figura suplementar 2. Da mesma forma, não houve diferenças entre os grupos quando analisados os seguintes parâmetros: diâmetro do ventrículo esquerdo em sístole/diástole e diâmetro das 3 principais ramificações da aorta torácica (Figura Suplementar 6). O efeito protetor da superexpressão de PDIA1 não foi devido a menores respostas pressóricas à AngII, uma vez que a pressão arterial média aumentou em média 35 mmHg no camundongo WT versus 43 mmHg em camundongos TgPDIA1 (dados não mostrados).

Tabela 1: Taxas médias de dissecação aórtica com ou sem ruptura em camundongos WT e TgPDIA1 expostos a BAPN + AngII

	WT	TgPDIA1
Abdominal dissection	50.0%	25.0%
Rupture/Death	50.0%	25.0%

-TgPDIA1: camundongos com superexpressão constitutiva ubíqua de PDIA1

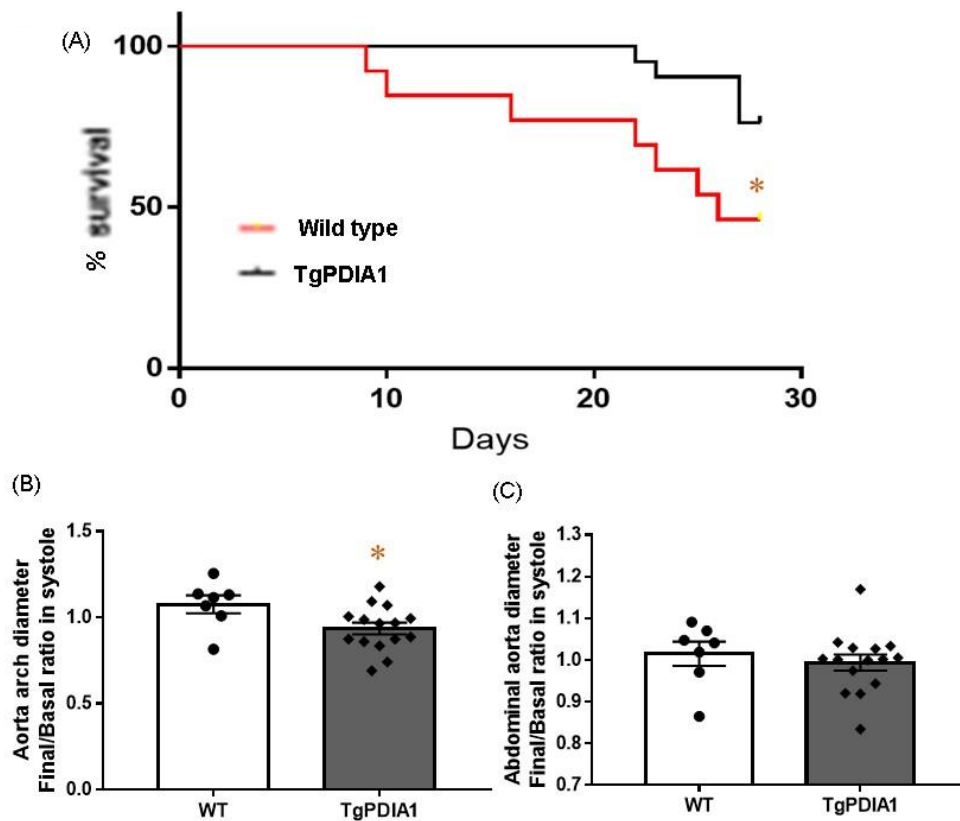


Figura 2: Taxas reduzidas de mortalidade por ruptura aórtica em camundongos TgPDIA1 versus controle no modelo de dissecção aórtica induzido por BAPN + AngII. (A) Curva de Kaplan-Meier representando as taxas de sobrevivência de camundongos selvagem WT em comparação com camundongos TgPDIA1 mice, * teste Gehan-Breslow-Wilcoxon: $p = 0,022$; (B) Diâmetro sistólico do arco aórtico, expresso como a razão entre os diâmetros final (28 dias) e inicial (basal). * $p=0,036$ vs. controle selvagem WT; (C) Diâmetro sistólico da aorta abdominal, expresso como a razão entre os diâmetros final (28 dias) e inicial (basal); $p>0,05$. Em (B) e (C), o teste T foi usado para as comparações estatísticas.

4.2 Redução nas taxas de quebras de fibras elásticas em camundongos com superexpressão de PDIA1

Investigamos a integridade da matriz extracelular na aorta de camundongos TgPDIA1 e WT expostos a BAPN e AngII, avaliando quantitativamente a quebra de fibras elásticas e deposição de colágeno. Camundongos TgPDIA1 exibiram diminuição do número de quebras de fibras elásticas na porção superior da aorta torácica descendente quando comparados a camundongos WT (Figura 3B). Entretanto, a quantidade de colágeno mostrou-se semelhante entre esses grupos na porção superior da

aorta torácica descendente (Figura 3C) ou aorta abdominal (Figura Suplementar 8F). O acúmulo de colágeno não diferiu entre camundongos TgPDIA1 e WT em todas as porções avaliadas da aorta (Figura Suplementar 8B, D e F), apesar de pequena diminuição não significativa ($p=0,066$) na porção superior da aorta torácica descendente em camundongos TgPDIA1 vs. WT (Figura 3C).

Em conjunto, os resultados globais desta etapa do estudo indicam que a superexpressão constitutiva de PDIA1 está associada a redução da extensão da doença aórtica e dissecção no modelo de BAPN/angiotensina.

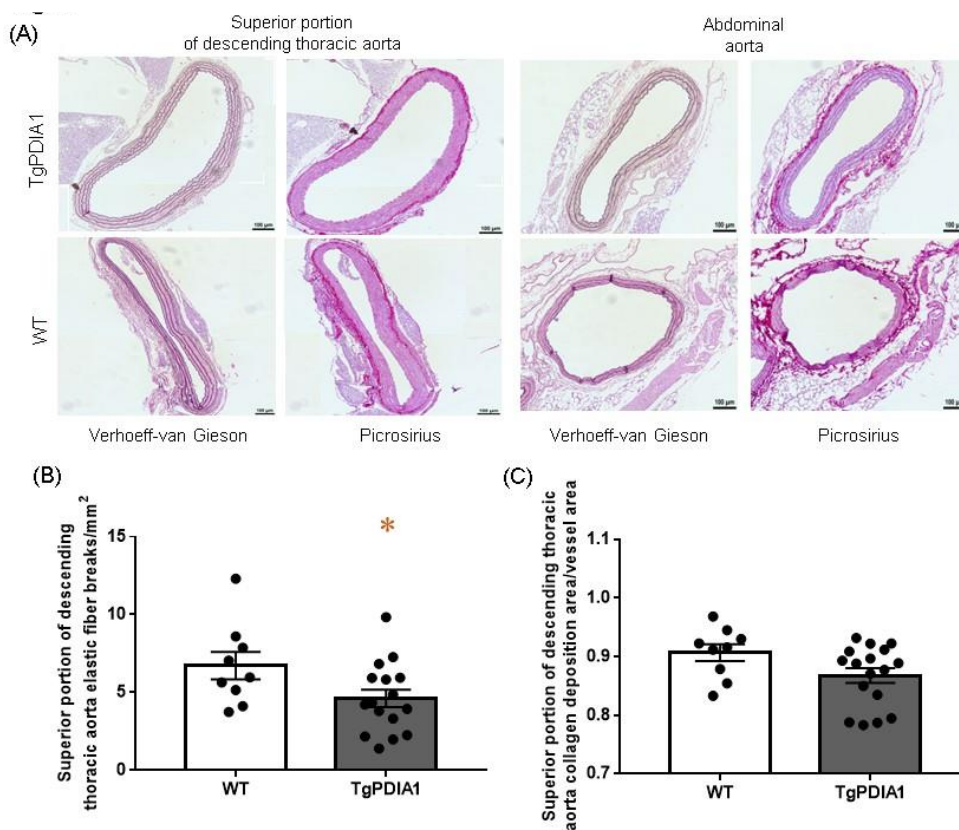


Figura 3: Análise de quebra de fibras elásticas e deposição de colágeno em camundongos TgPDIA1 versus WT no modelo de dissecção aórtica induzido por BAPN + AngII. (A) Análise histológica da porção superior da aorta torácica descendente mediante coloração de Verhoeff-van Gieson (fibras elásticas em cor preta) e Picosirius (colágeno em cor vermelha escura) em camundongos selvagem WT e TgPDIA1; (B) Quebra de fibras elásticas na porção superior da aorta torácica descendente em camundongos WT e TgPDIA1. * $p=0,047$ vs. WT. (C) Deposição de colágeno normalizada pela área do vaso na porção superior da aorta torácica descendente em camundongos WT e TgPDIA1; $p>0,05$. Em (B) e (C), o teste T foi utilizado para as comparações estatísticas.

4.3 Exposição à isquercetina (IQ) aumenta as taxas de mortalidade por dissecação aórtica em modelo de inibição da lisil oxidase

Como a superexpressão de PDIA1 reduziu as taxas de mortalidade e dissecação aórtica sem alterações claras no diâmetro da aorta, concentramos nossos esforços nos efeitos da administração de IQ em um modelo análogo de dissecação aórtica previamente descrito na literatura (66), a saber, inibição da lisil oxidase em camundongos C57BL/6 de 3 semanas de idade. Para validar inicialmente as doses de BAPN, os camundongos foram primeiramente expostos a 2g/kg/dia de BAPN na água de beber. No entanto, isso levou a uma taxa de mortalidade em 28 dias de 100%, tanto nos grupos expostos ao BAPN quanto ao BAPN + IQ (dados não mostrados). Assim, ajustamos a dose para 1g/kg/dia por 28 dias. Sob esta condição, a exposição ao BAPN+IQ aumentou a mortalidade decorrente de dissecação/ruptura da aorta torácica em camundongos expostos ao BAPN, com taxas médias de 50,0% e 18,2% respectivamente (Figura 4A e Tabela 2). Essa diferença foi documentada por meio de análise de sobrevivência de Kaplan-Meier utilizando comparação de log-rank e teste de Gehan-Breslow-Wilcoxon. O tratamento de camundongos WT apenas com IQ não induziu mortalidade (Figura 4A). É importante ressaltar que todos os camundongos que morreram ao longo do período de 28 dias deste protocolo apresentaram sinais macroscópicos de ruptura aórtica (sangue na cavidade torácica, laceração aórtica evidente e hematomas de parede) além da formação de um duplo lúmen vascular, confirmando assim a dissecação/ruptura aórtica. Além da dissecação com ruptura, as taxas de dissecação sem ruptura foram as seguintes: controle, 0%; IQ, 0%; BAPN, 4,55%; BAPN+IQ, 0% (Tabela 2). A análise estatística das dissecações totais (com + sem ruptura) seguiu o mesmo padrão das taxas de mortalidade na Figura 4A (dados não mostrados). Em todos os casos em que a arquitetura aórtica estava suficientemente preservada, pudemos traçar a origem da dissecação na transição entre o arco aórtico e aorta descendente, próximo à emergência da artéria subclávia esquerda.

Embora a dilatação macroscópica da aorta tenha sido evidente em alguns camundongos que receberam BAPN ou BAPN + IQ, a análise

ecocardiográfica geral dos camundongos sobreviventes ao protocolo de 28 dias não mostrou diferença no diâmetro dos segmentos aórticos entre os distintos grupos avaliados (Figura 4B e Figura suplementar 3). De modo semelhante ao protocolo BAPN+AngII descrito anteriormente, esse resultado pode ter sido afetado pela não inclusão de camundongos que morreram antes do exame ecocardiográfico no dia 28. Assim, em experimentos adicionais (n=19), realizamos ecocardiografia após 21 dias de protocolo com BAPN, mas também não encontramos diferenças entre os grupos (Figura suplementar 3F). Isso indica que as condições desse modelo favorecem preferencialmente a ocorrência de dissecação, com menor formação de aneurisma de aorta torácica. Outras variáveis ecocardiográficas também não mostraram diferenças significativas entre os grupos, incluindo diâmetros do VE e diâmetros das artérias subclávia e carótida (Figura suplementar 4). Uma exceção foi o diâmetro do tronco braquiocefálico, que aumentou em camundongos expostos apenas a IQ versus BAPN+IQ (Figura suplementar 4A).

O exame histológico evidenciou que os camundongos tratados com BAPN+IQ exibiram um aumento nas quebras de fibras elásticas em comparação com WT nas porções superior (Figura 4C) e inferior (Figura suplementar 8) da aorta torácica descendente, enquanto camundongos expostos apenas BAPN não demonstraram aumento significativo. Camundongos tratados com BAPN+IQ apresentaram maior acúmulo de colágeno versus WT na porção superior (Figura 4D) e inferior (Figura suplementar 8B) da aorta torácica descendente. A Figura 5 ilustra esta análise, mostrando espessamento da parede vascular com formação de duplo lúmen em camundongos expostos a BAPN, agravado pelo tratamento concomitante com IQ (Figura 5A). Observamos alterações análogas quanto à arquitetura de fibras elásticas (Figura 5B) e acúmulo de colágeno (Figura 5C-D).

Tabela 2: Taxas médias de dissecação aórtica com ou sem ruptura em camundongos expostos a BAPN, IQ ou BAPN+IQ

	Controle	BAPN	IQ	BAPN + IQ.
Dissecação aorta	0%	22.7%	0%	50.0%
Ruptura/Morte	0%	18.2%	0%	50.0%

BAPN: beta-aminopropionitrilo; IQ: isoquercetina.

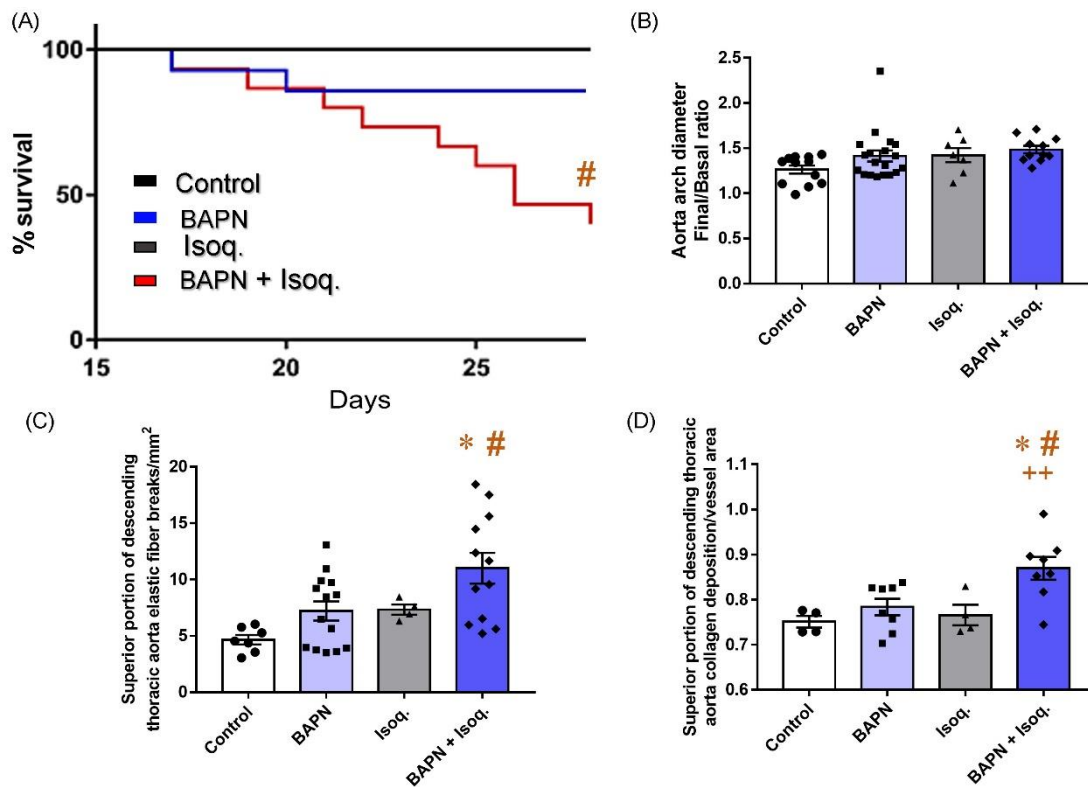


Figura 4: Isoquercetina (IQ) aumenta a mortalidade relacionada à ruptura aórtica no modelo de dissecação induzido por BAPN. (A) Curva de Kaplan-Meier representando a sobrevivência dos camundongos nos seguintes grupos: controle, BAPN, IQ e BAPN + IQ; # Teste de Gehan-Breslow-Wilcoxon: $p = 0,002$; (B) Diâmetro sistólico do arco aórtico, expresso como a razão entre os diâmetros final (28 dias) e inicial (basal). ANOVA de uma via: $p > 0,05$ (C) Quebra de fibra elástica (normalizada pela área da parede do vaso) na porção superior da aorta torácica descendente de camundongos C57BL6 expostos a BAPN, IQ ou sua combinação. * $p = 0,039$ vs. controle, # $p = 0,002$ vs. BAPN; (D) Acúmulo de fibras de colágeno (normalizado pela área da parede do vaso) na porção superior da aorta torácica descendente dos mesmos grupos descritos em (C). * $p = 0,013$ vs. controle; # $p = 0,029$ vs. BAPN; ++ $p = 0,032$ vs. IQ.

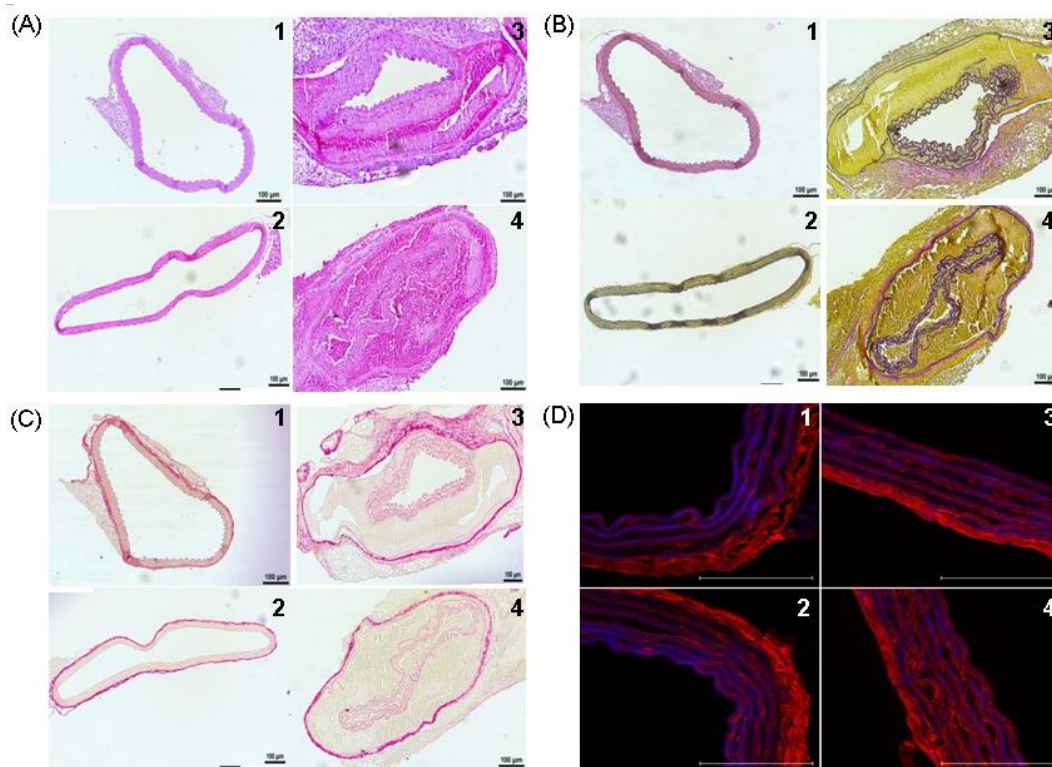


Figura 5: Análise histológica de aortas de camundongos expostos a BAPN, IQ ou sua combinação. Os números representam camundongos C57BL6 expostos a intervenções distintas, como segue: 1. Controle; 2. IQ; 3. BAPN; 4. BAPN + IQ. Todos os painéis mostram cortes da porção superior da aorta torácica descendente. De (A) a (C), ampliação 10 X e barra = 100µm. (A) Coloração de hematoxilina/eosina; (B) coloração de Verhoeff-van Gieson, mostrando a estrutura da fibra elástica (em preto) e quebras; (C) Coloração de Picrosirius, mostrando a deposição de colágeno em vermelho; (D) Imagens de microscopia confocal (ampliação 63x) mostrando fibras colágenas coradas por Picrosirius em vermelho, autofluorescência de fibras elásticas em azul e Barra de 50µm.

4.4 Aortas torácicas de camundongos expostos a IQ ou BAPN exibem modos distintos de falha biomecânica

É pertinente interrogar se o tratamento com IQ teria um efeito aditivo semelhante ou distinto com respeito à falha biomecânica causada pelo BAPN, o que seria indicativo de mecanismos subjacentes específicos a cada uma dessas condições. A viscoelasticidade aórtica foi avaliada pela análise das curvas de estiramento-tensão (ver Métodos). Nossos resultados mostraram que

aortas coletadas de camundongos expostos a BAPN, IQ ou a sua combinação desenvolveram menos tensão em resposta ao estiramento progressivo quando comparadas ao controle, indicando viscoelasticidade prejudicada e complacência aumentada devido a falha biomecânica (Figuras 6A, 7A e C). O modo final de falha, no entanto, foi diferente entre esses grupos. Em camundongos controle ou expostos a BAPN, a falta de aumento adicional na tensão após o estiramento progressivo (que arbitrariamente definimos como “falha inicial”) foi imediatamente seguida por uma tensão diminuída (que definimos como “falha avançada”), em decorrência de ruptura progressiva do tecido. Ressalte-se que aortas de camundongos expostos a BAPN exibiram falha mecânica com diâmetros maiores e tensões mais baixas quando comparadas às aortas controle (Figuras 6A, 7 A-C). Por outro lado, as aortas de camundongos tratados com IQ mostraram, após um determinado limiar, um platô sustentado de tensão em face do estiramento progressivo, definindo assim um intervalo mais longo de estiramento entre a falha inicial e avançada (Figuras 6A, 7A-C). Aortas de camundongos expostos a BAPN+IQ exibiram um padrão de falha mecânica semelhante, porém ainda mais acentuado, com um limiar mais baixo para o platô de tensão, o qual ocorreu em diâmetros menores (Figuras 6A e 7A).

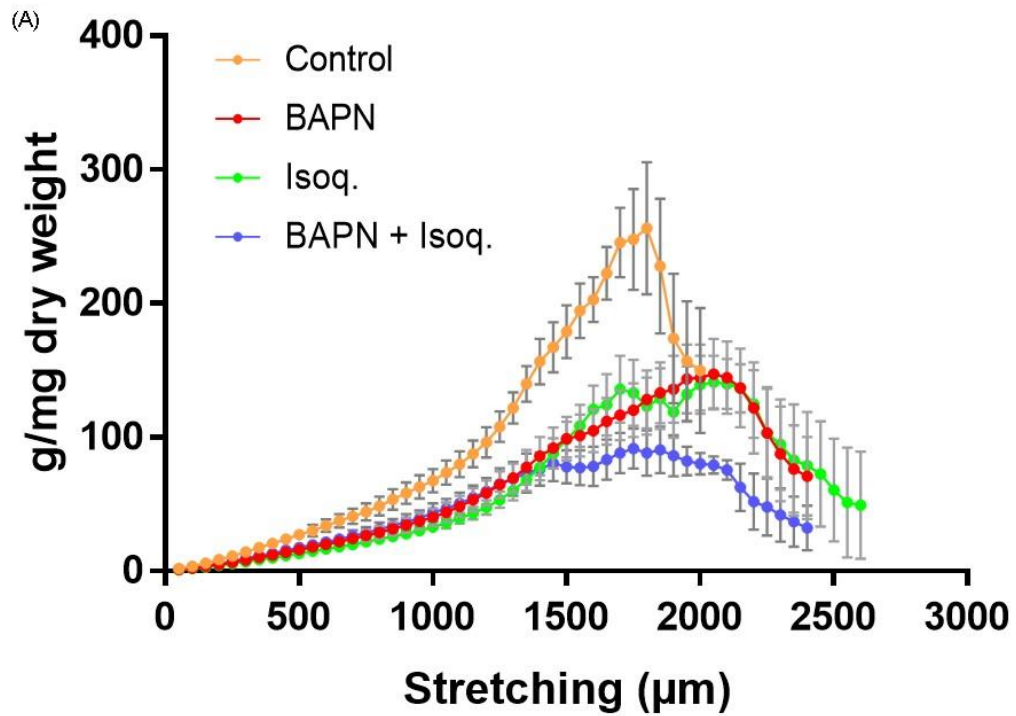


Figura 6: Análise da viscoelasticidade aórtica por meio da tensão desenvolvida em resposta ao estiramento progressivo (A): Resposta de tensão da parede ao estiramento mecânico progressivo em anéis aórticos de camundongos dos seguintes grupos: Controle, BAPN, IQ ou BAPN + IQ. ANOVA de duas vias: $p=0,002$, todos os grupos diferem vs. controle.

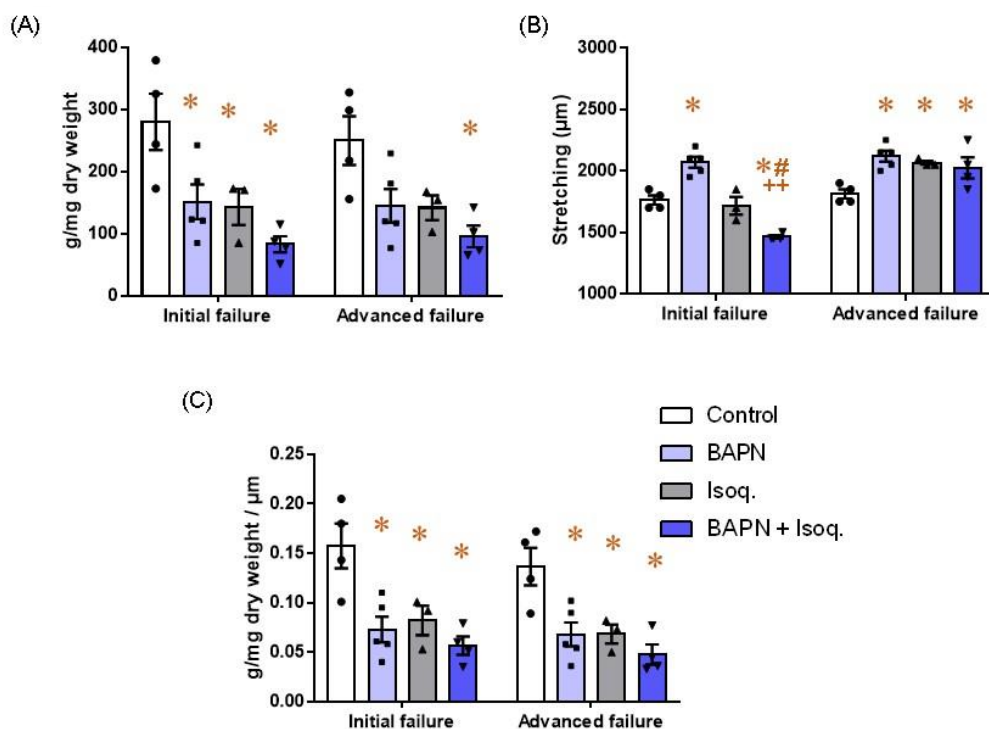


Figura 7: Efeitos do estiramento progressivo em diferentes modalidades de falha mecânica. De (A) a (C), a "falha inicial" é definida como a falta de aumento adicional de tensão após estiramento progressivo e a "falha avançada", por sua vez, foi definida como diminuição de tensão após estiramento progressivo. (A) Tensão mensurada em diferentes níveis de falha mecânica em anéis de aorta distendidos, analisando os mesmos grupos descritos na figura 5. * $p < 0,03$ vs. controle (ANOVA de uma via); (B) Distância de estiramento em diferentes níveis de falha mecânica, analisada em anéis de aorta dos mesmos grupos descritos na figura 5. * $p < 0,026$ vs. controle; ++ $p = 0,012$ vs. IQ; # $p < 0,0001$ vs. BAPN. (D) Relação tensão/estiramento em diferentes modalidades de falha mecânica em anéis de aorta analisados nos mesmos grupos descritos na figura 5. * $p < 0,027$ vs. controle.

4.5 A exposição a BAPN e IQ aumenta a oxidação intracelular em VSMCs cultivadas

Com o objetivo de investigar se BAPN, IQ ou a sua combinação poderiam envolver mudanças no estado redox intracelular devido à falha da unidade VSMC-MEC (21), bem como avaliar possíveis efeitos antioxidantes diretos da IQ, realizamos experimentos em VSMC cultivadas expostas ou não a esses agentes, bem como a um protocolo de estiramento mecânico cíclico. As concentrações de reagentes para este protocolo estão descritas na seção de

métodos “Ensaio de diclorofluoresceína”. O status de oxidação intracelular foi abordado através da sonda fluorescente diclorofluoresceína (DCF), que reflete a oxidação geral intracelular, embora seja um indicador muito pouco específico de detecção de oxidantes específicos, como o peróxido de hidrogênio. A combinação de BAPN e IQ promoveu aumento significativo na oxidação de DCF, enquanto cada um dos compostos de forma isolada não teve efeito significativo (Figura 8A). O estiramento mecânico exibiu efeito insignificante sozinho ou combinado com outros agentes. Embora este protocolo seja até certo ponto limitado para permitir conclusões in vivo, ele mostra que a exposição ao BAPN em combinação com IQ é suficiente para afetar diretamente o estado de oxidação de VSMCs de modo celular autônomo.

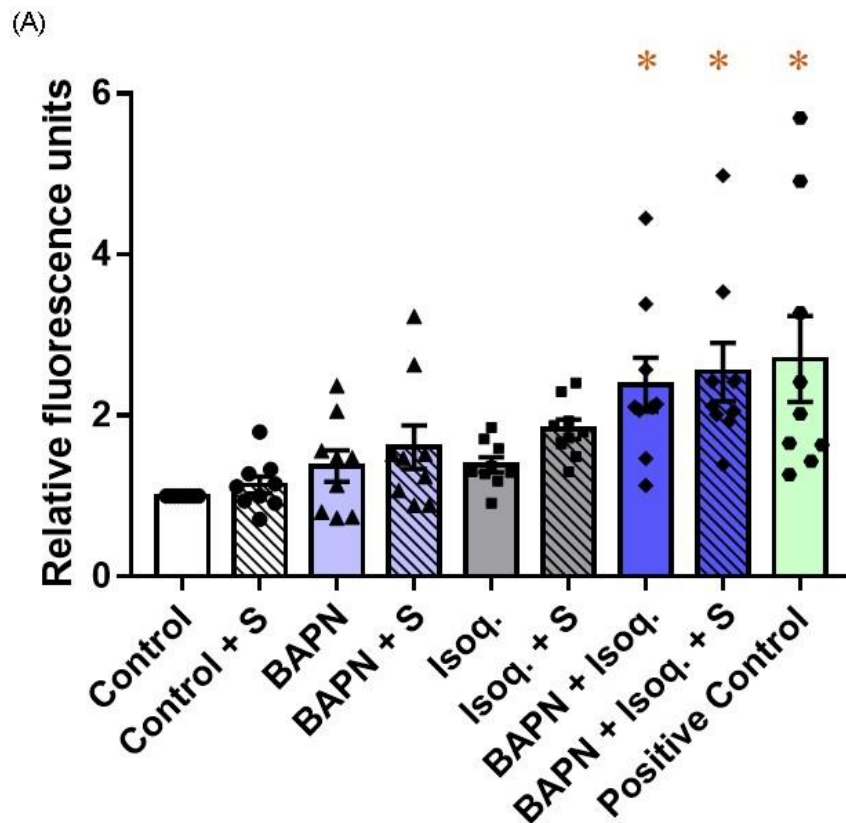


Figura 8: Análise da oxidação intracelular em VSMCs. (A) VSMCs cultivadas foram expostas a BAPN, IQ, ou sua combinação sob efeito ou não de estiramento mecânico cíclico (S). Exposição de VSMCs à combinação de BAPN+IQ apresentou aumento significativo na oxidação intracelular geral avaliada por fluorescência de DCF, conforme descrito nos Métodos. * $p=0,02$ vs. controle.

4.6 Resposta ao estresse do retículo endoplasmático (RE) em aortas de camundongos expostos a BAPN e IQ

O estresse oxidativo tem laços estreitos com o estresse do RE, que sabidamente contribui para a fisiopatologia da dissecção aórtica através da perda de VSMC, degradação da MEC e inflamação (74). Assim, avaliamos a expressão de mRNA de genes marcadores de resposta a proteínas mal-enoveladas (UPR) *BIP/GRP78*, *GRP94*, *CHOP*, *ATF4* e *ATF6* em aortas torácicas coletadas de camundongos expostos a BAPN, IQ ou sua combinação durante 28 dias. A análise de *CHOP* e *ATF4*, que pertencem a uma via conectada, mostrou menor expressão em camundongos expostos a BAPN+IQ

(Figuras 9B-C). Enquanto isso, *BIP* (*GRP78*), *ATF4* e *ATF6* não mostraram diferenças nos níveis de expressão em todos os grupos (Figuras 9D-F). No geral, esses resultados indicam que a ativação da resposta de proteína mal enovelada (UPR) não deve ter provavelmente contribuído para o aumento das taxas de dissecação promovido por IQ em camundongos expostos a BAPN.

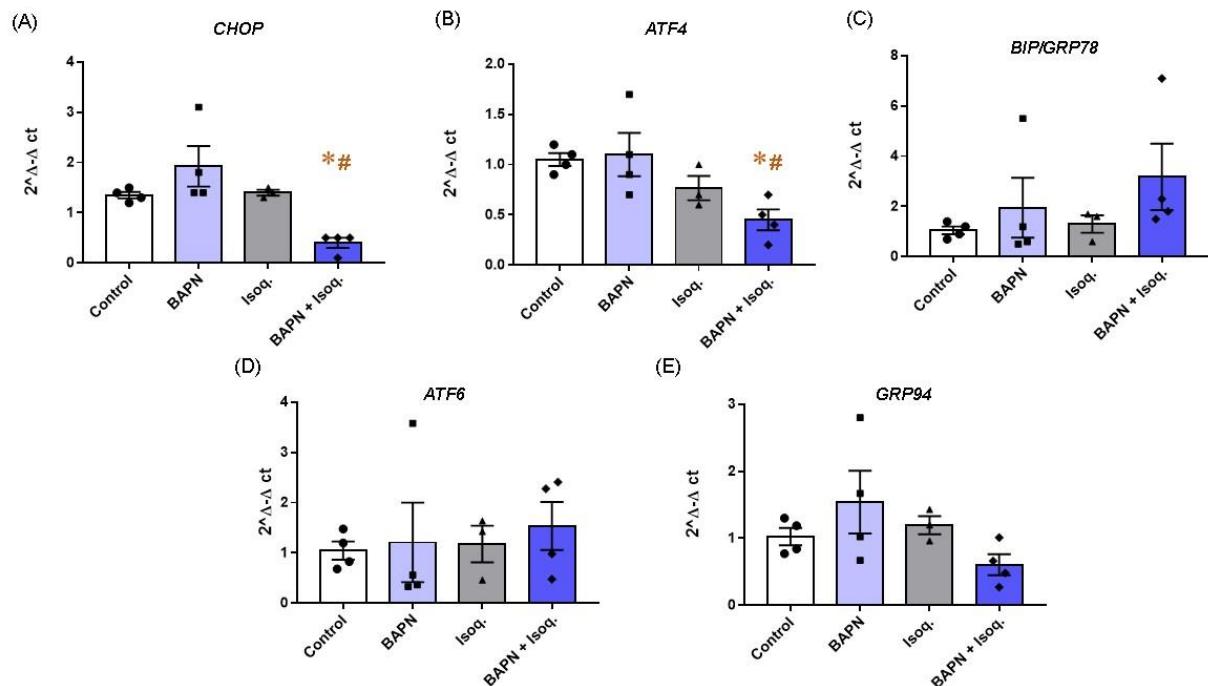


Figura 9: Expressão de marcadores de resposta a proteínas mal enoveladas (UPR) (B) a (F) em aortas torácicas coletadas de camundongos controle ou camundongos expostos a BAPN, IQ ou sua combinação durante 28 dias. Para o gene CHOP: * $p < 0,047$ vs. controle; $p =$ vs. controle e # $p < 0,023$ vs. BAPN (ANOVA de uma via). Para o gene ATF4: * $p = 0.043$ vs. controle e # $p = 0.028$ vs. BAPN. De (D) a (F), ANOVA de uma via não apresentou diferenças significativas entre os grupos, com $p > 0,05$.

5 Discussão

Os dois principais resultados do nosso trabalho foram: 1) Superexpressão de PDIA1 em modelo de camundongo transgênico protege contra a dissecação da aorta abdominal e quebra de fibras elásticas em modelo de inibição da lisil oxidase + infusão de AngII; 2) IQ, um flavonóide com efeitos inibidores de PDI, aumentou consideravelmente as taxas de dissecação da aorta torácica por meio de um mecanismo associado a uma falha mecânica dúctil em um modelo de inibição da lisil oxidase em camundongos.

Juntos, os efeitos da superexpressão de PDIA1 no modelo transgênico e os efeitos opostos da IQ dão suporte a um papel protetor de PDIA1, particularmente da sua porção extracelular, contra a doença aórtica. Tais efeitos ocorreram em dois modelos de dissecação aórtica induzidos por diferentes estímulos, em camundongos com distintas constituições genéticas e idades, e evidenciando locais específicos de ruptura aórtica. Em conjunto, estes modelos utilizados em nosso estudo envolvem diversidade de mecanismos patogénéticos. Isso indica um possível efeito geral da PDIA1 independente das especificidades da doença aórtica, sugerindo que a PDIA1 pode fazer parte de um mecanismo geral comum às dissecações aórticas.

Há uma série de possíveis mecanismos protetores da arquitetura da aorta pela PDIA1 extracelular, que serão discutidos a seguir. Primeiro, a PDIA1 auxilia na restauração da homeostase biomecânica, o que está de acordo com os efeitos bem conhecidos da PDIA1 extracelular na regulação de integrinas e organização da MEC (38). De fato, mostramos anteriormente que a PDIA1 sustenta a organização do citoesqueleto e reduz o ruído de distribuição da força celular e da migração direcional (28, 54). Tais efeitos extracelulares da PDIA1 podem ser traduzidos, via sinalização de integrinas de fora para dentro, em efeitos intracelulares (28). Além disso, não se pode excluir contribuições adicionais da PDIA1 intracelular no processamento de colágeno e outras proteínas de MEC (75). Um segundo mecanismo dos efeitos da PDIA1 está relacionado ao seu suporte de um fenótipo diferenciado de VSMC (53), capaz

de promover aumento da geração de força contrátil. A perda da capacidade de geração de força por VSMCs é um fator comum na gênese de muitos tipos de dissecção/aneurisma aórtico, particularmente aqueles associados a mutações genéticas (9, 10) incluindo, como mostrado recentemente por nosso grupo, a Síndrome de Marfan (73). Além disso, a manutenção de um fenótipo contrátil de VSMC pode modular negativamente programas de desenvolvimento celular sabidamente associados a aneurismas vasculares (76). A PDIA1 evidenciou correlação inversa com o grau de dilatação do aneurisma em um estudo proteômico de aneurisma de aorta abdominal (AAA) humano, juntamente com outras PDIs e tiorredoxinas (77). Um terceiro efeito potencial da PDIA1 é a proteção contra a disfunção endotelial, um mecanismo cada vez mais associado à dissecção aórtica (1), sendo inclusive um mediador dos efeitos protetores do resveratrol (78). Essa proteção poderia estar relacionada ao aumento na biodisponibilidade de óxido nítrico (ON) intracelular mediado por PDIA1, via transnitrosilação (38). Curiosamente, trabalhos recentes indicam que a fosfolipase A2 endotelial secretada do grupo V protege contra a dissecção da aorta por meio do aumento da disponibilidade de ácidos graxos que antagonizam o estresse do retículo endoplasmático (RE) (79). No entanto, embora o estresse do RE esteja associado à progressão da dissecção/aneurisma aórtico (1), não encontramos evidências de ativação da resposta a proteínas mal-enoveladas em resposta a IQ e/ou BAPN em nosso estudo.

As elevadas taxas de dissecção aórtica causadas pela IQ em nosso modelo contrastam com os papéis protetores do seu análogo estrutural quercetina (80), bem como de outros flavonóides, no AAA (Li *et al.*, 2020). A quercetina não possui o grupamento glicosil no carbono 3 do anel C-pirona (Figura suplementar 1) e, por este motivo, não inibe a atividade da PDIA1, com $IC_{50} > 100 \mu M$ vs. $7,1 \mu M$ para isoquercetina (61). Este grupo glicosil também limita o acesso intracelular da IQ, reduzindo a probabilidade de efeitos nocivos deste flavonóide relacionados à inibição da PDI intracelular. Nossa dosagem de IQ (5,8 mg/kg/dia) foi estimada com base na comparação entre o IC_{50} da mesma e o de seu análogo quercetina-3 rutinosídeo (rutina) (61), que é um inibidor efetivo documentado da PDIA1. Administração de rutina não é

acompanhada de outros efeitos colaterais perceptíveis (61). A escolha pela IQ foi baseada em sua melhor biodisponibilidade oral em comparação à rutina (64). Cabe salientar que as doses protetoras documentadas de quercetina em AAA (80) foram de 60 mg/kg/dia, administradas por 8 semanas, portanto, muito acima das doses de IQ do nosso estudo. Em conjunto, essas considerações indicam que a dose de IQ utilizada em nosso modelo provavelmente não foi excessiva.

Embora a IQ tenha sido bem documentada como um inibidor da PDIA1 (e algumas outras PDIs), não podemos excluir que efeitos adicionais pleiotrópicos da IQ possam ter contribuído indiretamente para a dissecação aórtica. No entanto, um eventual efeito antioxidante direto, atribuível potencialmente a flavonoides em geral, não foi evidente. Pelo contrário, em VSMCs cultivadas, a exposição combinada a IQ e BAPN promoveu aumento da oxidação intracelular, o qual atribuímos principalmente a uma acentuação da disfunção mecânica da unidade VSMC/MEC, com consequente ativação intracelular de geradores de ROS, como mitocôndrias e NADPH oxidases (Nox) (21). De fato, a disfunção mitocondrial desencadeada por perturbações da arquitetura da MEC foi previamente demonstrada em modelos de Síndrome de Marfan (19). A ausência de efeito antioxidante documentado da IQ não é surpreendente à medida em que está de acordo com o mecanismo dos efeitos antioxidantes diretos dos flavonoides em geral (Oteiza *et al.*, 2018). Tais efeitos são principalmente dependentes de sinalização intracelular (81), algo potencialmente limitado para compostos com acessibilidade intracelular restrita, como a IQ (67).

Independente dos mecanismos envolvidos, o agravamento na mecanodisfunção foi um aspecto crucial dos efeitos da IQ, como demonstrado pelos distintos tipos de falência mecânica induzidos pelo estiramento em aortas de camundongos tratados com BAPN vs. IQ. O BAPN inibe a lisil oxidase, uma amino-oxidase dependente de cobre que forma ligações cruzadas covalentes entre os resíduos de lisina presentes na elastina e no colágeno, organizando a montagem e estabilização das fibras elásticas (82). A ruptura elástica vascular é conhecida por estar associada a altas taxas de dissipação de energia na parede aórtica e sua incapacidade de suportar tensões mecânicas (83). As

aortas de camundongos expostos ao BAPN geraram menos tensão em todos os graus de estiramento, um comportamento consistente com a falha tanto do componente elástico linear em baixas tensões quanto do componente exponencial de colágeno em altas tensões (84). As aortas de camundongos tratados com IQ também apresentaram falha na tensão exercida em resposta ao estiramento. No entanto, enquanto o padrão de falência mecânica nas aortas dos camundongos controle ou expostos ao BAPN foi súbito, as aortas expostas a IQ e, particularmente, ao BAPN+IQ exibiram uma falência do tipo dúctil, com um longo platô de tensão sustentada apesar do estiramento aumentado antes da ruptura (ductilidade é a capacidade de um corpo sofrer estiramento sem se romper). O mecanismo desse componente de complacência dúctil afetado pela IQ não está claro, mas pode estar associado à falência de ligações cruzadas de colágeno e elastina resistentes ao BAPN, assim como falência de outros componentes da MEC ou mesmo uma resistência mecânica diretamente imposta pelo tônus/rigidez celular (9, 10). Qualquer que seja o mecanismo, sabe-se que uma piora da homeostase tensional/mecânica, como a induzida pela IQ, está associada à doença aórtica, particularmente dissecção aórtica (10, 21).

Várias limitações deste trabalho devem ser mencionadas, incluindo a natureza dos modelos utilizados, os potenciais efeitos não específicos da IQ e a falta de uma investigação mais detalhada sobre doses distintas de IQ e o seu perfil farmacocinético. O tipo de modelo é importante, pois trabalhos anteriores mostraram efeitos opostos do HIF-1-alfa em modelos de dissecção (BAPN + AngII) comparados a modelos de aneurisma (AngII em fundo hiperlipidêmico) (85). Fatores genéticos devem ser considerados a este respeito e, de fato, o fundo do camundongo FVB é conhecido por afetar a incidência e a localização da dissecção aórtica em camundongos expostos a BAPN, concomitante ou não à AngII (66). A idade também é uma consideração relevante, pois notamos que os camundongos de 4 semanas não responderam ao BAPN, em oposição aos de 3 semanas (dados não mostrados). A falta de dilatação da aorta na análise ecocardiográfica em nossos camundongos foi até certo ponto inesperada, mas pode refletir vários fatores, como um possível início rápido de dilatação localizada antes da ruptura, predominância de dissecção/ruptura de aorta em

nossos modelos ao invés de aneurisma, ou ainda falta de avaliação ecocardiográfica em camundongos que morreram subitamente antes do final do protocolo. Cabe ressaltar que estudos anteriores usando administração de BAPN, embora mostrando exemplos de dilatação aórtica, não relataram análises ecocardiográficas quantitativas gerais (66, 74, 86). Coletivamente, esses resultados corroboram até certo ponto que ao menos alguns mecanismos de aneurisma e dissecação podem diferir substancialmente e indicam que os efeitos protetores da PDIA1 contra dissecação não devem, em princípio, ser extrapolados para aneurismas aórticos. Finalmente, os resultados do nosso trabalho se beneficiariam da validação em diferentes condições laboratoriais, uma vez que a microbiota é moduladora essencial das respostas aos compostos flavonóides (87). Esses pontos devem ser considerados em estudos translacionais envolvendo nossos resultados.

6- Conclusão

Em resumo, nossos dados indicam que PDIA1 pode ser um novo mecanismo de proteção geral contra dissecção aórtica. Em conjunto com evidências anteriores do nosso grupo, eles reforçam ainda mais a PDIA1 como mecanismo integrador capaz de orquestrar o acoplamento entre homeostase mecânica e processos redox (21) diretamente implicados no remodelamento vascular associado a doenças. Além disso, mostramos que a administração do inibidor da PDI IQ tem o potencial de aumentar as taxas de ruptura aórtica. Esses dados contribuem para ajudar a entender os mecanismos de dissecção da aorta e podem ser importantes no cenário emergente das implicações translacionais dos inibidores de PDIA1 cada vez mais propostos para utilização contra trombose e câncer (88).

7- Dados suplementares

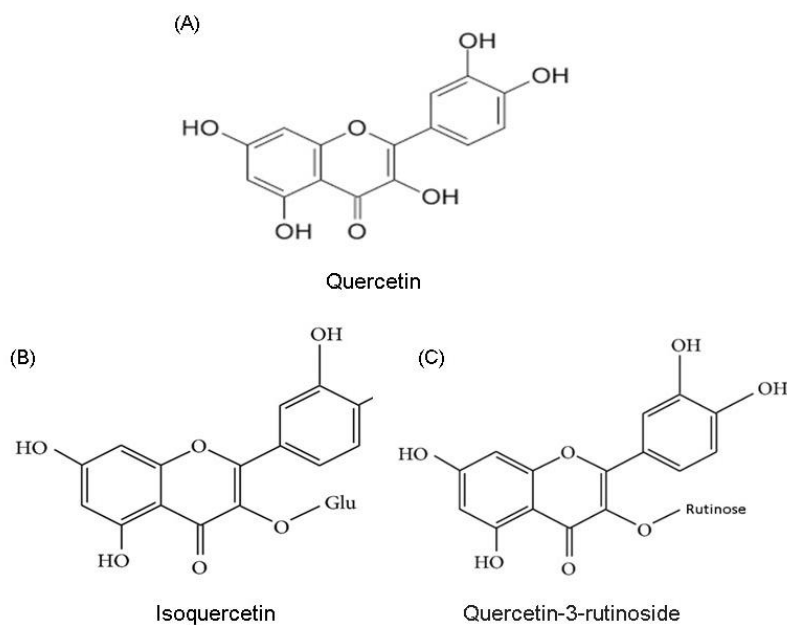


Figura suplementar 1: Estrutura química de alguns dos principais análogos da quercetina. (A) Estrutura química da quercetina. (B) Estrutura química da Isoquercetina. (C) Estrutura química da Quercetina-3-rutinosídeo ou Rutina.

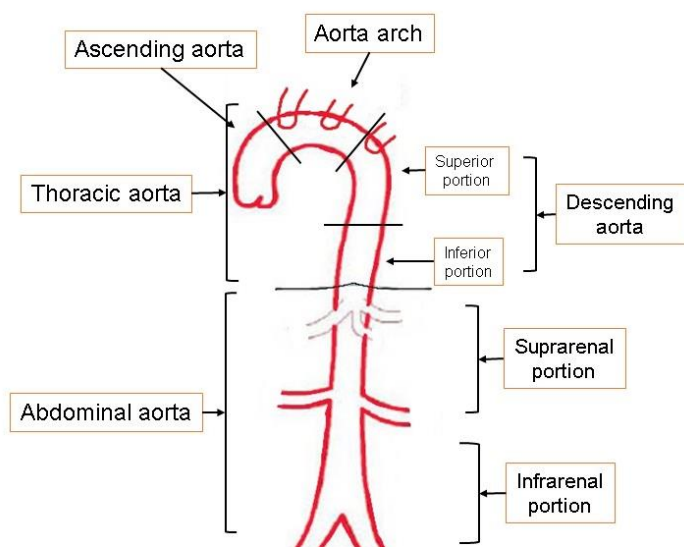


Figura suplementar 2: Esquema da divisão dos segmentos aórticos utilizados no presente estudo, com a respectiva nomenclatura.

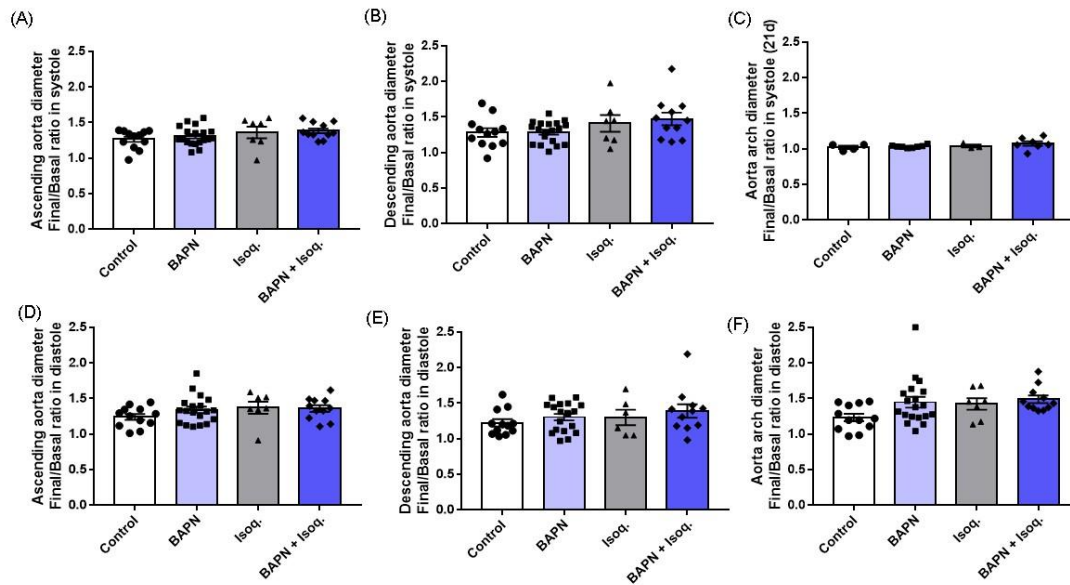


Figura suplementar 3: Dados ecocardiográficos dos diâmetros aórticos no modelo de dissecção aórtica induzido por BAPN em camundongos C57BL6. (A) Diâmetro sistólico da aorta ascendente, relatado como a razão entre os diâmetros final (28 dias) e inicial (basal). (B) Diâmetro sistólico da aorta descendente, relatado como a razão entre os diâmetros final (28 dias) e inicial (basal). (C) Diâmetro sistólico do arco aórtico, relatado como a razão entre o dia 21 de exposição e os diâmetros iniciais (basais). (D) Diâmetro diastólico da aorta ascendente, relatado como a razão entre os diâmetros final (28 dias) e inicial (basal). (E) Diâmetro diastólico da aorta descendente, relatado como a razão entre os diâmetros final (28 dias) e inicial (basal). (F) Diâmetro diastólico do arco aórtico, relatado como a razão entre os diâmetros final (28 dias) e inicial (basal). Em todos os casos, a ANOVA de uma via não mostrou diferenças significativas entre os grupos, com $p > 0,05$. Cada ponto representa um único camundongo.

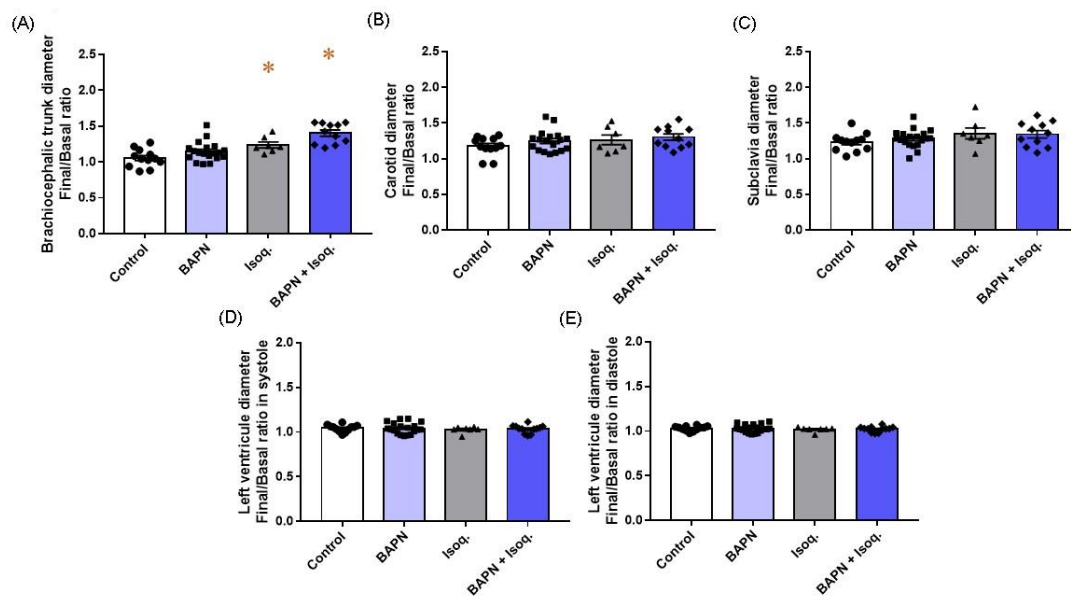


Figura suplementar 4: Dados ecocardiográficos mostrando os diâmetros do ramo aórtico principal e do ventrículo esquerdo no modelo de dissecação aórtica induzido por BAPN em camundongos C57BL6. (A) Diâmetro do tronco braquiocefálico, relatado como a razão entre os diâmetros final (28 dias) e inicial (basal); * $p < 0,03$ vs. controle. (B) Diâmetro da artéria carótida, relatado como a razão entre os diâmetros final (28 dias) e inicial (basal). (C) Diâmetro da artéria subclávia, relatado como a razão entre os diâmetros final (28 dias) e inicial (basal). (D) Diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo, relatado como a razão entre os diâmetros final (28 dias) e inicial (basal). (E) Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo, relatado como a razão entre os diâmetros final (28 dias) e inicial (basal). De (B) a (E), a ANOVA de uma via não apresentou diferenças significativas entre os grupos, com $p > 0,05$. Cada ponto representa um único camundongo.

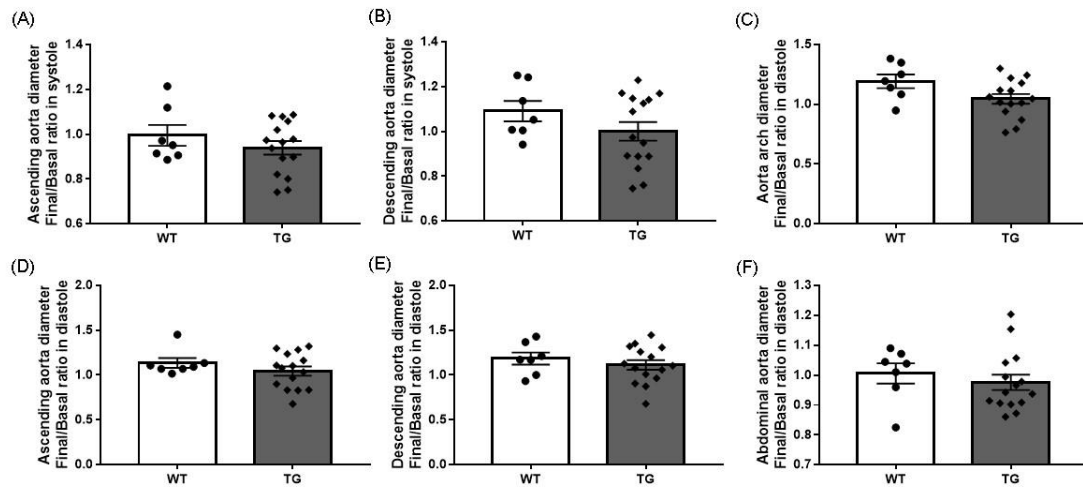


Figura suplementar 5: Dados ecocardiográficos do diâmetro aórtico no modelo de dissecação aórtica induzido por BAPN + AngII em camundongos de selvagem WT e TgPDIA1 (fundo FVB). (A) Diâmetro sistólico da aorta ascendente, relatado como a razão entre os diâmetros final (28 dias) e inicial (basal). (B) Diâmetro sistólico da aorta descendente, relatado como a razão entre os diâmetros final (28 dias) e inicial (basal). (C) Diâmetro diastólico do arco aórtico, relatado como a razão entre os diâmetros final (28 dias) e inicial (basal). (D) Diâmetro diastólico da aorta ascendente, relatado como a razão entre os diâmetros final (28 dias) e inicial (basal). (E) Diâmetro diastólico da aorta descendente, relatado como a razão entre os diâmetros final (28 dias) e inicial (basal). (F) Diâmetro da aorta abdominal, relatado como a razão entre os diâmetros final (28 dias) e inicial (basal). Em todos os casos, a ANOVA de uma via não mostrou diferenças significativas entre os grupos, com $p > 0,05$. Cada ponto representa um único camundongo.

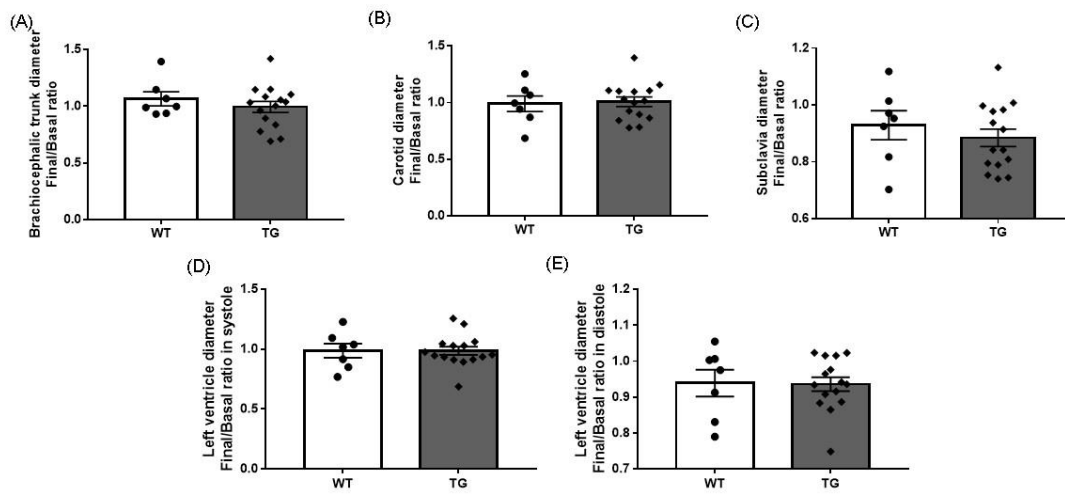


Figura suplementar 6: Dados ecocardiográficos representando os diâmetros do ramo aórtico principal e do ventrículo esquerdo no modelo de dissecação aórtica induzido por BAPN + AngII em camundongos de selvagem WT e TgPDIA1 (fundo de FVB). (A) Diâmetro do tronco braquiocefálico, relatado como a razão entre os diâmetros final (28 dias) e inicial (basal); (B) Diâmetro da artéria carótida, relatado como a razão entre os diâmetros final (28 dias) e inicial (basal). (C) Diâmetro da artéria subclávia, relatado como a razão entre os diâmetros final (28 dias) e inicial (basal). (D) Diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo, relatado como a razão entre os diâmetros final (28 dias) e inicial (basal). (E) Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo, relatado como a razão entre os diâmetros final (28 dias) e inicial (basal). Em todos os casos, a ANOVA de uma via não mostrou diferenças significativas entre os grupos, com $p > 0,05$. Cada ponto representa um único camundongo.

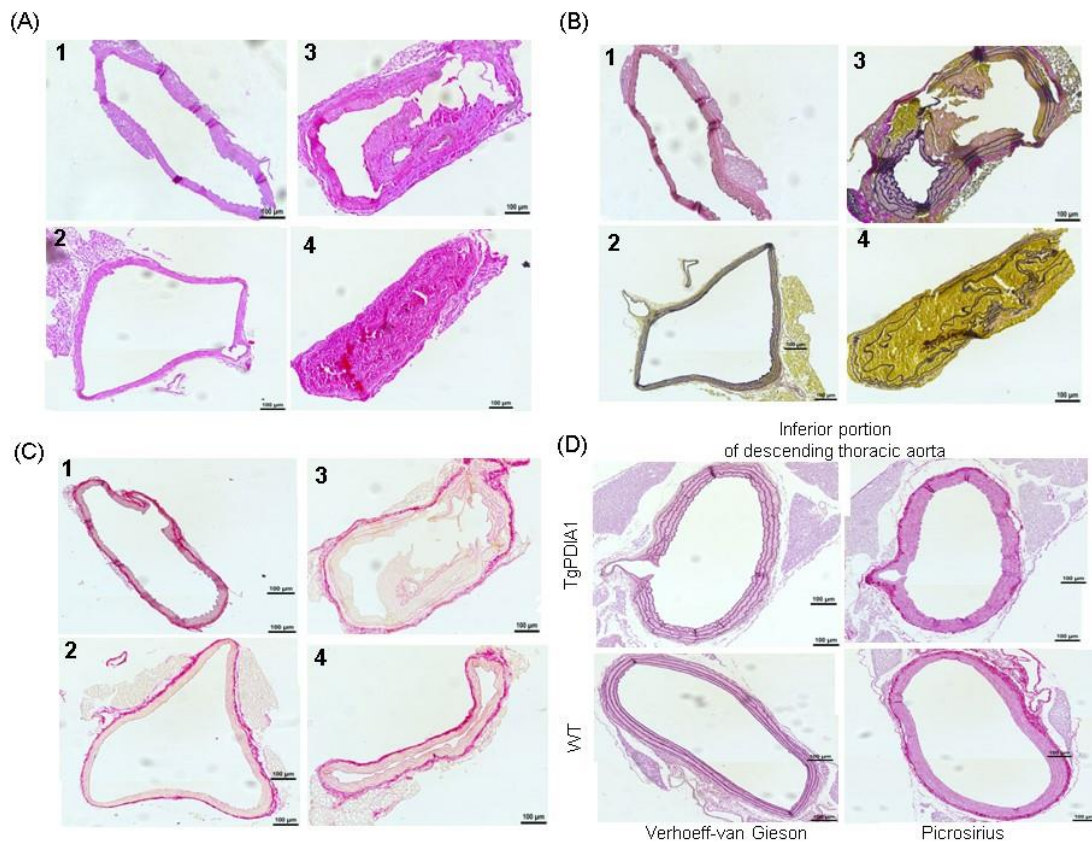


Figura suplementar 7: Análise histológica de aortas de camundongos expostos a BAPN ou à combinação de BAPN + AngII. Todos os slides mostram cortes da porção inferior da aorta torácica descendente. Ampliação, 10 X e barras de 100µm. Dos painéis A a C, os números representam camundongos C57BL6 expostos a intervenções distintas, como segue: 1. Controle; 2. IQ; 3. BAPN; 4. BAPN + IQ. (A) Coloração de hematoxilina/eosina; (B) coloração de Verhoeff-van Gieson mostrando a estrutura da fibra elástica e quebras; (C) Coloração Picrosirius mostrando a coloração das fibras de colágeno em vermelho; (D) Colorações de Verhoeff-van Gieson ou Picrosirius de camundongos de tipo selvagem ou TgPDIA1 expostos a BAPN + AngII.

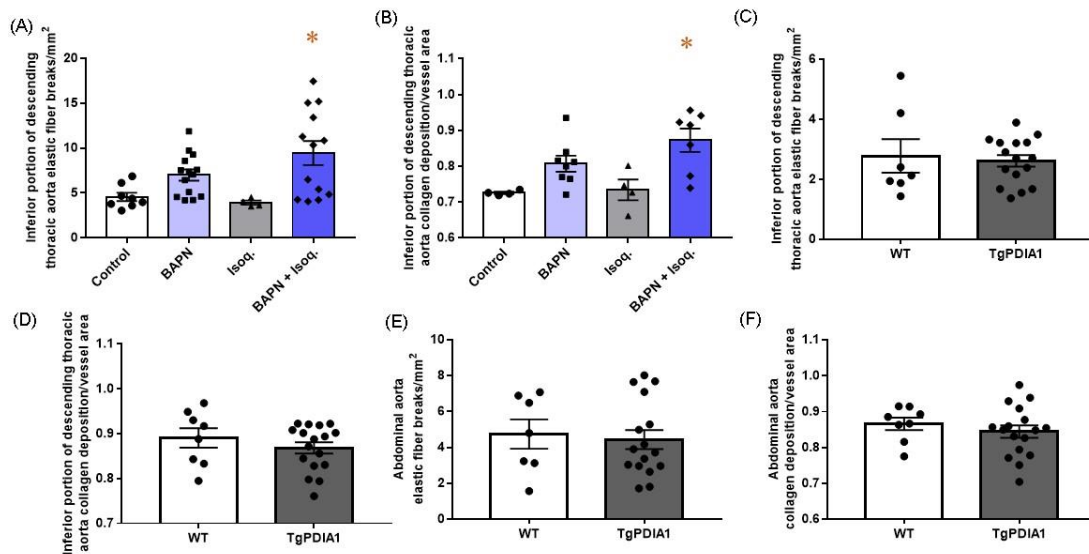


Figura suplementar 8: Quantificação da análise histológica de aortas de camundongos expostos a BAPN ou à combinação de BAPN + AngII. (A): Rupturas de fibras elásticas (normalizadas pela área da parede do vaso) na porção inferior da aorta torácica descendente de camundongos C57BL6 expostos a BAPN, IQ ou sua combinação. * $p < 0,01$ vs. controle; (B): Acúmulo de fibras de colágeno (normalizado pela área da parede do vaso) na porção inferior da aorta torácica descendente de camundongos C57BL6 expostos a BAPN, IQ ou sua combinação. * $p = 0,01$ vs. controle; (C): Rupturas de fibras elásticas (normalizadas pela área da parede do vaso) na porção inferior da aorta torácica descendente de camundongos selvagem WT e TgPDIA1 expostos a BAPN e AngII. (D) Acúmulo de fibras de colágeno (normalizado pela área da parede do vaso) na porção inferior da aorta torácica descendente de camundongos selvagem WT e TgPDIA1 expostos a BAPN e AngII. (E) Quebra de fibra elástica (normalizada pela a área da parede do vaso) na aorta abdominal de camundongos de selvagem WT e TgPDIA1 expostos a BAPN e AngII. (F) Acúmulo de fibras de colágeno (normalizado pela área da parede do vaso) na aorta abdominal de camundongos de selvagem WT e TgPDIA1 expostos a BAPN e AngII. De (C) a (F): $p > 0,05$, teste t.

8- Referências

1. Quintana RA, Taylor WR. Cellular Mechanisms of Aortic Aneurysm Formation. *Circ Res*. 2019;124(4):607-18.
2. Golledge J, Muller J, Daugherty A, Norman P. Abdominal aortic aneurysm: pathogenesis and implications for management. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(12):2605-13.
3. Golledge J. Abdominal aortic aneurysm: update on pathogenesis and medical treatments. *Nat Rev Cardiol*. 2019;16(4):225-42.
4. Nienaber CA, Clough RE, Sakalihasan N, Suzuki T, Gibbs R, Mussa F, et al. Aortic dissection. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2:16071.
5. Sampson UK, Norman PE, Fowkes FG, Aboyans V, Song Y, Harrell FE, et al. Estimation of global and regional incidence and prevalence of abdominal aortic aneurysms 1990 to 2010. *Glob Heart*. 2014;9(1):159-70.
6. Brewster DC, Cronenwett JL, Hallett JW, Johnston KW, Krupski WC, Matsumura JS, et al. Guidelines for the treatment of abdominal aortic aneurysms. Report of a subcommittee of the Joint Council of the American Association for Vascular Surgery and Society for Vascular Surgery. *J Vasc Surg*. 2003;37(5):1106-17.
7. Calero A, Illig KA. Overview of aortic aneurysm management in the endovascular era. *Semin Vasc Surg*. 2016;29(1-2):3-17.
8. Kuzmik GA, Sang AX, Elefteriades JA. Natural history of thoracic aortic aneurysms. *J Vasc Surg*. 2012;56(2):565-71.
9. Humphrey JD, Milewicz DM, Tellides G, Schwartz MA. Cell biology. Dysfunctional mechanosensing in aneurysms. *Science*. 2014;344(6183):477-9.

10. Humphrey JD, Schwartz MA, Tellides G, Milewicz DM. Role of mechanotransduction in vascular biology: focus on thoracic aortic aneurysms and dissections. *Circ Res.* 2015;116(8):1448-61.
11. Pinard A, Jones GT, Milewicz DM. Genetics of Thoracic and Abdominal Aortic Diseases. *Circ Res.* 2019;124(4):588-606.
12. Petsophonsakul P, Furmanik M, Forsythe R, Dweck M, Schurink GW, Natour E, et al. Role of Vascular Smooth Muscle Cell Phenotypic Switching and Calcification in Aortic Aneurysm Formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2019;39(7):1351-68.
13. Harky A, Fan KS, Fan KH. The genetics and biomechanics of thoracic aortic diseases. *Vasc Biol.* 2019;1(1):R13-R25.
14. Dinesh NEH, Reinhardt DP. Inflammation in thoracic aortic aneurysms. *Herz.* 2019;44(2):138-46.
15. Al-Abcha A, Saleh Y, Mujer M, Boumegouas M, Herzallah K, Charles L, et al. Meta-analysis Examining the Usefulness of Angiotensin Receptor blockers for the Prevention of Aortic Root Dilation in Patients With the Marfan Syndrome. *Am J Cardiol.* 2020;128:101-6.
16. Siu KL, Miao XN, Cai H. Recoupling of eNOS with folic acid prevents abdominal aortic aneurysm formation in angiotensin II-infused apolipoprotein E null mice. *PLoS One.* 2014;9(2):e88899.
17. Kim HW, Blomkalns AL, Ogbi M, Thomas M, Gavrila D, Neltner BS, et al. Role of myeloperoxidase in abdominal aortic aneurysm formation: mitigation by taurine. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2017;313(6):H1168-H79.
18. Jiménez-Altayó F, Meirelles T, Crosas-Molist E, Sorolla MA, Del Blanco DG, López-Luque J, et al. Redox stress in Marfan syndrome: Dissecting the role of the NADPH oxidase NOX4 in aortic aneurysm. *Free Radic Biol Med.* 2018;118:44-58.

19. Oller J, Gabandé-Rodríguez E, Ruiz-Rodríguez MJ, Desdín-Micó G, Aranda JF, Rodrigues-Diez R, et al. Extracellular Tuning of Mitochondrial Respiration Leads to Aortic Aneurysm. *Circulation*. 2021;143(21):2091-109.
20. de la Fuente-Alonso A, Toral M, Alfayate A, Ruiz-Rodríguez MJ, Bonzón-Kulichenko E, Teixido-Tura G, et al. Aortic disease in Marfan syndrome is caused by overactivation of sGC-PRKG signaling by NO. *Nat Commun*. 2021;12(1):2628.
21. Tanaka LY, Laurindo FRM. Vascular remodeling: A redox-modulated mechanism of vessel caliber regulation. *Free Radic Biol Med*. 2017;109:11-21.
22. Plekhanova OS, Parfenova EV, Tkachuk VA. [Mechanisms of Vascular Remodeling Following Arterial Injury]. *Kardiologija*. 2015;55(7):63-77.
23. Ward MR, Pasterkamp G, Yeung AC, Borst C. Arterial remodeling. Mechanisms and clinical implications. *Circulation*. 2000;102(10):1186-91.
24. Karimi Galoughi K, Ashley EA, Ali ZA. Redox regulation of vascular remodeling. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73(2):349-63.
25. Jones DP. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. 2006;8(9-10):1865-79.
26. Oliveira PVS, Laurindo FRM. Implications of plasma thiol redox in disease. *Clin Sci (Lond)*. 2018;132(12):1257-80.
27. Winterbourn CC, Hampton MB. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Radic Biol Med*. 2008;45(5):549-61.
28. Tanaka LY, Oliveira PVS, Laurindo FRM. Peri/Epicellular Thiol Oxidoreductases as Mediators of Extracellular Redox Signaling. *Antioxid Redox Signal*. 2020;33(4):280-307.
29. Winterbourn CC. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat Chem Biol*. 2008;4(5):278-86.

30. Stöcker S, Maurer M, Ruppert T, Dick TP. A role for 2-Cys peroxiredoxins in facilitating cytosolic protein thiol oxidation. *Nat Chem Biol.* 2018;14(2):148-55.
31. Stöcker S, Van Laer K, Mijuskovic A, Dick TP. The Conundrum of Hydrogen Peroxide Signaling and the Emerging Role of Peroxiredoxins as Redox Relay Hubs. *Antioxid Redox Signal.* 2018;28(7):558-73.
32. Appenzeller-Herzog C, Ellgaard L. The human PDI family: versatility packed into a single fold. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1783(4):535-48.
33. Hatahet F, Ruddock LW. Protein disulfide isomerase: a critical evaluation of its function in disulfide bond formation. *Antioxid Redox Signal.* 2009;11(11):2807-50.
34. Laurindo FR, Pescatore LA, Fernandes DeC. Protein disulfide isomerase in redox cell signaling and homeostasis. *Free Radic Biol Med.* 2012;52(9):1954-69.
35. Parakh S, Atkin JD. Novel roles for protein disulphide isomerase in disease states: a double edged sword? *Front Cell Dev Biol.* 2015;3:30.
36. Ellgaard L, Ruddock LW. The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties. *EMBO Rep.* 2005;6(1):28-32.
37. Wang L, Wang X, Wang CC. Protein disulfide-isomerase, a folding catalyst and a redox-regulated chaperone. *Free Radic Biol Med.* 2015;83:305-13.
38. Soares Moretti AI, Martins Laurindo FR. Protein disulfide isomerases: Redox connections in and out of the endoplasmic reticulum. *Arch Biochem Biophys.* 2017;617:106-19.
39. Araujo TLS, Fernandes CG, Laurindo FRM. Golgi-independent routes support protein disulfide isomerase externalization in vascular smooth muscle cells. *Redox Biol.* 2017;12:1004-10.

40. Flaumenhaft R, Furie B. Vascular thiol isomerases. *Blood*. 2016;128(7):893-901.
41. Essex DW. Redox control of platelet function. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11(5):1191-225.
42. Ryser HJ, Levy EM, Mandel R, DiSciullo GJ. Inhibition of human immunodeficiency virus infection by agents that interfere with thiol-disulfide interchange upon virus-receptor interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(10):4559-63.
43. Tanaka LY, Araújo HA, Hironaka GK, Araujo TL, Takimura CK, Rodriguez AI, et al. Peri/Epicellular Protein Disulfide Isomerase Sustains Vascular Lumen Caliber Through an Anticonstrictive Remodeling Effect. *Hypertension*. 2016;67(3):613-22.
44. Hetz C, Mollereau B. Disturbance of endoplasmic reticulum proteostasis in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*. 2014;15(4):233-49.
45. Meirelles T, Araujo TLS, Nolasco P, Moretti AIS, Guido MC, Debbas V, et al. Fibrillin-1 Δ (Ipn) Marfan syndrome mutation associates with preserved proteostasis and bypass of a protein disulfide isomerase-dependent quality checkpoint. *Int J Biochem Cell Biol*. 2016;71:81-91.
46. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*. 2000;86(5):494-501.
47. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 2007;87(1):245-313.
48. Janiszewski M, Lopes LR, Carmo AO, Pedro MA, Brandes RP, Santos CX, et al. Regulation of NAD(P)H oxidase by associated protein disulfide isomerase in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 2005;280(49):40813-9.

49. Santos CX, Stolf BS, Takemoto PV, Amanso AM, Lopes LR, Souza EB, et al. Protein disulfide isomerase (PDI) associates with NADPH oxidase and is required for phagocytosis of *Leishmania chagasi* promastigotes by macrophages. *J Leukoc Biol.* 2009;86(4):989-98.
50. Fernandes DC, Manoel AH, Wosniak J, Laurindo FR. Protein disulfide isomerase overexpression in vascular smooth muscle cells induces spontaneous preemptive NADPH oxidase activation and Nox1 mRNA expression: effects of nitrosothiol exposure. *Arch Biochem Biophys.* 2009;484(2):197-204.
51. Pescatore LA, Bonatto D, Forti FL, Sadok A, Kovacic H, Laurindo FR. Protein disulfide isomerase is required for platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell migration, Nox1 NADPH oxidase expression, and RhoGTPase activation. *J Biol Chem.* 2012;287(35):29290-300.
52. Gimenez M, Veríssimo-Filho S, Wittig I, Schickling BM, Hahner F, Schürmann C, et al. Redox Activation of Nox1 (NADPH Oxidase 1) Involves an Intermolecular Disulfide Bond Between Protein Disulfide Isomerase and p47. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2019;39(2):224-36.
53. Fernandes DC, Wosniak J, Gonçalves RC, Tanaka LY, Fernandes CG, Zanatta DB, et al. PDIA1 acts as master organizer of NOX1/NOX4 balance and phenotype response in vascular smooth muscle. *Free Radic Biol Med.* 2021;162:603-14.
54. Tanaka LY, Araujo TLS, Rodriguez AI, Ferraz MS, Pelegati VB, Morais MCC, et al. Peri/epicellular protein disulfide isomerase-A1 acts as an upstream organizer of cytoskeletal mechanoadaptation in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2019;316(3):H566-H79.
55. Navas-Madroñal M, Rodriguez C, Kassan M, Fité J, Escudero JR, Cañes L, et al. Enhanced endoplasmic reticulum and mitochondrial stress in abdominal aortic aneurysm. *Clin Sci (Lond).* 2019;133(13):1421-38.

56. Essex DW, Li M. Protein disulphide isomerase mediates platelet aggregation and secretion. *Br J Haematol.* 1999;104(3):448-54.
57. Flaumenhaft R. Protein disulfide isomerase as an antithrombotic target. *Trends Cardiovasc Med.* 2013;23(7):264-8.
58. Mor-Cohen R. Disulfide Bonds as Regulators of Integrin Function in Thrombosis and Hemostasis. *Antioxid Redox Signal.* 2016;24(1):16-31.
59. Bowley SR, Fang C, Merrill-Skoloff G, Furie BC, Furie B. Protein disulfide isomerase secretion following vascular injury initiates a regulatory pathway for thrombus formation. *Nat Commun.* 2017;8:14151.
60. Lovat PE, Corazzari M, Armstrong JL, Martin S, Pagliarini V, Hill D, et al. Increasing melanoma cell death using inhibitors of protein disulfide isomerases to abrogate survival responses to endoplasmic reticulum stress. *Cancer Res.* 2008;68(13):5363-9.
61. Jasuja R, Passam FH, Kennedy DR, Kim SH, van Hessem L, Lin L, et al. Protein disulfide isomerase inhibitors constitute a new class of antithrombotic agents. *J Clin Invest.* 2012;122(6):2104-13.
62. Mozaffarian D, Wu JHY. Flavonoids, Dairy Foods, and Cardiovascular and Metabolic Health: A Review of Emerging Biologic Pathways. *Circ Res.* 2018;122(2):369-84.
63. Zwicker JI, Schlechter BL, Stopa JD, Liebman HA, Aggarwal A, Puligandla M, et al. Targeting protein disulfide isomerase with the flavonoid isoquercetin to improve hypercoagulability in advanced cancer. *JCI Insight.* 2019;4(4).
64. Lin L, Gopal S, Sharda A, Passam F, Bowley SR, Stopa J, et al. Quercetin-3-rutinoside Inhibits Protein Disulfide Isomerase by Binding to Its b'x Domain. *J Biol Chem.* 2015;290(39):23543-52.
65. Furie B, Flaumenhaft R. Thiol isomerases in thrombus formation. *Circ Res.* 2014;114(7):1162-73.

66. Ren W, Liu Y, Wang X, Jia L, Piao C, Lan F, et al. β -Aminopropionitrile monofumarate induces thoracic aortic dissection in C57BL/6 mice. *Sci Rep*. 2016;6:28149.
67. Valentová K, Vrba J, Bancířová M, Ulrichová J, Křen V. Isoquercitrin: pharmacology, toxicology, and metabolism. *Food Chem Toxicol*. 2014;68:267-82.
68. Mitchell C, Rahko PS, Blauwet LA, Canaday B, Finstuen JA, Foster MC, et al. Guidelines for Performing a Comprehensive Transthoracic Echocardiographic Examination in Adults: Recommendations from the American Society of Echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr*. 2019;32(1):1-64.
69. Martin-McNulty B, Vincelette J, Vergona R, Sullivan ME, Wang YX. Noninvasive measurement of abdominal aortic aneurysms in intact mice by a high-frequency ultrasound imaging system. *Ultrasound Med Biol*. 2005;31(6):745-9.
70. Lee L, Cui JZ, Cua M, Esfandiarei M, Sheng X, Chui WA, et al. Aortic and Cardiac Structure and Function Using High-Resolution Echocardiography and Optical Coherence Tomography in a Mouse Model of Marfan Syndrome. *PLoS One*. 2016;11(11):e0164778.
71. Li Q, Zhu CC, Ni B, Zhang ZZ, Jiang SH, Hu LP, et al. Lysyl oxidase promotes liver metastasis of gastric cancer via facilitating the reciprocal interactions between tumor cells and cancer associated fibroblasts. *EBioMedicine*. 2019;49:157-71.
72. Jung SH, Kim BJ, Lee EH, Osborne NN. Isoquercitrin is the most effective antioxidant in the plant *Thuja orientalis* and able to counteract oxidative-induced damage to a transformed cell line (RGC-5 cells). *Neurochem Int*. 2010;57(7):713-21.

73. Nolasco P, Fernandes CG, Ribeiro-Silva JC, Oliveira PVS, Sacrini M, de Brito IV, et al. Impaired vascular smooth muscle cell force-generating capacity and phenotypic deregulation in Marfan Syndrome mice. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2020;1866(1):165587.
74. Jia LX, Zhang WM, Zhang HJ, Li TT, Wang YL, Qin YW, et al. Mechanical stretch-induced endoplasmic reticulum stress, apoptosis and inflammation contribute to thoracic aortic aneurysm and dissection. *J Pathol.* 2015;236(3):373-83.
75. McLaughlin SH, Bulleid NJ. Thiol-independent interaction of protein disulphide isomerase with type X collagen during intra-cellular folding and assembly. *Biochem J.* 1998;331 (Pt 3):793-800.
76. Clément M, Chappell J, Raffort J, Lareyre F, Vandestienne M, Taylor AL, et al. Vascular Smooth Muscle Cell Plasticity and Autophagy in Dissecting Aortic Aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2019;39(6):1149-59.
77. Parker SJ, Stotland A, MacFarlane E, Wilson N, Orosco A, Venkatraman V, et al. Proteomics reveals Rictor as a noncanonical TGF- β signaling target during aneurysm progression in Marfan mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2018;315(5):H1112-H26.
78. Wang K, Zhao J, Zhang W, Zhu M, Xu M, Li D, et al. Resveratrol Attenuates Aortic Dissection by Increasing Endothelial Barrier Function Through the SIRT1 Pathway. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2020;76(1):86-93.
79. Watanabe K, Taketomi Y, Miki Y, Kugiyama K, Murakami M. Group V secreted phospholipase A. *J Biol Chem.* 2020;295(30):10092-111.
80. Wang L, Wang B, Li H, Lu H, Qiu F, Xiong L, et al. Quercetin, a flavonoid with anti-inflammatory activity, suppresses the development of abdominal aortic aneurysms in mice. *Eur J Pharmacol.* 2012;690(1-3):133-41.
81. Serreli G, Deiana M. In vivo formed metabolites of polyphenols and their biological efficacy. *Food Funct.* 2019;10(11):6999-7021.

82. Canelón SP, Wallace JM. β -Aminopropionitrile-Induced Reduction in Enzymatic Crosslinking Causes In Vitro Changes in Collagen Morphology and Molecular Composition. *PLoS One*. 2016;11(11):e0166392.
83. Perdikaris P, Karniadakis GE. Fractional-order viscoelasticity in one-dimensional blood flow models. *Ann Biomed Eng*. 2014;42(5):1012-23.
84. Iddawela S, Ravendren A, Harky A. Bio-chemo-mechanics of the thoracic aorta. *Vasc Biol*. 2021;3(1):R25-R33.
85. Kim HW, Weintraub NL. Aortic Aneurysm: In Defense of the Vascular Smooth Muscle Cell. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016;36(11):2138-40.
86. Han L, Dai L, Zhao YF, Li HY, Liu O, Lan F, et al. CD40L promotes development of acute aortic dissection via induction of inflammation and impairment of endothelial cell function. *Aging (Albany NY)*. 2018;10(3):371-85.
87. Sun WL, Li XY, Dou HY, Wang XD, Li JD, Shen L, et al. Myricetin supplementation decreases hepatic lipid synthesis and inflammation by modulating gut microbiota. *Cell Rep*. 2021;36(9):109641.
88. Gaspar RS, Sage T, Little G, Kriek N, Pula G, Gibbins JM. Protein Disulphide Isomerase and NADPH Oxidase 1 Cooperate to Control Platelet Function and Are Associated with Cardiometabolic Disease Risk Factors. *Antioxidants (Basel)*. 2021;10(3).