

Gabriela Venturini da Silva

**Identificação de marcadores proteicos de alto e
baixo *shear stress***

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

Programa de Cardiologia

Orientador: Dr. Alexandre da Costa
Pereira

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Gabriela Venturini da
Identificação de marcadores proteicos de alto e
baixo shear stress / Gabriela Venturini da Silva. --
São Paulo, 2018.
Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Cardiologia.
Orientador: Alexandre da Costa Pereira.

Descritores: 1.Lipídios 2.Receptores de LDL
3.Células endoteliais 4. Metabolismo 5.Metabolômica
6.Proteômica

USP/FM/DBD-262/18

DEDICATORIA

Dedico este trabalho à minha família:

meus pais, Margarida e Walter, pelo apoio incondicional e constante, e pelas palavras e atitudes de incentivo que me encorajam a seguir meus sonhos;

meus irmãos, João Victor, Rafael e Wilson, por serem sempre parceiros nas minhas escolhas;

meu marido, Caique, pelo carinho, amor e companheirismo nessa jornada.

*Dedico também à família Titan-
Pereira, que foi crucial para o meu doutoramento:*

*Silvinha e Ale, por serem exemplos,
inspirações e por cuidarem de mim com tanto carinho;*

*Bia, Ceci e Lele, por despertarem em
mim os sentimentos mais doces que eu já senti.*

AGRADECIMENTO

Essa tese de doutorado é fruto da colaboração e apoio de várias pessoas, não restrito apenas a esses últimos quatro anos e nem diretamente ao trabalho apresentado nesse documento. Nos quase 10 anos de convivência no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular, muitas pessoas cruzaram pela minha bancada e ajudaram a desenvolver a pesquisadora que eu tento me tornar diariamente. Deixo aqui meus sinceros e profundos agradecimentos. Vocês não fazem ideia da importância de todos vocês em meus passos.

Agradeço ao Prof. Dr. Jose Eduardo Krieger por esses quase 10 anos de convivência profissional em seu laboratório, por me permitir utilizar sua estrutura, fazer parte da sua equipe, participar das discussões, por apoiar e criticar meus projetos, me ajudar no processo da construção do conhecimento científico, por me abrir portas e por confiar nos meus posicionamentos. É um grande prazer ser parte da sua equipe.

Aos PIs do laboratório: Dra. Ayumi Miyakawa pela disposição e colaboração em todas as discussões científicas e Dra. Miriam Alaniz pelas discussões científicas, técnicas e ajuda em momentos de dúvidas com western blot e células endoteliais.

À Dra. Adriana Girardi por todas as colaborações, ideias, sugestões, críticas, apoio científico e amizade. É muito bom ser vizinha de bancada de uma profissional tão competente como você.

À toda equipe administrativa do LGCM, as meninas que são indispensáveis para manter essa roda girando! As queridas Luciana Soares, Felícia, Amanda, Juliana, Rosângela, Isabel e Lúcia que nos ajudaram no passado e deixaram saudades! Marcelly e Priscila, obrigada pela ajuda no “meio de campo” com todas as comissões, fundações, direções, etc! Ana Maria, Ednalva e Márcia obrigada pelo acolhimento: das pessoas, dos pacientes, dos materiais, e dos pepinos!

Maude, obrigada por toda colaboração nesses anos, por me ensinar os meandros da administração financeira de um laboratório, mas principalmente, obrigada pela sua amizade. Sil, obrigada pela organização de toda papelada burocrática, por comandar todos os agendamentos e sempre ter uma cópia de tudo. Obrigada pelo seu sorriso dizendo, “fica calma que a gente vai resolver”.

À toda equipe de apoio de limpeza, por manter a organização do ambiente e fornecimento dos materiais, contribuindo para a realização dos experimentos. Brendo, Andrea e Sirleide muito obrigada pela disposição e amizade todos esses anos.

Agradeço aos técnicos e alunos da genética, aos que ainda estão conosco e todos que passaram pelo grupo, nossas épocas de discussões, apresentações e confraternizações eram muito prazerosas. Diogo Biagi obrigada por compartilharmos bons momentos durante nossa divisão de bancada e por hoje termos nos tornado colaboradores e amigos. Júlia Marsiglia obrigada por me ensinar os caminhos de Boston.

À Renata Carmona pelo apoio nas mudanças estruturais, na implantação de novas metodologias que permitiram que nossos projetos fossem executados e por confiar no meu trabalho.

Aos técnicos Mariliza, Thiago e Mariana pelo apoio, discussões de experimentos, de protocolos e pela amizade. Elida, obrigada por fazer da cultura de células um lugar organizado, por fazer do nosso laboratório um lugar seguro com seus treinamentos e por fazer das nossas conversas momentos de muita diversão!

Ao pessoal da Bioinfo por sempre ajudar desde os problemas mais simples até os algoritmos mais indecifráveis. Obrigada especialmente a Andrea e Luz pela ajuda direta em nossos projetos.

Ao pessoal da Pleura, Carlos, Vanessa e Milena pela disponibilidade em ajudar sempre.

Ao laboratório de Biologia Vasculuar por estarem sempre dispostos a colaborar, discutir e emprestar reagentes e equipamentos. Agradeço ao Leonardo Tanaka pela realização da técnica En Face para esse trabalho. Agradeço à Thais Araújo por todas as discussões, hoje você se tornou uma grande amiga e parceira de pesquisa.

Aos amigos do laboratório geral que me apoiam nessa caminhada, Vinícius, Samatha, Nathália, Iguaracy, Aline, Camila, Thayane, Theo, Fanny, Flávia, Acaris, Renato e Daniel. À Thais Girão por dividirmos fases de aflições e euforias nestes últimos anos, pelas incontáveis discussões científicas e metodológicas que tivemos, você é um grande exemplo de profissional e ser humano. Ao João Carlos, muito obrigada pela sua amizade, pelas discussões científicas, gastronômicas e culturais, pela ajuda diretamente na correção dessa tese e por ser meu colaborador em outros projetos. Que continuemos assim!

Aos amigos que foram muito presentes no início do doutorado, Marcus Vinicius, Ana Paula e Bianca. Ao Rafael pelo apoio e colaboração no em todo percurso que me levou ao doutorado. Ao Leonardo Jensen, obrigada pelos cafés científicos e amistosos. Pela colaboração dentro e fora do laboratório. Você e a Natália sempre foram grandes parceiros de mestrado, doutorado e além.

Aos meus grandes colaboradores do P&D do Grupo Fleury que me empurraram para esse mundo analítico. Valdemir, obrigada por todo conhecimento repassado, por me ensinar como lidar com os massas e pela amizade. Karina, obrigada por me apresentar o mundo de pequenas moléculas e pela nossa grande amizade. À Jéssica, obrigada pela ajuda em vários momentos nas bancadas do Fleury, por todas as nossas horas e horas de conversa, pela presença nos processos de mudanças. Você e o Felipe são parceiros que eu quero levar para vida!

Gostaria de agradecer imensamente as meninas do meu grupo: Kally, Thamiris, Juliana e Pamella. Poucos tem a sorte de poder contar de olhos fechados com os seus parceiros de trabalho. Eu tive a sorte muito grande de encontrar vocês, parceiras com as quais eu posso contar a qualquer hora! Muito obrigada por essa presença tão próxima que me faz pensar, de verdade, que esse trabalho é nosso. Espero ter estado tão presente para vocês quanto vocês estiveram para mim. Vocês são profissionais competentes e pessoas incríveis que eu sou muito grata de ter por perto.

Pamella, obrigada por estar comigo desde o início do nosso grupo, por nos manter unidas quando uma ou outra estava ausente. Pela paciência, insistência e por sempre nos mostrar o lado bom das coisas. Você é uma amiga muito especial a quem eu desejo todo o sucesso e felicidade do mundo.

Aos membros do Seidman Lab, que tornaram o inverno um pouco mais aquecido. Cricket e Jon muito obrigada pela oportunidade de trabalhar com vocês e pela confiança depositada. Vocês são grandes inspirações profissionais. Barb, Yuri, Chris e Manuel obrigada pela amizade, pela colaboração e pelos momentos de descontração. Existe amizade no outro lado do equador!

Aos queridos Vinicius e Ludmila que são companheiros de longa data! Obrigada pela amizade e presença na minha vida.

Ao Carlos e Sérgio, obrigada pelo apoio, na ciência e na vida! Obrigada pela amizade e pelo carinho.

Ao Jonathas por ser meu fiel e amado amigo. Passam-se os anos, as cidades, os países, os projetos, mas a gente continua! Obrigada pela disponibilidade, pela amizade e por estar sempre aqui.

Ao meu querido e competente orientador, Alexandre Pereira. Sempre faltarão palavras para lhe agradecer toda a oportunidade, toda a confiança e toda a amizade que você depositou em mim. Trabalhar com você é aprender diariamente como fazer ciência, como ser profissional, como fazer parcerias, como priorizar esforços, como ser relevante, como encontrar os problemas, como resolver os problemas... enfim, você é o profissional em quem eu me espelho. Foi um prazer enorme conviver com você todos esses anos, e quem venham muitos. MUITÍSSIMO obrigada por dividir sua família comigo.

Mais uma vez, Sílvia, Beatriz, Cecília e Helena. Obrigada pelo ano incrível que passamos juntas. Sílvia, obrigada por abrir sua casa, pelo apoio, pelo carinho, pela música, pelo aconchego que eu nunca esquecerei. Meu amor e carinho por vocês não tem tamanho.

À minha família, obrigada pelo apoio e me desculpem as ausências.

Meus pais, Walter e Margarida, vocês são fonte de confiança e amor. Obrigada pelo apoio emocional, financeiro e pela segurança que vocês sempre me passaram. Por me ensinarem valores essenciais na formação de um doutor como ética, respeito, o valor do conhecimento e do esforço. É muito mais fácil finalizar um doutorado quando se tem pais dizendo que você sempre tem para onde voltar. Meus queridos irmãos, vocês são meus parceiros que estão sempre presentes apoiando minhas escolhas e presenciando os momentos mais especiais da minha vida, obrigada.

Ao Caique, meu companheiro. Obrigada pelo apoio diário e imensurável. Sua presença na minha vida, longe ou perto, sua atenção, seu carinho, sua paciência e seu cuidado fizeram muita diferença para eu encerrar esse ciclo, e me dão confiança para começar tantos outros. Obrigada pela compreensão da ausência, por incentivar meu desenvolvimento profissional e pessoal, e por apoiar as minhas decisões. A você, todo meu amor.

Vocês são meu porto seguro, e minhas conquistas são também de vocês.

Agradeço o apoio financeiro da Fapesp durante o doutorado e estágio no exterior.

Esta dissertação 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. Serviço 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. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com Listo of Journals Indexed in Index Medicus.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xvi
ABREVIACÕES	xvii
RESUMO	xix
ABSTRACT	xxi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Células endoteliais (CE).....	2
1.2. SS e aterosclerose	3
1.3. SS e alterações moleculares.....	6
1.4. Aterosclerose, SS e alterações metabólicas	10
1.5. SS e análises proteômicas.....	13
2. OBJETIVOS	16
2.1. Objetivo Geral	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 – Análise proteômica de células endoteliais submetidas a alto e baixo shear stress	17
3.1.1. <i>Incorporação de aminoácidos marcados às proteínas celulares – SILAC</i> 17	
3.1.2. <i>Shear stress</i>	20
3.1.3. <i>Medida de NO secretado por HUVECs após SS</i>	21
3.1.4. <i>Extração de proteínas</i>	22
3.1.5. <i>Quantificação de KLF2 e VE-caderina em HUVECs após SS</i>	22
3.1.6. <i>Digestão de proteínas</i>	23
3.1.7. <i>Análise por Espectrometria de Massas</i>	23
3.1.8. <i>Limpeza dos dados e seleção das proteínas diferenciais</i>	25

3.2. – Análise Metabolômica de CE submetidas a alto e baixo shear stress	27
3.2.1. <i>Extração de metabólitos</i>	27
3.2.2. <i>Derivação</i>	28
3.2.3. <i>Análise em GC-MS</i>	28
3.2.4. <i>Análise de dados metabolômicos</i>	28
3.2.5. <i>Análise Estatística</i>	29
3.2.6. <i>Análise de rede</i>	29
3.3. O papel do receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDLR) no efeito ateroprotetor do SS	31
3.3.1. <i>Validação da modulação do LDLR em diferentes intensidades de SS</i>	31
3.3.2. <i>Glicosilação do LDLR</i>	32
3.3.3. <i>Aumento do LDLR em CE com tratamento com estatina</i>	33
3.3.4. <i>Análise metabolômica de HUVECs submetidas a BSS e tratadas com estatina</i>	34
3.3.5. <i>Análise Estatística</i>	35
3.4. – Análise das proteínas diferencialmente glicosiladas de HUVECs submetidas a alto e baixo SS	36
4. RESULTADOS	38
4.1. – Análise proteômica de CE submetidas a alto e baixo shear stress ..	39
4.2. – Análise metabolômica de CE submetidas a alto e baixo shear stress	44
4.3. – Caracterização do LDLR em HUVECs submetidas a alto e baixo SS	48
4.3.1. <i>Aumento da expressão do LDLR através de tratamento com atorvastatina</i>	51
4.4. – Análise do glicoproteoma de HUVECs submetidas a BSS e ASS ...	57
5. DISCUSSÃO	59
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	68
7. ANEXOS	69
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Forças mecânicas na parede do vaso. Ilustração de uma parede arterial mostrando as células endoteliais internamente alinhadas e células musculares lisas na camada média vascular. A Pressão (p) é uma força perpendicular ao vaso, resultando em estiramento circunferencial à parede do vaso. *Shear stress* (τ) é uma força paralela à parede do vaso e é exercida longitudinalmente na direção do fluxo de sangue. Modificado de Hahn e colaboradores (6). 3
- Figura 2: Ilustração demonstrando a formação de lesões ateroscleróticas predominantemente em regiões expostas a fluxo baixo ou oscilatório como em bifurcações. Duas teorias são propostas para esse fenômeno 1) Teoria do transporte de massas e 2) teoria do SS. Modificado de Warboys e colaboradores (14). 4
- Figura 3: Células endoteliais (CE) respondem ao estímulo de *shear stress* (SS) através de vários mecanosensores incluindo sensores presentes em membrana (canais iônicos, receptores de tirosina quinase, receptores acoplados a proteína G); moléculas de interação célula-célula e de interação com a matriz extracelular (proteínas de adesão focal, caderinas, PECAM), glicocálice e proteínas de citoesqueleto. A) O SS laminar ou alto resulta na ativação de vias responsáveis por alinhar as células em direção ao fluxo, aumentar a produção de NO e inibir a expressão de moléculas inflamatórias e de adesão. B) Enquanto CE sob SS baixo ou oscilatórios induzem a expressão de moléculas inflamatórias e de adesão, estresse oxidativo e moléculas pro-apoptóticas. Figura extraída de Simmons, et al (32). 7
- Figura 4: Visão geral do protocolo SILAC. Os experimentos de SILAC consistem em duas fases – (a) de Adaptação, quando as células crescem em meio contendo aminoácidos (AA) leves (ponto preto) e pesados (estrela vermelha) até que os aminoácidos pesados sejam incorporados em mais de 90% das proteínas. Dessa maneira, as proteínas marcadas provenientes das células marcadas são distinguíveis das proteínas não marcadas por uma diferença de massa. Após incorporação e crescimento das células até se obter as quantidades necessárias, inicia-se a fase Experimental (b) na qual as células diferencialmente marcadas são submetidas a diferentes tratamentos. Em seguida as proteínas são misturadas e analisadas por espectrometria de massas. A razão da intensidade do sinal de um mesmo peptídeo na sua versão leve e pesada nos fornece a abundância relativa da proteína nos dois estados celulares. Modificado de Ong e colaboradores (97). 19

- Figura 5: Sistema de *Shear stress in vitro Cone plate*. A) Desenho esquemático de sistema de *cone-plate*. Adaptado de Malek e colaboradores (15). B) Foto ilustrativa de sistema de *cone plate* para placas de 10 cm² utilizado nesse trabalho. C) Equação para cálculo do SS aplicado às células (100).
..... 20
- Figura 6: Esquema de como as HUVECs foram submetidas a o SS com marcações intercaladas de modo que não houvesse viés em relação às proteínas contaminantes provenientes do meio de cultura de manipulação. Após SS, as proteínas foram quantificadas e 100µg de cada condição (alto e baixo SS e marcação leve e pesada) foram misturadas e enviadas para análise proteômica no Centro de Espectrometria de Massas da Universidade de Vanderbilt. 21
- Figura 7: Esquema de tratamento das células com atorvastatina seguido de SS. As células foram submetidas a 15 dinas/cm² e a 5 dinas/cm² (sem tratamento) e a 5 dinas/cm² após tratamento com estatinas e estatinas mais L-name. Foram extraídos metabólitos e o perfil das células foi comparado. 35
- Figura 8: A) HUVECs submetidas a SS de 5 dinas/cm² (BSS) secretaram menos NO em meio de cultura quando comparado a células submetidas a 15 dinas/cm² (ASS). B) Células submetidas a SS de 5 dinas/cm² também expressaram menos KLF2 (C) e VE-caderina (D) quando comparado a 15 dinas/cm². Esses dados sugerem que as HUVECs responderam aos estímulos conforme descrito na literatura. 38
- Figura 9: Fluxograma das proteínas identificadas pela análise proteômica. Foram identificadas 6122 proteínas, restando 5486 proteínas após retirada de contaminantes, identificadas por um sítio e em biblioteca reversa. Dessas, 1094 foram estatisticamente diferentes sendo 364 identificadas em pelo menos duas replicatas. As proteínas aumentadas em células submetidas a alto SS (ASS) ou baixo SS (BSS) foram submetidas a análise de enriquecimento de vias canônicas. 40
- Figura 10: *Heatmap* das 364 proteínas estatisticamente diferentes presentes em pelo menos 2 replicatas. As proteínas foram clusterizadas em dois principais grupos: as aumentadas em ASS (vermelho) e as aumentadas em BSS (verde). Para construção do *heatmap* foram plotados os log₂ das razões das intensidades de proteínas identificadas em ASS/BSS. 41
- Figura 11: Principais vias canônicas enriquecidas pelas proteínas aumentadas em ASS (azul) e em BSS (laranja). As proteínas que estão em maior concentração em ASS estão relacionadas a metabolismo celular, especificamente metabolismo de lipídios; e metabolismo de proteínas, especificamente em metabolismo de modificação pós-traducional. As proteínas presentes em maiores concentrações em HUVECs submetidas a BSS foram relacionadas a interação com a matriz extracelular e ativação de coagulação em plaquetas. As vias foram significativamente enriquecidas segundo teste Exato de Fisher com correção para múltiplos testes FDR com valor de p menor que 0,05. 42

- Figura 12: Análise de componentes principais de células submetidas a ASS (vermelho) e BSS (verde) utilizando todos os metabólitos. PC1 e PC2: componente principal 1 e componente principal 2. Cada ponto representa o perfil metabólico de uma replicata biológica e as elipses, o intervalo de confiança de 95%. 44
- Figura 13 *Heatmap* dos 58 metabólitos estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) entre as HUVECs submetidas a ASS (vermelho) e BSS (verde). Para construção do *heatmap* foram utilizados os valores de \log_2 da intensidade de cada metabólito. 45
- Figura 14: Análise de rede entre as proteínas e metabólitos aumentados em HUVECs submetidas a ASS em relação a BSS. O LDLR e o colesterol foram as duas moléculas com maior número de interações. 47
- Figura 15: Diferenças na modulação do receptor de LDL (LDLR) em HUVECs submetidas a ASS (15 dinas/cm²) e BSS (5 dinas/cm²). A) Quando submetidas a BSS, as HUVECs apresentam parte dos receptores na forma glicosilada (madura) e parte na forma não glicosilada (imatura), enquanto que em HUVECS submetidas a ASS, o receptor encontrava-se totalmente na forma glicosilada. B) Após enriquecimento das proteínas de membrana HUVECs pós SS, foi identificada uma menor quantidade de LDLR na superfície de membrana de células submetidas a BSS em comparação com ASS. C) Foi observado ainda diminuição da quantidade de fator de transcrição de LDLR (SRBP1) nuclear em HUVECS sob BSS em relação a ASS..... 49
- Figura 16: Extratos proteicos de HUVECS submetidas a ASS e BSS tratados com PNGase F para remoção das N-glicosilações. Foi observado uma leve redução de tamanho na banda do receptor maduro (160kDa) mas não alcançou o mesmo tamanho da banda do receptor imaturo 50
- Figura 17: Localização diferencial do LDLR nas HUVECs quando submetidas a BSS (5 dinas/cm²) e ASS (15 dinas/cm²). Foi observado que em ASS (painel inferior) o LDR está distribuído na membrana, concentrado principalmente no sentido do fluxo, enquanto que em BSS (painel superior) o receptor está localizado na região perinuclear. Foi utilizado DAPI para marcar o núcleo em azul, Anti-LDLR em vermelho (anticorpo secundário marcado com alexa 555). Imagens Confocal. Magnificação de 400x. 50
- Figura 18: Localização diferencial do LDLR em células endoteliais de artéria aorta de camundongo pela técnica *Em Face*. Foi observado que em células endoteliais de Arco Aórtico (A) o LDR estava distribuído na região perinuclear como pequenos pontos concentrados, enquanto que na região de aorta abdominal (B) o receptor estava localizado de forma mais homogênea na membrana. Foi utilizado DAPI para marcar o núcleo em azul, anti-LDLR está em vermelho (anticorpo secundário marcado com alexa 555) e a lâmina elástica está representada em verde identificada por autofluorescência. Imagens Confocal. Magnificação de 400x. 51
- Figura 19: Aumento da expressão de LDLR em células endoteliais após 72 horas de tratamento com atorvastatina. HUVECs tratadas com veículo (DMSO) na parte superior e com 5 μ M de atorvastatina na parte inferior por

24, 48 e 72 horas. Núcleos celulares corados com DAPI em azul e LDLR corado em vermelho (anticorpo secundário alexa 555). Observa-se o aumento do LDLR na membrana após 72 horas de tratamento. A célula HepG2 foi utilizada como controle positivo do tratamento. Magnificação de 400x..... 52

Figura 20: Análise de componentes principais (PCA). *Score plot* entre as componentes selecionadas (Componente 1 e 2). É possível identificar que células tratadas com estatina (BSS_Statin) apresentam um perfil mais próximo de HUVECs submetidas a ASS (vermelho) que células submetidas a BSS sem tratamento com estatina (verde). PC1 e PC2: componente principal 1 e componente principal 2. Cada ponto representa o perfil metabólico de uma replicata biológica e as elipses, o intervalo de confiança de 95%..... 53

Figura 21: *Heatmap* dos 17 metabólitos estatisticamente diferentes entre ASS e BSS, mas que deixaram de apresentar diferença após tratamento com estatina. Para construção do *heatmap* foram utilizados os valores de log2 da intensidade de cada metabólito. 54

Figura 22: Metabólitos diferentes em HUVECS sob BSS em comparação com ASS e que deixaram de apresentar diferença após tratamento com estatina. Os quatro últimos metabólitos (quadrado vermelho) tiveram sua recuperação dependente de NO, pois após tratamento com L-name juntamente com estatina, os valores voltaram aos de células submetidas a BSS. ANOVA com Bonferroni como pós teste..... 56

Figura 23: *Heatmap* das 59 proteínas diferencialmente glicosiladas em ASS (vermelho) e BSS (verde). Para construção do *heatmap* foram plotados os log2 das razões das intensidades de proteínas identificadas em ASS/BSS. 58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lista de metabólitos estatisticamente diferentes entre HUVECs submetidas a ASS e BSS e suas funções de acordo com análise no KEEG. Os metabólitos grifados e em itálico foram identificados em maior quantidade em BSS em relação a ASS.	46
---	----

ABREVIACOES

APOE	Apolipoproteína E
ASS	Alto <i>shear stress</i>
AT1R	Receptor de AT1
BSS	Baixo <i>shear stress</i>
CE	Células Endoteliais
DTT	Ditiotreitol
EGM	Meio de crescimento de células endoteliais, do inglês <i>Endothelial Cell Growth Medium</i>
FAME	Ácidos graxos metil esterificados, do inglês <i>Fatty acids methyl ester</i>
FDR	Taxa de falso descobrimento, do inglês <i>False Discovery Rate</i>
GC/MS	Cromatografia a gás acoplada ao espectrômetro de massas
GPCRs	Receptores acoplados a proteína G, do inglês <i>G protein coupled receptors</i>
hEGF	Fator de crescimento endotelial humano, do inglês <i>human Endothelial Growth Factor</i>
hFGF	Fator de crescimento de fibroblasto humano, do inglês <i>human Fibroblast Growth Factor</i>
HUVEC	Células endoteliais de veia de cordão umbilical humanas, do inglês <i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
ICAM	Molécula de adesão intracelular, do inglês <i>Intercellular adhesion molecule</i>

IGF	Fator de crescimento similar a insulina, do inglês <i>Insulin-like Growth Factor</i>
KLF2	do inglês <i>Krueppel-like factor 2</i>
LDL	Lipoproteína de baixa densidade, do inglês <i>low-density lipoprotein</i>
LDLR	Receptor de lipoproteína de baixa densidade
MudPIT	Tecnologia Multidimensional de Identificação de Proteínas, do inglês <i>Multidimensional Protein Identification Technology</i>
NIST	Instituto Nacional de Padrões e Tecnologias, do inglês <i>National Institute of Standards and Technology</i>
NO	Óxido Nítrico
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PCA	Análise de componentes principais, do inglês <i>Principal Component Analysis</i>
PECAM1	Molécula de adesão celular endotelial plaquetária, do inglês <i>Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1</i>
PI3K	Fosfatidilinositol 3 quinase, do inglês <i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>
SILAC	Marcação de isótopos de aminoácidos estáveis em cultura celular, do inglês <i>Stable Isotope Labeling by Aminoacids in Cell Culture</i>
SS	Estresse de cisalhamento, do inglês <i>shear stress</i>
VCAM	do inglês <i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
VEGFR2	Receptor de VEGF (do inglês <i>vascular endothelial growth factor</i>)

RESUMO

Silva GV. Identificação de marcadores proteicos de alto e baixo *shear stress* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018

As doenças cardiovasculares ainda são as principais causas de mortalidade e morbidade em todo o mundo. E a aterosclerose é uma das principais precursoras de vários desfechos clínicos como isquemias e infarto do miocárdio. As placas ateroscleróticas se desenvolvem preferencialmente em regiões de bifurcação ou curvatura dos vasos, onde o *shear stress* (SS) encontra-se diminuído ou perturbado. A expressão de proteínas pró-aterogênicas em regiões de baixo SS e ateroprotetoras em regiões de SS alto foram relatadas na literatura, porém o mecanismo completo carece de elucidação. Este trabalho teve por objetivo integrar proteômica e metabolômica para um melhor entendimento das alterações moleculares que acontecem nas células endoteliais em situações de alto e baixo SS, que podem resultar no desenvolvimento de lesões e placas ateroscleróticas. Para esta finalidade, células endoteliais foram submetidas a alto e baixo SS em sistema *cone plate*, seguido de análise proteômica e metabolômica por espectrometria de massas. Nossos dados demonstraram que o metabolismo de lipídio e metabolismo de modificações pós-traducionais de proteínas (N-glicosilações) estavam diminuídos em baixo SS. Em relação ao metabolismo de lipídio, foi identificada diminuição na concentração de ácidos graxos e na expressão de enzimas e proteínas transportadoras de lipídios em células sob baixo SS. O receptor de LDL, proteína importante para a homeostase do colesterol, foi identificado em menor concentração na membrana, bem como com alteração no seu perfil de glicosilação em células após baixo SS. As células submetidas a baixo SS e, portanto, aquelas com perfil pró-aterogênico, quando tratadas com estatina para o aumento da expressão de LDLR, aproximaram seu fenótipo ao de

células submetidas a alto SS, adquirindo parte de um fenótipo ateroprotetor, com recuperação dos níveis de aminoácidos, lipídios, açúcares e ácidos carboxílicos. Os dados deste trabalho sugerem que o metabolismo de lipídios é um processo importante na manutenção do perfil ateroprotetor de células submetidas a alto SS. Além disso, as evidências demonstraram que estatinas apresentam uma atividade protetora, não apenas sistêmica, com diminuição do LDL circulante, mas também no microambiente vascular, contribuindo para o bom funcionamento das células endoteliais.

Descritores: lipídios; receptores de LDL; células endoteliais; metabolismo, metabólica, proteômica.

ABSTRACT

Silva GV. Identification of proteic biomarkers of low and high shear stress [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2018.

Cardiovascular diseases are the main cause of the mortality and morbidity worldwide. Atherosclerotic plaque development is closely associated to the hemodynamic forces applied to endothelial cells (EC). Among these, shear stress (SS) plays a key role in disease development since changes in flow intensity and direction could stimulate an atheroprone or atheroprotective phenotype. EC under low and/or oscillatory SS (LSS) have upregulation of inflammatory proteins, adhesion and cellular permeability molecules. On the contrary, cells under high/laminar SS (HSS) increase their expression of protective and anti-inflammatory factors. The mechanism behind the SS regulating an atheroprotective phenotype is not completely elucidated. Here we used proteomics and metabolomics to better understand the changes suffered by endothelial cells under LSS and HSS that promote the atheroprone and atheroprotective profile and how these modifications can be connected to atherosclerosis development. Our data showed that lipid metabolism and post translational modification protein metabolism were downregulated in cells under LSS. About lipid metabolism, we found the LDLR, one important protein in cholesterol homeostasis, showed significant alterations both at the quantitative expression level, as well as regarding post-translational modifications. Under LSS, LDLR was seen at lower concentrations and with a different glycosylation profile. Finally, modulating LDLR with atorvastatin led to the recapitulation of an HSS metabolic phenotype in EC under LSS. The phenotype was recovery based on increasing of amino acids, lipids, sugars and carboxylic acids. Altogether, our data suggest lipid metabolism is important in atheroprotective phenotype of endothelial cells under HSS. Statins showed benefits not only

systemic, decreasing cholesterol level in blood, but also in vascular environment, contributing for protector phenotype of endothelial cells.

Descriptors: lipids; receptors, LDL; endothelial cells; metabolism; metabolomic; proteomic.

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares são as principais causas de mortalidade e morbidade em todo o mundo. O desenvolvimento de placas ateroscleróticas em artérias coronárias está associado à origem de diversos eventos cardiovasculares clínicos graves, como doenças isquêmicas e infarto do miocárdio. Assim, um melhor entendimento sobre os mecanismos de desenvolvimento dessas placas, identificação precoce da lesão, localização e predição de ruptura podem contribuir para redução da mortalidade através do desenvolvimento de novas terapias, bem como novas estratégias clínicas (1).

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica em que há o acúmulo de lipídios, células inflamatórias e matriz extracelular na parede das artérias. Este acúmulo leva à formação de placas ateroscleróticas, que diminuem o lúmen do vaso e, eventualmente, o conteúdo dessas placas extravasam culminando em trombos e consequente obstrução do fluxo sanguíneo (2).

O desenvolvimento da aterosclerose se inicia com a oxidação do LDL (lipoproteína de baixa densidade, do inglês *low-density lipoprotein*) por espécies reativas de oxigênio. Uma vez oxidado, o LDL é internalizado na parede vascular e promove o recrutamento de células inflamatórias por meio da expressão de proteínas de adesão e citocinas em células endoteliais (como a VCAM-1 - do inglês *vascular cell adhesion molecule-1* e e-selectinas) (3).

Sabe-se que vários fatores de risco contribuem para o desenvolvimento da placa aterosclerótica, incluindo idade, histórico familiar, hipercolesterolemia, diabetes, hipertensão, obesidade, frequência de atividade física e tabagismo (4). Porém, nos últimos anos, as pesquisas na área têm demonstrado que a formação de placas está relacionada não apenas aos fatores sistêmicos como os acima citados, mas também com o microambiente arterial (5). Vários componentes caracterizam o microambiente arterial, incluindo fatores

hemodinâmicos, deposição de matriz e produção de fatores de coagulação e crescimento celular, e citocinas (6).

A maior parte dos fatores que influenciam o microambiente vascular é resultado da atividade direta das células endoteliais (CE), sendo estas grandes protagonistas na instalação da lesão aterosclerótica.

1.1. Células endoteliais (CE)

As células endoteliais (CE) estão localizadas entre o fluxo sanguíneo e a parede vascular e formam uma barreira seletiva e não trombogênica entre ambos (7–9). Além do papel estrutural desenvolvido por essas células, elas também estão envolvidas na modulação de importantes funções celulares, como migração, apoptose, produção, secreção e metabolização de biomoléculas, além de regular a contratilidade das células musculares lisas (8). Ao modular tais processos, o endotélio participa da manutenção das propriedades anticoagulantes, do controle fisiológico do diâmetro do lúmen, da regulação da permeabilidade vascular, cicatrização e prevenção no desenvolvimento de doenças vasculares (9).

Estas funções desempenhadas por CE são moduladas por ligações químicas de moléculas presentes no sangue, como citocinas, fatores de crescimento e lipoproteínas. Porém, diferente da maioria das células, as CE estão diretamente expostas às forças hemodinâmicas derivadas do fluxo sanguíneo, que por sua vez, são importantes para a manutenção da homeostase vascular e mecanotransdução.

As forças que atuam sobre e internamente às células podem ser descritas como *estresses* ou *tensões*. A pressão sanguínea, um exemplo dessas forças, age normalmente na superfície celular criando um estresse de compressão dentro das células, enquanto que a força de fricção do fluxo sanguíneo gera um estresse de cisalhamento (ou *shear stress* - SS) que tangencia a superfície celular. Além dessas duas forças atuantes, existem também a distensão do vaso sanguíneo devido à pressão de pulso, que transmite uma tensão de tração através do contato das células com a matriz extracelular (Figura 1). Esses fatores hemodinâmicos influenciam diretamente a biologia endotelial,

seja pela ação direta nas CE, ou indiretamente, por modificações locais das concentrações de biomoléculas em contato com as mesmas (9).

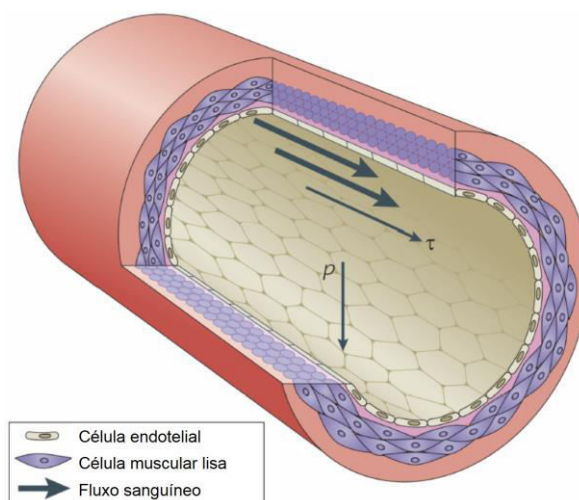


Figura 1: Forças mecânicas na parede do vaso. Ilustração de uma parede arterial mostrando as células endoteliais internamente alinhadas e células musculares lisas na camada média vascular. A Pressão (p) é uma força perpendicular ao vaso, resultando em estiramento circunferencial à parede do vaso. *Shear stress* (τ) é uma força paralela à parede do vaso e é exercida longitudinalmente na direção do fluxo de sangue. Modificado de Hahn e colaboradores (6).

Apesar das CE responderem a diversos fatores hemodinâmicos, o SS parece ser determinante para a atividade do endotélio. O SS é capaz de modificar a sinalização intracelular, expressão gênica e expressão proteica resultando em alterações funcionais celulares (7).

1.2. SS e aterosclerose

A intensidade do SS está altamente relacionada com as características anatômicas do vaso, sendo laminar e mais alto em vasos distantes, sem curvaturas e sem bifurcações (10), e menor ou oscilatório na parte interna de curvaturas ou em regiões de ramificações (11,12). Caro e colaboradores (13) identificaram que os sítios de desenvolvimento de placas ateroscleróticas coincidem com regiões de fluxo sanguíneo alterado, sugerindo assim que forças mecânicas de fluxo podem ter papel chave no desenvolvimento de lesões. Isso ocorre, provavelmente, devido a dois motivos: teoria do efeito de transporte de massas e teoria do SS, como ilustrado na figura 2.

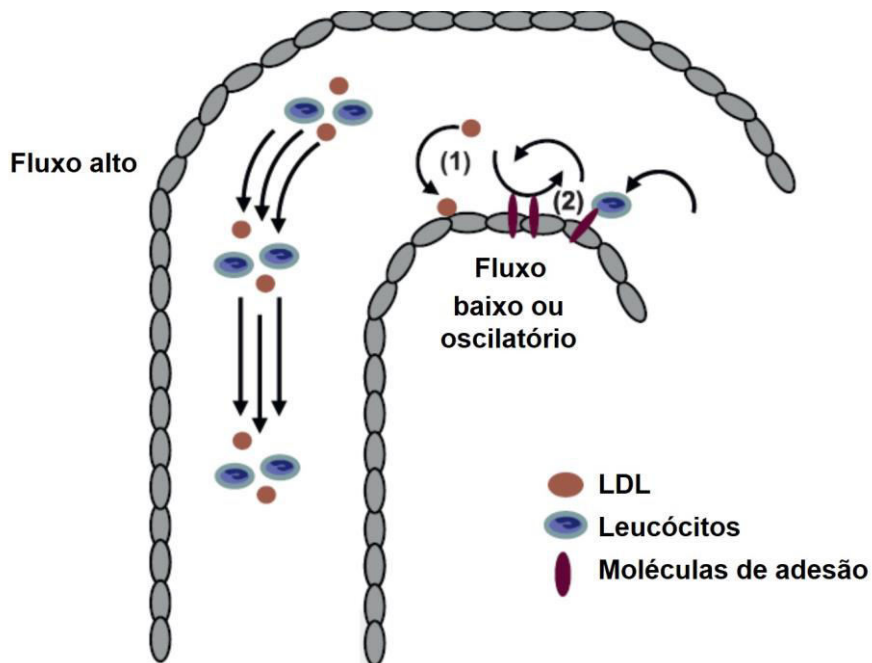


Figura 2: Ilustração demonstrando a formação de lesões ateroscleróticas predominantemente em regiões expostas a fluxo baixo ou oscilatório como em bifurcações. Duas teorias são propostas para esse fenômeno 1) Teoria do transporte de massas e 2) teoria do SS. Modificado de Warboys e colaboradores (14).

Segundo a teoria de transporte de massas, o material aterogênico como LDL e leucócitos teria melhor acesso à parede arterial em áreas de baixo fluxo ou estagnação devido a um aumento do tempo de contato dessas moléculas do sangue com a parede do vaso. Essa teoria é suportada por experimentos como o de Weinberg e colaboradores(8), mostrando maior incorporação de macromoléculas marcadas em região de baixo fluxo.

A outra teoria, Teoria do SS, está relacionada diretamente com a força hemodinâmica discutida anteriormente. O endotélio está constantemente exposto às forças mecânicas do fluxo sanguíneo como SS e na maior parte das vezes as artérias estão sob um fluxo uniforme, unidirecional e de relativamente alto SS (ASS) (aproximadamente 15 dinas/cm^2). Porém, quando se tem bifurcação ou curva, o fluxo é perturbado e muda de direção durante o ciclo cardíaco, resultando em um SS baixo (BSS) ou oscilatório (equivalente a 5 dinas/cm^2) (14,15). A diferença na intensidade e direção do fluxo podem levar a alterações estruturais e moleculares que estariam, então, relacionadas ao desenvolvimento de placas ateroscleróticas. Desta maneira, o SS baixo

proporcionaria uma pré-disposição para formação de placas, enquanto o alto SS teria um papel de proteção do endotélio (14).

Estudos de genômica demonstraram que vários genes endoteliais são regulados em resposta a um fluxo laminar ou perturbado (16–18) e estes genes, por sua vez, podem alterar a resposta a fatores secretados como componentes vasoativos, fatores de crescimento, fatores de coagulação, fatores de formação e degradação de fibrina e matriz extracelular. De forma geral, o ASS promove a expressão de moléculas anti-inflamatórias, anti-proliferativas, anti-apoptóticas e genes anti-oxidantes. Em contraste, BSS está relacionado à formação de moléculas pró-inflamatórias, moléculas de adesão (16,19,20) e espécies reativas de oxigênio. Além de alterar o padrão de expressão de várias moléculas, alterações do SS levam à desregulação da produção de óxido nítrico (NO), biomolécula relevante à manutenção das atividades essenciais do vaso e de espécies reativas de oxigênio (21–24).

As variações do SS levam a alterações também em proteínas de arcabouço celular, influenciando diretamente a permeabilidade e a integridade endotelial. Evidências demonstram que as CE tem papel importante na formação da placas através do aumento da permeabilidade do LDL na parede arterial (25). A actina e microtúbulos, essenciais para manutenção da integridade celular, tem suas distribuições e organizações reguladas pelo fluxo. Enquanto BSS promove a formação preferencial de microtúbulos na periferia celular, ASS promove a formação de microtúbulos na região central da célula (26). Em estudos *in vivo*, foi identificado que BSS está associado a menor contatos célula-célula e alinhamento desordenado no citoesqueleto (27), levando não só à formação de placas ateroscleróticas, mas também às complicações da lesão, como a ruptura de placas instáveis. Em um modelo porcino de artéria ilíaca, região conhecida como de fluxo complexo, por meio de coloração de azul de Evan ligado a albumina, foi identificado o aumento de permeabilidade em regiões de fluxo oscilatório (28) enquanto que, em regiões onde o fluxo era laminar, a permeabilidade do vaso era diminuída. Este é um exemplo de que a alteração na permeabilidade endotelial está intimamente

relacionada às mudanças no citoesqueleto durante alterações de SS (27,29,30).

O SS está envolvido tanto na manutenção do estado fisiológico do vaso, como no desenvolvimento de estado patológico em artérias. Dessa maneira, alterações nas forças mecânicas do fluxo podem levar à formação de placas ateroscleróticas. A identificação de marcadores robustos de mudanças de SS é de extrema importância no monitoramento do bom funcionamento vascular, bem como em tomadas de condutas em caso de desestabilização do mesmo.

1.3. SS e alterações moleculares

As alterações descritas no item anterior ocorrem porque CE respondem em nível molecular a alterações de fluxo através de mecanossensores. Os mecanossensores são moléculas capazes de converter estímulos mecânicos em sinais bioquímicos que, por meio de moléculas adaptadoras, disparam cascatas de vias de sinalização e, por consequência, podem ativar a expressão de inúmeros genes com função proliferativa (micro RNAs), de crescimento, inflamatórios ou anti-inflamatórios (31). Modificações nas expressões gênicas e proteicas resultante da ativação desses mecanossensores podem regular e alterar o comportamento funcional das células, principalmente em resposta a doenças e alterações fisiológicas.

A exposição constante a um estímulo mecânico como o SS pode alterar o perfil de moléculas disponíveis na membrana para expor ou esconder sítios de ligação a outras moléculas e assim, disponibilizar novos alvos para interações com substratos e desencadear novas vias de sinalizações (32). Existem vários mecanismos bem definidos e caracterizados sobre a resposta de CE diante de diferentes intensidades de SS que incluem a ativação de mecanossensores, como ilustrado na figura 3.

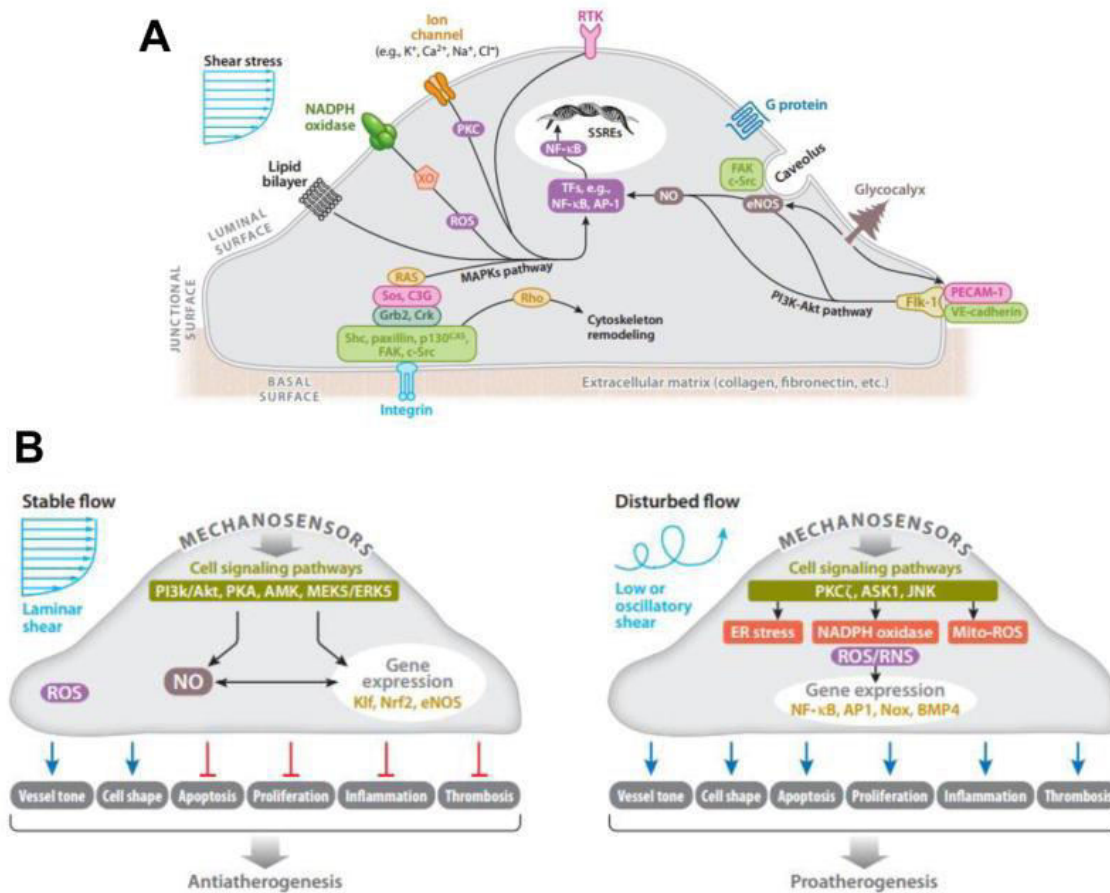


Figura 3: Células endoteliais (CE) respondem ao estímulo de *shear stress* (SS) através de vários mecanosensores incluindo sensores presentes em membrana (canais iônicos, receptores de tirosina quinase, receptores acoplados a proteína G); moléculas de interação célula-célula e de interação com a matriz extracelular (proteínas de adesão focal, caderinas, PECAM), glicocálice e proteínas de citoesqueleto. A) O SS laminar ou alto resulta na ativação de vias responsáveis por alinhar as células em direção ao fluxo, aumentar a produção de NO e inibir a expressão de moléculas inflamatórias e de adesão. B) Enquanto CE sob SS baixo ou oscilatórios induzem a expressão de moléculas inflamatórias e de adesão, estresse oxidativo e moléculas pro-apoptóticas. Figura extraída de Simmons, et al (32).

Estudos prévios de SS já caracterizaram várias moléculas que são moduladas pelo fluxo e atuam como mecanossensores. As integrinas são proteínas transmembranas, e uma das classes de moléculas que podem atuar como mecanossensores. Esse complexo proteico é formado por várias subunidades que atuam como importantes proteínas de ligação de CE a matriz extracelular. O dímero participa tanto da adesão e ligação com a matriz, quanto são responsáveis pela conexão com citoesqueleto citoplasmático e recrutamento de proteínas para transdução do sinal (33). Durante o SS, as integrinas mudam suas conformações e seus parceiros de interações na

porção citoplasmática, e são responsáveis pela ativação de vias de migração de CE sob SS (34).

Os receptores acoplados a proteína G (GPCRs) são outro exemplo de mecanossensores de membrana. O AT1R, receptor que classicamente responde à ligação à angiotensina II, foi um dos primeiros mecanossensores descritos como responsável por responder a um estímulo mecânico sem a presença de um ligante, resultando na ativação de via de inflamação, crescimento celular e diferenciação (35–37). Em CE sob SS, a ativação mecânica de AT1R está relacionada à produção de NO, ao aumento de fosforilação de ERK, AKT e eNOS, e ao influxo de cálcio após o estímulo. Dados da literatura demonstraram que o estímulo mecânico em AT1R por SS resulta em alterações de conformações da β -arrestina independente do ligante e de ativação de proteína G (38) responsável, então, pela ativação das diversas vias *downstream*.

A molécula de ligação de CE a plaquetas (PECAM1 ou CD31), outro exemplo de mecanossensor, está presente na superfície de CE, principalmente nas junções célula-célula. Em resposta ao SS, PECAM1 é fosforilada e passa a interagir com SHP-2, resultando em fosforilação de ERK (39,40). Além da fosforilação de ERK, PECAM1 ainda interage com VEGFR2 e VE-caderina, ativando PI3K (fosfatidilinositol-3-OH-quinase), uma quinase mecanossensível. Com a ativação de PI3K, se inicia uma cascata de ativação de quinases que envolve a AKT, levando ao remodelamento do citoesqueleto e alinhamento de CE em direção ao fluxo quando submetidas a SS alto laminar. Quando as CE são submetidas a BSS, a ativação desses mesmos mecanossensores leva à ativação de Rac1, resultando em geração de espécies reativas de oxigênio e ativação de NF κ B (41,42).

A Caveolina 1 é outra importante proteína passível de ser modulada por diferentes intensidades de SS. É uma proteína que também está presente na membrana e que possui a interessante característica de se associar a lipídios como colesterol e esfingolipídios, formando importantes centros de sinalização como as cavéolas. Entre os vários mecanismos pelos quais a formação de cavéolas se relaciona ao SS está a fosforilação de eNOS e o controle da

secreção de NO (43), a ativação de integrinas (44,45) e o metabolismo de lipídios (46).

O glicocálice, por recobrir toda a superfície celular, está constantemente exposto aos estímulos mecânicos, não sendo isto diferente com relação ao SS (47). Essa cobertura celular é composta por várias moléculas, incluindo glicoproteínas, proteoglicanos e glicosaminoglicanos (48), capazes de interagir com várias moléculas incluindo proteínas circulantes e contribuindo para a barreira seletiva de CE, filtrando moléculas com base em seus tamanhos e cargas. Em diferentes condições de fluxo, há um remodelamento adaptativo do glicocálice, tanto de sua constituição quanto de sua localização, se associando às cavéolas (49). O glicocálice também modula a secreção de NO (50) e interage com proteínas de citoesqueleto, permitindo sua reorganização em resposta a intensidade de SS (51).

O aumento de expressão de KLF-2 é um marcador robusto de CE expostas a SS laminar (52–54), assim como aumento da atividade de eNOS e da consequente secreção de NO (37,55–58). Quando comparadas às CE expostas ao SS laminar, CE expostas a SS oscilatório apresentam maior quantidade de espécies reativas de oxigênio via regulação de atividade de NADPH oxidases e disfunção mitocondrial (59–62), maior ativação de resposta inflamatória via NFκB (63,64) – regulando a expressão de moléculas de adesão como VCAM, ICAM, E-selectina (17,65–67), e maior expressão de citocinas (68,69).

Além das alterações clássicas moduladas por SS descritas acima, dados mais recentes na literatura utilizando RNAseq mostraram o envolvimento de novas moléculas e vias responsivas à intensidade do SS, como o aumento de moléculas que regulam o ciclo celular de CE em SS oscilatório (70); e a inibição da via Hippo/YAP/Taz em SS laminar regulando o processo inflamatório *upstream* e contribuindo para o perfil ateroprotetor de CE em SS laminar (71–73).

O uso de novas tecnologias como metabolômica, análise de fluxo metabólico em tempo real e RNAseq permitiram identificar alterações do perfil

metabólico de células sob diferentes intensidades de SS, com aumento de atividade glicolítica (74) em SS oscilatório, diminuição de metabolismo lipídico celular (70) e comprometimento do ciclo do ácido cítrico (75).

De maneira geral, as diferentes intensidades de SS possuem impactos profundos nas CE, impactos estes que vão desde alterações estruturais – como a alteração no alinhamento dependente de vias de sinalização que regulam o citoesqueleto (26,27,29) até alterações enzimáticas e de localização subcelular de proteínas, modulando o papel parácrino de CE e alterando qualitativamente e quantitativamente as proteínas e metabólitos secretados (76).

1.4. Aterosclerose, SS e alterações metabólicas

Metabólitos são moléculas de baixo peso molecular que atuam como intermediários ou subprodutos do metabolismo celular. Alterações metabólicas são as alterações mais rápidas e sensíveis em resposta a um determinado estímulo, sendo que o nível de metabólitos podem mudar em segundos após um insulto e desencadear mudanças nos processos transcricionais, tradução e pós-traducionais (77).

Há anos metabólitos são quantificados no soro/plasma e urina de indivíduos e estão associados a processos fisiopatológicos, atuando como marcadores de doenças. Atualmente, com as várias plataformas existentes, como espectrometria de massas e análise de fluxo extracelular em tempo real, e constantes evoluções nas tecnologias de equipamentos e processos de análise de dados, é possível identificar e quantificar centenas de metabólitos concomitantemente provenientes de diversas fontes como tecido, células, meio de cultura e fluidos corporais. Informações metabólicas podem ser integradas com os fenótipos biológicos e outras medidas ômicas (como proteômica e transcriptômica), resultando no aprofundamento do conhecimento a respeito de determinado fenótipo.

Vários estudos foram realizados utilizando a medida de metabolômica em soro/plasma de pacientes ou modelos animais com diferentes gravidades de aterosclerose. Além da clássica informação dos estudos populacionais associando a quantidade de colesterol circulante (na forma de LDL e HDL) e triglicerídeos ao desenvolvimento de aterosclerose (78), estudos clínicos mais recentes demonstraram também que, além do colesterol, o aumento de ácido palmítico e de ácidos esteáricos no soro está relacionado com a presença de placa aterosclerótica (79) e que estas moléculas seriam responsáveis pelo aumento de inflamação do endotélio anterior ao processo de lesão. Já estudos com urina e plasma de camundongo *knockout* para LDLR com e sem dieta hipercalórica mostraram que mudanças no receptor levam a alterações dos metabólitos do ciclo do ácido cítrico, do metabolismo de ácidos graxos e metabolismo de colina (80). Corroborando os dados de que metabolismo de lipídios e aminoácidos estariam relacionados a presença de aterosclerose, camundongos ApoE^{-/-} com ligadura parcial de carótida, que resulta em uma perturbação de fluxo sanguíneo, apresentaram aumento nos níveis plasmáticos dos aminoácidos metionina e fenilalanina e de esfingomiélinina quando comparados aos animais controle, e diminuição de fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina (81).

Entretanto, alterações em metabólitos plasmáticos sofrem influência direta da alimentação e do estilo de vida do indivíduo, além de representarem uma resposta sistêmica e não local. Ademais, metabólitos são moléculas “locais dependentes”, sendo que os mesmos metabólitos podem possuir funções distintas (e até opostas) dependendo da sua localização, seja ela subcelular ou extracelular. Açúcares e lipídios são exemplos claros da importância da localização da molécula na homeostase celular, podendo desencadear processos inflamatórios e nocivos quando altos na circulação, e alterando funcionalidade e estrutura celular quando em baixa concentração em membranas ou citoplasma.

Algumas análises de metabólitos de células e tecidos submetidos a diferentes intensidades de SS foram realizadas anteriormente, e trouxeram informações importantes sobre o metabolismo local de CE em condição de

fluxo, e como essas alterações estariam relacionadas ao desenvolvimento de aterosclerose.

Estudos pioneiros mostraram que o SS, através de mecanotransdução, ativa em CE uma via de sinalização modulatória de lipídios, resultando em alterações dos níveis de glicerofosfolípidios, com aumento de fosfatidiletanolamina e ácido fosfatídico de maneira aguda, e aumento de diacilglicerol e trifosfato de inositol tardiamente (82). Além dos fosfolípidios, a distribuição de colesterol e outros lipídios em membrana celular são modulados por diferentes intensidades de SS (83,84), alterando por sua vez a fluidez da membrana. Estudos metabolômicos recentes realizados em aorta de camundongos ApoE^{-/-} com lesões ateroscleróticas leves e graves identificaram diminuição de alanina e adenosina fosfato, e aumento de colina em células de aorta de animais ApoE^{-/-} comparado aos animais controle (85).

Estudos de transcriptômica também podem sugerir alterações em vias metabólicas, através da detecção de alterações na expressão de enzimas ou fatores de transcrição. A partir de dados de RNAseq de CE de região de BSS e ASS de curvaturas de aortas de porcos, Serbanovic-Canic e colaboradores (86) mostraram aumento de HIF1- α em CE de regiões de BSS comparado a regiões de ASS, e que esta modulação resultaria em alteração nas expressão de enzimas *downstream* a HIF1- α , em associação a uma mudança metabólica, com ativação da via glicolítica nesses locais propensos a desenvolver aterosclerose (74). Os autores ainda mostraram que essa alteração metabólica seria a iniciadora e determinante para ativação da cascata inflamatória, para aumento de proliferação de CE resultando na disfunção vascular observada nos estágios iniciais de aterosclerose.

No mesmo ano, um outro estudo de análise dos transcritos de CE em ASS e BSS corroborou os estudos de Serbanovic-Canic e cols., onde se observou a mesma ativação de HIF1- α e via glicolítica e ainda acrescentou outras vias metabólicas que também estavam moduladas em CE submetidas a diferentes intensidades de SS, como diminuição de processos lipídicos – transporte, sinalização e síntese de lipídios através de SREBP; e diminuição dos intermediários do ciclo do ácido cítrico em CE submetidas a BSS (70).

Esses dados demonstram que o SS – seja ele alto ou baixo - resulta em alteração direta no metabolismo celular, apontando o estudo do metabolismo como ferramenta útil ao entendimento do fenótipo pró-aterogênico de regiões de BSS e ateroprotetor de regiões de ASS e, com isso, o desenvolvimento de potenciais estratégias de manipulação. Há uma lacuna na literatura sobre o metabolismo de CE em diferentes intensidades de SS e novos trabalhos precisam ser desenvolvidos.

1.5. SS e análises proteômicas

A proteômica é uma técnica poderosa que permite detectar e quantificar centenas a milhares de proteínas de uma determinada condição fisiológica ou patológica. Várias técnicas envolvendo marcação proteica e análise por espectrometria de massas permitiram maior robustez e confiabilidade nos dados, sendo essa técnica amplamente utilizada em estudos da área de biologia e ciências da saúde. Apesar da proteômica ter se tornado cada vez mais popular e acessível, poucos foram os trabalhos que utilizaram proteômica na caracterização de CE sob diferentes intensidades de SS (87).

A grande contribuição da proteômica para o estudo das alterações em CE causadas por diferentes intensidades de SS foi a caracterização das modificações pós-traducionais em proteínas. Utilizando esse método, foi identificado que, em condições de SS laminar, AMPK fosforila eNOS no resíduo de serina 633 e que essa fosforilação seria responsável pelo aumento de secreção de NO em condição de SS laminar (88). Outros dois sítios de fosforilação em eNOS foram também descritos por análise de fosfoproteoma como resultante da atividade de PI3K e AKT dependente de SS laminar (89). A fosforilação de SIRT1 nos resíduos de serina 27 e 47 por CaMKK- β em CE submetidas a SS pulsátil também foi identificada por proteômica, assim como o aumento da expressão da própria SIRT1. Esses resultados foram validados por vários experimentos de mutantes de SIRT1 e CaMKK- β (90).

Uma outra modificação pós-traducional que ocorre em situações com aumento da secreção de NO foi identificada em CE sob SS: a nitrosilação de resíduos de cisteína. Huang e colaboradores (91) identificaram nitrosilação de proteínas de citoesqueleto após SS, sugerindo este mecanismo como parte do processo de adaptação ao fluxo.

A presença de NO em situação de estresse oxidativo pode levar a formação de peróxinitrito (ONOO⁻), uma espécie reativa que pode modificar proteínas causando nitração de resíduos de tirosina. Análises em células endoteliais submetidas ao SS oscilatório identificaram aumento de nitração de apoB-100, uma proteína componente do LDL que pode, mais tardiamente, estar relacionado ao desenvolvimento de aterosclerose (92). Outras importantes modificações pós-traducionais ainda não foram exploradas no contexto de CE e SS, como a diferença na glicosilação de proteínas.

A glicosilação é uma modificação pós-traducional, que consiste na ligação de um carboidrato a uma proteína e, apesar de ser a modificação mais comum em mamíferos (93), nenhum trabalho de glicoproteoma foi realizado em CE submetidas a SS. Cerca de 50% das proteínas humanas são glicosiladas e essa modificação é, em muitas delas, determinante para manutenção de suas funções biológicas e correta localização subcelular (94,95). Glicoproteínas podem ser classificadas de acordo com o açúcar que carregam e o aminoácido onde esse carboidrato está ligado, podendo ser N-glicoproteínas com o carboidrato ligado ao grupamento amina de resíduos de asparagina e iniciando com um N-acetilglucosamina seguido de combinações de manoses e outros açúcares. Ou ainda os carboidratos podem estar ligados ao oxigênio de aminoácidos formando as O-glicoproteínas que podem se combinar em uma grande diversidade de cadeias e tipos de carboidratos ligados (93).

Glicoproteínas podem tanto ser secretadas quanto estar localizadas na superfície celular ou serem proteínas intracelulares. Possuem especial função na interação do ambiente extracelular com a sinalização intracelular, promovendo adesão celular, transporte, enovelamento correto de receptores, entre outros. Ainda, retículo endoplasmático e complexo de Golgi fazem parte do orquestrado controle no correto enovelamento de proteínas. A incorreta

glicosilação de proteínas, como exemplo a glicosilação de um receptor, pode influenciar sua estabilidade e interação com o ligante (93,95,96).

Apesar da vasta literatura a respeito das alterações moleculares que acontecem em resposta ao SS, e da associação entre alto SS e proteção ao desenvolvimento e vulnerabilidade da placa aterosclerótica, ainda há informações que precisam ser acrescentadas para entendimento dos mecanismos pelos quais alterações no fluxo podem tornar as células mais ou menos propensas a desenvolver uma lesão aterosclerótica. Este entendimento pode ajudar na modulação desse fenótipo por vias farmacológicas e diminuir a incidência de complicações clínicas. Ainda, pouco se sabe sobre as alterações metabólicas sofridas por essas células em diferentes fluxos de SS e quais as pequenas moléculas envolvidas nesse processo. Neste sentido, o uso e a integração de técnicas proteômicas e metabolômicas podem promover melhor entendimento do fenótipo ateroprotetor e pró-aterogênico vascular.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Identificar proteínas e metabólitos diferenciais em células endoteliais submetidas a diferentes intensidades de fluxos de *shear stress* (SS) – SS alto e baixo por espectrometria de massas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Análise proteômica de células endoteliais submetidas a alto e baixo *shear stress*

3.1.1. Incorporação de aminoácidos marcados às proteínas celulares – SILAC

Nesse trabalho foram utilizadas células endoteliais extraídas de veia de cordão umbilical HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells* – Life Technologies #C-003-5C) para a realização de todos os experimentos. As células eram provenientes de um único doador recém-nascido. Os experimentos foram realizados em células com passagem entre 6 e 8.

Para análise das proteínas diferenciais, foi utilizada a técnica SILAC.

A técnica de SILAC (97) (do inglês, *Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell Culture*) é uma estratégia de marcação metabólica que utiliza aminoácidos compostos por isótopos estáveis. Esses aminoácidos marcados são adicionados ao meio de cultura para serem incorporados às proteínas durante a multiplicação celular e, dessa maneira, diferenciar as proteínas provenientes de diferentes condições experimentais em análise proteômica quantitativa. Com essa técnica, é possível comparar dois proteomas submetidos a estímulos diferentes com o menor nível de variabilidade de manipulação, uma vez que todo processo de digestão, fracionamento e análise é realizado concomitantemente. Através do SILAC é inserida uma diferença de massa entre a mesma proteína em duas condições de cultura diferentes, e com isso é possível detectar mudanças biológicas específicas em ensaios funcionais proteômicos, adquirir perfis temporais de abundância proteica e identificar alterações de modificações pós traducionais.

Nesta metodologia, normalmente são realizadas duas culturas separadamente – uma com o meio de cultura “leve”, ou seja, com aminoácidos não marcados, e outro com aminoácidos “pesados”, ou marcados isotopicamente. As células são cultivadas nesses meios por no mínimo 5 duplicações, e após esse período, em média, 97% das proteínas terão acrescentados aminoácidos pesados em suas sequencias. Em seguida, amostras leves e pesadas são misturadas e analisadas por espectrometria de massas – as proteínas de cada condição estarão separadas por uma diferença de massa resíduo-específica que corresponde ao número de isótopos estáveis e ao número de resíduos marcados no analito. Os sinais da intensidade das amostras leves e pesadas fornecem uma comparação quantitativa de suas abundâncias relativas na mistura.

Os experimentos foram realizados em duas fases. Na primeira, chamada de fase de adaptação (Figura 4a), as culturas celulares cresceram em paralelo (meios leve e pesado), para permitir total incorporação dos aminoácidos SILAC. Durante esta fase, foram feitas análises de grau de incorporação a cada passagem. A segunda fase é a fase experimental em si (Figura 4b), na qual as células foram estimuladas diferentemente com meios diferentes (leve e pesado).

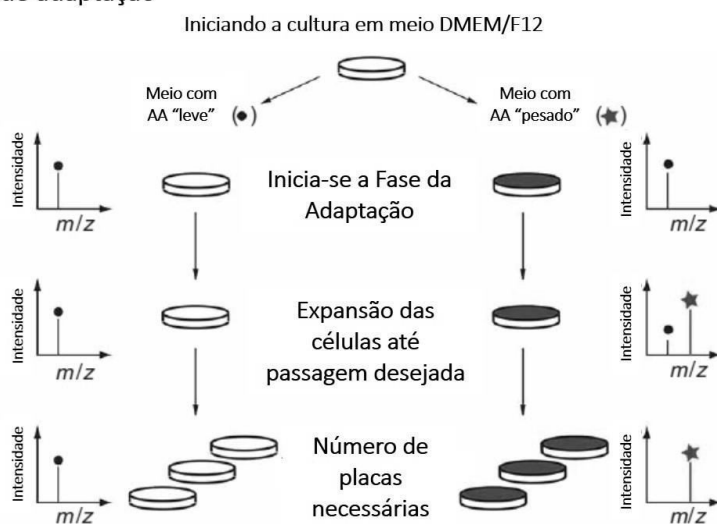
No presente trabalho, a marcação SILAC foi realizada de acordo com Mann e colaboradores (98). Um tubo contendo 1×10^6 células HUVEC em passagem 0 foi descongelado em placa de 10cm^2 e meio DMEM/F12 SILAC *pesado* (Life Technologies #A2494301) contendo suplementação de hEGF, hidrocortisona, GA-1000 (Gentamicina, Amfotericina-B), FBS dialisado (soro fetal bovino), VEGF, hFGF-B, IGF-1, ácido ascórbico, heparina, arginina 13C6, 15N4 (Sigma #608033), lisina 13C6 15N2 (Sigma#608041) e glutamina; ou meio DMEM/F12 SILAC *leve* contendo aminoácidos lisina e arginina não marcados.

É descrito que algumas células convertem arginina (R) em prolina (P) quando se tem arginina em alta concentração. Para evitar essa conversão foi adicionado prolina ($200 \mu\text{g/mL}$) ao meio(99).

As células foram mantidas em cultura até passagem 5, passagem em que foi previamente determinado que a taxa de incorporação de aminoácidos

marcados era maior que 90%. Após a passagem 5, as células foram então submetidas a o alto e baixo SS.

a Fase de adaptação



b Fase Experimental

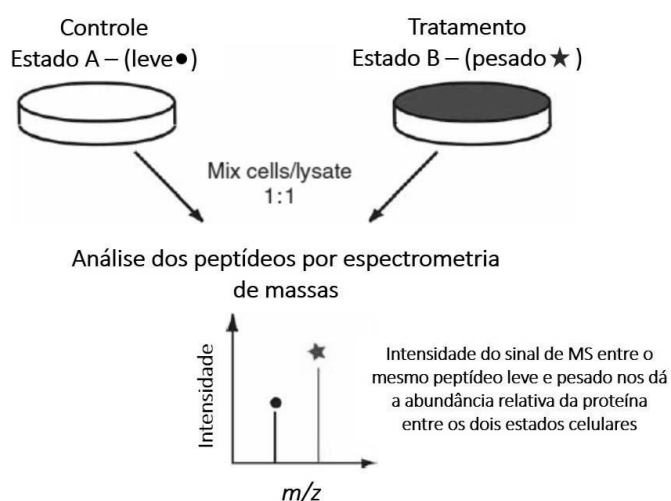


Figura 4: Visão geral do protocolo SILAC. Os experimentos de SILAC consistem em duas fases – (a) de Adaptação, quando as células crescem em meio contendo aminoácidos (AA) leves (ponto preto) e pesados (estrela vermelha) até que os aminoácidos pesados sejam incorporados em mais de 90% das proteínas. Dessa maneira, as proteínas marcadas provenientes das células marcadas são distinguíveis das proteínas não marcadas por uma diferença de massa. Após incorporação e crescimento das células até se obter as quantidades necessárias, inicia-se a fase Experimental (b) na qual as células diferencialmente marcadas são submetidas a diferentes tratamentos. Em seguida as proteínas são misturadas e analisadas por espectrometria de massas. A razão da intensidade do sinal de um mesmo peptídeo na sua versão leve e pesada nos fornece a abundância relativa da proteína nos dois estados celulares. Modificado de Ong e colaboradores (97).

3.1.2. Shear stress

As CE marcadas (*pesadas*) e não marcadas (*leves*) foram cultivadas até adquirirem 80% de confluência. Então, foi realizado um *starving* de 16 horas através da retirada dos suplementos, citocinas e FBS dialisado do meio de cultura (porém mantendo os aminoácidos marcados ou não marcados; a prolina e a glutamina). Após o *starving*, o meio foi trocado novamente para um novo meio sem suplementação e submetido a SS de 15 dinas/cm² (alto SS - ASS) ou 5 dinas/cm² (Baixo SS - BSS) por 24 horas em sistema *cone plate* (Figura 5). A rotação foi fixada de acordo com a equação exposta na Figura 5C (100).

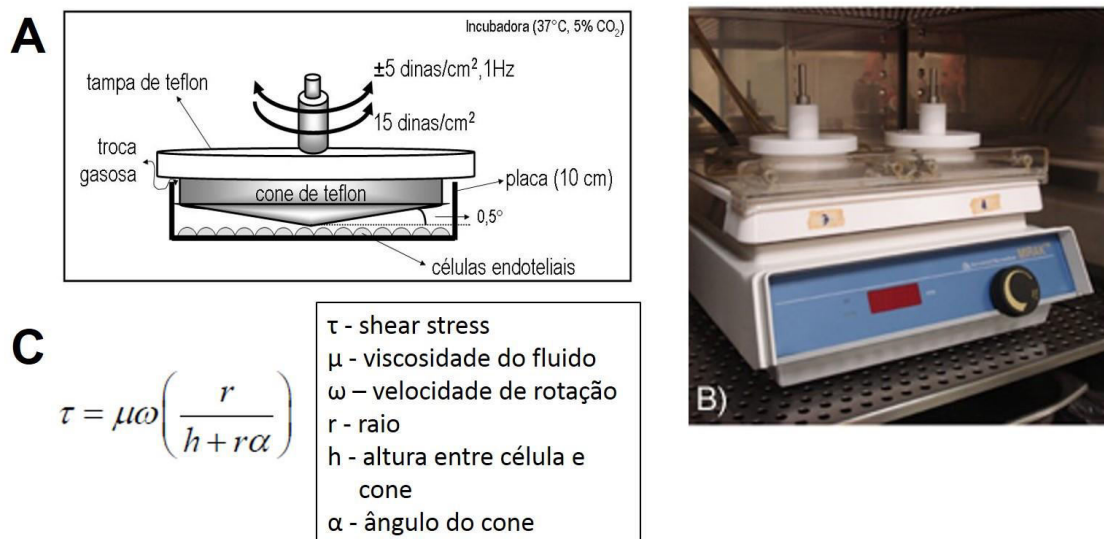


Figura 5: Sistema de *Shear stress in vitro Cone plate*. A) Desenho esquemático de sistema de *cone-plate*. Adaptado de Malek e colaboradores (15). B) Foto ilustrativa de sistema de *cone plate* para placas de 10 cm² utilizado nesse trabalho. C) Equação para cálculo do SS aplicado às células (100).

No total, foram realizados 5 experimentos de alto e baixo SS. Cada replicata experimental consistiu de um *pool* de proteínas de 3 placas independentes submetidas a o SS ao mesmo tempo.

As células foram submetidas a alto e baixo SS com marcações intercaladas, de modo que não houvesse viés em relação às proteínas contaminantes provenientes do meio de cultura e manipulação, conforme figura 6.

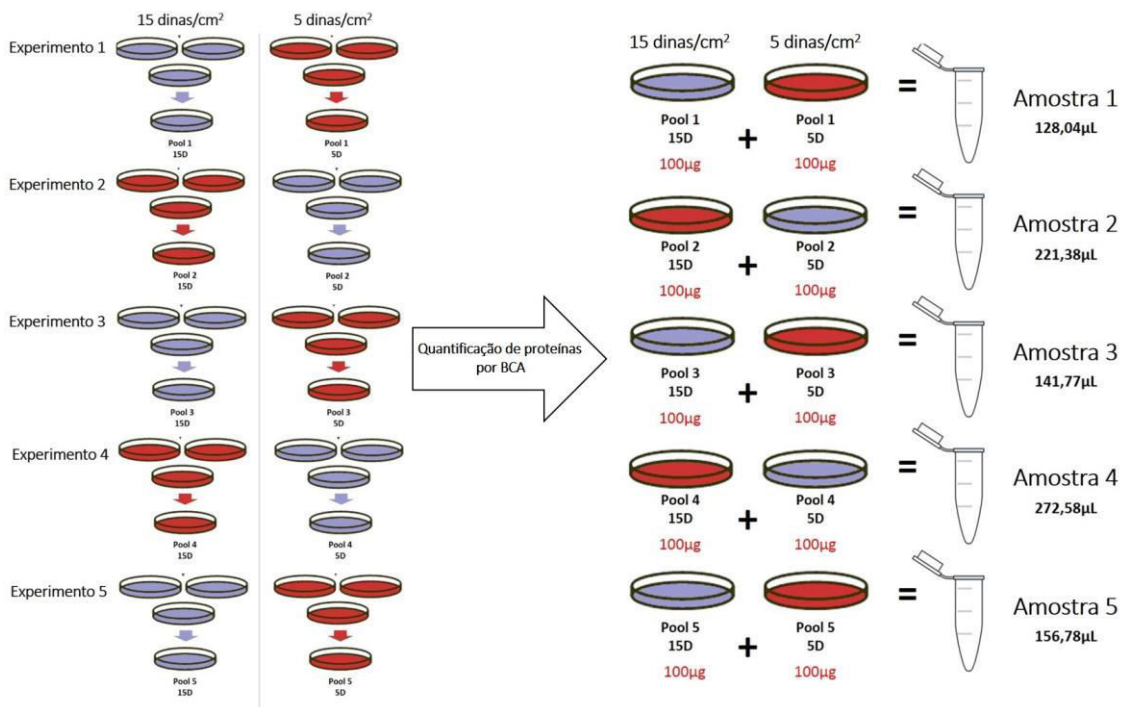


Figura 6: Esquema de como as HUVECs foram submetidas a o SS com marcações intercaladas de modo que não houvesse viés em relação às proteínas contaminantes provenientes do meio de cultura de manipulação. Após SS, as proteínas foram quantificadas e 100µg de cada condição (alto e baixo SS e marcação leve e pesada) foram misturadas e enviadas para análise proteômica no Centro de Espectrometria de Massas da Universidade de Vanderbilt.

3.1.3. Medida de NO secretado por HUVECs após SS

Células endoteliais respondem ao SS alterando a produção de NO. Essa medida foi utilizada para comprovar que as células realmente foram expostas à diferentes estímulos de SS.

Após 24 horas de estímulo, foi retirado uma alíquota de 1mL de meio de cultura para dosagem de nitrato e nitrito, como medida indireta de produção de NO. Foi utilizado um analisador do tipo Sievers NOA TM 280 *Nitric Oxide Analyzer*, e os ensaios foram realizados conforme especificações do fabricante. Os valores de nitrato e nitrito foram corrigidos pelo volume total de meio nas placas após 24 horas de experimento e pela quantidade de proteínas em cada placa.

3.1.4. Extração de proteínas

Após 24 horas de ASS ou BSS, as células foram lavadas com tampão PBS gelado e as proteínas foram extraídas através de raspagem com 300 μ L de tampão contendo 8M ureia, 150mM NaCl, 50mM Tris, 1mM EDTA adicionado coquetel de inibidores de protease (Sigma #P8340) e fosfatase (Sigma #P2859 e #P5726) segundo recomendações do fabricante. As proteínas foram quantificadas em triplicata pelo método BCA, segundo recomendações do fabricante (Thermo #23225). 100 μ g de proteína de cada par de amostra (15 dinas/cm² “pesado” com 5 dinas/cm² “leve”; ou 15 dinas/cm² “leve” com 5 dinas/cm² “pesado”) foram agrupadas e enviadas para a Centro de Espectrometria de Massas da Universidade de Vanderbilt (conforme figura 6).

3.1.5. Quantificação de KLF2 e VE-caderina em HUVECs após SS

Células endoteliais submetidas a diferentes intensidades de SS apresentam modulação diferencial de proteínas como KLF2 e VE-caderina, como reportado na literatura (101,102). Para validar se as células foram expostas a alto e baixo SS antes da análise proteômica, 10 μ g de proteínas foram submetidas a eletroforese SDS-PAGE 10%. Em cada gel foi inserido também um padrão de peso molecular (BioRad Kaleidoscope #161-0324). Após a migração, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF (GE HybondP #25006567) no sistema semiúmido por 50 minutos. Após a transferência, a membrana permaneceu por 16 horas a 37°C para completa secagem. A membrana foi bloqueada por 1 hora com 5% de albumina bovina sérica (BSA) em tampão PBST 0,1%. Após 3 lavagens com PBST 0,1%, a membrana foi incubada por 16 horas a 4°C sob agitação com os anticorpos de interesse (anticorpo anti-KLF2 – LSBio #LS-B4570 diluição 1:1000, anticorpo anti-VE-caderina – Cell Signaling #2500 diluição 1:1000 e anti-GAPDH - #ab9485 1:1000), diluído em 5% de BSA diluído em PBST 0,1%. Após

seguidas lavagens, a membrana foi incubada por 1 hora com anticorpo Cabra anti-IgG de coelho (cadeia leve e pesada) (Thermo Scientific # 31460) conjugado com HRP (1:5000), lavadas novamente e reveladas pelo método de quimiluminescência (ECL).

3.1.6. Digestão de proteínas

Para digestão proteica, 200µg de proteínas foram reduzidas com DTT 5mM e a solução foi incubada por 30 minutos a 60°C. Em seguida, as proteínas foram alquiladas com adição de 30mM de iodoacetamida e a reação foi incubada por 30 minutos, no escuro e a temperatura ambiente. Após a alquilação, foi adicionado tripsina para digestão (1:50 massa/massa) (Promega #V511A), a solução foi vortexada e incubada por 16 horas a 37°C. Após a digestão foi adicionado 10µL de TFA (Pierce # 53102) 5% para finalizar a reação.

3.1.7. Análise por Espectrometria de Massas

Após digestão, os peptídeos foram dessalizados com zip-tip e liofilizados em *Speedvac*. Os peptídeos foram fracionados e analisados em espectrômetro de massas Q-Exactive segundo método MudPIT (103) (do inglês *Multidimensional Protein Identification Technology*). Neste método, os peptídeos foram separados em várias frações através de uma cromatografia de troca catiônica com diferentes concentrações salinas, em seguida houve a separação por cromatografia em fase reversa e injeção no espectrômetro de massas. Segue abaixo os detalhes com as modificações aplicadas a esse trabalho:

Os peptídeos foram reconstituídos em solução 0,1% de ácido fórmico e carregados em uma coluna bifásica C18/SCX MudPIT de 360 x 150µm de sílica fundida.

Usando um cromatógrafo Eksigent NanoLC HPLC e autoamostrador, as análises de MudPIT aconteceram utilizando 11 passos de gradiente salino (25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 500, 750mM e 1M de acetato de amônio). Seguindo de cada pulso de sal, os peptídeos foram eluídos da coluna analítica em um fluxo de 500nL/min utilizando 0,1% de ácido fórmico em água como fase A e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila como fase B. Para os peptídeos eluídos nas 10 primeiras frações da troca catiônica (SCX), foram utilizadas corridas de fase reversa de 120 minutos por fração, consistindo de um gradiente de 2 a 50% de solvente B em 95 minutos, seguido de 15 minutos de equilíbrio em 2% de solvente B. Para a última fração (contendo alta concentração de sal), os peptídeos foram eluídos da coluna analítica com um gradiente de 2 a 98% de solvente B em 100 minutos. Os peptídeos foram introduzidos no espectrômetro de massas Q-Exactive (Thermo Scientific) via *nanoeletrospray*. O Q-Exactive operou em modo DDA (análise dependente de dados) adquirindo HCD MS/MS *scans* (resolução de 17500) após cada MS1 *scan* ($R=70000$) dos 20 íons mais abundantes, usando MS1 *ion target* de 1×10^6 íons e MS2 *target* de 1×10^5 íons. O máximo de tempo para cada *scan* de MS/MS foi fixado em 100ms, a energia de colisão da HCD foi fixada em 30eV e a exclusão dinâmica em 30s.

Para identificação de proteínas e peptídeos, as análises foram realizadas no programa MaxQuant (104–107). Espectros de MS/MS foram buscados utilizando a biblioteca Uniprot (9606). A tolerância do precursor de massas foi fixada em 20ppm para a primeira busca e 10ppm para a busca principal. O máximo de estado de carga por precursor foi de 7 e foram utilizadas carbamidometilação de cisteínas como modificação fixa e oxidação de metioninas como modificação variável. Tripsina foi utilizada como enzima, com no máximo de 2 perdas de clivagens. O FDR (*False Discovery Rate*) para peptídeos e proteínas foi de 1% e multiplicidade de 2 para marcação pesada de arginina¹⁰ e lisina⁸ foram selecionadas. Para razões SILAC de proteínas pesadas e leves, foi selecionado um mínimo de 1 peptídeo *unique* e pelo menos duas contagens por proteína. Todas as proteínas foram identificadas a partir de 2 ou mais peptídeos.

3.1.8. *Limpeza dos dados e seleção das proteínas diferenciais*

Após processamento, foram retiradas as proteínas identificadas pela biblioteca reversa, proteínas contaminantes provenientes do soro ou da manipulação e proteínas apenas identificadas por 1 sítio, ou seja, aquelas que não obtiveram FDR menor que 1%, mas que apresentaram alguma modificação fixa ou variável e foram identificadas apenas por esse critério.

Após limpeza, para cada experimento, foram selecionadas apenas as proteínas que apresentaram mais que dois peptídeos com a razão pesado/leve detectadas.

Para identificação das proteínas estatisticamente diferentes, as razões normalizadas das intensidades das proteínas (pesadas e leves) foram logaritimizadas (\log_2) e foi aplicado o teste de Significância B utilizando o software Perseus. Proteínas que apresentaram p valor menor que 0,05 foram consideradas significativamente diferentes.

O teste de Significância B é um teste aplicado para cada amostra individualmente. Esse teste de significância calcula a variância de toda a população de proteínas e utiliza o *teste t de uma amostra* para determinar se o log das razões é significativamente diferente de zero. Como o desvio padrão tende a variar com a intensidade medida, toda a população de proteínas é dividida em *bins* diferentes de acordo com a intensidade das proteínas e a Significância B é calculada apenas sobre os subconjuntos de proteínas obtidos por binning de intensidade (108).

Para as análises posteriores (*Cluster* e Enriquecimento de vias), foram utilizadas as proteínas estatisticamente significativas em pelo menos duas replicatas biológicas.

Para análise de *cluster* hierárquico foi utilizado a razão normalizada (\log_2) das intensidades de cada proteína em ASS e BSS. Foi utilizado o algoritmo de clusterização Ward D e medida de Distância Euclidiana. Para plotagem do *heatmap*, os valores foram normalizados por amostra por z-escore. As análises foram realizadas no *software* Metaboanalyst.

Foram consideradas proteínas aumentadas aquelas que apresentaram valor de p inferior a 0,05 no teste de Significância B, e que estavam pelo menos

25% maior em um grupo em relação ao outro, ou seja, a razão das intensidades de ASS por BSS (intensidade da proteína em células submetidas a ASS/intensidade da proteína em células submetidas a BSS) fosse maior que 1,25 ou menor que 0,8.

As proteínas aumentadas em cada grupo foram associadas às diferentes vias canônicas utilizando o teste de super-representação estatística do programa *Panther* (versão de 05/12/2017) (109,110). Para tal, foi realizado o *upload* das proteínas aumentadas em ASS ou BSS separadamente e elas foram associadas às vias canônicas do banco de dados *Reactome* utilizando todos os genes do banco *Homo sapiens* como referência (versão 58 publicada em 07/12/2016). Para associação, foi utilizado o teste Exato de Fisher com correção para múltiplos testes (Benjamini & Hochberg *False Discovery Rate*).

3.2. – Análise Metabolômica de CE submetidas a alto e baixo *shear stress*

Com o objetivo de verificar a diferença no perfil metabolômico de HUVECs submetidas a ASS e BSS, 1×10^7 células foram cultivadas em meio EGM-2 e foram submetidas a SS a 5 ou 15 dinas/cm² por 24 horas em sistema *cone plate*.

3.2.1. **Extração de metabólitos**

As amostras foram extraídas e analisadas de acordo com o protocolo padronizado pelo laboratório do Dr. Oliver Fiehn (111,112). As células foram lavadas com PBS gelado por 2 vezes, seguida de extração de metabólitos com 1mL de uma solução gelada e desaerada contendo acetonitrila, isopropanol e água Milli-Q (3:3:2 v/v). Os metabólitos foram transferidos para um tubo de baixa retenção e centrifugados por 5 minutos a 15800xg a 0°C. Após centrifugação, 850µL do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo e tanto o sobrenadante quanto o *pellet* (contendo as proteínas para normalização) foram liofilizados em *Speedvac* por 18 horas. Após liofilização, o resíduo contendo os metabólitos foram ressuspensos em 1mL de solução gelada e desaerada de água e acetonitrila (1:1 v/v). O tubo foi novamente centrifugado a 15800xg por 5 minutos a 0°C e 850µL do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo de baixa retenção e adicionado 5µL padrão interno (ácido mirístico deuterado D27 - Sigma- Aldrich #366889), seguido de liofilização por 18 horas em *Speevac*.

O *pellet* contendo as proteínas foi ressuspensado em solução de 8M de ureia e as proteínas foram quantificadas por método BCA para a normalização dos metabólitos.

3.2.2. Derivação

Para análise por GC/MS, os compostos devem ser capazes de se tornarem voláteis quando submetidos à altas temperaturas. Para isso, após segunda liofilização, o resíduo foi ressuscitado em 20µL da solução de 40mg/mL de metoxiamina diluída em piridina (Sigma-Aldrich) e adicionado 3µL de uma solução contendo ácidos graxos metilesterificados para serem utilizados como *index* de tempo de retenção no cromatograma (FAME), seguido por agitação durante 3 minutos. A reação de metoxiamação ocorreu a 25°C durante 16 horas, seguido por trimetilsililação durante 1h com a adição de 90µL de MSTFA (N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamina) com 1% de TMCS (trimetilclorosilano) (Sigma-Aldrich). Após derivação, as amostras foram novamente submetidas a centrifugação (5 minutos à 15,800xg) e 90µL do sobrenadante foi transferido para um *vial* apropriado para o equipamento de GC/MS. Vale ressaltar que a análise do material derivado foi, e sempre deve ser, realizada em no máximo 24 horas após término da derivação.

3.2.3. Análise em GC-MS

As análises foram realizadas em um equipamento GC/MS Agilent (7890B GC; 5977A MS). Um microlitro do derivado foi injetado no sistema GC Agilent 7890B operando no modo *splitless*. Uma coluna DB5-MS + 10m *DuraGuard capillary* (Agilent 122-5532G) foi utilizada para a separação dos metabólitos com gás Hélio em fluxo de 1,1mL/min. A temperatura do injetor foi fixada em 250°C e a temperatura da coluna em 60°C durante 1 minuto e então elevada a 310°C em uma velocidade de 10°C/min. O eluente da coluna foi automaticamente passado para o MS (Agilent 5977A). O detector operou no modo de ionização por impacto de elétrons (70eV) e o espectro de massa foi registrado após *solvent delay* de 6,5min. A temperatura do MS quadrupolo foi fixada em 180°C e a fonte de íons em 280°C. As amostras correram em triplicata técnica.

3.2.4. Análise de dados metabolômicos

A identificação dos compostos foi determinada comparando o espectro de massa e o tempo de retenção obtidos com a de bibliotecas de metabólitos Agilent Fiehn GC/MS Metabolomics RTL (versão A.01.00) e *National Institute of Standards and Technology* (NIST) (2014) através do *software Unknowns - Agilent MassHunter Work-station Quantitative Analysis* (version B.06.00). Foi utilizado 60% de homologia entre os espectros adquiridos e os espectros das bibliotecas.

A quantificação foi realizada baseada na altura do pico de cada metabólito.

3.2.5. Análise Estatística

Foram considerados para análise estatística apenas os metabólitos que foram identificados em pelo menos 2 das 3 replicatas técnicas de cada amostra. Foi realizada a média das quantificações das replicatas técnicas e foram considerados apenas os metabólitos que foram identificados em pelo menos 50% das amostras biológicas de um dos grupos.

Os dados foram submetidos ao programa Metaboanalyst (113) e normalizados por \log_2 , e os valores faltantes foram substituídos pelo menor valor empiricamente observado.

Foram realizadas análises de componentes principais (PCA) e teste t com correção para múltiplos testes FDR com significância de $p < 0,05$. Para análise de *cluster* hierárquico foi utilizada a razão normalizada (\log_2) das intensidades de cada metabólito em ASS e BSS. Foi utilizado o algoritmo de clusterização Ward D e medida de Distância Euclidiana. Para plotagem do *heatmap*, os valores foram normalizados por amostra por z-score.

3.2.6. Análise de rede

Para identificar as conexões entre as proteínas e entre os metabólitos foi realizada análise de redes do programa NetworkAnalyst (114) utilizando o

banco de dados de proteína-proteína IMEX (115), e para metabólitos e proteínas foi utilizado o banco de dados KEGG. Para ambos, foi construída uma rede de ordem zero de enriquecimento, ou seja, utilizando apenas as conexões diretas entre as proteínas/metabólitos fornecidos.

3.3. O papel do receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDLR) no efeito ateroprotetor do SS

3.3.1. Validação da modulação do LDLR em diferentes intensidades de SS

Para validação da alteração do LDLR em células submetidas a baixo SS foram realizadas análises de *Western blot* e imunofluorescência.

Western blot

Após as HUVECs serem submetidas a alto e baixo SS (conforme item 3.1.2) as proteínas foram extraídas, quantificadas (conforme o item 3.1.4) e corridas e transferidas (conforme item 3.1.5). A membrana foi incubada por 16 horas a 4°C sob agitação com os anticorpos de interesse (anticorpo anti-LDLR – LSBio #LS-B10039 diluição 1:1000 e anticorpo anti-SREBP1 – Abcam #ab135133 diluição 1:1000), diluído em 5% de BSA diluído em PBST 0,1%. Após seguidas lavagens, a membrana foi incubada por 1 hora com anticorpo Anti-IgG de coelho (cadeia leve e pesada) (Thermo Scientific # 31460) conjugado com HRP (1:5000), lavadas novamente e reveladas pelo método de quimiluminescência (ECL).

Para análise das proteínas nucleares e de membrana, foi utilizado o *kit* de fracionamento celular (kit #78840, Life Technologies) conforme recomendações do fabricante.

Imunofluorescência

Após as HUVECs serem submetidas a alto e baixo SS (conforme item 3.1.2) as células foram fixadas em paraformaldeído 4% pH 7,4 por 30 minutos a temperatura ambiente. Depois de seguidas lavagens, as células foram

bloqueadas com caseína 2% diluída em PBS por uma hora a temperatura ambiente. As células foram então incubadas por 16 horas a 4°C com o anticorpo anti-LDLR (LSBio #LS-B10039 diluição 1:200). Após sucessivas lavagens, as células foram incubadas por 90 minutos em temperatura ambiente com anticorpo secundário anti-IgG de coelho feito em cabra marcado com Alexa Fluor 555 (Thermo Scientific #A27039 diluição 1:500). Após lavagens, as células foram incubadas por 15 minutos com DAPI. As lamínulas foram lavadas e montadas com glicergel (Life Technologies). As imagens foram analisadas por microscopia confocal (Zeiss LSM 510 META).

En Face Microscopy

Para verificar a localização do LDLR *in vivo*, foram realizadas análises de imunofluorescência pelo método *En Face*. Camundongos C57BL/6 machos de 6 semanas foram eutanasiados através de inalação de CO₂ e tiveram a aorta cuidadosamente removida e cortada longitudinalmente. A artéria aorta foi separada em duas partes, arco aórtico e aorta descendente e fixadas com paraformaldeído 4% pH 7,4 por 20 minutos a temperatura ambiente. Os vasos foram bloqueados com 5% de BSA diluído em PBS seguido por incubação com anticorpo primário anti-LDLR (LSBio #LS-B10039 diluição 1:200) diluído em 1% BSA durante 16 horas a 4°C. Artérias foram gentilmente lavadas com PBS seguidas de incubação com anticorpo secundário anti IgG de coelho feito em cabra marcado com Alexa Fluor 555 (Thermo Scientific #A27039 diluição 1:500) e DAPI durante uma hora a temperatura ambiente. Imagens foram adquiridas utilizando microscopia confocal (Zeiss LSM 510 META). Para análises por camadas, foi realizado escaneamento no intervalo de 1µm a partir da camada íntima até a camada média.

3.3.2. Glicosilação do LDLR

Para verificar se a diferença de peso molecular do LDLR identificado em *western blot* era realmente devido a glicosilação, 10µg de proteínas de HUVECs submetidas a alto e baixo SS foram tratadas com 0,25U de PNGase F

(Sigma-Aldrich P7367) a 37°C durante 16 horas. Após reação enzimática, o LDLR foi analisado por *western blot* conforme descrito no item 3.1.5.

3.3.3. Aumento do LDLR em CE com tratamento com estatina

Para verificar o papel do LDLR no SS, foi realizado o aumento da expressão do LDLR em células endoteliais utilizando tratamento com estatina. 7×10^4 células HUVECs foram plaqueadas em lâminas de cultura de células com 8 poços (Falcon Culture Slides #354108). Após 24 horas de plaqueamento, as células foram tratadas com 5 μ M de atorvastatina (Sigma# PZ001-5MG) diluída em DMSO ou somente como DMSO (controle), em meio EGM-2 (Lonza #CC-3162). Como controle positivo, foi utilizada uma linhagem de célula de fígado imortalizada (HepG2 - TCC HB-8065) em que foi descrito o aumento a expressão de LDLR após tratamento com atorvastatina (116). As células foram tratadas por 24, 48 e 72 horas com troca de meio suplementado com atorvastatina a cada 24 horas. Após o tempo de tratamento, as células foram lavadas com tampão PBS seguida de fixação com PFA 4% por 30 minutos a temperatura ambiente. Depois de seguidas lavagens, as células foram bloqueadas com caseína 2% diluída em PBS por uma hora a temperatura ambiente. As células foram então incubadas por 16 horas a 4°C com o anticorpo anti-LDLR (LSBio #LS-B10039). Após sucessivas lavagens, as células foram incubadas por 90 minutos a temperatura ambiente com anticorpo secundário anti-igG de coelho feito em cabra marcado com Alexa Fluor 555 (Thermo Scientific #A27039 diluição 1:500). Após lavagens as células foram incubadas por 15 minutos com DAPI. As lamínulas foram lavadas e montadas com glicergel (Life Technologies). As imagens foram analisadas por microscopia confocal (Zeiss LSM 510 META).

3.3.4. Análise metabolômica de HUVECs submetidas a BSS e tratadas com estatina

Com o objetivo de verificar o quanto o aumento na expressão do LDLR aproxima o fenótipo metabólico pró-aterogênico de uma célula endotelial submetido a BSS ao fenótipo ateroprotetor de uma célula submetido a ASS, as HUVECs foram pré tratadas com atorvastatina ou veículo por 72 horas e submetidas novamente a BSS e ASS. Como descrito na literatura, o tratamento com estatinas aumenta a produção de NO (57,117,118), porém o objetivo era identificar a aproximação do fenótipo independente do aumento de NO. Desta maneira, um grupo de células foi tratado com estatina e L-name para inibição da síntese de NO, conforme esquema abaixo (Figura 7).

As células endoteliais foram cultivadas em meio EGM-2 com suplementação de 5 μ M de atorvastatina, ou atorvastatina mais 10mM de L-name ou apenas DMSO por 72 horas em placas de 10cm². Após o tratamento, o meio foi trocado novamente para um novo meio também contendo atorvastatina, ou atorvastatina mais L-name e as células foram submetidas a SS a 5 dinas/cm² por 24 horas em sistema *cone plate*. As células tratadas com veículo (DMSO) foram submetidas a SS de 5 ou 15 dinas/cm² também por 24 horas. Foram realizados os seguintes experimentos para cada condição:

- Cinco amostras de células tratados com DMSO e submetidas a 15 dinas/cm²
- Cinco amostras de células tratados com DMSO e submetidas a 5 dinas/cm²
- Seis amostras de células tratados com 5 μ M de atorvastatina e submetidas a 5 dinas/cm²
- Seis amostras de células tratados com 5 μ M de atorvastatina e 10mM de L-name e submetidas a 5 dinas/cm²

Os experimentos de BSS (5 dinas/cm²) com os diferentes tratamentos foram realizados ao mesmo tempo, de modo que não houvesse nenhum viés de dia de SS ou de tratamento.

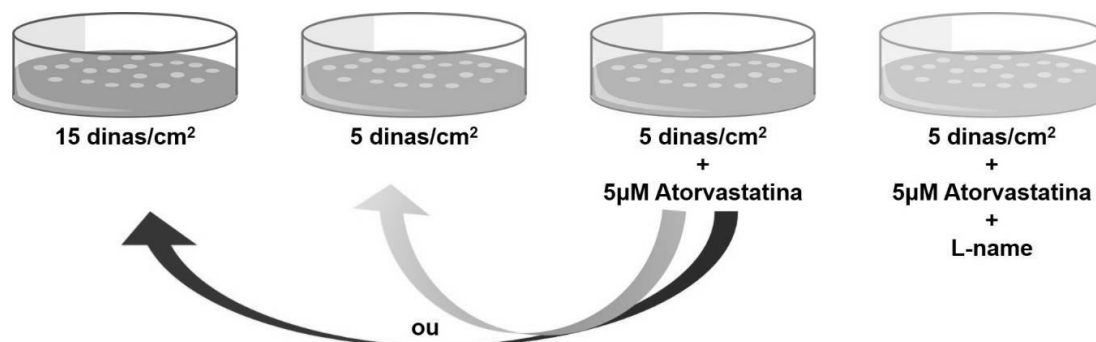


Figura 7: Esquema de tratamento das células com atorvastatina seguido de SS. As células foram submetidas a 15 dinas/cm² e a 5 dinas/cm² (sem tratamento) e a 5 dinas/cm² após tratamento com estatinas e estatinas mais L-name. Foram extraídos metabólitos e o perfil das células foi comparado.

As extrações, derivações e análises no espectrômetro de massas foram realizadas conforme descrito nos itens 3.2.1, 3.2.2 e 3.2.3.

3.3.5. Análise Estatística

Foram considerados para análise estatística apenas os metabólitos que foram identificados em pelo menos duas das três replicatas técnicas de cada amostra. Foi realizada a média das quantificações das replicatas técnicas. E foram considerados apenas os metabólitos que foram identificados em pelo menos 50% das amostras biológicas de um dos grupos.

Foram realizadas análises multivariadas de componentes principais (PCA), ANOVA com significância de $p < 0,05$ e Fisher's *Least Significant Difference* (LSD) como pós-teste. Para análise de *cluster* hierárquico, foi utilizado a razão normalizada (\log_2) das intensidades de cada metabólito em ASS, BSS e BSS mais estatina. Foi utilizado o algoritmo de clusterização Ward D e medida de Distância Euclidiana. Para plotagem do *heatmap*, os valores foram normalizados por amostra por z-escore.

3.4. – Análise das proteínas diferencialmente glicosiladas de HUVECs submetidas a alto e baixo SS

Para verificar o quanto a diminuição de proteínas responsáveis pela glicosilação (como identificado pelos dados de proteômica – Figura 11) resultou na diferença de um perfil de proteínas glicosiladas em HUVECs submetidas a alto e baixo SS, foi realizado uma análise de glicoproteoma.

3.4.1. Enriquecimento de glicopeptídeos de HUVECs submetidas a alto e baixo SS

Proteínas de HUVECs metabolicamente marcadas com aminoácidos “leves” e “pesados” e submetidas a alto e baixo SS (conforme item 3.1.1 e Figura 5) foram digeridas (conforme item 3.1.6) e dessalinizadas por zip-tip. Peptídeos glicosilados foram enriquecidos utilizando o *kit* de enriquecimento de glicopeptídeos ProteoExtract (Millipore # 72103-3) segundo recomendações do fabricante. Brevemente, 50µL de peptídeos foram diluídos em 50µL de tampão de ligação, homogeneizados e incubados com resina de glicocaptura durante 30 minutos a temperatura ambiente. A resina de glicocaptura tem principal afinidade por peptídeos contendo N-glicosilações ricas em manose, híbridas ou complexas. Após a incubação, os tubos foram centrifugados, o sobrenadante descartado e as resinas lavadas com tampão de lavagem ZIC. Peptídeos ligados a resina foram eluídos com 50µL de Bicarbonato de Amônio 50mM. Os açúcares foram clivados com PNGase F conforme descrito no item 3.2.2. Para análise de glicoproteoma foram utilizadas 4 replicatas biológicas.

3.4.2. Análise do glicoproteoma por espectrometria de massas

Após o enriquecimento, os glicopeptídeos foram analisados utilizando o espectrômetro de massas Thermo Scientific Q Exactive™ (San Jose, USA) acoplado a uma cromatografia líquida de ultra performance (UPLC)

nanoACQUITY da Waters (Milford, MA, USA). Para a corrida cromatográfica, 2µL de solução peptídica foram carregados em uma coluna PST C18 nanoACQUITY Trap (180µm × 20mm) com fluxo de 15µL/min de TFA 0.1% (vol/vol) durante 3 minutos. A separação analítica dos peptídeos foi feita usando uma coluna nanoACQUITY UPLC HSS C18 (1,8µm, 75µm × 150mm), em um gradiente linear de acetonitrila 1% e ácido fórmico 0,1% para acetonitrila 60% e ácido fórmico 0,1% por 90 minutos com fluxo de 0,5µL/min. Os espectros foram adquiridos entre 300–2000m/z com 70000 de resolução (m/z 200) e aquisição dependente de dados (DDA) por seleção dos 10 íons precursores mais abundantes para espectrometria de massas em tandem (MS/MS) por Dissociação Induzida por Alta Energia de Colisão (HCD), fragmentação usando uma janela de isolamento 1,2 Da, energia de colisão de 30 eV, e a resolução de 35000.

Os espectros foram analisados no programa MaxQuant (104–107) para identificação de proteínas e peptídeos. Os espectros de MS/MS foram buscados utilizando a biblioteca humana Swissprot (download em outubro/2017). A tolerância de massas do precursor foi fixada em 20ppm para a primeira busca e 4,5ppm para a busca principal. Carbamidometilação de cisteínas foi fixado como modificação fixa, acetilação de N terminal e oxidação de metioninas foram fixadas como modificações variáveis. Tripsina foi utilizada como enzima, com no máximo de 2 perdas de clivagens. O FDR para peptídeos e proteínas foi de 1% e multiplicidade de 2 para marcação pesada de arginina¹⁰ e lisina⁸ foram selecionadas. Para razões SILAC de proteínas pesadas e leves, foi selecionado um mínimo de 1 peptídeo *unique* e pelo menos duas contagens por proteína. Todas as proteínas foram identificadas a partir de 2 ou mais peptídeos.

Foram consideradas proteínas estatisticamente diferentes aquelas que apresentaram p valor < 0,05 no teste de Significância B, conforme descrito no item 3.1.8.

4. RESULTADOS

A eficiência do estímulo de baixo e alto SS em HUVECs foi medida através de secreção de NO (medido indiretamente através de nitrito e nitrato) pelas HUVECS em meio de cultura após 24 horas de SS. Foi observada diminuição de secreção de NO em células submetidas a BSS em relação as células submetidas a ASS (Figura 8A). Também foi verificado que as células submetidas a SS com intensidade de 5 dinas/cm^2 apresentaram menor expressão ou níveis proteicos de KLF2 e VE-caderina (Figura 8B, 8C e 8D) como já reportado na literatura como indicador de BSS.

Após validação de que as HUVECs foram estimuladas com ASS e BSS, as proteínas foram submetidas a análises proteômicas.

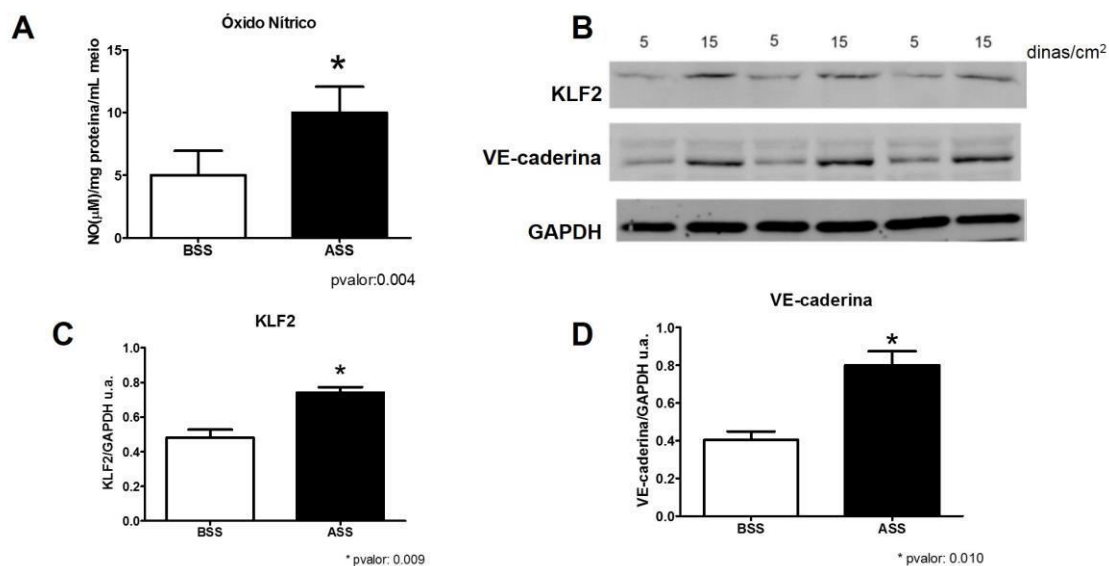


Figura 8: A) HUVECs submetidas a SS de 5 dinas/cm^2 (BSS) secretaram menos NO em meio de cultura quando comparado a células submetidas a 15 dinas/cm^2 (ASS). B) Células submetidas a SS de 5 dinas/cm^2 também expressaram menos KLF2 (C) e VE-caderina (D) quando comparado a 15 dinas/cm^2 . Esses dados sugerem que as HUVECs responderam aos estímulos conforme descrito na literatura.

4.1. – Análise proteômica de CE submetidas a alto e baixo *shear stress*

Após análise e processamento dos dados adquiridos por espectrometria de massas, foram identificadas 6122 proteínas. Após retirada das proteínas contaminantes (como proteínas provenientes do FBS e de manipulação da amostra), proteínas identificadas pela biblioteca reversa *decoy*, e proteínas identificadas apenas por um sítio de modificação pós-traducional, restaram 5486 proteínas sendo 2393 identificadas em todas replicatas biológicas e 4355 identificadas em pelo menos duas replicatas (resumo na Figura 9).

Após aplicação do teste de Significância B em cada amostra, foram obtidas 1094 proteínas com valor de p inferior a 0,05, sendo 590 proteínas aumentadas nas células submetidas a ASS e 503 proteínas aumentadas nas células submetidas a BSS. Entre as proteínas estatisticamente diferentes, 364 proteínas foram identificadas em pelo menos dois experimentos e foram agrupadas hierarquicamente e plotadas em um *heatmap* (Figura 10). Nessa análise foi possível identificar que as proteínas se clusterizam em dois principais grupos: as proteínas aumentadas em células submetidas a ASS (121 proteínas) e as proteínas aumentadas em células submetidas a BSS (98 proteínas). Essas proteínas foram utilizadas nas análises posteriores (Figura 11). As 219 proteínas estatisticamente diferentes e identificadas em pelo menos dois experimentos foram listadas no anexo A e B, no final da tese.

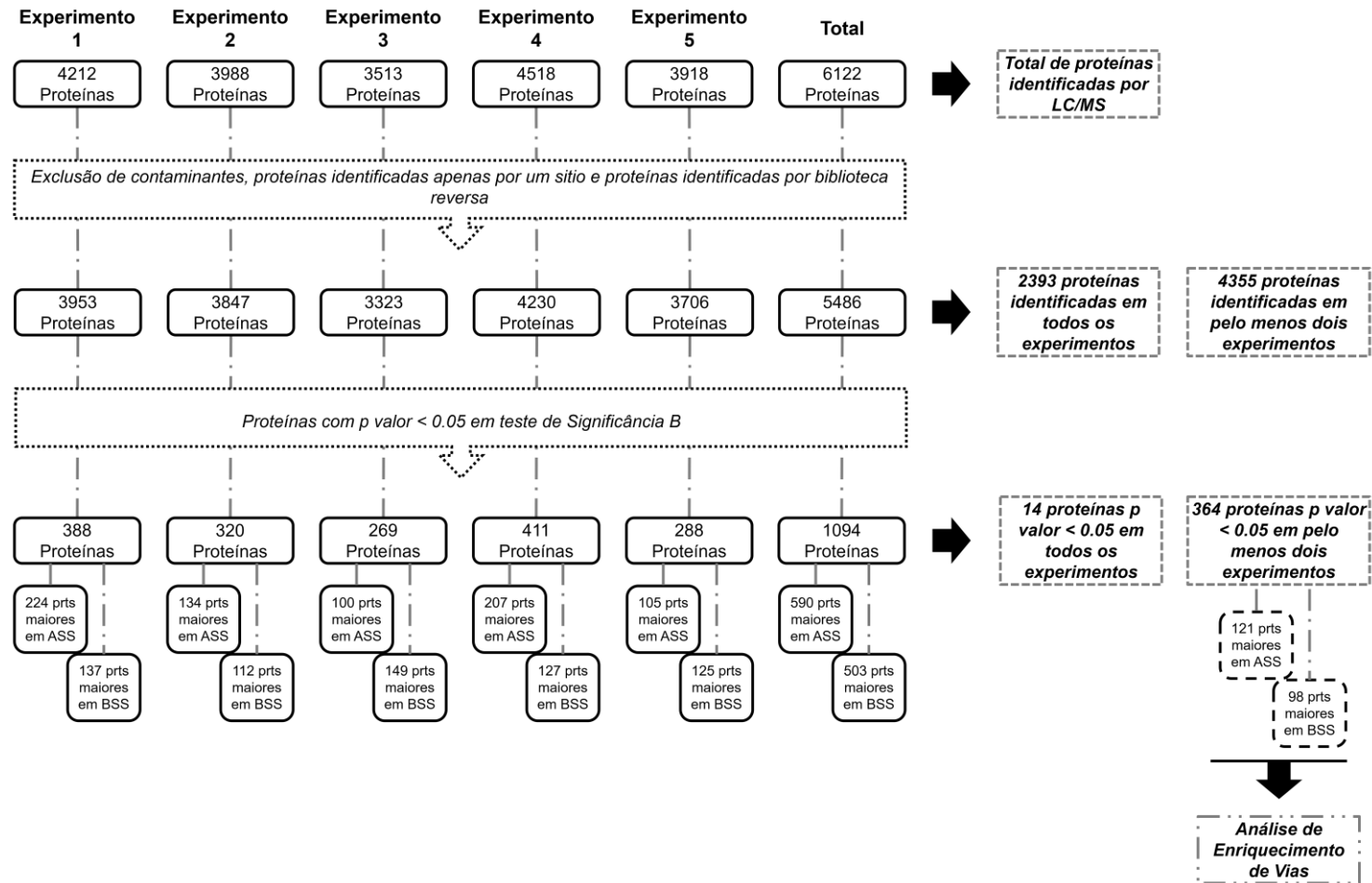


Figura 9: Fluxograma das proteínas identificadas pela análise proteômica. Foram identificadas 6122 proteínas, restando 5486 proteínas após retirada de contaminantes, identificadas por um sítio e em biblioteca reversa. Dessas, 1094 foram estatisticamente diferentes sendo 364 identificadas em pelo menos duas replicatas. As proteínas aumentadas em células submetidas a alto SS (ASS) ou baixo SS (BSS) foram submetidas a análise de enriquecimento de vias canônicas.

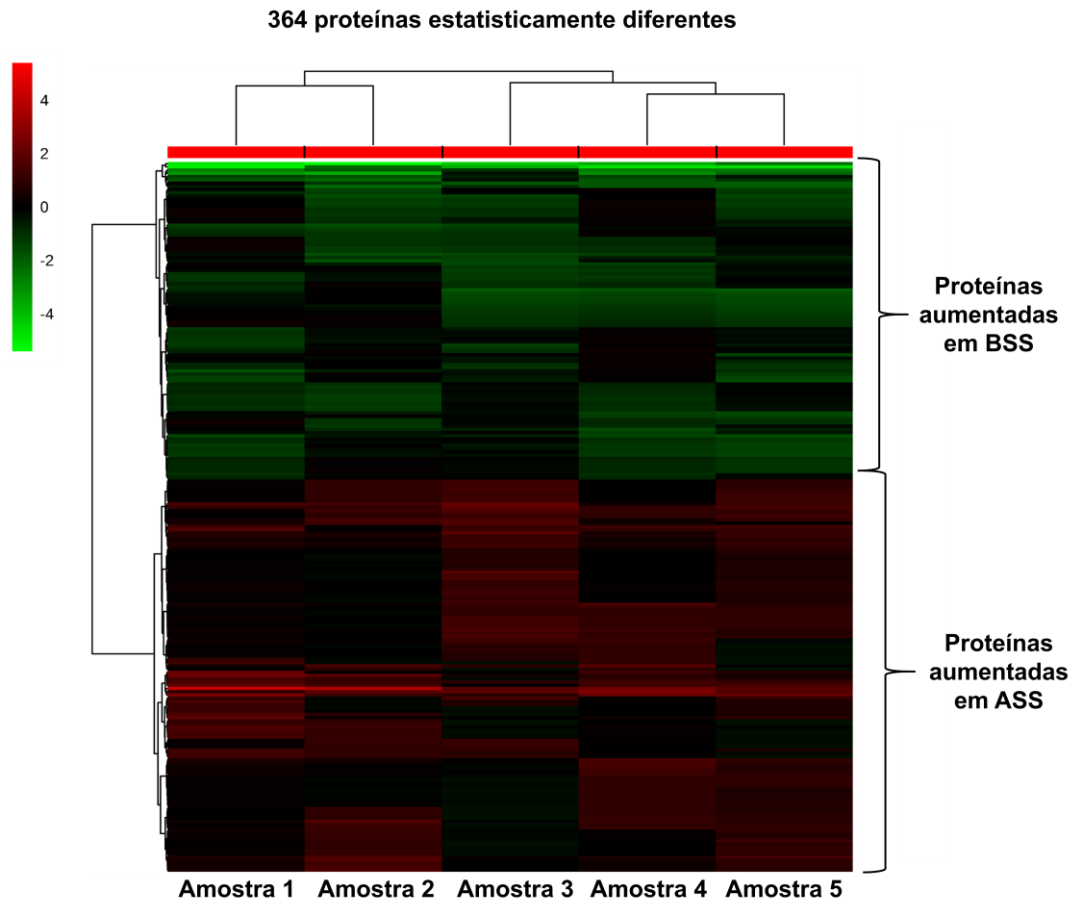


Figura 10: *Heatmap* das 364 proteínas estatisticamente diferentes presentes em pelo menos 2 replicatas. As proteínas foram clusterizadas em dois principais grupos: as aumentadas em ASS (vermelho) e as aumentadas em BSS (verde). Para construção do *heatmap* foram plotados os \log_2 das razões das intensidades de proteínas identificadas em ASS/BSS.

De acordo com a análise de enriquecimento de vias canônicas, as proteínas com maior expressão em HUVECs submetidas a ASS estavam associadas ao metabolismo celular, especificamente metabolismo de lipídios e lipoproteínas; e metabolismo de modificações pós traducionais, especificamente N-glicosilações (Figura 11). Enquanto as proteínas aumentadas em BSS estavam associadas à formação de fibras elásticas, à interação com matriz extracelular e ativação de plaquetas.

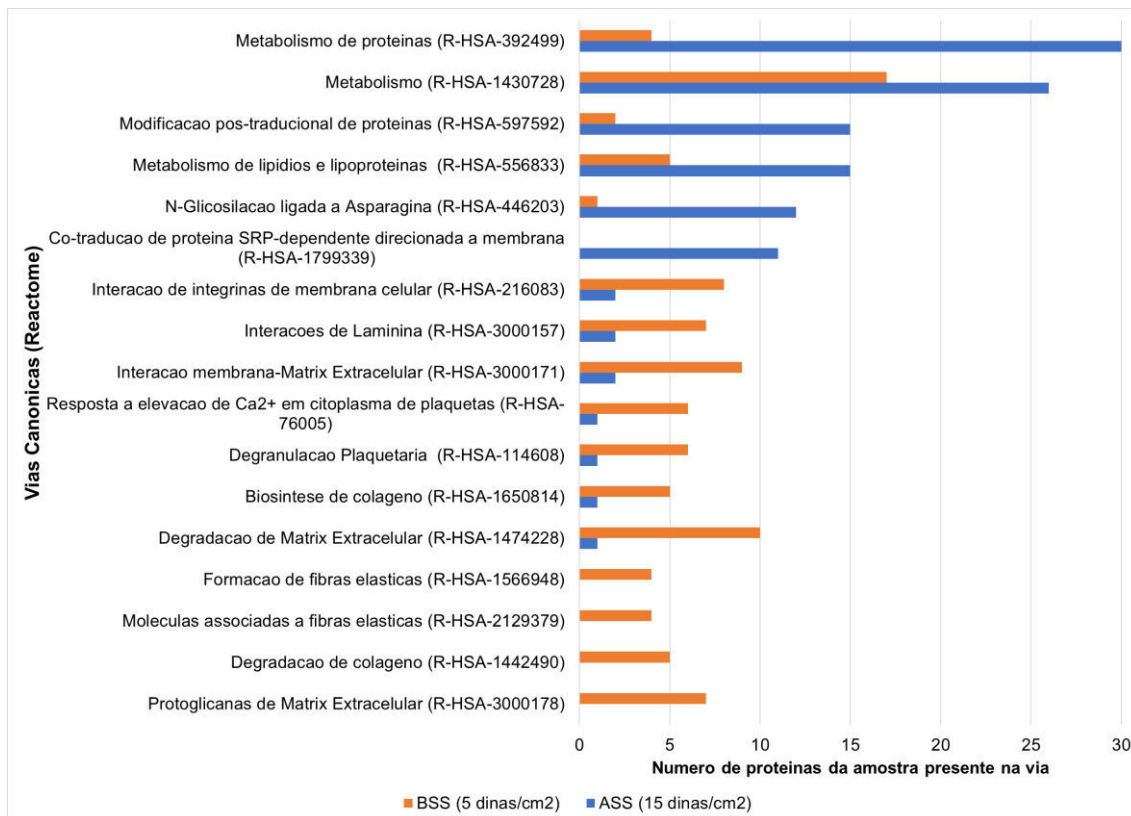


Figura 11: Principais vias canônicas enriquecidas pelas proteínas aumentadas em ASS (azul) e em BSS (laranja). As proteínas que estão em maior concentração em ASS estão relacionadas a metabolismo celular, especificamente metabolismo de lipídios; e metabolismo de proteínas, especificamente em metabolismo de modificação pós-traducional. As proteínas presentes em maiores concentrações em HUVECs submetidas a BSS foram relacionadas a interação com a matriz extracelular e ativação de coagulação em plaquetas. As vias foram significativamente enriquecidas segundo teste Exato de Fisher com correção para múltiplos testes FDR com valor de p menor que 0,05.

Foram identificadas 16 proteínas aumentadas em ASS e participantes do metabolismo de lipídios e lipoproteínas. Sendo elas: o receptor de LDL (LDLR), lisofosfolípido aciltransferase 7 (MBOA7), hidrolase de éster de colesterol (NCEH1), proteína de alongamento de cadeia muito longa de ácidos graxos (ELOV1), caveolina (CAV1), membro 3 da família de aldoceto redutase (AK1C3), Acetil-CoA acetil transferase (ACAT1), lisofasfatidilcolina acil-transferase (PCAT2), sinaptotagmina extendida (ESYT1), mediador de transcrição de RNA polimerase II (MED4), membro 4 da família de aldoceto

redutase (AK1C4), membro 2 da família de aldoceto redutase (AK1C2), cadeia longa 3-oxoacil-CoA redutase (DHB12), proteína A associada a vesículas associadas a membrana (VAPA), 7-dehidrocolesterol redutase (DHCR7) e Membro 3 da subfamília D do cassete de ligação a ATP (ABCD3).

Dentre as proteínas participantes das vias modificação pós-traducional estavam: calnexina (CANX), glicoproteína CD59 (CD59), proteína doliquil-difosfato-oligossacarídeo glicosiltransferase subunidade 48kDa (DDOST), doliquil-difosfato-oligossacarídeo glicosiltransferase subunidade 1 (RPN1), doliquil-difosfato-oligossacarídeo glicosiltransferase subunidade 2 (RPN2), proteína de utilização em defeitos manose-P-dolicol (MPDU1), manosil oligossacarídeo glucosidase (MOGS), proteína ERGIC-53 (LMNA1), proteína relacionada a Ras (RAB1A), proteína transmembrana 10 contendo domínio emp24 (TMED10), proteína transmembrana 9 contendo domínio emp24 (TMED9) e proteína vesicular integral de membrana 36 (VIP36).

Dentre as proteínas aumentadas em células sob BSS participantes da via de ativação de plaquetas estavam fibronectina (FN1), multimerina 1 (MMRN1), PAI1, trombospondina 1 (THBS1), antígeno D2 associado a melanoma (MAGED2) e clusterina (CLU). Dentre as moléculas de adesão e participantes de vias de integração com matriz estavam: ICAM1, laminina A4 (LAMA4), nidogene 1 (NID1), HSPG2, colágeno 18A1 (COL18A1), subunidade beta 1 da laminina (LAMB1), subunidade gama 1 da laminina (LAMC1), colágeno 4A2 (COL4A2), colágeno 8A1 (COL8A1), colágeno 8A1 (COL18A1), colágeno 4A2 (COL5A1), fibronectina (FN1), trombospondina 1 (THBS1) e netrina 4 (NTN4). E dentre as proteínas participantes da formação e degradação de fibras elásticas estão: proteína de matriz extracelular fibulina-like contendo domínio EGF (EFEMP1), emilina 1 (EMILIN1) e proteína 2 ligante a LTGF beta (LTBP2).

4.2. – Análise metabolômica de CE submetidas a alto e baixo *shear stress*

Após o processamento dos espectros adquiridos pelo GC-MS, foram identificados 1369 metabólitos. Após retirada dos contaminantes provenientes de vazamento de coluna e do processo de derivação; e dos metabólitos que estavam presentes em menos duas replicatas de algum grupo amostral, restaram 113 metabólitos que foram submetidos a análise estatística.

HUVECs submetidas a ASS e BSS apresentaram perfis metabólicos diferentes, como pode ser visualizado pela análise de componentes principais (Figura 12).

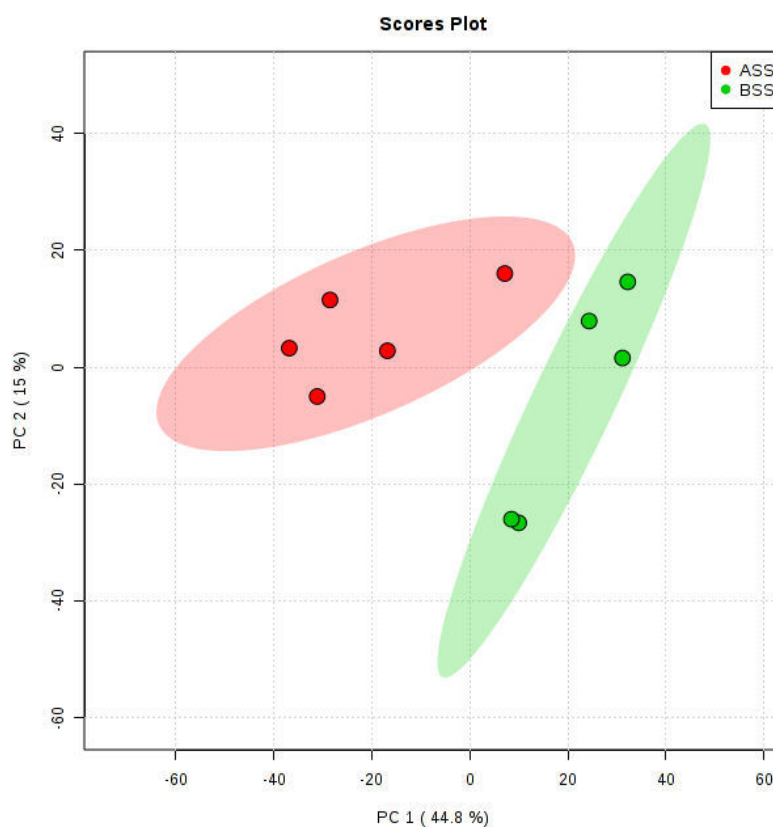


Figura 12: Análise de componentes principais de células submetidas a ASS (vermelho) e BSS (verde) utilizando todos os metabólitos. PC1 e PC2: componente principal 1 e componente principal 2. Cada ponto representa o perfil metabólico de uma replicata biológica e as elipses, o intervalo de confiança de 95%.

Cinquenta e oito metabólitos (Figura 13) apresentaram valor de p inferior a 0,05 no teste t , estando sete metabólitos aumentados em células submetidas a BSS e o restante aumentados em células submetidas a ASS. Os metabólitos diferentes entre os grupos foram principalmente lipídios ou metabólitos de lipídios, e aminoácidos e metabólitos de aminoácidos (Tabela 1). Os dados de metabolômica corroboraram os dados de proteômica, mostrando que HUVECs submetidas a ASS e BSS apresentam diferenças em seus metabolismos, sendo os lipídios uma das principais classes de metabólitos alterados, juntamente com os aminoácidos e açúcares.

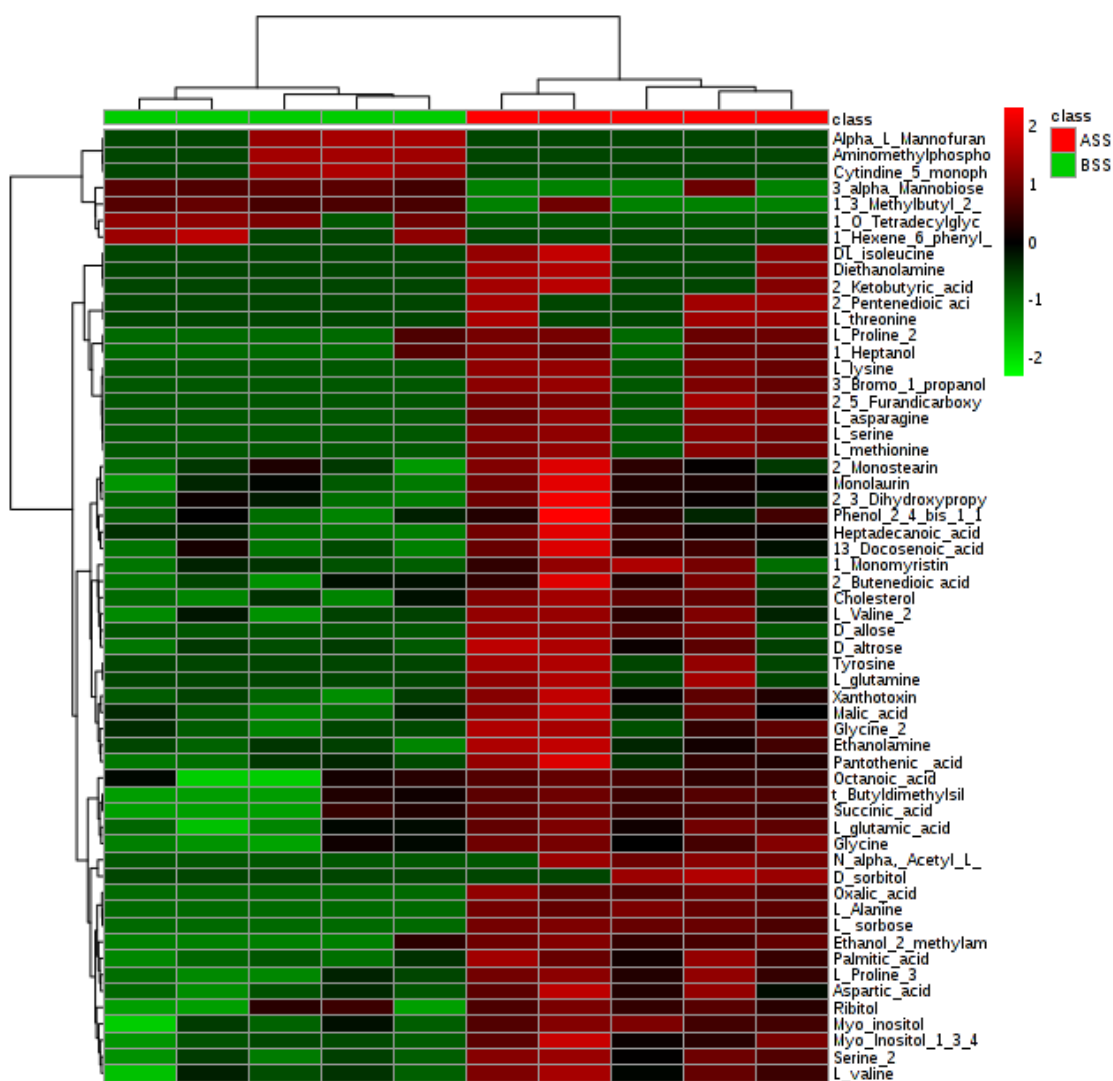


Figura 13 Heatmap dos 58 metabólitos estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) entre as HUVECs submetidas a ASS (vermelho) e BSS (verde). Para construção do heatmap foram utilizados os valores de \log_2 da intensidade de cada metabólito.

Tabela 1: Lista de metabólitos estatisticamente diferentes entre HUVECs submetidas a ASS e BSS e suas funções de acordo com análise no KEEG. Os metabólitos grifados e em itálico foram identificados em maior quantidade em BSS em relação a ASS.

Metabólitos	Valor de p (teste t)	log2 ASS/BSS	Função
L-sorbose	<0,001	9,0	Açúcar
D-alose	0,005	9,4	Açúcar
<i>Manobiose</i>	<i>0,009</i>	<i>-1,5</i>	<i>Açúcar</i>
D-altrose	0,012	3,4	Açúcar
<i>Alfa-manofuranose</i>	<i>0,040</i>	<i>-8,2</i>	<i>Açúcar</i>
Ribitol	0,022	2,6	Metabolismo de Açúcar
D-sorbitol	0,040	8,2	Metabolismo de Açúcar
L-alanina	<0,001	8,6	Aminoácidos
L-prolina 2	0,042	3,5	Aminoácidos
L-prolina 3	<0,001	1,2	Aminoácidos
L-serina	0,004	11,9	Aminoácidos
L-serina 2	<0,001	2,3	Aminoácidos
Ácido aspártico	0,002	1,5	Aminoácidos
L-asparagina	0,004	7,8	Aminoácidos
L-valina	0,002	1,5	Aminoácidos
L-valina 2	0,004	1,0	Aminoácidos
L- ácido glutâmico	0,002	1,9	Aminoácidos
L- glutamina	0,041	12,2	Aminoácidos
L-metionina	0,004	7,9	Aminoácidos
L-lisina	0,004	8,8	Aminoácidos
Glicina	0,004	2,1	Aminoácidos
Glicina 2	0,010	1,4	Aminoácidos
L-treonina	0,040	9,0	Aminoácidos
DL-isoleucina	0,042	8,1	Aminoácidos
Tirosina	0,040	7,0	Aminoácidos
N-alfa-acetil-L-lisina	0,004	8,9	Metabolismo de Aminoácidos
2-ácido ketobutírico	0,042	9,8	Metabolismo de Aminoácidos
Ácido palmítico	<0,001	1,2	Lipídio
Colesterol	0,004	1,1	Lipídio
13-ácido docosenóico	0,009	0,9	Lipídio
Ácido octanóico	0,033	2,8	Lipídio
2-metil-2-ácido-pentenedióico	0,040	6,7	Lipídio
Ácido heptadecanóico	0,005	0,9	Lipídio
1-heptanol	0,048	2,8	Lipídio
Mio-inositol	0,001	2,1	Metabolismo de Fosfolipídio
Mio-inositol-1,3,4,5,6P	0,001	1,6	Metabolismo de Fosfolipídio
<i>Citidina-5-monofosfato</i>	<i>0,040</i>	<i>-6,3</i>	<i>Pirimidina</i>
Ácido oxálico	<0,001	11,5	Ácidos Carboxílicos
Ácido succínico	0,015	2,7	Ácidos Carboxílicos/ TCA
Ácido málico	0,011	1,4	Ácidos Orgânicos/ TCA
Ácido fumárico	0,030	0,7	Ácidos Carboxílicos/ TCA
Ácido pantotênico	0,013	1,1	Ácidos Carboxílicos/ TCA
<i>Ácido aminometilfosfonico</i>	<i>0,040</i>	<i>-7,5</i>	<i>Ácidos Orgânicos</i>
2,5-Ácido furandicarboxílico	0,004	5,8	Furanos
Etanolamina	0,007	0,9	Amina
Dietanolamina	0,041	7,3	Amina

<u>1,3-Metilbutil-2, 3, 4, 6-tetrametilbenzeno</u>	<u>0,010</u>	<u>-1,1</u>
Monolaurina	0,011	1,0
1-monomiristina	0,021	1,1
2-monostearina	0,045	0,9
Phenol-2, 4,bis, 1, 1, dimetillethil-fosfito	0,031	0,6
2,3-dihidroxiopropil icosanoato	0,037	0,7
<u>1-hexeno-6 -fenil- 4-1-fenilettox</u>	<u>0,041</u>	<u>-5,6</u>
Etanol-2-metilamino -N-trifluoroacetil	0,001	4,6
Xantotoxina	0,001	1,6
<u>1-O-tetradecilglicerol</u>	<u>0,004</u>	<u>-5,8</u>
3-bromo-1-propanol	0,004	6,9
t-butildimetilsilil-3-metil-3-4 metil-pent-3-enil-oxiran-2-il-metanona	0,005	3,6

Foram identificados três metabólitos intermediários do ciclo do ácido cítrico e um precursor do Acetil-CoA diminuídos em HUVECs submetidas a BSS.

Foi construída uma rede entre as proteínas e os metabólitos aumentados em ASS para identificar potenciais *hubs* e conexões. Por esta análise foi possível identificar que o colesterol e o LDLR eram moléculas *hubs* por apresentarem maior número de conexões e ainda se conectarem (Figura 14).

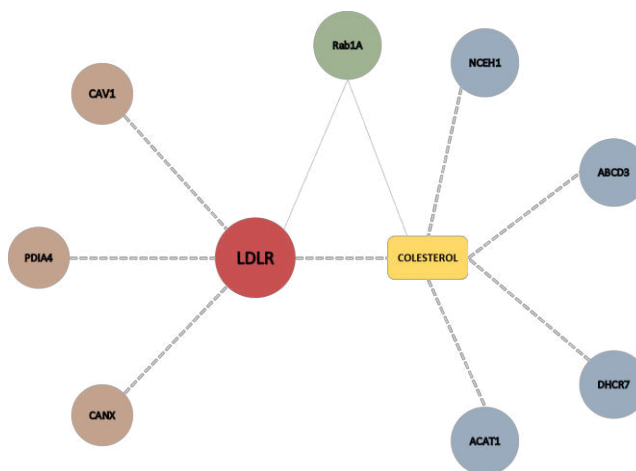


Figura 14: Análise de rede entre as proteínas e metabólitos aumentados em HUVECs submetidas a ASS em relação a BSS. O LDLR e o colesterol foram as duas moléculas com maior número de interações.

4.3. – Caracterização do LDLR em HUVECs submetidas a alto e baixo SS

Como descrito no item anterior, as análises proteômica e metabolômica sugeriram que o de metabolismo de lipídios era um dos principais representantes das alterações que ocorrem em HUVECS submetidas a BSS em relação a ASS, em especial o LDLR e a via de metabolismo de colesterol.

Verificou-se por *western blot* que, quando as HUVECs foram submetidas a BSS, parte do receptor se encontrava na forma não glicosilada ou imatura (de aproximadamente 120kDa), enquanto em ASS foi encontrado apenas a banda correspondente à forma glicosilada ou madura do receptor (de aproximadamente 160 kDa) (Figura 15A). Após fracionamento celular, verificamos que havia menor quantidade de LDLR na membrana de células endoteliais submetidas a BSS em comparação às células submetidas a ASS (Figura 15B).

Foi identificado também que os níveis da proteína SREBP1, fator de transcrição para LDLR, estavam diminuídos em células submetidas a BSS em comparação àquelas submetidas a ASS (Figura 15C).

Para verificar se a diferença de tamanho na banda do receptor nas células submetidas a ASS e BSS visualizado por *western blot* era realmente devido à diferença de glicosilação (apesar das especificações do anticorpo descreverem a reação com a forma imatura do receptor gerando uma banda em aproximadamente 120kDa), os extratos proteicos foram tratados com PNGase F para clivagem da N-glicosilações. Após a retirada das N-glicosilações, foi observado uma redução no peso molecular do LDLR, mas não o suficiente para que se observasse a banda correspondente à forma imatura do receptor. Outras enzimas devem ser utilizadas para retirada de O-glicosilações, a fim de confirmar se a diferença de tamanho se deve à

modificação pós-traducional do LDLR em diferentes intensidades de SS (Figura 16).

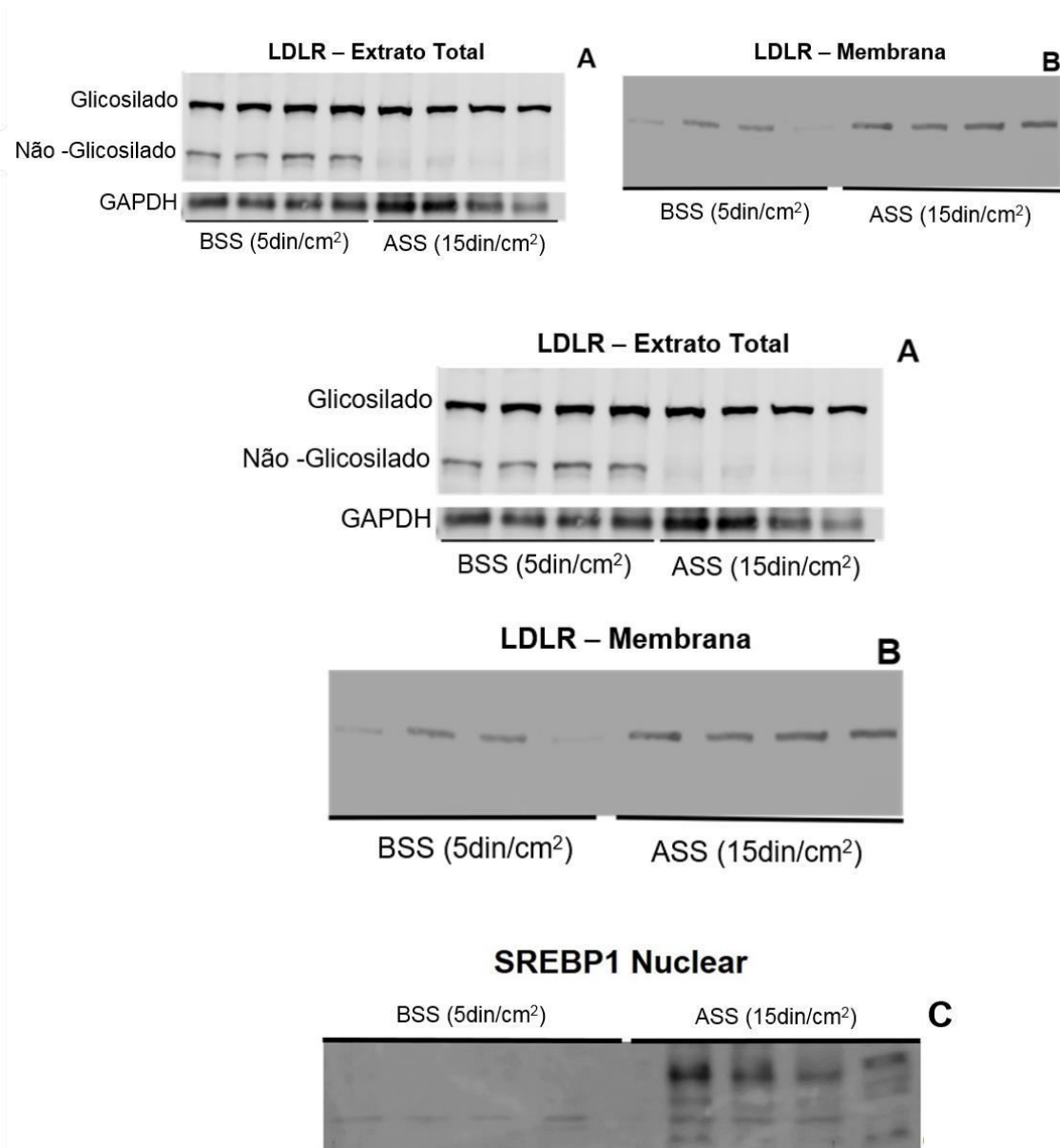


Figura 15: Diferenças na modulação do receptor de LDL (LDLR) em HUVECs submetidas a ASS (15 dinas/cm²) e BSS (5 dinas/cm²). A) Quando submetidas a BSS, as HUVECs apresentam parte dos receptores na forma glicosilada (madura) e parte na forma não glicosilada (imatura), enquanto que em HUVECS submetidas a ASS, o receptor encontrava-se totalmente na forma glicosilada. B) Após enriquecimento das proteínas de membrana HUVECs pós SS, foi identificada uma menor quantidade de LDLR na superfície de membrana de células submetidas a BSS em comparação com ASS. C) Foi observado ainda diminuição da quantidade de fator de transcrição de LDLR (SRBP1) nuclear em HUVECS sob BSS em relação a ASS.

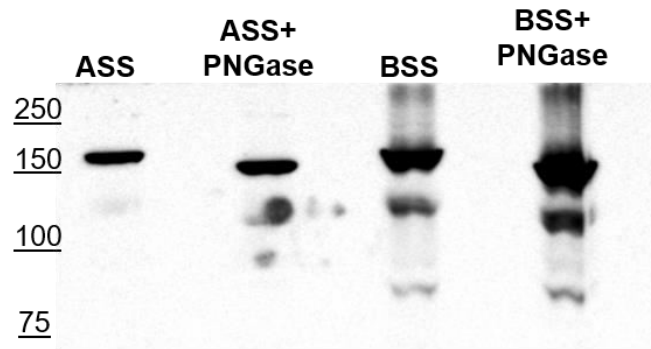


Figura 16: Extratos proteicos de HUVECS submetidas a ASS e BSS tratados com PNGase F para remoção das N-glicosilações. Foi observado uma leve redução de tamanho na banda do receptor maduro (160kDa) mas não alcançou o mesmo tamanho da banda do receptor imaturo

Além da diferença na maturação do receptor (forma glicosilada e não glicosilada) e da quantidade de receptor na membrana, foi observado também que em HUVECs submetidas a BSS os LDLRs estavam localizados no citoplasma e em região perinuclear, enquanto que em células submetidas a ASS o receptor estava localizado de maneira homogênea na membrana (Figura 17).

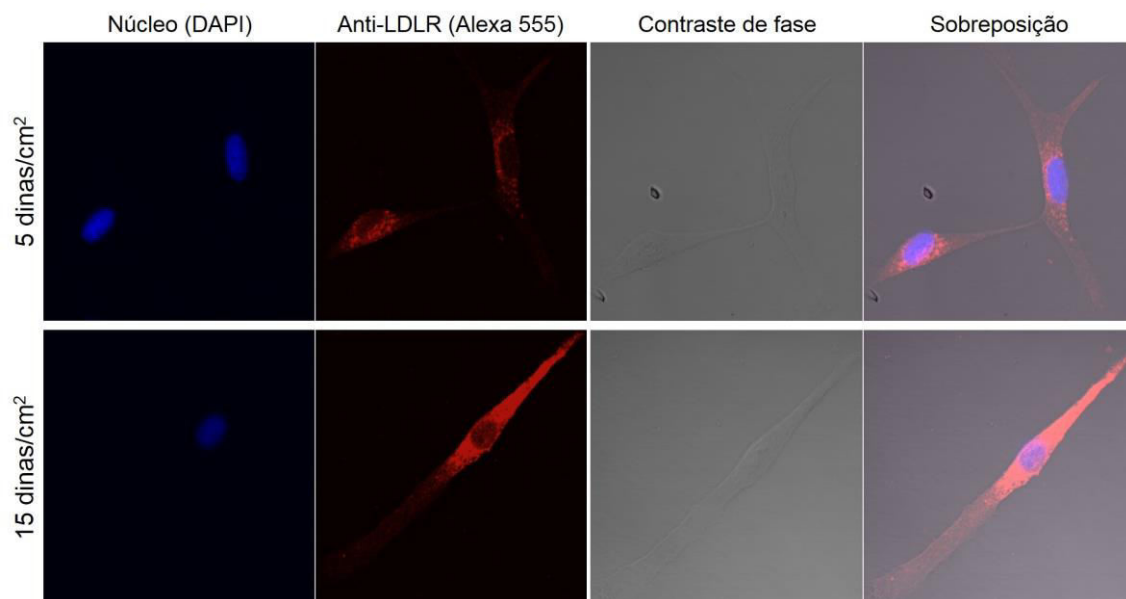


Figura 17: Localização diferencial do LDLR nas HUVECs quando submetidas a BSS (5 dinas/cm²) e ASS (15 dinas/cm²). Foi observado que em ASS (painel inferior) o LDR está distribuído na membrana, concentrado principalmente no sentido do fluxo, enquanto que em BSS (painel superior) o receptor está localizado na região perinuclear. Foi utilizado DAPI para marcar o núcleo em azul, Anti-LDLR em vermelho (anticorpo secundário marcado com alexa 555). Imagens Confocal. Magnificação de 400x.

Para identificar a localização subcelular do LDLR em células endoteliais *in vivo*, foi realizado o ensaio de imunofluorescência *En Face* utilizando arco aórtico de camundongo (região conhecida por apresentar SS baixo e/ou turbulento *in vivo*) e aorta abdominal (região que apresenta SS alto laminar). Nesse ensaio foi verificado que, assim como em HUVECs submetidas a BSS *in vitro*, células endoteliais na região do arco aórtico apresentavam o LDLR marcado em região perinuclear (Figura 18A) enquanto que em células endoteliais da aorta abdominal descendente o receptor encontrava-se distribuído pela membrana (Figura 18B).

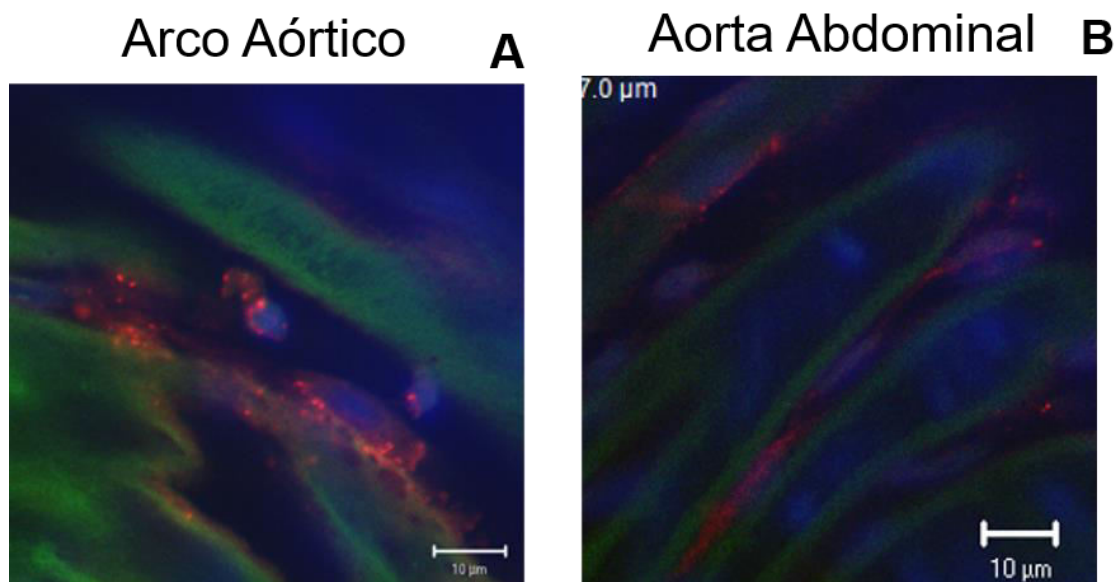


Figura 18: Localização diferencial do LDLR em células endoteliais de artéria aorta de camundongo pela técnica *En Face*. Foi observado que em células endoteliais de Arco Aórtico (A) o LDR estava distribuído na região perinuclear como pequenos pontos concentrados, enquanto que na região de aorta abdominal (B) o receptor estava localizado de forma mais homogênea na membrana. Foi utilizado DAPI para marcar o núcleo em azul, anti-LDLR está em vermelho (anticorpo secundário marcado com alexa 555) e a lâmina elástica está representada em verde identificada por autofluorescência. Imagens Confocal. Magnificação de 400x.

4.3.1. Aumento da expressão do LDLR através de tratamento com atorvastatina

Para melhor entendimento da importância do LDLR no fenótipo ateroprotetor de CE sob ASS, foi realizada a modulação do receptor através do tratamento farmacológico com atorvastatina. As células endoteliais foram tratadas com atorvastatina durante 24, 48 e 72 horas. Após 72 horas foi observado o aumento do receptor na membrana, podendo ser utilizada para os estudos de modulação do receptor (Figura 19). A célula de fígado HepG2 foi utilizada como controle positivo.

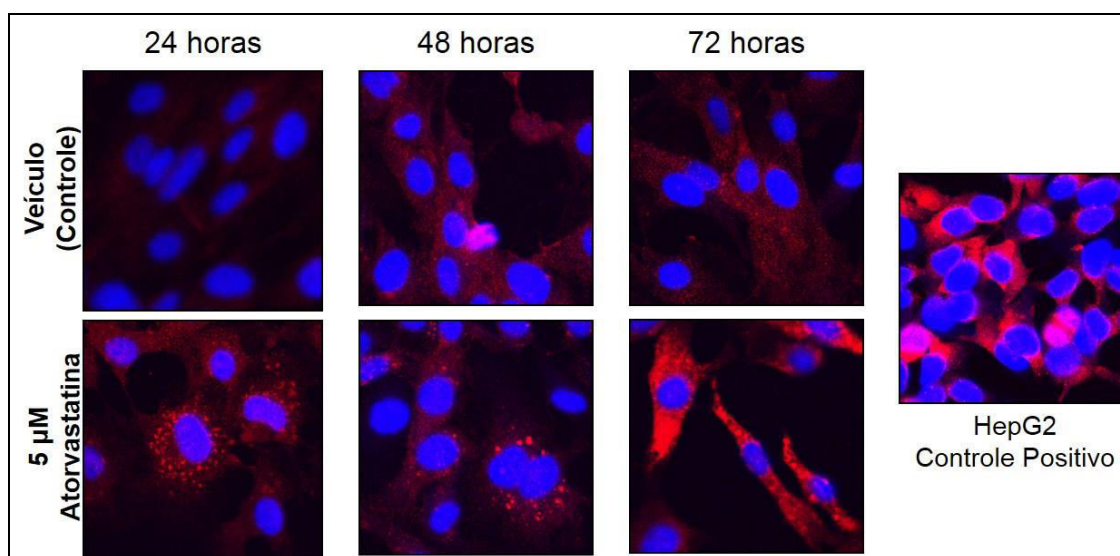


Figura 19: Aumento da expressão de LDLR em células endoteliais após 72 horas de tratamento com atorvastatina. HUVECs tratadas com veículo (DMSO) na parte superior e com 5µM de atorvastatina na parte inferior por 24, 48 e 72 horas. Núcleos celulares corados com DAPI em azul e LDLR corado em vermelho (anticorpo secundário alexa 555). Observa-se o aumento do LDLR na membrana após 72 horas de tratamento. A célula HepG2 foi utilizada como controle positivo do tratamento. Magnificação de 400x.

Após os tratamentos com atorvastatina, L-name ou veículo, as células foram submetidas a ASS e BSS e tiveram seus metabólitos extraídos e analisados por GC-MS.

Ao todo foram identificados 1369 metabólitos e, após filtragens e limpezas de acordo com as replicatas técnicas e biológicas, 159 metabólitos foram submetidos à análise estatística. De acordo com a PCA, o perfil metabólico das células submetidas a BSS e tratadas com estatina se aproximou do perfil metabólico das células submetidas a ASS (Figura 20) sugerindo que parte do

fenótipo metabólico se aproximou do perfil ateroprotetor após aumento de LDLR. O mesmo resultado foi observado na análise de *cluster* representada pelo *Heatmap* (Figura 21).

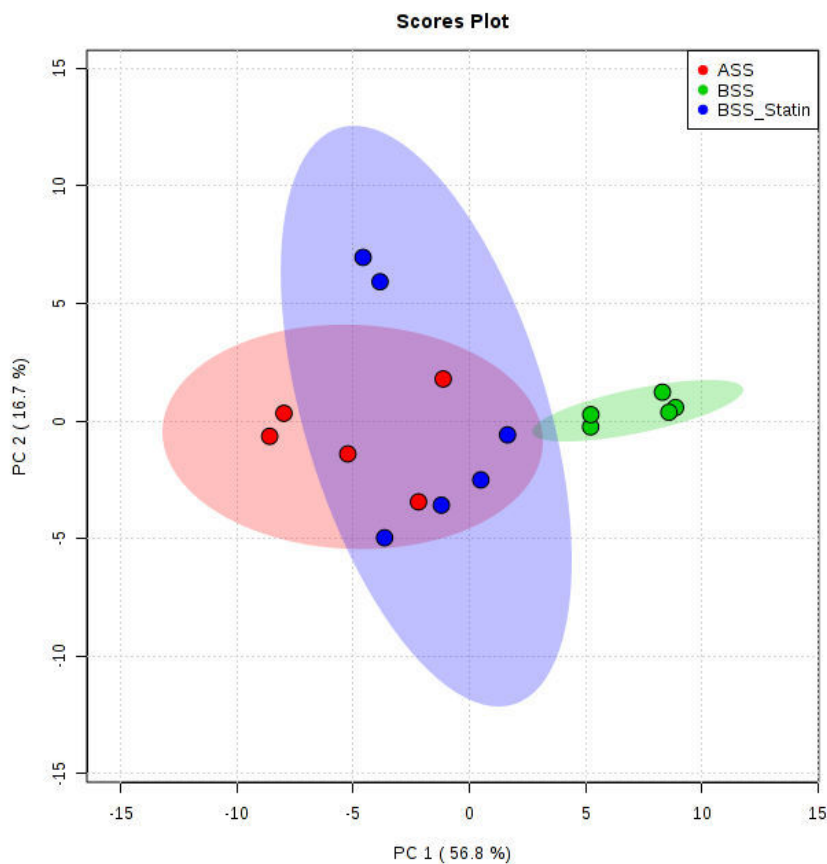


Figura 20: Análise de componentes principais (PCA). *Score plot* entre as componentes selecionadas (Componente 1 e 2). É possível identificar que células tratadas com estatina (BSS_Statin) apresentam um perfil mais próximo de HUVECs submetidas a ASS (vermelho) que células submetidas a BSS sem tratamento com estatina (verde). PC1 e PC2: componente principal 1 e componente principal 2. Cada ponto representa o perfil metabólico de uma replicata biológica e as elipses, o intervalo de confiança de 95%.

Dezessete (17) metabólitos apresentaram diferença entre ASS e BSS, mas deixaram de apresentar essa diferença após o tratamento, aproximando seus valores aos de uma célula submetida a ASS. Os metabólitos que tiveram seus valores recuperados com o tratamento com atorvastatina foram os aminoácidos asparagina, glutamato, glicina e serina; os lipídios ácido palmítico, ácido octanóico e ácido pentanedióico, os ácidos carboxílicos ácido succínico, ácido oxálico; os açúcares sorbose, alose, altrose e alfa-manobiose; e os

demais metabólitos mio-inositol, 2,5-ácido furandicarboxílico, xantotoxina e 4-bromo-1-butanol (Figura 21).

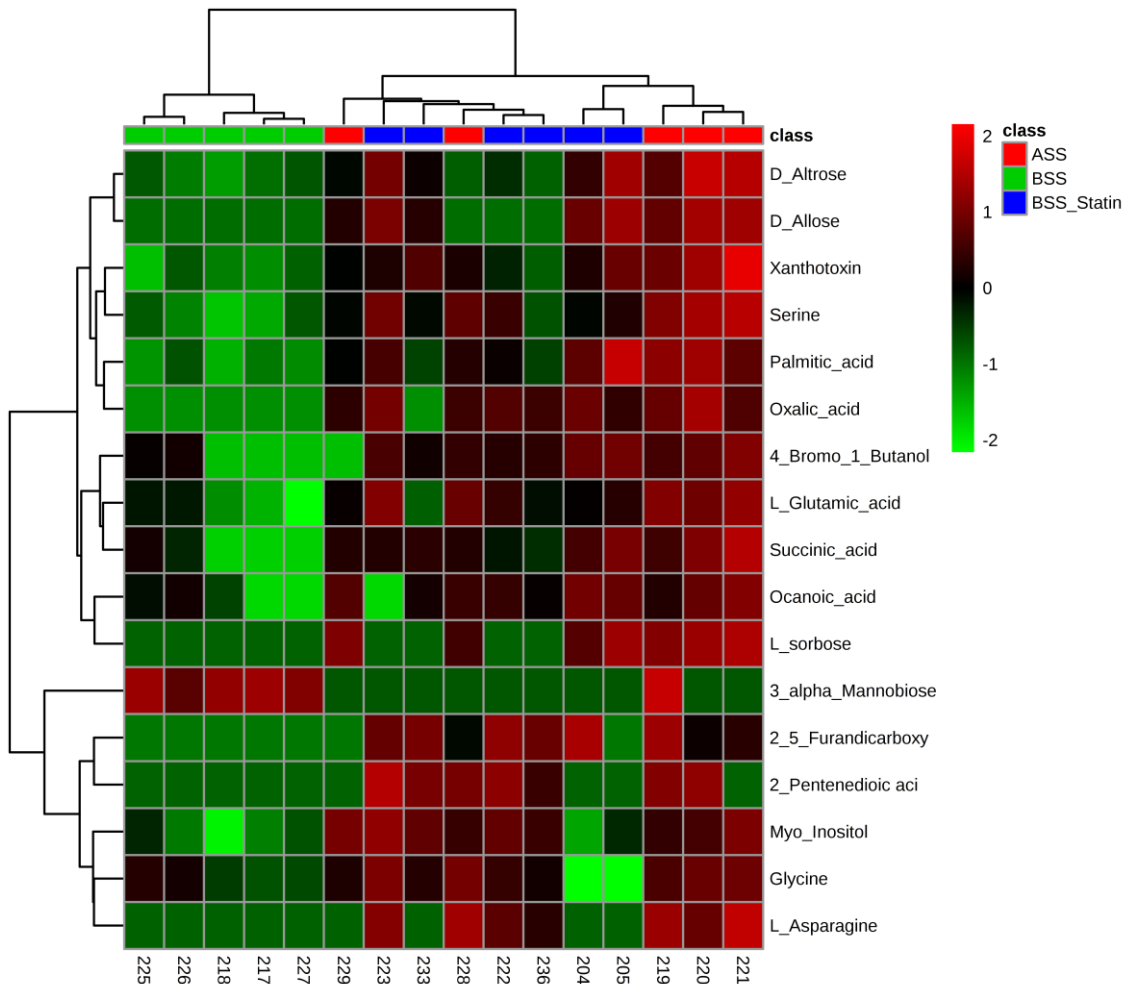


Figura 21: *Heatmap* dos 17 metabólitos estatisticamente diferentes entre ASS e BSS, mas que deixaram de apresentar diferença após tratamento com estatina. Para construção do *heatmap* foram utilizados os valores de \log_2 da intensidade de cada metabólito.

Como é descrito na literatura que CE tratadas com estatina aumentam não apenas a expressão de LDLR, mas também a secreção de NO, as células também foram tratadas com L-name para separar o efeito de recuperação do fenótipo devido ao LDLR e não ao aumento de NO. Foi possível identificar que dos 17 metabólitos que recuperaram os valores de ASS em BSS após tratamento com atorvastatina, quatro metabólitos tiveram essa recuperação

dependente de NO, pois quando tratados com estatina mais L-name, retornaram seus valores ao de células submetidas a BSS sem tratamento com atorvastatina (Figura 22). Sendo eles: mio-inositol, glutamato, glicina, e 2,5-ácido furandicarboxílico.

Apesar do aumento do LDLR com o tratamento com atorvastatina, os valores de colesterol de células submetidas a BSS não retornaram para o nível das células submetidas ASS. Dois metabólitos, o-fosfocolamina e beta-alanina, só estavam presentes em células tratadas com atorvastatina, não se relacionando, portanto, ao SS.

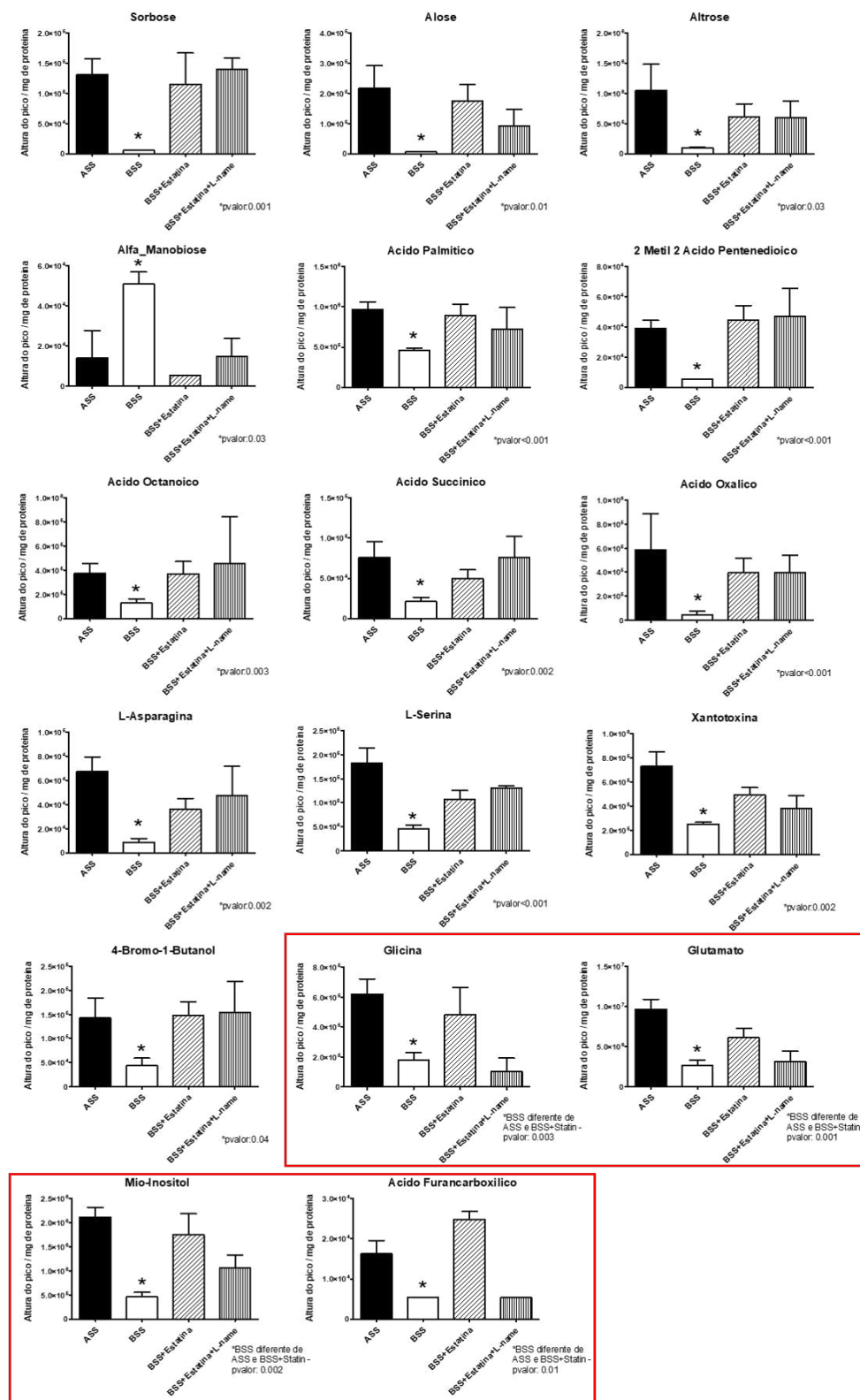


Figura 22: Metabólitos diferentes em HUVECS sob BSS em comparação com ASS e que deixaram de apresentar diferença após tratamento com estatina. Os quatro últimos metabólitos (quadrado vermelho) tiveram sua recuperação dependente de NO, pois após tratamento com L-Name juntamente com estatina, os valores voltaram aos de células submetidas a BSS. ANOVA com Bonferroni como pós teste.

4.4. – Análise do glicoproteoma de HUVECs submetidas a BSS e ASS

Além de diferenças no metabolismo de lipídios identificado por proteômica e metabolômica de HUVECs submetidas a ASS comparado a BSS, o metabolismo de proteínas foi outra via alterada em células sob BSS, especificamente modificações pós traducionais e N-glicosilações.

Para verificar a diferença de proteínas glicosiladas em HUVECs sob ASS e BSS, foi realizado o glicoproteoma dessas células. Após corrida das amostras e processamento dos espectros, foram identificadas 355 proteínas. Após retirada de contaminantes, proteínas identificadas apenas por um sítio e proteínas identificadas por biblioteca reversa, 337 proteínas foram submetidas a análise estatística.

Foram identificadas 59 glicoproteínas com razão estatisticamente diferente entre ASS e BSS, sendo 30 aumentadas em ASS e 29 aumentadas em BSS (anexo C e D). Das 59 glicoproteínas estatisticamente diferentes, apenas 4 estavam diferentes também no proteoma total, sugerindo que a diferença encontrada no resultado é devido a glicosilação diferencial e não à diferença de expressão dessas proteínas (Figura 23).

As proteínas glicosiladas aumentadas em ASS em relação a BSS estavam relacionadas a processos de adesão e junção celular (p valor: 0,00022) e chaperonas envolvidas no enovelamento de proteínas (p valor: $6,28 \times 10^{-7}$), estando mais relacionadas a função estrutural. Já as proteínas glicosiladas aumentadas em BSS em relação a ASS estavam relacionadas a sinalização celular, como sinalização de TGF β (p valor $1,64 \times 10^{-4}$), sinalização de Rho kinase (p valor $1,54 \times 10^{-6}$), via do mTOR (p valor: $5,8 \times 10^{-4}$) e via de Hippo- YAP (p valor: 0,021).

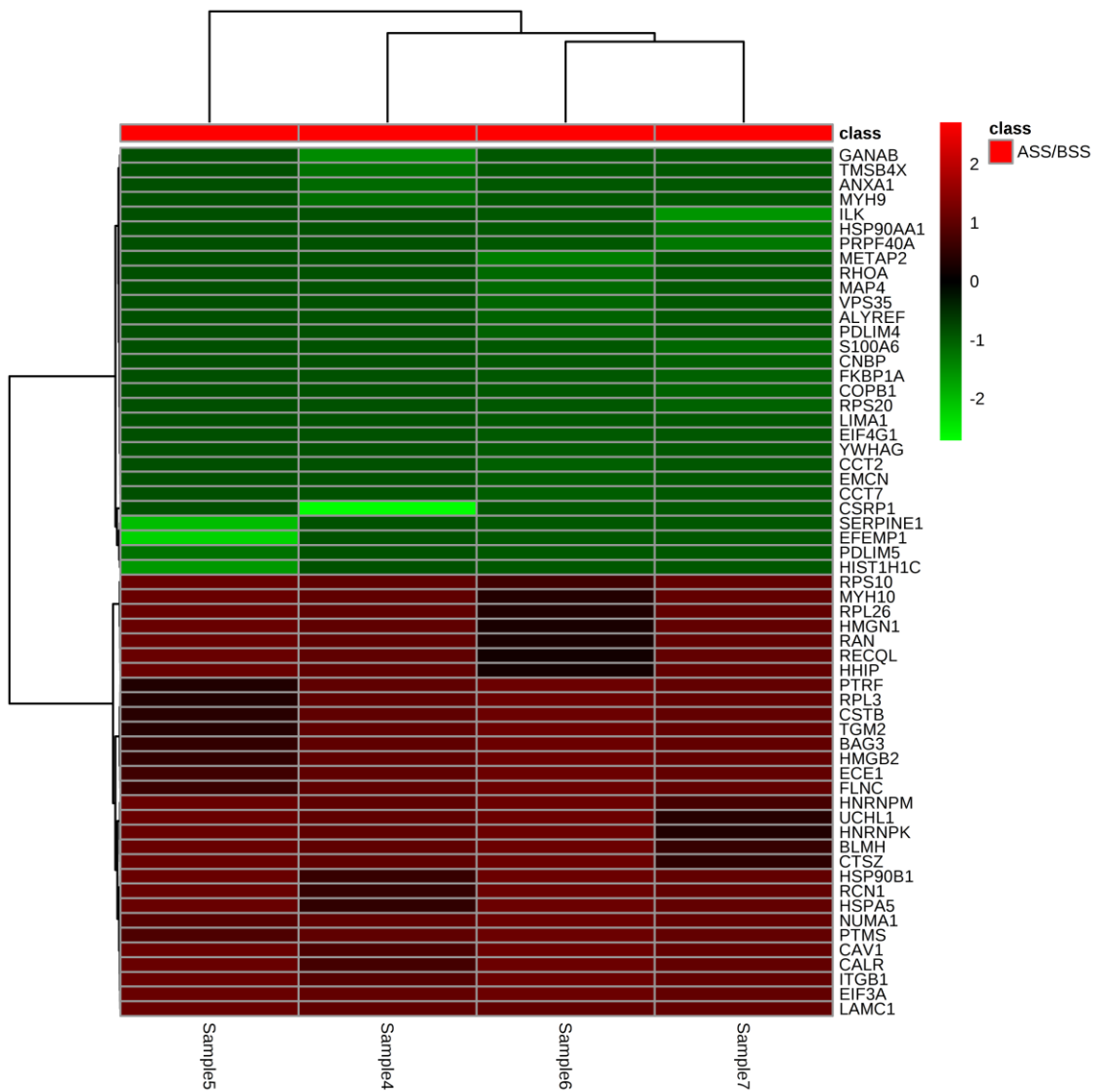


Figura 23: *Heatmap* das 59 proteínas diferencialmente glicosiladas em ASS (vermelho) e BSS (verde). Para construção do *heatmap* foram plotados os log₂ das razões das intensidades de proteínas identificadas em ASS/BSS.

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho utilizou a integração de dados proteômicos e metabolômicos de CE submetidas a BSS e ASS com objetivo de identificar os mecanismos moleculares que caracterizam perfil ateroprotetor e pró-aterogênico adotado por células endoteliais quando submetidas respectivamente a alto e baixo *shear stress*.

A análise proteômica identificou aumento de moléculas de adesão, proteínas participantes de vias de interação com matriz, formação de fibras elásticas e fatores pró-coagulantes em HUVECs sob BSS, corroborando estudos prévios da literatura (32,60,62,70,119). Além das vias já descritas, a análise de vias utilizando as proteínas diferencialmente expressas entre as duas condições (BSS e ASS) mostrou que o metabolismo de lipídios era uma das principais vias enriquecidas em ASS, assim como a via de modificações pós-traducionais de proteínas - N-glicosilações. Interessantemente, as vias de metabolismo de lipídio também foram observadas na análise de metabolômica, que mostrou que os lipídios estavam diminuídos em células sob BSS, juntamente com aminoácidos e açúcares. No total, foi identificado o aumento de dezesseis proteínas e nove metabólitos participantes do metabolismo de lipídio em HUVECs sob ASS em relação a BSS.

Muito é descrito na literatura sobre o metabolismo de lipídios e risco cardiovascular, porém a maioria dos estudos trata do consumo de lipídios e poucos avaliaram a constituição lipídica celular e como o perfil lipídico dessa membrana poderia estar relacionado aos efeitos protetores ou pró-aterogênicos encontrados em CE em diferentes regiões da árvore arterial.

Ao integrar os metabólitos e proteínas através de análise de redes, foi identificado que o receptor de LDL (LDLR) era a proteína relacionada ao metabolismo de lipídios com maior número de interações diretas com as outras

proteínas de expressão diferencial em células submetidas a ASS. Além disso, esse receptor apresentou interação direta com o colesterol, um metabólito que também estava aumentado em células sob ASS comparado a BSS e que expandia a rede com outras 5 proteínas, também aumentadas em ASS. Dado o papel central de LDLR na análise de redes, novos experimentos foram realizados buscando validar o papel deste receptor no SS.

No processo de validação, os dados mostraram que o LDLR foi identificado parcialmente na forma não glicosilada (ou imatura) em células sob BSS, enquanto em HUVECs sob ASS foi identificado o receptor apenas na forma madura ou glicosilada. O receptor também apresentou menor expressão na membrana de células, com distribuição ao redor do núcleo em BSS, ao passo que em células que foram submetidas a ASS, a maioria do receptor estava distribuído de forma homogênea na membrana.

A presença do receptor de LDL oxidado (LOX-1) é associada por vários autores com o início do desenvolvimento de placas ateroscleróticas (120–128). No final da década de 90, foram publicados os achados de modulação do LOX-1 em CE associado ao tratamento com angiotensina II(126), TNF- α (125) e a intensidades de SS (129). Porém, pouquíssimos estudos foram realizados relacionando o receptor de LDL total (LDLR) em CE e as diferentes intensidades de fluxo. Em 1983, Goldstein e colaboradores (121) sugeriram que o aumento de receptor de LDL em áreas de bifurcação poderia estar associado ao desenvolvimento de placas. Já Sprague e colaboradores (123) demonstraram em 1987 que quando células endoteliais bovinas (BAECs) eram submetidas a ASS era obtido maior taxa de incorporação de LDL, enquanto que em BSS essa taxa estava diminuída. Mesmo em privação de soro - situação em que as células aumentavam a expressão do LDLR, se mantinha uma maior incorporação de LDL total em ASS, sugerindo assim que o receptor era modulado pelo SS. Também no final da década de 90, os fatores de transcrição SREBP foram associados ao aumento de expressão do LDLR e, por sua vez, ao metabolismo de colesterol (128). Porém, após esses achados, a literatura não avançou na associação entre o LDLR e intensidades de SS. Apenas em 2002, Liu e colaboradores (130) identificaram que a SREBP1

estava aumentada e intermitente em células submetidas a ASS em relação à condição estática, e que quando as células eram submetidas a fluxo turbulento, essa expressão era contínua. Este trabalho demonstrou ainda que a ativação de SREBP1 pelo SS era realizada através de beta-1 integrina.

O LDLR é um receptor transmembrana de passagem única presente na superfície celular de todos os tipos celulares. Sua principal função está envolvida com o metabolismo do LDL. Após se ligar ao LDL ambos, receptor e LDL são englobados por lisossomos onde o receptor será degradado e o colesterol será liberado. A internalização do LDLR e liberação do LDL reprimem a enzima HMG-CoA redutase (3-hidroxi-1-metilglutaril-coenzima A) reprimindo, assim, a biossíntese do colesterol. Além de sua principal função de se ligar a Apolipoproteína B-100 presente na molécula de LDL, esse receptor está também envolvido nos processos de entrada de vírus e parasitas durante infecções(131–134).

O receptor de LDL apresenta várias modificações pós-traducionais, incluindo uma fosforilação e vários sítios de N e O glicosilações (96,135,136). O LDLR é sintetizado em sua forma precursora, se tornando maduro após a adição de duas N-glicosilações e 18 O-glicosilações (137). Dados da literatura mostraram que a completa glicosilação é essencial para a expressão do receptor na superfície celular e estabilidade do receptor, impedindo degradações (135,138). Defeitos no processo de glicosilação do LDLR resultam em um aumento na degradação de 5 a 10 vezes em relação ao receptor completamente glicosilado. Em LDLR não glicosilados, a reversão das N-glicosilações não recupera a estabilidade e função do receptor, enquanto a recuperação das O-glicosilações resulta em uma molécula mais estável, com atividade normal sugerindo que as O-glicosilações são as modificações chaves para bom funcionamento do receptor (136). Ainda, o mesmo grupo mostrou que essas O-glicosilações estavam presentes em todo o “tronco” do receptor e também na porção N-terminal da proteína, sendo que a retirada das glicosilações do tronco não resultaram em perda de estabilidade e função do receptor, enquanto as glicosilações no N-terminal eram determinantes à função do receptor. Estes dados foram posteriormente corroborados por estudos com

linhagem de células resistentes a monesina em que foi mantido a glicosilação da porção do tronco do receptor e retirado as glicosilações N-terminais, resultando em uma forte redução da ligação e *uptake* do LDL pelo receptor (139,140). Esses dados sugerem a importância da forma madura e completamente glicosilada do receptor para completa atividade e metabolismo do LDL.

Considerando um possível papel importante do LDLR na manutenção do fenótipo ateroprotetor de CE sob ASS, foi realizada a modulação farmacológica desse receptor. Após o tratamento com estatina houve a recuperação parcial do fenótipo ateroprotetor de ASS pelas HUVECs sob BSS sugerindo que a presença desse receptor pode ser importante para a homeostase celular. Alguns lipídios incluindo o ácido palmítico e ácido octanóico; o ácido succínico, intermediário do ciclo do ácido cítrico e alguns aminoácidos aproximaram seus valores de células sob BSS (após tratamento com estatina) aos de célula sob ASS sendo, portanto, potenciais moléculas *downstream* a LDLR que contribuem para o fenótipo ateroprotetor.

Estatinas são inibidores de HMG-CoA, reduzindo a biossíntese de colesterol e aumentando a expressão de LDLR. Os benefícios da estatina sobre CE já foi reportado na literatura anteriormente, como influenciando o crescimento e migração celular por mecanismos não relacionados ao metabolismo de lipídios (141). Segundo os autores, o efeito protetor de estatinas sobre o endotélio seria devido à ativação de ERK5, resultando em diminuição das vias inflamatórias mediadas por NFκB, diminuição da expressão de moléculas de adesão como VCAM e ICAM e aumento da atividade de eNOS resultado em maior secreção de NO (142–144). Com o objetivo de verificar o efeito da estatina sob células endoteliais especificamente em relação ao LDLR e não ao aumento de NO, um grupo foi tratado também com L-name juntamente com estatina. Através desse grupo vimos que alguns metabólitos como o mio-Inositol, que era altamente modulado em CE sob ASS, tinha seu efeito dependente de NO uma vez que o tratamento com L-name juntamente com estatina retornou seus valores ao de células não tratadas com estatina.

Além do LDLR, outras proteínas relacionadas ao metabolismo de colesterol estavam diminuídas em células sob BSS, incluindo o DHCR7 participante da síntese do colesterol e responsável pela conversão de 7-deidrocolesterol em colesterol, ABCG3 envolvido no transporte de colesterol da membrana para o citoplasma, e NCEH1 e ACAT1 envolvidas no processo de degradação do colesterol através da conversão do colesterol livre em ésteres de colesterol. Células inflamatórias de animais *knockout* para ACAT demonstraram menor efluxo de colesterol, facilitando a formação de lesões ateroscleróticas (145).

As análises de metabolômica corroboram os achados de proteômica deste trabalho, à medida que, além das proteínas participantes do metabolismo do colesterol, foi observado também uma diminuição do colesterol total em HUVECs sob BSS. Foi demonstrado pela literatura que a quantidade de colesterol e a composição lipídica da célula podem ser modulados por SS, alterando assim a fluidez da membrana celular (83,84). Além disso, a depleção de colesterol torna as células mais rígidas, diminuindo adesões focais e aumentando a permeabilidade do endotélio (146,147), sendo esse último fenótipo bastante característico de CE em região de BSS. Cerca de 85% do colesterol livre está presente na membrana celular (148) e, juntamente com esfingolipídios, formam microdomínios chamados *lipid rafts* (149). Os *lipid rafts* são regiões na membrana celular onde ocorrem vários processos celulares incluindo tráfego pela membrana, polarização celular e transdução de sinal. Muitas das proteínas descritas como moduladas por intensidade de fluxo estão localizadas nessas regiões, de modo que mudando a quantidade de colesterol e lipídios na membrana celular, pode-se alterar as estruturas dos *lipid rafts* e influenciar a mecanotransdução.

Park e colaboradores (150) mostraram que a fosforilação de ERK em CE expostas a SS era inibida com a redução de colesterol na membrana. A mesma via também foi inibida em osteoblastos submetidos a SS, em condição de depleção de colesterol da membrana dessas células (151). A simples adição de

moléculas de colesterol ao meio de cultura de CE resulta em maior incorporação dessa molécula em cavéolas e ativa a translocação da cadeia β de ATP sintase da mitocôndria para a membrana celular (152). Fu e colaboradores (45) demonstraram que o SS também é capaz de modular o colesterol especificamente de *lipid rafts* agudamente, com aumento nas duas primeiras horas de SS oscilatório, voltando para os valores basais se o SS oscilatório for mantido por 6 horas; e ligeira diminuição nas primeiras horas de SS laminar, retornando ao valor basal também após 6 horas. Segundo os autores, essa modulação aguda do colesterol em *lipid rafts* após SS oscilatório é responsável pela ativação de integrina $\alpha 5$ (sem alterar os níveis totais na proteína), resultando na ativação *downstream* de moléculas pro-aterogênicas como caspase-1, VCAM-1, ICAM-1 e IL-1 β (44). Apesar de ser um efeito agudo, esses achados demonstram que existe um remodelamento lipídico da membrana celular dependente do fluxo que podem interferir na sinalização celular.

O ácido palmítico foi outro ácido graxo modulado em CE sob diferentes intensidades de SS, estando diminuído em HUVECs sob BSS quando comparado a células sob ASS. Não existem evidências diretas na literatura a respeito da modulação de ácido palmítico em CE, e pouco se sabe a respeito do papel desse ácido graxo na membrana celular. O ácido palmítico é um ácido graxo saturado com papel controverso na literatura. Muitos estudos mostram que o alto consumo de ácidos graxos saturados na alimentação (estudos utilizam o ácido palmítico como modelo de ingestão de ácido graxo saturado em estudo com animais e células) está relacionado ao aumento de resistência à insulina, processos inflamatórios, estresse de retículo endoplasmático, diminuição da atividade da eNOS e interrupção da sinalização por AKT (153–156). Porém, outros estudos demonstram a importância do ácido palmítico para o crescimento celular (157) como importante constituinte de membrana (158), fazendo parte de motivos de ancoramento na membrana e definições de forma e curvaturas celulares (159).

Murthy e colaboradores (158) demonstraram que existe uma relação entre ácido palmítico e colesterol. Células de adenocarcinoma de cólon tratadas com

ácido palmítico ativam a síntese de colesterol, com a ativação de HMG-CoA e aumento do colesterol na membrana celular. O mesmo grupo mostrou que o ácido palmítico é incorporado na membrana celular na forma de fosfatidiletanolamina e fosfatidilcolina. Apesar de não ter dados na literatura relacionando diretamente o aumento de ácido palmítico a SS, trabalhos já mostraram que os produtos finais de ácido palmítico, a fosfatidiletanolamina e fosfatidilcolina, estão aumentados em células sob ASS (82) e diminuídos na circulação de animais com ligação de carótida causando um distúrbio no SS (81).

Além do colesterol e ácido palmítico, outros ácidos graxos também estavam diminuídos em células sob BSS, sendo eles 13-ácido docosenóico, ácido octanoico, 2-metil-2-ácido-pentenedioico, ácido heptadecanóico e 1-heptanol. Existem poucas informações a respeito dos efeitos desses ácidos graxos em CE. Entre as poucas informações que existem, foi verificado por Hecker e colaboradores (160) o efeito benéfico do tratamento com alguns ácidos graxos em CE. Neste trabalho eles que trataram HUVECs com diferentes ácidos graxos de cadeia média e pequena - como o ácido octanóico, e observaram efeito protetor desses lipídios sobre as células resultando em melhores atividades mitocondriais com manutenção da síntese de ATP em situações de inflamação (160).

Em adição aos lipídios, os aminoácidos foram outra classe de moléculas altamente moduladas em HUVECs em situação de ASS e BSS. Quatorze aminoácidos estavam diminuídos em HUVECs sob BSS. Além da relação com o consumo de arginina e síntese de NO, não há discussões na literatura a respeito dos aminoácidos em CE sob diferentes intensidades de SS. Todos os aminoácidos regulados fazem parte de vias anapleróticas do ciclo do ácido cítrico. Três importantes intermediários do ciclo do ácido cítrico, malato, succinato e fumarato, estavam diminuídos em HUVECs sob BSS, sugerindo que essa via pode estar prejudicada nessas condições, como já relatado por outros trabalhos (70,75).

A diminuição de aminoácidos em células submetidas a BSS pode estar relacionada ao catabolismo dos mesmos para manutenção da atividade do ciclo do ácido cítrico. A arginina, glutamina, prolina e glutamato podem ser oxidados para formação de alfa-cetoglutarato; enquanto isoleucina, treonina, valina e metionina são aminoácidos que estão na via de formação de succinil-CoA; a tirosina está relacionada a formação de fumarato enquanto que a asparagina e o aspartato entram na via de formação do ácido oxálico; alanina, glicina e serina oxidam para formação de piruvato e lisina pode ser precursor de acetoacetato. Apesar da interação entre a modulação dos intermediários do ciclo do ácido cítrico e dos aminoácidos, não detectamos a regulação de nenhuma proteína responsável por essa anaplerose.

Além do metabolismo de lipídio, outra via enriquecida pelas proteínas aumentadas em HUVECs sob HSS foi a de metabolismo de modificações pós-traducionais de proteínas, especificamente as N-glicosilações. 15 proteínas envolvidas no processo de glicosilação estavam diminuídas em células sob BSS. São elas: as subunidades catalíticas do complexo de oligosacariltransferases RPN1, RPN2 e DDOST e MPDU1, responsáveis por transferir o açúcar para a proteína nascente; proteínas envolvidas no tráfego de glicoproteínas entre as membranas do complexo de Golgi ou entre o Golgi e o retículo endoplasmático TMED9, TMED10, CD59, RAB1A, LMAN2 e LMAN1; MOGS proteína envolvida no metabolismo de glicanas e clivagem de N-glicanas; PIGS responsável por transferir GPIs para proteínas; e demais proteínas acessórias do processo como CANX, ADAMTSL1 e VDAC1. Interessantemente alguns açúcares e moléculas participantes do metabolismo de açúcares também estavam em menor concentração em HUVECs pós BSS, sugerindo que toda a maquinaria de glicosilação, enzimas e substratos, estavam menos disponíveis em BSS.

Não foi detectada diferença na quantidade de proteínas glicosiladas entre células sob ASS e BSS, o que pode ser devido ao método empregado que incluiu um passo de captura que limita a quantidade de peptídeos glicosilados capturados. Mesmo não observando diferenças nas quantidades de proteínas glicosiladas, foi observado que o perfil de proteínas glicosiladas foi diferente

entre células sob ASS e BSS. Enquanto as proteínas glicosiladas em ASS estavam mais relacionadas à formação de estruturas como adesão celular, proteínas de membrana, enovelamento de proteínas e proteínas de junção celular, as proteínas de BSS estavam mais relacionadas a secreção como o PAI-1, e sinalização celular como a via do TGF β , sinalização de Rho kinase, sinalização de mTOR e Via de Hippo-YAP. Todas as moléculas identificadas haviam sido caracterizadas previamente como glicosiladas por outros estudos da literatura (161).

O glicoproteoma, apesar de identificar proteínas diferentes daquelas identificadas no proteoma total, foi capaz de recuperar vias alteradas em células sob BSS. A ativação de sinalização da via do TGF β já foi previamente reportada na literatura e associada à transição endotélio-mesenquimal adquiridas por CE em condição de BSS (70,162). Assim como a via de ativação do mTOR em células sob BSS está relacionado ao processo de migração e multiplicação celular nessas condições (163). Recentemente novos achados na literatura associaram a inibição da via Hippo-YAP como um dos fatores benéficos do SS laminar, sendo a ativação dessa via relacionada ao desenvolvimento de lesões ateroscleróticas (71,164).

A análise de glicoproteoma mostrou que existe uma modulação diferencial de glicoproteínas em células endoteliais sob diferentes fluxos que podem resultar em diferenças na estabilidade e translocação de proteínas para superfície celular e, com isso, mecanismos e metabolismos diferenciados. Essa técnica possui potencial uso na identificação de marcadores de regiões que estejam sob fluxo não laminar uma vez que pode caracterizar o perfil de proteínas que compõe a superfície celular. Além da diminuição das proteínas envolvidas na glicosilação, foi identificada diminuição de proteínas do retículo endoplasmático em células sob BSS. Evidências recentes mostraram que regiões com maior propensão para o desenvolvimento de aterosclerose apresentam estresse do retículo quando como um iniciador do processo inflamatório(165,166).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados obtidos neste trabalho sugerem que um conjunto de metabólitos e proteínas estão relacionados ao perfil ateroprotetor de células endoteliais sob ASS e, dentro desse conjunto, o metabolismo de lipídios foi uma das vias mais representadas pelas proteínas e metabólitos diferencialmente encontrados.

Ainda, nossos dados sugerem que o LDLR é um receptor que apresenta modulação na sua expressão, localização e modificação pós traducional dependente da intensidade de fluxo aplicado em células endoteliais.

Através da modulação da expressão de LDLR em células endoteliais foi possível recuperar parcialmente o fenótipo ateroprotetor em CE submetidas a BSS, um evento acompanhado de aumento de lipídios, aminoácidos, ácido succínico e açúcares.

Adicionalmente, o processo de glicosilação de proteínas também foi modulado em HUVECs submetidas a ASS e BSS, gerando um perfil único de glicoproteínas em resposta às diferentes intensidades de SS utilizadas neste estudo.

Assim como o LDLR, outras moléculas identificadas nesse trabalho podem ser potenciais alvos de intervenção terapêutica contribuindo para o tratamento ou prevenção de placas ateroscleróticas.

7. ANEXOS

Anexo A: Proteínas aumentadas em células submetidas a ASS em relação à BSS, razão da concentração de proteína entre ASS/BSS, classes e vias que participam segundo banco de dados Reactome.

Gene	ASS/BSS 1	ASS/BSS 2	ASS/BSS 3	ASS/BSS 4	ASS/BSS 5	Classe	Via Reactome
NHRF2	1.64	1.79	1.71	1.97	1.36		
PODXL	2.05	1.61	1.49	2.63	NA		
ITB4	4.40	NA	1.61	2.08	1.75	cell adhesion molecule; extracellular matrix glycoprotein; receptor	Cell-Cell communication;Extracellular matrix organization;Assembly of collagen fibrils and other multimeric structures;Cell junction organization;Non-integrin membrane-ECM interactions;Collagen formation;Syndecan interactions;Type I hemidesmosome assembly;Laminin interactions
OST48	2.47	1.35	NA	1.90	1.28	glycosyltransferase	Asparagine N-linked glycosylation;Translation;Post-translational protein modification;Advanced glycosylation endproduct receptor signaling;Metabolism of proteins
CALRL	NA	1.69	2.28	2.62	1.79		G alpha (s) signalling events;Calcitonin-like ligand receptors;GPCR downstream signaling;Signaling by GPCR;Signal Transduction;Class B/2 (Secretin family receptors);GPCR ligand binding
NCEH1	3.02	1.40	NA	2.13	1.56	lipase; serine protease	Lipid digestion, mobilization, and transport;Metabolism of lipids and lipoproteins;Metabolism
LMO7	2.20	1.41	1.86	2.04	NA		Class I MHC mediated antigen processing & presentation;Immune System;Antigen processing: Ubiquitination & Proteasome degradation;Adaptive Immune System

NDRG1	NA	1.37	1.62	1.37	1.41	serine protease	TP53 regulates transcription of several additional cell death genes whose specific roles in p53-dependent apoptosis remain uncertain;TP53 Regulates Transcription of Cell Death Genes;Generic Transcription Pathway;Transcriptional Regulation by TP53;Gene Expression
PRDBP	1.76	NA	1.48	1.32	1.35	transcription factor	
TM109	2.10	1.28	NA	2.24	1.32		
GDF3	4.32	4.38	NA	2.98	2.32	growth factor	
PGRC1	2.20	NA	NA	1.70	1.32	receptor; signaling molecule	
ZN185	1.50	NA	1.48	NA	1.40		
SURF4	NA	1.36	NA	1.59	1.29	oxidase; transmembrane receptor regulatory/adaptor protein	Membrane Trafficking;COPI-dependent Golgi-to-ER retrograde traffic;Vesicle-mediated transport;Golgi-to-ER retrograde transport;Intra-Golgi and retrograde Golgi-to-ER traffic
CYB5B	2.44	NA	NA	1.76	1.36	oxidase	
LANC1	NA	1.28	NA	1.73	1.58		
LMNA	1.29	NA	1.64	1.43	NA		XBP1(S) activates chaperone genes;Unfolded Protein Response (UPR);IRE1alpha activates chaperones;Metabolism of proteins
RPN1	2.26	1.33	NA	1.78	NA	glycosyltransferase	SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane;Post-translational protein modification;Asparagine N-linked glycosylation;Translation;Gene Expression;Metabolism of proteins
RPN2	2.48	1.33	NA	1.87	NA	glycosyltransferase	SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane;Asparagine N-linked glycosylation;Post-translational protein modification;Translation;Gene Expression;Metabolism of proteins
AT1A1	NA	1.26	NA	1.33	1.39	cation transporter; hydrolase; ion channel	Cardiac conduction;Ion homeostasis;Ion channel transport;Ion transport by P-type ATPases;Transmembrane transport of small molecules;Muscle contraction
TRBM	NA	3.12	3.49	4.45	NA		Formation of Fibrin Clot (Clotting Cascade);Hemostasis;Common Pathway of Fibrin Clot Formation;Cell surface interactions at the vascular wall
HSP71	1.47	1.48	1.29	NA	NA	Chaperone	

HMOX1	1.66	2.33	NA	NA	1.82	oxygenase	Metabolism of porphyrins;Iron uptake and transport;Metabolism;Transmembrane transport of small molecules;Heme degradation
ITA6	2.56	NA	1.31	1.82	NA		Cell-Cell communication;Extracellular matrix organization;Assembly of collagen fibrils and other multimeric structures;Cell junction organization;Non-integrin membrane-ECM interactions;Collagen formation;Syndecan interactions;Integrin cell surface interactions;Hemostasis;Type I hemidesmosome assembly;Basigin interactions;Laminin interactions;Cell surface interactions at the vascular wall
CALX	1.85	1.34	NA	1.78	NA	calcium-binding protein; chaperone	N-glycan trimming in the ER and Calnexin/Calreticulin cycle;Asparagine N-linked glycosylation;Virus Assembly and Release;Assembly of Viral Components at the Budding Site;Adaptive Immune System;Post-translational protein modification;Metabolism of proteins;Calnexin/calreticulin cycle
LAP2B	2.36	1.36	NA	1.47	NA		
SSRA	2.39	1.44	NA	1.80	NA	calcium-binding protein; membrane traffic protein	XBP1(S) activates chaperone genes;SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane;Unfolded Protein Response (UPR);IRE1alpha activates chaperones;Translation;Gene Expression;Metabolism of proteins
HSP72	NA	1.51	NA	1.54	2.05		Cell Cycle;Meiosis;Meiotic synapsis;Cellular responses to stress;Regulation of HSF1-mediated heat shock response;HSF1-dependent transactivation;Cellular response to heat stress;Attenuation phase
AT1B3	NA	1.32	NA	1.45	1.28		Muscle contraction;Transmembrane transport of small molecules;Ion homeostasis;Hemostasis;Cardiac conduction;Ion transport by P-type ATPases;Basigin interactions;Ion channel transport;Cell surface interactions at the vascular wall
SC61B	2.71	1.36	NA	1.59	NA		IRE1alpha activates chaperones;XBP1(S) activates chaperone genes;Translation;Adaptive Immune System;Metabolism of proteins;Class I MHC mediated antigen processing & presentation;Gene Expression;Immune System;Antigen processing-Cross presentation;ER-Phagosome pathway;SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane;Unfolded Protein Response (UPR)

CKAP4	2.11	NA	NA	1.63	1.33		Surfactant metabolism;Metabolism of proteins
MOGS	1.93	1.44	NA	1.55	NA		Defective MOGS causes MOGS-CDG (CDG-2b);N-glycan trimming in the ER and Calnexin/Calreticulin cycle;Disease;Diseases of glycosylation;Asparagine N-linked glycosylation;Post-translational protein modification;Diseases associated with N-glycosylation of proteins;Metabolism of proteins
SPCS2	NA	1.44	NA	1.75	1.47	enzyme modulator	Synthesis, secretion, and deacylation of Ghrelin;Translation;Peptide hormone metabolism;Synthesis, secretion, and inactivation of Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide (GIP);Metabolism of proteins;Incretin synthesis, secretion, and inactivation;Synthesis, secretion, and inactivation of Glucagon-like Peptide-1 (GLP-1);Gene Expression;SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane
DHB12	2.39	NA	NA	2.13	1.31		Fatty Acyl-CoA Biosynthesis;Androgen biosynthesis;Metabolism of lipids and lipoproteins;Triglyceride Biosynthesis;Synthesis of very long-chain fatty acyl-CoAs;Metabolism of steroid hormones;Fatty acid, triacylglycerol, and ketone body metabolism;Metabolism
ATLA3	2.03	NA	NA	2.08	1.32	heterotrimeric G-protein	
KANK3	NA	NA	1.77	1.28	1.25		
AHNK2	1.69	NA	1.47	NA	1.26		
CCD47	2.10	2.03	NA	1.63	NA		
LRC59	2.43	1.39	NA	1.73	NA		
F213A	2.73	NA	NA	1.76	1.69		
ESYT1	2.27	NA	NA	1.80	1.32		Glycosphingolipid metabolism;Metabolism of lipids and lipoproteins;Sphingolipid metabolism;Metabolism
TMED9	NA	1.38	NA	1.56	1.26	transfer/carrier protein; vesicle coat protein	COPI-dependent Golgi-to-ER retrograde traffic;Golgi-to-ER retrograde transport;Transport to the Golgi and subsequent modification;Asparagine N-linked glycosylation;Post-translational protein modification;Metabolism of proteins;Membrane Trafficking;Intra-Golgi and retrograde Golgi-to-ER traffic;Vesicle-mediated transport;COPI-mediated anterograde transport;ER to Golgi Anterograde Transport
EHD2	1.41	NA	1.33	1.31	NA	G-protein modulator; calcium-binding	Hemostasis;Factors involved in megakaryocyte development and platelet production

VAPA	1.84	1.27	NA	1.79	NA	protein; membrane traffic protein membrane trafficking regulatory protein	Sphingolipid de novo biosynthesis;Metabolism of lipids and lipoproteins;Sphingolipid metabolism;Metabolism Regulation of cholesterol biosynthesis by SREBP (SREBF);Cholesterol biosynthesis via lathosterol;Cholesterol biosynthesis;Cholesterol biosynthesis via desmosterol;Metabolism of lipids and lipoproteins;Activation of gene expression by SREBF (SREBP);Metabolism
DHCR7	2.25	NA	NA	2.15	1.28	receptor; reductase	
CSKI2	NA	1.64	2.57	1.53	NA	transmembrane receptor regulatory/adaptor protein	
ELOV1	2.79	1.50	NA	1.52	NA	acyltransferase	Metabolism;Triglyceride Biosynthesis;alpha-linolenic acid (ALA) metabolism;Linoleic acid (LA) metabolism;alpha-linolenic (omega3) and linoleic (omega6) acid metabolism;Fatty Acyl-CoA Biosynthesis;Synthesis of very long-chain fatty acyl-CoAs;Metabolism of lipids and lipoproteins;Fatty acid, triacylglycerol, and ketone body metabolism
K2C1	NA	NA	10.18	NA	6.80		
SCAM1	NA	1.87	NA	1.44	NA	transfer/carrier protein; transferase	
PGRC2	2.15	NA	NA	1.62	NA	receptor; signaling molecule	
PLOD3	1.37	NA	NA	1.33	NA	oxygenase	Extracellular matrix organization;Collagen biosynthesis and modifying enzymes;Collagen formation Disease;Defective MPDU1 causes MPDU1-CDG (CDG-1f);Diseases of glycosylation;Biosynthesis of the N-glycan precursor (dolichol lipid-linked oligosaccharide, LLO) and transfer to a nascent protein;Asparagine N-linked glycosylation;Post-translational protein modification;Diseases associated with N-glycosylation of proteins;Metabolism of proteins
MPU1	2.00	NA	NA	2.10	NA		
PRAF3	NA	NA	NA	1.71	1.37	amino acid transporter	Neurotransmitter Release Cycle;Neuronal System;Glutamate Neurotransmitter Release Cycle;Transmission across Chemical Synapses

AL1A2	NA	NA	1.57	NA	1.35	dehydrogenase	RA biosynthesis pathway;Signal Transduction;Signaling by Retinoic Acid
DHE3	1.82	NA	NA	1.31	NA	dehydrogenase	Metabolism of amino acids and derivatives;Amino acid synthesis and interconversion (transamination);Metabolism
NB5R3	2.09	NA	NA	1.77	NA		Metabolism of vitamins and cofactors;Metabolism of water-soluble vitamins and cofactors;Vitamin C (ascorbate) metabolism;Metabolism
LDLR	NA	NA	NA	1.59	1.71		Signal Transduction;Metabolism;Lipoprotein metabolism;Metabolism of fat-soluble vitamins;Visual phototransduction;LDL-mediated lipid transport;Metabolism of vitamins and cofactors;Retinoid metabolism and transport;Membrane Trafficking;Clathrin-mediated endocytosis;Metabolism of lipids and lipoproteins;Cargo recognition for clathrin-mediated endocytosis;Vesicle-mediated transport;Chylomicron-mediated lipid transport;Lipid digestion, mobilization, and transport
CATA	NA	NA	1.33	1.27	NA	peroxidase	Detoxification of Reactive Oxygen Species;Purine catabolism;Cellular responses to stress;Purine metabolism;Metabolism;Metabolism of nucleotides
GELS	NA	NA	1.26	NA	1.31	non-motor actin binding protein	Apoptotic execution phase;Programmed Cell Death;Apoptosis;Amyloid fiber formation;Caspase-mediated cleavage of cytoskeletal proteins;Apoptotic cleavage of cellular proteins;Metabolism of proteins
SRPR	2.36	NA	NA	1.81	NA	G-protein; RNA binding protein; receptor	XBP1(S) activates chaperone genes;SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane;Unfolded Protein Response (UPR);IRE1alpha activates chaperones;Translation;Gene Expression;Metabolism of proteins
PDIA4	1.43	1.28	NA	NA	NA		

CD59	1.89	NA	NA	1.47	NA	Transport to the Golgi and subsequent modification;Asparagine N-linked glycosylation;Post-translational protein modification;Metabolism of proteins;Membrane Trafficking;Immune System;Vesicle-mediated transport;COPII (Coat Protein 2) Mediated Vesicle Transport;COPI-mediated anterograde transport;Regulation of Complement cascade;Innate Immune System;ER to Golgi Anterograde Transport;Cargo concentration in the ER;Complement cascade
NQO1	NA	1.29	NA	NA	1.28	Metabolism of polyamines;Metabolism of amino acids and derivatives;Metabolism;Regulation of ornithine decarboxylase (ODC)
CD44	2.16	NA	NA	1.41	NA	Metabolism;Extracellular matrix organization;Interferon gamma signaling;Hyaluronan uptake and degradation;Glycosaminoglycan metabolism;Cytokine Signaling in Immune system;Interferon Signaling;Degradation of the extracellular matrix;Integrin cell surface interactions;Hyaluronan metabolism;Immune System;Hemostasis;Metabolism of carbohydrates;Cell surface interactions at the vascular wall
PTMS	NA	NA	1.26	NA	1.42	
VDAC1	2.15	NA	NA	1.37	NA	anion channel; voltage-gated ion channel Mitophagy;Ub-specific processing proteases;Post-translational protein modification;Deubiquitination;Metabolism of proteins;Mitochondrial protein import;Pink/Parkin Mediated Mitophagy
CD9	1.45	NA	NA	1.25	NA	Disease;Platelet degranulation ;Hemostasis;Response to elevated platelet cytosolic Ca2+;Platelet activation, signaling and aggregation
AT5F1	2.53	NA	NA	1.27	NA	Respiratory electron transport, ATP synthesis by chemiosmotic coupling, and heat production by uncoupling proteins.;Formation of ATP by chemiosmotic coupling;The citric acid (TCA) cycle and respiratory electron transport;Metabolism

ACAT1	2.17	NA	NA	1.27	NA	acetyltransferase	Synthesis of Ketone Bodies;Ketone body metabolism;Utilization of Ketone Bodies;Metabolism of lipids and lipoproteins;Branched-chain amino acid catabolism;Metabolism of amino acids and derivatives;Fatty acid, triacylglycerol, and ketone body metabolism;Metabolism
STOM	1.83	NA	NA	1.41	NA	cytoskeletal protein; protease inhibitor	Stimuli-sensing channels;Ion channel transport;Transmembrane transport of small molecules
ABCD3	NA	NA	NA	2.52	1.86	transporter	ABC transporters in lipid homeostasis;ABC-family proteins mediated transport;Transmembrane transport of small molecules
SSFA2	NA	NA	1.61	NA	1.39	metalloprotease	Transport to the Golgi and subsequent modification;Asparagine N-linked glycosylation;Post-translational protein modification;Metabolism of proteins;Membrane Trafficking;Vesicle-mediated transport;COPII (Coat Protein 2) Mediated Vesicle Transport;Cargo concentration in the ER;ER to Golgi Anterograde Transport
ECE1	1.53	NA	NA	1.35	NA		
LMAN1	NA	NA	NA	1.67	1.33	membrane traffic protein	Golgi-to-ER retrograde transport;COPI-dependent Golgi-to-ER retrograde traffic;Transport to the Golgi and subsequent modification;Asparagine N-linked glycosylation;Post-translational protein modification;Metabolism of proteins;Membrane Trafficking;Intra-Golgi and retrograde Golgi-to-ER traffic;Vesicle-mediated transport;COPI-mediated anterograde transport;COPII (Coat Protein 2) Mediated Vesicle Transport;Cargo concentration in the ER;ER to Golgi Anterograde Transport
TMEDA	NA	NA	NA	1.40	1.37	transfer/carrier protein; vesicle coat protein	Phase II conjugation;Biological oxidations;Cytosolic sulfonation of small molecules;Metabolism
ST1A3	2.07	1.50	NA	NA	NA		Mitotic Metaphase and Anaphase;Nuclear Envelope Reassembly;M Phase;Nuclear Envelope Breakdown;Depolymerisation of the Nuclear Lamina;Mitotic Anaphase;Initiation of Nuclear Envelope Reformation;Mitotic Prophase;Clearance of Nuclear Envelope Membranes from Chromatin;Cell Cycle;Cell Cycle, Mitotic
EMD	NA	NA	NA	1.89	1.32		SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane;Translation;Metabolism of proteins;Gene Expression
SSRD	NA	1.35	NA	1.40	NA		

SPCS3	2.09	NA	NA	NA	1.39	protease	Synthesis, secretion, and deacylation of Ghrelin; Translation; Peptide hormone metabolism; Synthesis, secretion, and inactivation of Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide (GIP); Metabolism of proteins; Incretin synthesis, secretion, and inactivation; Synthesis, secretion, and inactivation of Glucagon-like Peptide-1 (GLP-1); Gene Expression; SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane
H4	1.46	1.38	NA	NA	NA	histone	
MPCP	2.90	NA	NA	1.27	NA		
REEP5	NA	NA	NA	2.26	1.35	receptor; transporter	
FLI1	NA	NA	1.45	1.42	NA	nucleic acid binding; signaling molecule	
CAV1	1.45	NA	NA	1.51	NA	G-protein modulator; membrane traffic protein	Lipid digestion, mobilization, and transport; Basigin interactions; Hemostasis; Signaling by Wnt; Metabolism of lipids and lipoproteins; Hormone-sensitive lipase (HSL)-mediated triacylglycerol hydrolysis; Metabolism of nitric oxide; Metabolism; Disassembly of the destruction complex and recruitment of AXIN to the membrane; eNOS activation; VEGFA-VEGFR2 Pathway; NOSTRIN mediated eNOS trafficking; Cell surface interactions at the vascular wall; TCF dependent signaling in response to WNT; eNOS activation and regulation; Signal Transduction; Signaling by VEGF; VEGFR2 mediated vascular permeability
CGNL1	NA	1.34	NA	1.30	NA		
TBL3	3.33	NA	NA	NA	1.63	G-protein coupled receptor	rRNA processing in the nucleus and cytosol; rRNA processing; rRNA modification in the nucleus and cytosol; Gene Expression; Major pathway of rRNA processing in the nucleolus and cytosol
HYAL2	NA	1.63	NA	1.52	NA	glycosidase	Glycosaminoglycan metabolism; Hyaluronan uptake and degradation; Hyaluronan metabolism; Metabolism of carbohydrates; Metabolism

LMAN2	NA	NA	NA	1.57	1.25	membrane traffic protein	Transport to the Golgi and subsequent modification;Asparagine N-linked glycosylation;Post-translational protein modification;Metabolism of proteins;Membrane Trafficking;Vesicle-mediated transport;COPII (Coat Protein 2) Mediated Vesicle Transport;Cargo concentration in the ER;ER to Golgi Anterograde Transport
DNJC3	1.71	1.35	NA	NA	NA		IRE1alpha activates chaperones;Influenza Viral RNA Transcription and Replication;XBP1(S) activates chaperone genes;Viral mRNA Translation;Metabolism of proteins;Disease;Infectious disease;Influenza Life Cycle;Influenza Infection;Unfolded Protein Response (UPR)
STIM1	2.01	NA	NA	NA	1.36		Elevation of cytosolic Ca ²⁺ levels;Signaling by the B Cell Receptor (BCR);Platelet calcium homeostasis;Adaptive Immune System;Muscle contraction;Platelet homeostasis;Ion homeostasis;Immune System;Hemostasis;Antigen activates B Cell Receptor (BCR) leading to generation of second messengers;Cardiac conduction
TOIP1	NA	1.34	NA	1.83	NA		
PTRD1	NA	NA	2.89	NA	2.30		
TM205	NA	1.57	NA	1.65	NA		
PCAT2	NA	1.32	NA	1.40	NA	acyltransferase; annexin; calmodulin	Acyl chain remodelling of PC;Phospholipid metabolism;Metabolism of lipids and lipoproteins;Glycerophospholipid biosynthesis;Metabolism
CP062	NA	NA	2.21	1.61	NA		
LYRIC	NA	1.43	NA	1.70	NA		
ATL1	NA	1.39	NA	1.46	NA	extracellular matrix glycoprotein; metalloprotease; serine protease inhibitor	Defective B3GALTL causes Peters-plus syndrome (PpS);Disease;Diseases of glycosylation;Post-translational protein modification;Diseases associated with O-glycosylation of proteins;O-glycosylation of TSR domain-containing proteins;O-linked glycosylation;Metabolism of proteins
TOIP2	NA	NA	NA	1.70	2.09		
ATLA2	NA	NA	NA	1.86	1.62	heterotrimeric G-protein	

HS105	1.48	1.35	NA	NA	NA		Vesicle-mediated transport;Binding and Uptake of Ligands by Scavenger Receptors;Cellular responses to stress;Regulation of HSF1-mediated heat shock response;Scavenging by Class F Receptors;Cellular response to heat stress
ERG11	NA	NA	NA	1.50	1.43		
KCD12	NA	NA	1.70	NA	1.34	enzyme modulator	
HS12B	NA	1.86	NA	1.76	NA		Cellular responses to stress;Regulation of HSF1-mediated heat shock response;Cellular response to heat stress
MBOA7	NA	1.35	NA	1.75	NA	acetyltransferase	Phospholipid metabolism;Metabolism of lipids and lipoproteins;Glycerophospholipid biosynthesis;Acyl chain remodelling of PI;Metabolism
PIGS	3.60	NA	NA	1.91	NA		Attachment of GPI anchor to uPAR;Post-translational modification: synthesis of GPI-anchored proteins;Post-translational protein modification;Metabolism of proteins
TENS1	NA	1.28	1.46	NA	NA		
APMAP	1.95	NA	NA	1.49	NA	lyase	
MED4	NA	1.34	NA	1.57	NA		PPARA activates gene expression;Metabolism;Generic Transcription Pathway;Developmental Biology;Metabolism of lipids and lipoproteins;Gene Expression;Transcriptional regulation of white adipocyte differentiation;Fatty acid, triacylglycerol, and ketone body metabolism;Regulation of lipid metabolism by Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha)
MYOF	1.41	NA	NA	1.56	NA	membrane traffic protein	
RBM27	NA	NA	1.93	NA	1.54	RNA binding protein	
SUN2	NA	NA	NA	1.80	1.45	non-motor microtubule binding protein	Cell Cycle;Meiosis;Meiotic synapsis
NDRG4	NA	1.91	NA	1.77	NA	serine protease	
EPCR	2.04	NA	NA	NA	1.34	enzyme modulator; receptor	Formation of Fibrin Clot (Clotting Cascade);Hemostasis;Common Pathway of Fibrin Clot Formation;Cell surface interactions at the vascular wall
CHSP1	NA	1.34	NA	1.30	NA	RNA binding protein	

SRPRB	NA	1.28	NA	1.89	NA		XBP1(S) activates chaperone genes;SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane;Unfolded Protein Response (UPR);IRE1alpha activates chaperones;Translation;Gene Expression;Metabolism of proteins
SPCS1	NA	NA	NA	1.62	1.88	signaling molecule	Synthesis, secretion, and deacylation of Ghrelin;Translation;Peptide hormone metabolism;Synthesis, secretion, and inactivation of Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide (GIP);Metabolism of proteins;Incretin synthesis, secretion, and inactivation;Synthesis, secretion, and inactivation of Glucagon-like Peptide-1 (GLP-1);Gene Expression;SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane
ADT3	3.47	NA	NA	1.36	NA		Metabolism;Host Interactions of HIV factors;Vpr-mediated induction of apoptosis by mitochondrial outer membrane permeabilization;HIV Infection;Metabolism of proteins
AK1C3	2.00	1.47	NA	NA	NA	reductase	Signal Transduction;Metabolism;Metabolism of fat-soluble vitamins;Visual phototransduction;Arachidonic acid metabolism;Synthesis of bile acids and bile salts via 24-hydroxycholesterol;Signaling by Retinoic Acid;Metabolism of vitamins and cofactors;Retinoid metabolism and transport;Synthesis of bile acids and bile salts via 7alpha-hydroxycholesterol;Synthesis of bile acids and bile salts;Bile acid and bile salt metabolism;RA biosynthesis pathway;Metabolism of lipids and lipoproteins;Synthesis of bile acids and bile salts via 27-hydroxycholesterol;Synthesis of Prostaglandins (PG) and Thromboxanes (TX)
CRIP1	4.12	NA	NA	2.63	NA	actin family cytoskeletal protein	
RAP1B	1.49	NA	NA	1.26	NA	small GTPase	MAP2K and MAPK activation;Signalling by NGF;Downstream signaling of activated FGFR2;Platelet activation, signaling and aggregation;FRS-mediated FGFR1 signaling;NGF signalling via TRKA from the plasma membrane;DAP12 signaling;Signaling by Interleukins;FCERI mediated MAPK activation;Immune System;Gastrin-CREB signalling pathway via PKC and MAPK;SOS-mediated signalling;Signalling to p38 via RIT and RIN;Interleukin-2 signaling

RAB1A	1.43	NA	NA	1.35	NA	Golgi Cisternae Pericentriolar Stack Reorganization;Golgi-to-ER retrograde transport;COPI-dependent Golgi-to-ER retrograde traffic;Transport to the Golgi and subsequent modification;Asparagine N-linked glycosylation;M Phase;Post-translational protein modification;Metabolism of proteins;Membrane Trafficking;Mitotic Prophase;Intra-Golgi and retrograde Golgi-to-ER traffic;Vesicle-mediated transport;COPI-mediated anterograde transport;COPII (Coat Protein 2) Mediated Vesicle Transport;Cell Cycle;ER to Golgi Anterograde Transport;Cell Cycle, Mitotic
-------	------	----	----	------	----	---

Anexo B: Proteínas aumentadas em células submetidas a BSS em relação à ASS, razão da concentração de proteína entre ASS/BSS, classes e vias que participam segundo banco de dados Reactome.

Gene	ASS/BSS 1	ASS/BSS 2	ASS/BSS 3	ASS/BSS 4	ASS/BSS 5	Classe	Vias Reactome
TGFI1	0.56	0.80	0.63	0.66	0.61	actin family cytoskeletal protein	
TSP1	0.58	0.62	0.59	0.43	0.37		Hemostasis; Disease; Post-translational protein modification; Diseases of glycosylation; Extracellular matrix organization; Metabolism of proteins; O-glycosylation of TSR domain-containing proteins; Integrin cell surface interactions; O-linked glycosylation; Platelet degranulation ; Signal Transduction; Response to elevated platelet cytosolic Ca ²⁺ ; Non-integrin membrane-ECM interactions; Syndecan interactions; Platelet activation, signaling and aggregation; Diseases associated with O-glycosylation of proteins; Defective B3GALTL causes Peters-plus syndrome (PpS); Signaling by PDGF
TPM1	0.57	0.71	0.54	0.47	0.72	actin binding motor protein	Smooth Muscle Contraction; Striated Muscle Contraction; Muscle contraction

PGBM	0.52	0.72	0.71	0.59	0.42	extracellular matrix linker protein; protease inhibitor; receptor	Diseases of glycosylation; HS-GAG degradation; Metabolism; Extracellular matrix organization; Amyloid fiber formation; Metabolism of fat-soluble vitamins; Metabolism of carbohydrates; Heparan sulfate/heparin (HS-GAG) metabolism; Defective EXT1 causes exostoses 1, TRPS2 and CHDS; Metabolism of proteins; HS-GAG biosynthesis; Integrin cell surface interactions; Degradation of the extracellular matrix; Chondroitin sulfate/dermatan sulfate metabolism; Retinoid metabolism and transport; Defective EXT2 causes exostoses 2; A tetrasaccharide linker sequence is required for GAG synthesis; Diseases associated with glycosaminoglycan metabolism; Non-integrin membrane-ECM interactions; Laminin interactions; Glycosaminoglycan metabolism
COCA1	0.28	0.43	0.59	0.46	0.36	receptor	Collagen degradation; Extracellular matrix organization; Collagen biosynthesis and modifying enzymes; Collagen formation; Degradation of the extracellular matrix
CYR61	0.77	0.75	0.56	NA	0.75	growth factor	

FINC	0.46	NA	0.61	0.49	0.42	signaling molecule	<p>Integrin alpha1b beta3 signaling; FCERI mediated MAPK activation; FRS-mediated FGFR2 signaling; Signaling by SCF-KIT; ARMS-mediated activation; NCAM signaling for neurite out-growth; VEGFA-VEGFR2 Pathway; Signalling to ERKs; NGF signalling via TRKA from the plasma membrane; Immune System; Signaling by Leptin; Signaling by ERBB4; Signaling by EGFR; Fibronectin matrix formation; Signaling by Interleukins; IRS-mediated signalling; ECM proteoglycans; MAP2K and MAPK activation; Gastrin-CREB signalling pathway via PKC and MAPK; Non-integrin membrane-ECM interactions; Syndecan interactions; Signaling by FGFR4; Innate Immune System; Signaling by FGFR3; Signaling by GPCR; Prolonged ERK activation events; Frs2-mediated activation; Signalling to RAS; Cytokine Signaling in Immune system; Signalling to p38 via RIT and RIN; Downstream signal transduction; Fc epsilon receptor (FCERI) signaling; SHC1 events in ERBB4 signaling; Developmental Biology; Signaling by FGFR2; Signal Transduction; Molecules associated with elastic fibres; Signaling by FGFR1; Signaling by Insulin receptor; Insulin receptor signalling cascade; Cell surface interactions at the vascular wall; DAP12 signaling; GRB2 events in EGFR signaling; Platelet Aggregation (Plug Formation)</p>
------	------	----	------	------	------	--------------------	---

LAMC1	0.78	0.74	NA	0.72	0.59	extracellular matrix linker protein; protease inhibitor; receptor	Laminin interactions; ECM proteoglycans; Developmental Biology; Extracellular matrix organization; L1CAM interactions; Degradation of the extracellular matrix; Axon guidance; Non-integrin membrane-ECM interactions
NID1	0.70	0.74	NA	0.67	0.63		Laminin interactions; Extracellular matrix organization; Degradation of the extracellular matrix
CO5A1	0.68	0.79	NA	0.75	0.55		Signal Transduction; Extracellular matrix organization; ECM proteoglycans; Assembly of collagen fibrils and other multimeric structures; Collagen biosynthesis and modifying enzymes; Developmental Biology; Axon guidance; NCAM signaling for neurite out-growth; Collagen formation; Non-integrin membrane-ECM interactions; Syndecan interactions; Integrin cell surface interactions; Degradation of the extracellular matrix; Signaling by PDGF; Collagen degradation; NCAM1 interactions
CTGF	0.63	0.63	NA	0.41	0.46	growth factor	YAP1- and WWTR1 (TAZ)-stimulated gene expression; Metabolism of lipids and lipoproteins; PPARA activates gene expression; Regulation of lipid metabolism by Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha); Generic Transcription Pathway; Gene Expression; Fatty acid, triacylglycerol, and ketone body metabolism; Metabolism
LAMA4	0.67	0.69	NA	0.71	0.61		Laminin interactions; ECM proteoglycans; Extracellular matrix organization; Non-integrin membrane-ECM interactions

NET4	0.75	NA	0.52	0.58	0.58	extracellular matrix linker protein; protease inhibitor; receptor	Netrin-1 signaling; Developmental Biology; Extracellular matrix organization; Axon guidance; Non-integrin membrane-ECM interactions
MAFF	0.54	0.71	NA	0.76	0.64		Hemostasis; Factors involved in megakaryocyte development and platelet production
WIPF1	NA	0.56	0.50	0.55	NA		Immune System; Regulation of actin dynamics for phagocytic cup formation; RHO GTPase Effectors; Fcgamma receptor (FCGR) dependent phagocytosis; Signal Transduction; Innate Immune System; Signaling by Rho GTPases; RHO GTPases Activate WASPs and WAVES
KHDR3	0.53	0.66	NA	NA	0.68	mRNA splicing factor; transcription cofactor	PTK6 Regulates Proteins Involved in RNA Processing; Signal Transduction; Signaling by PTK6
PAI1	0.76	0.78	0.58	NA	NA	serine protease inhibitor	Signal Transduction; Extracellular matrix organization; SMAD2/SMAD3:SMAD4 heterotrimer regulates transcription; Generic Transcription Pathway; ECM proteoglycans; Transcriptional activity of SMAD2/SMAD3:SMAD4 heterotrimer; Circadian Clock; Dissolution of Fibrin Clot; Gene Expression; Platelet degranulation ; Hemostasis; Signaling by TGF-beta Receptor Complex; BMAL1:CLOCK,NPAS2 activates circadian gene expression; Response to elevated platelet cytosolic Ca ²⁺ ; Platelet activation, signaling and aggregation

ICAM1	NA	NA	0.64	0.75	0.69	Immunoregulatory interactions between a Lymphoid and a non-Lymphoid cell; Immune System; Integrin cell surface interactions; Adaptive Immune System; Interferon gamma signaling; Extracellular matrix organization; Cytokine Signaling in Immune system; Interferon Signaling
LAMB1	NA	0.80	NA	0.80	0.65	extracellular matrix linker protein; protease inhibitor; receptor Laminin interactions; ECM proteoglycans; Developmental Biology; Extracellular matrix organization; L1CAM interactions; Degradation of the extracellular matrix; Non-integrin membrane-ECM interactions; Axon guidance
CO4A2	0.76	NA	NA	0.70	0.64	Collagen biosynthesis and modifying enzymes; Collagen degradation; NCAM signaling for neurite out-growth; Assembly of collagen fibrils and other multimeric structures; Developmental Biology; Collagen formation; Anchoring fibril formation; Extracellular matrix organization; Vesicle-mediated transport; NCAM1 interactions; Integrin cell surface interactions; Degradation of the extracellular matrix; ECM proteoglycans; Axon guidance; Signal Transduction; Non-integrin membrane-ECM interactions; Scavenging by Class A Receptors; Signaling by PDGF; Binding and Uptake of Ligands by Scavenger Receptors; Laminin interactions
PLAK	NA	NA	0.55	0.69	0.76	VEGFA-VEGFR2 Pathway; Cell-Cell communication; Cell-cell junction organization; Signal Transduction; Signaling by VEGF; Cell junction organization; Adherens junctions interactions; VEGFR2 mediated vascular permeability

CO8A1	0.67	NA	0.64	NA	0.50	extracellular matrix structural protein	Collagen degradation; Integrin cell surface interactions; Extracellular matrix organization; Collagen biosynthesis and modifying enzymes; Degradation of the extracellular matrix; Collagen formation; Assembly of collagen fibrils and other multimeric structures
BMX	0.69	NA	0.67	0.77	NA		Apoptotic execution phase; Programmed Cell Death; Apoptosis; Apoptotic cleavage of cellular proteins
LTBP2	NA	0.62	NA	0.54	0.68	annexin; calmodulin; cell adhesion molecule; extracellular matrix glycoprotein; extracellular matrix structural protein; signaling molecule	Elastic fibre formation; Extracellular matrix organization; Molecules associated with elastic fibres
FIL1L	0.75	NA	0.54	NA	0.73		
TINAL	NA	NA	0.63	0.66	0.49	cysteine protease; protease inhibitor	

WWTR1	NA	0.79	NA	0.79	0.77		Signal Transduction; PPARA activates gene expression; Metabolism; Generic Transcription Pathway; SMAD2/SMAD3:SMAD4 heterotrimer regulates transcription; Transcriptional activity of SMAD2/SMAD3:SMAD4 heterotrimer; Muscle contraction; Metabolism of lipids and lipoproteins; Gene Expression; Signaling by Hippo; Signaling by TGF-beta Receptor Complex; Fatty acid, triacylglycerol, and ketone body metabolism; YAP1- and WWTR1 (TAZ)-stimulated gene expression; Physiological factors; Cardiac conduction; Regulation of lipid metabolism by Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha)
PALMD	0.76	NA	NA	0.75	0.78		
RM17	0.49	0.72	NA	NA	0.68	ribosomal protein	Mitochondrial translation elongation; Mitochondrial translation termination; Mitochondrial translation; Mitochondrial translation initiation; Organelle biogenesis and maintenance
SERC	0.64	0.75	NA	NA	0.77		Serine biosynthesis; Metabolism of amino acids and derivatives; Amino acid synthesis and interconversion (transamination); Metabolism
K1C10	NA	0.05	NA	0.13	NA		
PDLI1	0.80	NA	NA	NA	0.67	non-motor actin binding protein	
ARVC	NA	NA	0.61	NA	0.63	intermediate filament binding protein	

MA2B1	0.63	NA	NA	0.76	NA		Lysosomal oligosaccharide catabolism; Metabolism of carbohydrates; Metabolism
PRS23	NA	NA	NA	0.75	0.80	serine protease	
TRI16; sp	0.48	NA	NA	0.61	NA		
SDPR	0.78	NA	NA	NA	0.78	transcription factor	
AL1A1	0.73	NA	NA	0.80	NA	dehydrogenase	Ethanol oxidation; Signal Transduction; Metabolism; Phase 1 - Functionalization of compounds; Signaling by Retinoic Acid; Biological oxidations; Fructose catabolism; RA biosynthesis pathway; Fructose metabolism; Metabolism of carbohydrates
FRIL	NA	NA	0.50	0.63	NA	storage protein	trans-Golgi Network Vesicle Budding; Membrane Trafficking; Transmembrane transport of small molecules; Binding and Uptake of Ligands by Scavenger Receptors; Clathrin derived vesicle budding; Golgi Associated Vesicle Biogenesis; Vesicle-mediated transport; Scavenging by Class A Receptors; Iron uptake and transport
FRIH	NA	NA	0.72	0.64	NA	storage protein	trans-Golgi Network Vesicle Budding; Membrane Trafficking; Transmembrane transport of small molecules; Binding and Uptake of Ligands by Scavenger Receptors; Clathrin derived vesicle budding; Golgi Associated Vesicle Biogenesis; Vesicle-mediated transport; Scavenging by Class A Receptors; Iron uptake and transport

LYAG	NA	0.68	NA	0.70	NA	glucosidase	Metabolism; Lysosomal glycogen catabolism; Glucose metabolism; Glycogen breakdown (glycogenolysis); Glycogen storage diseases; Diseases of carbohydrate metabolism; Glycogen storage disease type II (GAA); Diseases of metabolism; Disease; Metabolism of carbohydrates
TFPI1	NA	NA	NA	0.66	0.62	serine protease inhibitor	Formation of Fibrin Clot (Clotting Cascade); Hemostasis; Extrinsic Pathway of Fibrin Clot Formation
CLUS	NA	NA	NA	0.73	0.57		Immune System; Response to elevated platelet cytosolic Ca ²⁺ ; Hemostasis; Terminal pathway of complement; Platelet activation, signaling and aggregation; Innate Immune System; Platelet degranulation ; Complement cascade
RALA	NA	0.77	0.76	NA	NA	small GTPase	Signal Transduction; Signalling by NGF; Membrane Trafficking; Signalling to ERKs; Translocation of GLUT4 to the plasma membrane; p38MAPK events; Vesicle-mediated transport; Signalling to RAS; NGF signalling via TRKA from the plasma membrane
ANXA3	NA	NA	0.66	NA	0.79		
FABP4	0.60	NA	NA	NA	0.63		Hormone-sensitive lipase (HSL)-mediated triacylglycerol hydrolysis; Lipid digestion, mobilization, and transport; Developmental Biology; Metabolism of lipids and lipoproteins; Transcriptional regulation of white adipocyte differentiation; Metabolism
EGLN	NA	0.78	0.60	NA	NA		

IBP2	NA	NA	NA	0.78	0.60	protease inhibitor	Regulation of Insulin-like Growth Factor (IGF) transport and uptake by Insulin-like Growth Factor Binding Proteins (IGFBPs); Metabolism of proteins
CADH2	NA	0.69	0.63	NA	NA		Cell-Cell communication; Developmental Biology; Cell-cell junction organization; CDO in myogenesis; Myogenesis; Cell junction organization; Adherens junctions interactions
NDUV2	NA	0.73	NA	NA	0.72		Respiratory electron transport, ATP synthesis by chemiosmotic coupling, and heat production by uncoupling proteins.; Complex I biogenesis; Respiratory electron transport; The citric acid (TCA) cycle and respiratory electron transport; Metabolism
PTPRB	NA	0.59	NA	0.74	NA		
NDUS1	NA	NA	0.77	NA	0.73		Respiratory electron transport, ATP synthesis by chemiosmotic coupling, and heat production by uncoupling proteins.; Complex I biogenesis; Respiratory electron transport; The citric acid (TCA) cycle and respiratory electron transport; Metabolism
ILEU	NA	NA	0.56	NA	0.55	serine protease inhibitor	

MYH10	0.55	NA	NA	NA	0.76		Signal Transduction; Sema4D in semaphorin signaling; Signaling by Rho GTPases; RHO GTPase Effectors; EPH-Ephrin signaling; RHO GTPases activate PAKs; RHO GTPases activate CIT; Developmental Biology; Axon guidance; RHO GTPases Activate ROCKs; EPHA-mediated growth cone collapse; RHO GTPases activate PKNs; Semaphorin interactions; Sema4D induced cell migration and growth-cone collapse
COIA1	NA	NA	0.66	NA	0.36		Extracellular matrix organization; Assembly of collagen fibrils and other multimeric structures; Collagen biosynthesis and modifying enzymes; Activation of Matrix Metalloproteinases; Collagen formation; Degradation of the extracellular matrix; Integrin cell surface interactions; Collagen degradation; Laminin interactions
CAP2	0.70	NA	NA	NA	0.74	actin family cytoskeletal protein	Developmental Biology; Signaling by Robo receptor; Role of Abl in Robo-Slit signaling; Axon guidance
MDHM	NA	NA	0.75	NA	0.78	dehydrogenase	Citric acid cycle (TCA cycle); Gluconeogenesis; Metabolism of carbohydrates; The citric acid (TCA) cycle and respiratory electron transport; Pyruvate metabolism and Citric Acid (TCA) cycle; Glucose metabolism; Metabolism

LPPRC	NA	0.71	0.76	NA	NA		Respiratory electron transport, ATP synthesis by chemiosmotic coupling, and heat production by uncoupling proteins.; TP53 Regulates Metabolic Genes; Respiratory electron transport; Generic Transcription Pathway; Transcriptional Regulation by TP53; The citric acid (TCA) cycle and respiratory electron transport; Gene Expression; Metabolism
MUC18	NA	NA	0.68	NA	0.79	immunoglobulin superfamily cell adhesion molecule; receptor	
GPDM	NA	NA	0.61	NA	0.69		Metabolism of lipids and lipoproteins; Fatty acid, triacylglycerol, and ketone body metabolism; Metabolism
FNTA	0.77	NA	NA	NA	0.57	acyltransferase	Apoptotic execution phase; Programmed Cell Death; The phototransduction cascade; Apoptosis; Signal Transduction; Apoptotic cleavage of cellular proteins; Visual phototransduction; Inactivation, recovery and regulation of the phototransduction cascade
PPOX	0.34	NA	NA	NA	0.21	DNA methyltransferase; oxidase	Metabolism of porphyrins; Heme biosynthesis; Metabolism

CATC	0.75	NA	NA	0.69	NA	cysteine protease; protease inhibitor	Transport to the Golgi and subsequent modification; Asparagine N-linked glycosylation; Adaptive Immune System; Post-translational protein modification; Membrane Trafficking; Metabolism of proteins; Immune System; MHC class II antigen presentation; Vesicle-mediated transport; COPII (Coat Protein 2) Mediated Vesicle Transport; Cargo concentration in the ER; ER to Golgi Anterograde Transport
P5CS	NA	NA	0.49	NA	0.79	amino acid kinase; dehydrogenase	
S12A2	0.73	NA	0.74	NA	NA		Transport of inorganic cations/anions and amino acids/oligopeptides; Cation-coupled Chloride cotransporters; SLC-mediated transmembrane transport; Transmembrane transport of small molecules
H4	NA	NA	0.35	NA	0.75	histone	
DAB2	NA	NA	0.73	0.68	NA	signaling molecule	Membrane Trafficking; Vesicle-mediated transport; Gap junction degradation; Gap junction trafficking and regulation; Formation of annular gap junctions; Clathrin- mediated endocytosis; Cargo recognition for clathrin- mediated endocytosis; Gap junction trafficking
MPCP	NA	0.77	0.71	NA	NA		
CALD1	0.71	NA	NA	0.80	NA		Smooth Muscle Contraction; Muscle contraction

FBLN3	NA	NA	0.50	NA	0.71	annexin; calmodulin; cell adhesion molecule; extracellular matrix glycoprotein; extracellular matrix structural protein; signaling molecule	Elastic fibre formation; Extracellular matrix organization; Molecules associated with elastic fibres
MMRN1	NA	NA	NA	0.68	0.78	extracellular matrix glycoprotein	Response to elevated platelet cytosolic Ca ²⁺ ; Hemostasis; Platelet activation, signaling and aggregation; Platelet degranulation
GRAP; sp	0.67	NA	NA	0.36	NA		Signaling by SCF-KIT; Signal Transduction
SNX17	0.62	NA	NA	NA	0.55		
IMMT	NA	0.79	0.61	NA	NA		
RHG29	0.70	NA	NA	0.76	NA		Signal Transduction; Signaling by Rho GTPases; Rho GTPase cycle
H1BP3	0.72	NA	NA	NA	0.79		
OCAD2	NA	NA	0.46	NA	0.67	major histocompatibility complex antigen	
PREP	NA	0.62	0.51	NA	NA	metalloprotease	

MYH14	0.69	NA	NA	NA	0.80		Signal Transduction; Sema4D in semaphorin signaling; EPH-Ephrin signaling; Signaling by Rho GTPases; RHO GTPase Effectors; RHO GTPases activate PAKs; RHO GTPases activate CIT; Developmental Biology; Axon guidance; RHO GTPases Activate ROCKs; EPHA-mediated growth cone collapse; RHO GTPases activate PKNs; Semaphorin interactions; Sema4D induced cell migration and growth-cone collapse
CCD25	0.76	0.66	NA	NA	NA		
MESH1	0.04	NA	NA	NA	0.18		
FBLI1	NA	NA	0.73	0.80	NA	actin family cytoskeletal protein; cell junction protein; kinase modulator	Cell-extracellular matrix interactions; Cell-Cell communication; Cell junction organization
GGH	0.65	NA	NA	0.71	NA	cysteine protease	
PDLI5	0.76	NA	0.77	NA	NA	non-motor actin binding protein	Neuronal System; Protein-protein interactions at synapses; Interactions of neuroligins and neuroligins at synapses
PAWR	0.74	NA	NA	NA	0.63		
PLIN2	0.47	NA	NA	NA	0.53	transfer/carrier protein	Metabolism of lipids and lipoproteins; PPARA activates gene expression; Regulation of lipid metabolism by Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha); Fatty acid, triacylglycerol, and ketone body metabolism; Metabolism
PHB2	NA	NA	0.74	0.79	NA		

NDUAD	NA	NA	0.52	NA	0.74	dehydrogenase	Respiratory electron transport, ATP synthesis by chemiosmotic coupling, and heat production by uncoupling proteins.; Complex I biogenesis; Respiratory electron transport; The citric acid (TCA) cycle and respiratory electron transport; Metabolism
JCAD	NA	0.77	NA	NA	0.70		
Z3H7B	0.71	NA	NA	0.64	NA	nucleic acid binding	
MAGD2	NA	NA	0.70	0.79	NA	cell adhesion molecule	Response to elevated platelet cytosolic Ca ²⁺ ; Hemostasis; Platelet activation, signaling and aggregation; Platelet degranulation
EMIL1	0.72	NA	NA	NA	0.73	extracellular matrix glycoprotein	Elastic fibre formation; Extracellular matrix organization; Molecules associated with elastic fibres
PNPT1	0.63	NA	NA	0.15	NA	esterase; exoribonuclease; nucleotidyltransferase	
CDR2L	0.36	NA	0.43	NA	NA		
BGLR	0.69	NA	NA	0.67	NA		Metabolism; Hyaluronan uptake and degradation; Glycosaminoglycan metabolism; MPS VII - Sly syndrome; Diseases of carbohydrate metabolism; HS-GAG degradation; Diseases of metabolism; Hyaluronan metabolism; Disease; Mucopolysaccharidoses; Metabolism of carbohydrates
I2BP2	NA	0.75	NA	0.73	NA		
ROBO4	NA	0.71	NA	0.51	NA	transmembrane receptor regulatory/adaptor protein	
STMN2	0.79	NA	NA	0.78	NA		

Anexo C: Glicoproteínas aumentadas em células submetidas a ASS em relação à BSS, log2 da razão da concentração de proteína entre ASS/BSS, classes e vias que participam segundo banco de dados Reactome.

Genes	ASS/BSS 1	ASS/BSS 2	ASS/BSS 3	ASS/BSS 4	Classe	Via Reactome
EIF3A	0.825	NA	NA	NA	translation initiation factor	Formation of the ternary complex, and subsequently, the 43S complex; Activation of the mRNA upon binding of the cap-binding complex and eIFs, and subsequent binding to 43S; Formation of a pool of free 40S subunits; Cap-dependent Translation Initiation; Translation; GTP hydrolysis and joining of the 60S ribosomal subunit; Ribosomal scanning and start codon recognition; Metabolism of proteins; Translation initiation complex formation; L13a-mediated translational silencing of Ceruloplasmin expression; Gene Expression; Eukaryotic Translation Initiation
ITGB1	0.739	NA	NA	NA	cell adhesion molecule; extracellular matrix glycoprotein; receptor	Other semaphorin interactions; Basigin interactions; Molecules associated with elastic fibres; Hemostasis; Developmental Biology; Cell-Cell communication; Platelet Adhesion to exposed collagen; L1CAM interactions; RHO GTPase Effectors; Signaling by Rho GTPases; Cell-extracellular matrix interactions; Extracellular matrix organization; Cell junction organization; CHL1 interactions; Cell surface interactions at the vascular wall; Integrin cell surface interactions; ECM proteoglycans; Axon guidance; Signal transduction by L1; Signal Transduction; Semaphorin interactions; Non-integrin membrane-ECM interactions; Syndecan interactions; Immune System; Elastic fibre formation; RHO GTPases Activate Formins; Localization of the PINCH-ILK-PARVIN complex to focal adhesions; Fibronectin matrix formation; Laminin interactions
CAV1	0.673	NA	NA	NA	G-protein modulator; membrane traffic protein; structural protein; transmembrane receptor regulatory/adaptor protein	Lipid digestion, mobilization, and transport; Basigin interactions; Hemostasis; Signaling by Wnt; Metabolism of lipids and lipoproteins; Hormone-sensitive lipase (HSL)-mediated triacylglycerol hydrolysis; Metabolism of nitric oxide; Metabolism; Disassembly of the destruction complex and recruitment of AXIN to the membrane; eNOS activation; VEGFA-VEGFR2 Pathway; NOSTRIN mediated eNOS trafficking; Cell surface interactions at the vascular wall; TCF dependent signaling in response to WNT; eNOS activation and regulation; Signal Transduction; Signaling by VEGF; VEGFR2 mediated vascular permeability

CALR	0.643	NA	NA	NA	calcium-binding protein	Asparagine N-linked glycosylation; Class I MHC mediated antigen processing & presentation; N-glycan trimming in the ER and Calnexin/Calreticulin cycle; Disease; Post-translational protein modification; Unfolded Protein Response (UPR); Vesicle-mediated transport; Metabolism of proteins; ATF6-alpha activates chaperones; Antigen Presentation: Folding, assembly and peptide loading of class I MHC; Scavenging by Class F Receptors; Calnexin/calreticulin cycle; ER-Phagosome pathway; Scavenging by Class A Receptors; ATF6-alpha activates chaperone genes; Binding and Uptake of Ligands by Scavenger Receptors
HSP90B1	0.555	NA	NA	NA	Hsp90 family chaperone	ATF6-alpha activates chaperones; Metabolism of proteins; Toll-Like Receptors Cascades; Trafficking and processing of endosomal TLR; Binding and Uptake of Ligands by Scavenger Receptors; Immune System; Vesicle-mediated transport; ATF6-alpha activates chaperone genes; Scavenging by Class A Receptors; Unfolded Protein Response (UPR)
RCN1	0.534	NA	NA	NA	calmodulin	PERK regulates gene expression; IRE1alpha activates chaperones; Adaptive Immune System; Cellular responses to stress; ATF6-alpha activates chaperones; Metabolism of proteins; Class I MHC mediated antigen processing & presentation; Antigen Presentation: Folding, assembly and peptide loading of class I MHC; Platelet degranulation ; Immune System; Hemostasis; Response to elevated platelet cytosolic Ca2+; Regulation of HSF1-mediated heat shock response; ATF6-alpha activates chaperone genes; Cellular response to heat stress; Platelet activation, signaling and aggregation; Unfolded Protein Response (UPR)
HSPA5	0.516	NA	NA	NA		Recruitment of mitotic centrosome proteins and complexes; Cell Cycle, Mitotic; Cell Cycle; Mitotic G2-G2/M phases; G2/M Transition; Centrosome maturation; Recruitment of NuMA to mitotic centrosomes
NUMA1	NA	0.698	NA	NA		
PTMS	NA	0.634	NA	NA		
ECE1	NA	0.556	NA	NA	metalloprotease	
FLNC	NA	0.516	NA	NA		Cell-extracellular matrix interactions; Cell-Cell communication; Cell junction organization
BAG3	NA	0.479	NA	NA		Cellular responses to stress; Regulation of HSF1-mediated heat shock response; Cellular response to heat stress
HMGB2	NA	0.468	NA	NA	HMG box transcription factor; chromatin/chromatin-binding protein; signaling	Apoptotic execution phase; Programmed Cell Death; Apoptosis; Activation of DNA fragmentation factor; Apoptosis induced DNA fragmentation

CSTB	NA	0.415	NA	NA	cysteine protease inhibitor	
TGM2	NA	0.397	NA	NA	acyltransferase	
PTRF	NA	0.374	NA	NA	transcription factor	RNA Polymerase I, RNA Polymerase III, and Mitochondrial Transcription; RNA Polymerase I Transcription; RNA Polymerase I Transcription Termination; Gene Expression
RPL3	NA	0.370	NA	NA	ribosomal protein	Cap-dependent Translation Initiation; GTP hydrolysis and joining of the 60S ribosomal subunit; Translation; Eukaryotic Translation Termination; Formation of a pool of free 40S subunits; Metabolism; Metabolism of amino acids and derivatives; Metabolism of proteins; Major pathway of rRNA processing in the nucleolus and cytosol; Selenocysteine synthesis; Selenoamino acid metabolism; ; SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane;
LAMC1	NA	NA	0.743	NA	extracellular matrix linker protein; protease inhibitor; receptor	Laminin interactions; ECM proteoglycans; Developmental Biology; Extracellular matrix organization; L1CAM interactions; Degradation of the extracellular matrix; Axon guidance; Non-integrin membrane-ECM interactions
RPS10	NA	NA	0.556	NA	ribosomal protein	GTP hydrolysis and joining of the 60S ribosomal subunit; Cap-dependent Translation Initiation; Translation; Eukaryotic Translation Termination; Ribosomal scanning and start codon recognition; Formation of a pool of free 40S subunits; Gene Expression; Peptide chain elongation; L13a-mediated translational silencing of Ceruloplasmin expression; rRNA processing; Metabolism; Metabolism of amino acids and derivatives; Metabolism of proteins; Major pathway of rRNA processing in the nucleolus and cytosol; Selenocysteine synthesis; Formation of the ternary complex, and subsequently, the 43S complex; Selenoamino acid metabolism; Activation of the mRNA upon binding of the cap-binding complex and eIFs, and subsequent binding to 43S; rRNA processing in the nucleus and cytosol; Translation initiation complex formation; SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane
MYH10	NA	NA	0.398	NA		Signal Transduction; Sema4D in semaphorin signaling; Signaling by Rho GTPases; RHO GTPase Effectors; EPH-Ephrin signaling; RHO GTPases activate PAKs; RHO GTPases activate CIT; Developmental Biology; Axon guidance; RHO GTPases Activate ROCKs; EPHA-mediated growth cone collapse; RHO GTPases activate PKNs; Semaphorin interactions; Sema4D induced cell migration and growth-cone collapse

RPL26	NA	NA	0.368	NA	ribosomal protein	Cap-dependent Translation Initiation; GTP hydrolysis and joining of the 60S ribosomal subunit; Translation; Eukaryotic Translation Termination; Disease; Formation of a pool of free 40S subunits; Viral mRNA Translation; Infectious disease; Peptide chain elongation; Gene Expression; L13a-mediated translational silencing of Ceruloplasmin expression; rRNA processing; Metabolism; Metabolism of amino acids and derivatives; Major pathway of rRNA processing in the nucleolus and cytosol; Metabolism of proteins; Selenocysteine synthesis; Selenoamino acid metabolism; Influenza Viral RNA Transcription and Replication; rRNA processing in the nucleus and cytosol; SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane;
HMGN1	NA	NA	0.342	NA	chromatin/chromatin-binding protein	Transcription-Coupled Nucleotide Excision Repair (TC-NER); Nucleotide Excision Repair; Formation of TC-NER Pre-Incision Complex; Gap-filling DNA repair synthesis and ligation in TC-NER; Dual incision in TC-NER; DNA Repair Regulation of cholesterol biosynthesis by SREBP (SREBF); Interactions of Rev with host cellular proteins; Host Interactions of HIV factors; HIV Infection; Metabolism of lipids and lipoproteins; Disease; Gene Silencing by RNA; Infectious disease; Gene Expression; Metabolism; Nuclear import of Rev protein; Rev-mediated nuclear export of HIV RNA;
RAN	NA	NA	0.337	NA	small GTPase	MicroRNA (miRNA) biogenesis; tRNA processing in the nucleus; Transcriptional regulation by small RNAs; Export of Viral Ribonucleoproteins from Nucleus; HIV Life Cycle; NEP/NS2 Interacts with the Cellular Export Machinery; tRNA processing; Influenza Life Cycle; Influenza Infection; Late Phase of HIV Life Cycle
RECQL	NA	NA	0.308	NA	DNA helicase	
HHIP	NA	NA	0.298	NA		Hedgehog 'on' state; Ligand-receptor interactions; Signal Transduction; Signaling by Hedgehog
HNRNPM	NA	NA	NA	0.631	ribonucleoprotein	Signaling by FGFR2; FGFR2 alternative splicing; mRNA Splicing - Major Pathway; mRNA Splicing; Signal Transduction; Signaling by FGFR; Processing of Capped Intron-Containing Pre-mRNA; Gene Expression
BLMH	NA	NA	NA	0.541	cysteine protease	Class I MHC mediated antigen processing & presentation; Immune System; Antigen processing: Ubiquitination & Proteasome degradation; Adaptive Immune System Transport to the Golgi and subsequent modification; Asparagine N-linked glycosylation; Metabolism of Angiotensinogen to Angiotensins; Peptide hormone metabolism; Post-translational protein modification; trans-Golgi Network Vesicle Budding; Membrane Trafficking; Metabolism of proteins; Clathrin derived vesicle budding; Vesicle-mediated transport; Lysosome Vesicle Biogenesis; COPII (Coat Protein 2) Mediated Vesicle Transport; Cargo concentration in the ER; ER to Golgi Anterograde Transport
CTSZ	NA	NA	NA	0.480	cysteine protease; protease inhibitor	Post-translational protein modification; UCH proteinases; Deubiquitination
UCHL1	NA	NA	NA	0.441	cysteine protease	

HNRNPK	NA	NA	NA	0.408	enzyme modulator; mRNA splicing factor; ribonucleoprotein; serine protease	mRNA Splicing - Major Pathway; SUMOylation; SUMO E3 ligases SUMOylate target proteins; Post-translational protein modification; Processing of Capped Intron-Containing Pre-mRNA; Metabolism of proteins; Gene Expression; SUMOylation of RNA binding proteins; mRNA Splicing
--------	----	----	----	-------	--	--

Anexo D: Glicoproteínas aumentadas em células submetidas a BSS em relação à ASS, log2 da razão da concentração de proteína entre ASS/BSS, classes e vias que participam segundo banco de dados Reactome.

Genes	ASS/BSS 1	ASS/BSS 2	ASS/BSS 3	ASS/BSS 4	Classe	Via Reactome
ANXA1	-0.45	NA	NA	NA		Signal Transduction; Peptide ligand-binding receptors; G alpha (q) signalling events; Muscle contraction; G alpha (i) signalling events; GPCR ligand binding; Class A/1 (Rhodopsin-like receptors); Gastrin-CREB signalling pathway via PKC and MAPK; Formyl peptide receptors bind formyl peptides and many other ligands; Signaling by GPCR; Smooth Muscle Contraction; GPCR downstream signaling
MYH9	-0.47	NA	NA	NA		RHO GTPases Activate ROCKs; EPH-Ephrin signaling; Developmental Biology; RHO GTPase Effectors; RHO GTPases activate PKNs; Sema4D induced cell migration and growth-cone collapse; Signaling by Rho GTPases; Innate Immune System; RHO GTPases activate PAKs; Sema4D in semaphorin signaling; Axon guidance; Signal Transduction; Semaphorin interactions; EPHA-mediated growth cone collapse; Immune System; Regulation of actin dynamics for phagocytic cup formation; RHO GTPases activate CIT; Fcgamma receptor (FCGR) dependent phagocytosis
TMSB4X	-0.51	NA	NA	NA		Response to elevated platelet cytosolic Ca ²⁺ ; Hemostasis; Platelet activation, signaling and aggregation; Platelet degranulation
GANAB	-0.67	NA	NA	NA	glucosidase	N-glycan trimming in the ER and Calnexin/Calreticulin cycle; Asparagine N-linked glycosylation; Post-translational protein modification; Calnexin/calreticulin cycle; Metabolism of proteins
CSRP1	-1.40	NA	NA	NA	actin family cytoskeletal protein	
PDLIM5	NA	-0.51	NA	NA	non-motor actin binding protein	Neuronal System; Protein-protein interactions at synapses; Interactions of neuroligins and neuroligins at synapses
HIST1H1C	NA	-0.75	NA	NA	histone	Activation of DNA fragmentation factor; Programmed Cell Death; Cellular responses to stress; Apoptotic execution phase; Apoptosis induced DNA fragmentation; Apoptosis; DNA Damage/Telomere Stress Induced Senescence; Formation of Senescence-Associated Heterochromatin Foci (SAHF); Cellular Senescence Signal Transduction; Extracellular matrix organization; SMAD2/SMAD3:SMAD4 heterotrimer regulates transcription; Generic Transcription Pathway; ECM proteoglycans; Transcriptional activity of SMAD2/SMAD3:SMAD4 heterotrimer; Circadian Clock; Dissolution of Fibrin Clot; Gene Expression; Platelet degranulation ; Hemostasis; Signaling by TGF-beta Receptor Complex; BMAL1:CLOCK,NPAS2 activates circadian gene expression; Response to elevated platelet cytosolic Ca ²⁺ ; Platelet activation, signaling and aggregation
SERPINE1	NA	-0.97	NA	NA	serine protease inhibitor	
EFEMP1	NA	-1.10	NA	NA	annexin;cell adhesion molecule;extracellular matrix	Elastic fibre formation; Extracellular matrix organization; Molecules associated with elastic fibres

LIMA1	NA	NA	-0.30	NA	glycoprotein;signaling molecule actin family cytoskeletal protein;nuclease;transcription factor	Cap-dependent Translation Initiation; GTP hydrolysis and joining of the 60S ribosomal subunit; Cytokine Signaling in Immune system; Translation; Interferon Signaling; Ribosomal scanning and start codon recognition; Signaling by Insulin receptor; Insulin receptor signalling cascade; Signaling by Type 1 Insulin-like Growth Factor 1 Receptor (IGF1R); Gene Expression; L13a-mediated translational silencing of Ceruloplasmin expression; PI3K Cascade; Deadenylation of mRNA; PKB-mediated events; Metabolism of proteins; Deadenylation-dependent mRNA decay; Regulation of mRNA stability by proteins that bind AU-rich elements; Activation of the mRNA upon binding of the cap-binding complex and eIFs, and subsequent binding to 43S; Signal Transduction; IRS-mediated signalling; AUF1 (hnRNP D0) binds and destabilizes mRNA; Translation initiation complex formation; mTOR signalling; mTORC1-mediated signalling
EIF4G1	NA	NA	-0.31	NA	translation initiation factor	Cell Cycle, Mitotic; Assembly of the primary cilium; Loss of Nlp from mitotic centrosomes; Apoptosis; G2/M Transition; Centrosome maturation; Programmed Cell Death; Gene Expression; Membrane Trafficking; RHO GTPase Effectors; AURKA Activation by TPX2; Loss of proteins required for interphase microtubule organization from the centrosome; RHO GTPases activate PKNs; G2/M DNA damage checkpoint; Transcriptional Regulation by TP53; Signaling by Rho GTPases; Activation of BH3-only proteins; Organelle biogenesis and maintenance; Generic Transcription Pathway; Vesicle-mediated transport; Activation of BAD and translocation to mitochondria ; Anchoring of the basal body to the plasma membrane; Mitotic G2-G2/M phases; Intrinsic Pathway for Apoptosis; Regulation of PLK1 Activity at G2/M Transition; Recruitment of mitotic centrosome proteins and complexes; Translocation of GLUT4 to the plasma membrane
YWHAG	NA	NA	-0.31	NA	chaperone	Protein folding; Association of TriC/CCT with target proteins during biosynthesis; Cooperation of PDCL (PhLP1) and TriC/CCT in G-protein beta folding; Chaperonin-mediated protein folding; Cooperation of Prefoldin and TriC/CCT in actin and tubulin folding; Formation of tubulin folding intermediates by CCT/TriC; Prefoldin mediated transfer of substrate to CCT/TriC; Metabolism of proteins; Folding of actin by CCT/TriC
EMCN	NA	NA	-0.32	NA		
CCT7	NA	NA	-0.33	NA	chaperonin	

CCT2	NA	NA	-0.34	NA	chaperonin	Association of TriC/CCT with target proteins during biosynthesis; Protein folding; Cooperation of PDCL (PhLP1) and TRiC/CCT in G-protein beta folding; Organelle biogenesis and maintenance; Chaperonin-mediated protein folding; Formation of tubulin folding intermediates by CCT/TriC; Cooperation of Prefoldin and TriC/CCT in actin and tubulin folding; Prefoldin mediated transfer of substrate to CCT/TriC; Assembly of the primary cilium; Metabolism of proteins; BBSome-mediated cargo-targeting to cilium; Folding of actin by CCT/TriC; Cargo trafficking to the periciliary membrane
ALYREF	NA	NA	-0.36	NA	RNA binding protein	mRNA Splicing - Major Pathway; Transport of Mature mRNA derived from an Intron-Containing Transcript; mRNA 3'-end processing; Transport of Mature mRNAs Derived from Intronless Transcripts; Processing of Capped Intron-Containing Pre-mRNA; Transport of Mature mRNA Derived from an Intronless Transcript; Transport of Mature Transcript to Cytoplasm; Transport of the SLBP Dependant Mature mRNA; RNA Polymerase II Transcription; Transport of the SLBP independent Mature mRNA; RNA Polymerase II Transcription Termination; Gene Expression; Cleavage of Growing Transcript in the Termination Region
PDLIM4	NA	NA	-0.36	NA	non-motor actin binding protein	
VPS35	NA	NA	-0.37	NA	membrane traffic protein	WNT ligand biogenesis and trafficking; Signal Transduction; Signaling by Wnt PI3K/AKT activation; Platelet activation, signaling and aggregation; PTK6 Regulates RHO GTPases, RAS GTPase and MAP kinases; Metabolism of proteins; p75 NTR receptor-mediated signalling; Deubiquitination; Post-translational protein modification; Rho GTPase cycle; TGF-beta receptor signaling in EMT (epithelial to mesenchymal transition); Signal Transduction; Signaling by VEGF; Axon guidance; RHO GTPases Activate Rhotekin and RhoGTPases; Signaling by Wnt; Signaling by TGF-beta Receptor Complex; Sema4D in semaphorin signaling; RHO GTPases activate KTN1; Signaling by GPCR; EPH-Ephrin signaling; G beta:gamma signalling through PI3Kgamma; VEGFA-VEGFR2 Pathway; RHO GTPases activate PKNs; Signaling by Rho GTPases; RHO GTPases activate CIT; Hemostasis; Beta-catenin independent WNT signaling; Sema4D mediated inhibition of cell attachment and migration; Signaling by ERBB2
RHOA	NA	NA	-0.40	NA	small GTPase	
MAP4	NA	NA	-0.40	NA		
METAP2	NA	NA	-0.50	NA		The phototransduction cascade; Signal Transduction; Visual phototransduction; Inactivation, recovery and regulation of the phototransduction cascade
CNBP	NA	NA	NA	-0.35		

FKBP1A	NA	NA	NA	-0.36	calcium-binding protein;chaperone;isomerase	Signal Transduction; TGFBR2 Kinase Domain Mutants in Cancer; TGF-beta receptor signaling activates SMADs; TGF-beta receptor signaling in EMT (epithelial to mesenchymal transition); Loss of Function of TGFBR2 in Cancer; TGFBR1 LBD Mutants in Cancer; Loss of Function of TGFBR1 in Cancer; Signaling by TGF-beta Receptor Complex in Cancer; TGFBR1 KD Mutants in Cancer; Disease; Signaling by TGF-beta Receptor Complex; Diseases of signal transduction
COPB1	NA	NA	NA	-0.36	vesicle coat protein	Golgi-to-ER retrograde transport; COPI-dependent Golgi-to-ER retrograde traffic; Transport to the Golgi and subsequent modification; Asparagine N-linked glycosylation; Post-translational protein modification; Metabolism of proteins; Membrane Trafficking; Intra-Golgi and retrograde Golgi-to-ER traffic; Vesicle-mediated transport; COPI-mediated anterograde transport; ER to Golgi Anterograde Transport
RPS20	NA	NA	NA	-0.37	ribosomal protein	GTP hydrolysis and joining of the 60S ribosomal subunit; Cap-dependent Translation Initiation; Translation; Ribosomal scanning and start codon recognition; Eukaryotic Translation Termination; Formation of a pool of free 40S subunits; Infectious disease; Peptide chain elongation; Gene Expression; L13a-mediated translational silencing of Ceruloplasmin expression; rRNA processing; Metabolism; Metabolism of amino acids and derivatives; Metabolism of proteins; Major pathway of rRNA processing in the nucleolus and cytosol; Selenocysteine synthesis; Formation of the ternary complex, and subsequently, the 43S complex; Selenoamino acid metabolism; Activation of the mRNA upon binding of the cap-binding complex and eIFs, and subsequent binding to 43S; rRNA processing in the nucleus and cytosol; Translation initiation complex formation; SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane
S100A6	NA	NA	NA	-0.39	calmodulin;signaling molecule	G2/M Transition; Constitutive Signaling by Ligand-Responsive EGFR Cancer Variants; Metabolism; EPHA-mediated growth cone collapse; Cellular responses to stress; Gene Silencing by RNA; Assembly of the primary cilium; eNOS activation; Cellular response to heat stress; Gene Expression; Scavenging by Class F Receptors; Constitutive Signaling by EGFRvIII; Semaphorin interactions; Developmental Biology; Loss of Nlp from mitotic centrosomes; The role of GTSE1 in G2/M progression after G2 checkpoint; Centrosome maturation; eNOS activation and regulation; Organelle biogenesis and maintenance; Regulation of actin dynamics for phagocytic cup formation; Loss of proteins required for interphase microtubule organization from the centrosome; Fcgamma receptor (FCGR) dependent phagocytosis; Signal Transduction; Signaling by VEGF; Innate Immune System; HSF1 activation; HSF1-dependent transactivation; Anchoring of the basal body to the plasma membrane; Influenza Viral RNA Transcription and Replication; Metabolism of nitric oxide; EPH-Ephrin signaling; VEGFR2 mediated vascular permeability
HSP90AA1	NA	NA	NA	-0.47	Hsp90 family chaperone	

PRPF40A	NA	NA	NA	-0.48	mRNA Splicing - Major Pathway; mRNA Splicing; Processing of Capped Intron-Containing Pre-mRNA; Gene Expression
ILK	NA	NA	NA	-0.67	Cell-extracellular matrix interactions; Cell-Cell communication; Cell junction organization; Localization of the PINCH-ILK-PARVIN complex to focal adhesions

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brown AJ, Teng Z, Evans PC, Gillard JH, Samady H, Bennett MR. Role of biomechanical forces in the natural history of coronary atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol*. Nature Publishing Group; 2016;13(4):210–20.
2. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012 Sep;32(9):2045–51.
3. Galkina E, Ley K. Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007 Nov;27(11):2292–301.
4. Libby P. Mechanisms of Acute Coronary Syndromes and Their Implications for Therapy — NEJM. *N Engl J Med*. 2013;368(21):2004–13.
5. Yurdagul A, Finney AC, Woolard MD, Orr AW. The arterial microenvironment: the where and why of atherosclerosis. *Biochem J*. 2016;473(10):1281–95.
6. Hahn C, Schwartz MA. *NIH Public Access*. 2009;10(1):53–62.
7. Chien S. Mechanotransduction and endothelial cell homeostasis: the wisdom of the cell. *Am J Physiol Hear Circ Physiol*. 2007 Mar;292(3):H1209-24.
8. Uzarski JS, Scott EW, McFetridge PS. Adaptation of endothelial cells to physiologically-modeled, variable shear stress. *PLoS One*. 2013 Jan;8(2):e57004.
9. Davies PF. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev*. 1995 Jul;75(3):519–60.
10. Soulis J V., Farmakis TM, Giannoglou GD, Louridas GE. Wall shear stress in normal left coronary artery tree. *J Biomech*. 2006;39(4):742–9.
11. Zarins CK, Giddens DP, Bharadvaj BK, Sottiurai VS, Mabon RF, Glagov

- S. Carotid bifurcation atherosclerosis. Quantitative correlation of plaque localization with flow velocity profiles and wall shear stress. *Circ Res.* 1983;53(4):502–14.
12. Ku DN, Giddens DP, Zarins CK, Glagov S. Pulsatile flow and atherosclerosis in the human carotid bifurcation. Positive correlation between plaque location and low oscillating shear stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1985;5(3):293–302.
 13. Caro CG, Fitz-Gerald JM, Schroter RC. Arterial wall shear and distribution of early atheroma in man. *Nature.* 1969 Sep 13;223(5211):1159–60.
 14. Warboys CM, Amini N, De Luca A, Evans PC. The role of blood flow in determining the sites of atherosclerotic plaques. *F1000 Med Rep. Faculty of 1000 Ltd;* 2011 Jan;3(March):5.
 15. Malek AM, Alper SL, Izumo S. Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis. *JAMA.* 1999 Dec 1;282(21):2035–42.
 16. Brooks AR, Lelkes PI, Rubanyi GM. Gene expression profiling of vascular endothelial cells exposed to fluid mechanical forces: relevance for focal susceptibility to atherosclerosis. *Endothelium.* 2004;11(1):45–57.
 17. Brooks AR, Lelkes PI, Rubanyi GM. Gene expression profiling of human aortic endothelial cells exposed to disturbed flow and steady laminar flow. *Physiol Genomics.* 2002 Jan;9(1):27–41.
 18. Passerini AG, Polacek DC, Shi C, Francesco NM, Manduchi E, Grant GR, et al. Coexisting proinflammatory and antioxidative endothelial transcription profiles in a disturbed flow region of the adult porcine aorta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Feb 24;101(8):2482–7.
 19. Nagel T, Resnick N, Dewey CF, Gimbrone M a. Vascular Endothelial Cells Respond to Spatial Gradients in Fluid Shear Stress by Enhanced Activation of Transcription Factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999 Aug 1;19(8):1825–34.
 20. Wang X-L, Fu A, Raghavakaimal S, Lee H-C. Proteomic analysis of vascular endothelial cells in response to laminar shear stress.

- Proteomics. 2007 Mar;7(4):588–96.
21. Rubanyi GM, Romero JC, Vanhoutte PM. Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol*. 1986 Jun;250(6 Pt 2):H1145-9.
 22. Awolesi MA, Widmann MD, Sessa WC, Sumpio BE. Cyclic strain increases endothelial nitric oxide synthase activity. *Surgery*. 1994 Aug;116(2):439-44; discussion 444-5.
 23. Dimmeler S, Hermann C, Galle J, Zeiher a. M. Upregulation of Superoxide Dismutase and Nitric Oxide Synthase Mediates the Apoptosis-Suppressive Effects of Shear Stress on Endothelial Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999 Mar 1;19(3):656–64.
 24. Kuhlencordt PJ, Rosel E, Gerszten RE, Morales-Ruiz M, Dombkowski D, Atkinson WJ, et al. Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial activation: insights from eNOS knockout endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004 May;286(5):C1195-202.
 25. Tricot O, Mallat Z, Heymes C, Belmin J, Leseche G, Tedgui a. Relation Between Endothelial Cell Apoptosis and Blood Flow Direction in Human Atherosclerotic Plaques. *Circulation*. 2000 May 30;101(21):2450–3.
 26. Langille BL, Graham JJ, Kim D, Gotlieb a. I. Dynamics of shear-induced redistribution of F-actin in endothelial cells in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1991 Nov 1;11(6):1814–20.
 27. Vyalov S, Langille BL, Gotlieb a I. Decreased blood flow rate disrupts endothelial repair in vivo. *Am J Pathol*. 1996 Dec;149(6):2107–18.
 28. Himburg H a, Grzybowski DM, Hazel AL, LaMack J a, Li X-M, Friedman MH. Spatial comparison between wall shear stress measures and porcine arterial endothelial permeability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004 May;286(5):H1916-22.
 29. Kim DW, Langille BL, Wong MK, Gotlieb AI. Patterns of endothelial microfilament distribution in the rabbit aorta in situ. *Circ Res*. 1989 Jan;64(1):21–31.

30. Lee T-YJ, Gotlieb AI. Microfilaments and microtubules maintain endothelial integrity. *Microsc Res Tech*. 2003 Jan 1;60(1):115–27.
31. Urschel K, Cicha I, Daniel WG, Garlichs CD. Shear stress patterns affect the secreted chemokine profile in endothelial cells. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2012 Jan;50(1–2):143–52.
32. Simmons RD, Kumar S, Jo H. The role of endothelial mechanosensitive genes in atherosclerosis and omics approaches. Vol. 591, *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2016. p. 111–31.
33. Hynes RO. Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. Vol. 110, *Cell*. 2002. p. 673–87.
34. Urbich C, Dernbach E, Reissner A, Vasa M, Zeiher AM, Dimmeler S. Shear stress-induced endothelial cell migration involves integrin signaling via the fibronectin receptor subunits alpha(5) and beta(1). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22(1):69–75.
35. Mederos y Schnitzler M, Storch U, Gudermann T. AT1 receptors as mechanosensors. *Curr Opin Pharmacol*. 2011;11(2):112–6.
36. Barauna VG, Magalhaes FC, Campos LCG, Reis RI, Kunapuli SP, Costa-Neto CM, et al. Shear Stress-Induced Ang II AT1 Receptor Activation: G-Protein Dependent and Independent Mechanisms. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Apr 11;
37. Barauna VG, Mantuan PR, Magalhães FC, Campos LCG, Krieger JE. AT1 receptor blocker potentiates shear-stress induced nitric oxide production via modulation of eNOS phosphorylation of residues Thr(495) and Ser(1177.). *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Nov 29;441(4):713–9.
38. Rakesh K, Yoo B, Kim I-M, Salazar N, Kim K-S, Rockman HA. beta-Arrestin-biased agonism of the angiotensin receptor induced by mechanical stress. *Sci Signal*. 2010;3(125):ra46.
39. Osawa M, Masuda M, Harada N, Lopes RB, Fujiwara K. Tyrosine phosphorylation of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-

- 1, CD31) in mechanically stimulated vascular endothelial cells. *Eur J Cell Biol.* 1997;72:229–37.
40. Osawa M, Masuda M, Kusano KI, Fujiwara K. Evidence for a role of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 in endothelial cell mechanosignal transduction: Is it a mechanoresponsive molecule? *J Cell Biol.* 2002;158(4):773–85.
41. Tzima E, Irani-Tehrani M, Kiosses WB, Dejana E, Schultz DA, Engelhardt B, et al. A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature.* 2005 Sep;437(7057):426–31.
42. Tzima E, Del Pozo MA, Shattil SJ, Chien S, Schwartz MA. Activation of integrins in endothelial cells by fluid shear stress mediates Rho-dependent cytoskeletal alignment. *EMBO J.* 2001;20(17):4639–47.
43. Rizzo V, Morton C, Depaola N, Schnitzer JE, Davies PF. Recruitment of endothelial caveolae into mechanotransduction pathways by flow conditioning in vitro. *Am J Physiol Hear Circ Physiol.* 2003;285:1720–9.
44. Sun X, Fu Y, Gu M, Zhang L, Li D, Li H, et al. Activation of integrin $\alpha 5$ mediated by flow requires its translocation to membrane lipid rafts in vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A. National Academy of Sciences;* 2016 Jan 19;113(3):769–74.
45. Fu Y, Hou Y, Fu C, Gu M, Li C, Kong W, et al. A novel mechanism of γ/δ T-lymphocyte and endothelial activation by shear stress: the role of ecto-ATP synthase β chain. *Circ Res. American Heart Association, Inc.;* 2011 Feb 18;108(4):410–7.
46. Frank PG, Pavlides S, Cheung MW-C, Daumer K, Lisanti MP. Role of caveolin-1 in the regulation of lipoprotein metabolism. *Am J Physiol Cell Physiol. American Physiological Society;* 2008 Jul;295(1):C242-8.
47. Pahakis MY, Kosky JR, Dull RO, Tarbell JM. The role of endothelial glycocalyx components in mechanotransduction of fluid shear stress. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;355(1):228–33.
48. Pries AR, Secomb TW, Gaehtgens P. The endothelial surface layer. Vol.

- 440, Pflugers Archiv European Journal of Physiology. 2000. p. 653–66.
49. Zeng Y, Tarbell JM. The Adaptive Remodeling of Endothelial Glycocalyx in Response to Fluid Shear Stress. Vinci MC, editor. PLoS One. Public Library of Science; 2014 Jan 20;9(1):e86249.
 50. Florian JA, Kosky JR, Ainslie K, Pang Z, Dull RO, Tarbell JM. Heparan sulfate proteoglycan is a mechanosensor on endothelial cells. *Circ Res.* American Heart Association, Inc.; 2003 Nov 14;93(10):e136-42.
 51. Thi MM, Tarbell JM, Weinbaum S, Spray DC. The role of the glycocalyx in reorganization of the actin cytoskeleton under fluid shear stress: A “bumper-car” model. *Proc Natl Acad Sci.* 2004 Nov 23;101(47):16483–8.
 52. VANTHIENEN J, FLEDDERUS J, DEKKER R, ROHLENA J, VANIJZENDOORN G, KOOTSTRA N, et al. Shear stress sustains atheroprotective endothelial KLF2 expression more potently than statins through mRNA stabilization. *Cardiovasc Res.* 2006 Nov 1;72(2):231–40.
 53. Dekker RJ, Boon RA, Rondaij MG, Kragt A, Volger OL, Elderkamp YW, et al. KLF2 provokes a gene expression pattern that establishes functional quiescent differentiation of the endothelium. *Blood.* 2006;107(11):4354–63.
 54. Parmar KM, Larman HB, Dai G, Zhang Y, Wang ET, Moorthy SN, et al. Integration of flow-dependent endothelial phenotypes by Kruppel-like factor 2. *J Clin Invest.* 2006;116(1):49–58.
 55. Hecker M, Mulsch A, Bassenge E, Forstermann U, Busse R. Subcellular localization and characterization of nitric oxide synthase(s) in endothelial cells: physiological implications. Vol. 299 (Pt 1, *Biochem.J.* 1994. p. 247–52.
 56. Tran J, Magenau A, Rodriguez M, Rentero C, Royo T, Enrich C, et al. Activation of endothelial nitric oxide (eNOS) occurs through different membrane domains in endothelial cells. *PLoS One.* 2016;11(3):1–20.
 57. Laufs U, Liao JK. Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide

- synthase mRNA stability by Rho GTPase. *J Biol Chem.* 1998;273(37):24266–71.
58. Carneiro AP, Fonseca-Alaniz MH, Dallan LAO, Miyakawa AA, Krieger JE. β -arrestin is critical for early shear stress-induced Akt/eNOS activation in human vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* Academic Press; 2017 Jan 29;483(1):75–81.
 59. De Keulenaer GW, Chappell DC, Ishizaka N, Nerem RM, Alexander RW, Griending KK. Oscillatory and steady laminar shear stress differentially affect human endothelial redox state: Role of a superoxide-producing NADH Oxidase. *Circ Res.* 1998;82(10):1094–101.
 60. Chiu J-J, Chien S. Effects of Disturbed Flow on Vascular Endothelium: Pathophysiological Basis and Clinical Perspectives. *Physiol Rev.* 2011;91(1):327–87.
 61. Hsieh H-J, Liu C-A, Huang B, Tseng AH, Wang D. Shear-induced endothelial mechanotransduction: the interplay between reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) and the pathophysiological implications. *J Biomed Sci.* 2014;21(1):3.
 62. Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev Y V. Effects of shear stress on endothelial cells: go with the flow. *Acta Physiol.* 2017 Feb 1;219(2):382–408.
 63. Mohan S, Mohan N, Sprague EA. Differential activation of NF-kappa B in human aortic endothelial cells conditioned to specific flow environments. *Am J Physiol.* 1997;273(2 Pt 1):C572-8.
 64. Wang Y, Flores L, Lu S, Miao H, Li Y-S, Chien S. Shear Stress Regulates the Flk-1/Cbl/PI3K/NF- κ B Pathway Via Actin and Tyrosine Kinases. *Cell Mol Bioeng.* 2009 Sep 1;2(3):341–50.
 65. Walpola PL, Gotlieb AI, Cybulsky MI, Langille BL. Expression of ICAM-1 and VCAM-1 and monocyte adherence in arteries exposed to altered shear stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15(1):2–10.
 66. Bailey KA, Haj FG, Simon SI, Passerini AG. Atherosusceptible Shear

- Stress Activates Endoplasmic Reticulum Stress to Promote Endothelial Inflammation. *Sci Rep. Nature Publishing Group*; 2017 Aug;7(1):8196.
67. Lawrence MB, Smith CW, Eskin SG, McIntire L V. Effect of venous shear stress on CD18-mediated neutrophil adhesion to cultured endothelium. *Blood*. 1990;75:227–37.
 68. Aoki T, Yamamoto K, Fukuda M, Shimogonya Y, Fukuda S, Narumiya S. Sustained expression of MCP-1 by low wall shear stress loading concomitant with turbulent flow on endothelial cells of intracranial aneurysm. *Acta Neuropathol Commun*. 2016;4(1):48.
 69. Morikawa S, Takabe W, Mataka C, Kanke T, Itoh T, Wada Y, et al. The effect of statins on mRNA levels of genes related to inflammation, coagulation, and vascular constriction in HUVEC. Human umbilical vein endothelial cells. Vol. 9, *Journal of atherosclerosis and thrombosis*. 2002. p. 178–83.
 70. Ajami NE, Gupta S, Maurya MR, Nguyen P, Li JY-S, Shyy JY-J, et al. Systems biology analysis of longitudinal functional response of endothelial cells to shear stress. *Proc Natl Acad Sci*. 2017 Sep 26;201707517.
 71. Xu S, Koroleva M, Yin M, Jin ZG. Atheroprotective laminar flow inhibits Hippo pathway effector YAP in endothelial cells. *Transl Res. NIH Public Access*; 2016;176:18–28.e2.
 72. Nakajima H, Yamamoto K, Agarwala S, Terai K, Fukui H, Fukuhara S, et al. Flow-Dependent Endothelial YAP Regulation Contributes to Vessel Maintenance. *Dev Cell. Elsevier*; 2017 Mar 27;40(6):523–536.e6.
 73. Wang L, Luo J-Y, Li B, Tian XY, Chen L-J, Huang Y, et al. Integrin-YAP/TAZ-JNK cascade mediates atheroprotective effect of unidirectional shear flow. *Nature. Nature Publishing Group*; 2016 Dec 7;540(7634):579–82.
 74. Feng S, Bowden N, Fragiadaki M, Souilhol C, Hsiao S, Mahmoud M, et al. Mechanical Activation of Hypoxia-Inducible Factor 1 α Drives Endothelial

- Dysfunction at Atheroprone Sites. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Wolters Kluwer Health; 2017 Nov;37(11):2087–101.
75. Desai SY, Marroni M, Cucullo L, Krizanac-Bengez L, Mayberg MR, Hossain MT, et al. Mechanisms of endothelial survival under shear stress. *Endothelium*. 2002;9(February 2016):89–102.
 76. Bassaneze V, Barauna VG, Lavini-Ramos C, Kalil J, Schettert IT, Miyakawa AA, et al. Shear stress induces nitric oxide-mediated vascular endothelial growth factor production in human adipose tissue mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2010 Mar;19(3):371–8.
 77. Dumas M-E, Adamski J, Suhre K. Guest Editorial: Special issue on metabolomics. *Arch Biochem Biophys*. 2016;589(October):1–3.
 78. Castelli WP, Anderson K, Wilson PWF, Levy D. Lipids and risk of coronary heart disease The Framingham Study. *Ann Epidemiol*. 1992 Jan;2(1–2):23–8.
 79. Chen X, Liu L, Palacios G, Gao J, Zhang N, Li G, et al. Plasma metabolomics reveals biomarkers of the atherosclerosis. *J Sep Sci*. Wiley-Blackwell; 2010 Sep;33(17–18):2776–83.
 80. Cheng K-K, Martin Benson G, Grimsditch DC, Reid DG, Connor SC, Griffin JL, et al. Metabolomic study of the LDL receptor null mouse fed a high-fat diet reveals profound perturbations in choline metabolism that are shared with ApoE null mice.
 81. Go Y-M, Kim CW, Walker DI, Kang DW, Kumar S, Orr M, et al. Disturbed flow induces systemic changes in metabolites in mouse plasma: a metabolomics study using ApoE^{-/-} mice with partial carotid ligation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. American Physiological Society; 2015 Jan;308(1):R62-72.
 82. Bhagyalakshmi A, Berthiaume F, Reich KM, Frangos JA. Fluid Shear Stress Stimulates Membrane Phospholipid Metabolism in Cultured Human Endothelial Cells. *J Vasc Res*. 1992;29(6):443–9.
 83. Butler PJ, Norwich G, Weinbaum S, Chien S. Shear stress induces a

- time-and position-dependent increase in endothelial cell membrane fluidity.
84. Yamamoto K, Ando J. Vascular endothelial cell membranes differentiate between stretch and shear stress through transitions in their lipid phases. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2015;ajpheart.00241.2015.
 85. Mayr M, Chung Y-L, Mayr U, Yin X, Ly L, Troy H, et al. Proteomic and metabolomic analyses of atherosclerotic vessels from apolipoprotein E-deficient mice reveal alterations in inflammation, oxidative stress, and energy metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. American Heart Association, Inc.; 2005 Oct 1;25(10):2135–42.
 86. Serbanovic-Canic J, de Luca A, Warboys C, Ferreira PF, Luong LA, Hsiao S, et al. Zebrafish Model for Functional Screening of Flow-Responsive Genes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Wolters Kluwer Health; 2017;37(1):130–43.
 87. Firasat S, Hecker M, Binder L, Asif AR. Advances in endothelial shear stress proteomics. *Expert Rev Proteomics*. 2014;11(5):611–9.
 88. Chen Z, Peng I-C, Sun W, Su M-I, Hsu P-H, Fu Y, et al. AMP-Activated Protein Kinase Functionally Phosphorylates Endothelial Nitric Oxide Synthase Ser633. *Circ Res*. 2009 Jan 2;104(4):496–505.
 89. Gallis B, Corthals GL, Goodlett DR, Ueba H, Kim F, Presnell SR, et al. Identification of flow-dependent endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation sites by mass spectrometry and regulation of phosphorylation and nitric oxide production by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor LY294002. *J Biol Chem*. 1999 Oct 15;274(42):30101–8.
 90. Wen L, Chen Z, Zhang F, Cui X, Sun W, Geary GG, et al. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase phosphorylation of Sirtuin 1 in endothelium is atheroprotective. *Proc Natl Acad Sci*. 2013 Jun 25;110(26):E2420–7.
 91. Huang B, Chen SC, Wang DL. Shear flow increases S-nitrosylation of proteins in endothelial cells. *Cardiovasc Res*. 2009 Aug 1;83(3):536–46.

92. HSAI T, HWANG J, BARR M, CORREA A, HAMILTON R, ALAVI M, et al. Hemodynamics influences vascular peroxynitrite formation: Implication for low-density lipoprotein apo-B-100 nitration. *Free Radic Biol Med*. 2007 Feb 15;42(4):519–29.
93. Moremen KW, Tiemeyer M, Nairn A V. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. NIH Public Access; 2012 Jun 22;13(7):448–62.
94. Dennis JW, Lau KS, Demetriou M, Nabi IR. Adaptive Regulation at the Cell Surface by *N*-Glycosylation. *Traffic*. Blackwell Publishing Ltd; 2009 Nov 1;10(11):1569–78.
95. Stadlmann J, Taubenschmid J, Wenzel D, Gattinger A, Dürnberger G, Dusberger F, et al. Comparative glycoproteomics of stem cells identifies new players in ricin toxicity. *Nature*. 2017 Sep 20;549(7673):538–42.
96. Pedersen NB, Wang S, Narimatsu Y, Yang Z, Halim A, Schjoldager KT-BG, et al. Low density lipoprotein receptor class A repeats are O-glycosylated in linker regions. *J Biol Chem*. 2014 Jun 20;289(25):17312–24.
97. Ong S, Mann M. A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). *Nat Protoc*. 2006;1(6):2650–60.
98. Mann M. Functional and quantitative proteomics using SILAC. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006 Dec;7(12):952–8.
99. Bendall SC, Hughes C, Stewart MH, Doble B, Bhatia M, Lajoie G a. Prevention of amino acid conversion in SILAC experiments with embryonic stem cells. *Mol Cell Proteomics*. 2008 Sep;7(9):1587–97.
100. Coleman SE. The development of an in vitro flow simulation device to study the effects of arterial shear stress profiles on endothelial cells. 2005.
101. Noria S, Cowan DB, Gotlieb a I, Langille BL. Transient and steady-state effects of shear stress on endothelial cell adherens junctions. *Circ Res*. 1999;85(6):504–14.

102. VANTHIENEN J, FLEDDERUS J, DEKKER R, ROHLENA J, VANIJZENDOORN G, KOOTSTRA N, et al. Shear stress sustains atheroprotective endothelial KLF2 expression more potently than statins through mRNA stabilization. *Cardiovasc Res.* 2006 Nov;72(2):231–40.
103. Wolters DA, Washburn MP, Yates JR. An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. *Anal Chem.* 2001;73(23):5683–90.
104. Cox J, Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol.* 2008;26(12):1367–72.
105. Cox J, Matic I, Hilger M, Nagaraj N, Selbach M, Olsen J V, et al. A practical guide to the MaxQuant computational platform for SILAC-based quantitative proteomics. *Nat Protoc.* 2009;4(5):698–705.
106. Cox J, Neuhauser N, Michalski A, Scheltema RA, Olsen J V., Mann M. Andromeda: A peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. *J Proteome Res.* 2011;10(4):1794–805.
107. Tyanova S, Mann M, Cox J. MaxQuant for in-depth analysis of large SILAC datasets. *Methods Mol Biol.* 2014;1188:351–64.
108. Peng M. *Bioinformatics applications in proteomics data analysis.* Utrecht University; 2015. 1-158 p.
109. Mi H, Poudel S, Muruganujan A, Casagrande JT, Thomas PD. PANTHER version 10: expanded protein families and functions, and analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 2015;44(D1):D336-42.
110. Mi H, Muruganujan A, Casagrande JT, Thomas PD. Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system. *Nat Protoc.* 2013;8(8):1551–66.
111. Fiehn O. *Metabolomics by Gas Chromatography-Mass Spectrometry: Combined Targeted and Untargeted Profiling.* *Curr Protoc Mol Biol.* NIH Public Access; 2016 Apr 1;114:30.4.1-30.4.32.

112. Kind T, Wohlgemuth G, Lee DY, Lu Y, Palazoglu M, Shahbaz S, et al. FiehnLib: Mass Spectral and Retention Index Libraries for Metabolomics Based on Quadrupole and Time-of-Flight Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Anal Chem.* American Chemical Society; 2009 Dec 15;81(24):10038–48.
113. Xia J, Sinelnikov I V., Han B, Wishart DS. MetaboAnalyst 3.0--making metabolomics more meaningful. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(W1):W251-7.
114. Xia J, Gill EE, Hancock REW. NetworkAnalyst for statistical, visual and network-based meta-analysis of gene expression data. *Nat Protoc.* Nature Publishing Group; 2015 May 7;10(6):823–44.
115. Breuer K, Foroushani AK, Laird MR, Chen C, Sribnaia A, Lo R, et al. InnateDB: systems biology of innate immunity and beyond--recent updates and continuing curation. *Nucleic Acids Res.* Oxford University Press; 2013 Jan;41(Database issue):D1228-33.
116. Stormo C, Kringen MK, Lyle R, Olstad OK, Sachse D, Berg JP, et al. RNA-sequencing analysis of HepG2 cells treated with atorvastatin. *PLoS One.* Public Library of Science; 2014;9(8):e105836.
117. Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation.* 1998;97(12):1129–35.
118. Endres M, Laufs U, Huang Z, Nakamura T, Huang P, Moskowitz MA, et al. Stroke protection by 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase inhibitors mediated by endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(15):8880–5.
119. Nakajima H, Mochizuki N. Flow pattern-dependent endothelial cell responses through transcriptional regulation. *Cell Cycle.* Taylor & Francis; 2017 Oct 18;16(20):1893–901.
120. Cassel. The New England Journal of Medicine Downloaded from nejm.org at DARTMOUTH HITCHCOCK MED CTR on March 11, 2013.

For personal use only. No other uses without permission. From the NEJM Archive. Copyright © 2010 Massachusetts Medical Society. All rights reserved. *Nejm*. 1981;

121. Brown MS, Goldstein JL. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu Rev Biochem*. 1983;52:223–61.
122. Kita T, Nagano Y, Yokode M, Ishii K, Kume N, Ooshima A, et al. Probucol prevents the progression of atherosclerosis in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit, an animal model for familial hypercholesterolemia. *Proc Natl Acad Sci*. 1987;84(16):5928–31.
123. Sprague EA, Steinbach BL, Nerem RM, Schwartz CJ. Influence of a laminar steady-state fluid-imposed wall shear stress on the binding, internalization, and degradation of low-density lipoproteins by cultured arterial endothelium. *Circulation*. 1987;76(3):648–56.
124. Sawamura T, Kume N, Aoyama T, Moriwaki H, Hoshikawa H, Aiba Y, et al. An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. Vol. 386, *Nature*. 1997. p. 73–7.
125. Kume N, Murase T, Moriwaki H, Aoyama T, Sawamura T, Masaki T, et al. Inducible expression of lectin-like oxidized LDL receptor-1 in vascular endothelial cells. *Circ Res*. 1998;83(3):322–7.
126. Li DY, Zhang YC, Philips MI, Sawamura T, Mehta JL. Upregulation of endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein (LOX-1) in cultured human coronary artery endothelial cells by angiotensin II type 1 receptor activation. *Circ Res*. 1999;84:1043–9.
127. Chen M, Masaki T, Sawamura T. LOX-1, the receptor for oxidized low-density lipoprotein identified from endothelial cells: Implications in endothelial dysfunction and atherosclerosis. Vol. 95, *Pharmacology and Therapeutics*. 2002. p. 89–100.
128. Dhaliwal BS, Steinbrecher UP. Scavenger receptors and oxidized low density lipoproteins. *Clin Chim Acta*. 1999;286(1–2):191–205.

129. Murase T, Kume N, Korenaga R, Ando J, Sawamura T, Masaki T, et al. Fluid shear stress transcriptionally induces lectin-like oxidized LDL receptor-1 in vascular endothelial cells. *Circ Res*. 1998;83(3):328–33.
130. Liu Y, Chen BP, Lu M, Zhu Y, Stemerman MB, Chien S, et al. Shear stress activation of SREBP1 in endothelial cells is mediated by integrins. *Arter Thromb Vasc Biol*. 2002;22(1):76–81.
131. Nagajyothi F, Weiss LM, Silver DL, Desruisseaux MS, Scherer PE, Herz J, et al. *Trypanosoma cruzi* utilizes the host low Density Lipoprotein receptor in invasion. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(2).
132. Molina S, Castet V, Fournier-Wirth C, Pichard-Garcia L, Avner R, Harats D, et al. The low-density lipoprotein receptor plays a role in the infection of primary human hepatocytes by hepatitis C virus. *J Hepatol*. 2007;46(3):411–9.
133. Finkelshtein D, Werman A, Novick D, Barak S, Rubinstein M. LDL receptor and its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(18):7306–11.
134. Olofsson S, Bergström T. Glycoconjugate glycans as viral receptors. Vol. 37, *Annals of Medicine*. 2005. p. 154–72.
135. Kozarsky K, Kingsley D, Krieger M. Use of a mutant cell line to study the kinetics and function of O-linked glycosylation of low density lipoprotein receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. National Academy of Sciences; 1988 Jun;85(12):4335–9.
136. Davis CG, Elhammer A, Russell DW, Schneider WJ, Kornfeld S, Brown MS, et al. Deletion of clustered O-linked carbohydrates does not impair function of low density lipoprotein receptor in transfected fibroblasts. *J Biol Chem*. 1986;261(6):2828–38.
137. Cummings RD, Kornfeld S, Schneider WJ, Hobgood KK, Tolleshaug H, Brown MS, et al. Biosynthesis of N- and O-linked oligosaccharides of the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem*. 1983;258(24):15261–73.

138. Kingsley DM, Kozarsky KF, Hobbie L, Krieger M. Reversible defects in O-linked glycosylation and LDL receptor expression in a UDP-GalUDP-GalNAc 4-epimerase deficient mutant. *Cell*. 1986 Mar;44(5):749–59.
139. Seguchi T, Merkle RK, Ono M, Kuwano M, Cummings RD. The dysfunctional LDL receptor in a monensin-resistant mutant of chinese hamster ovary cells lacks selected O-linked oligosaccharides. *Arch Biochem Biophys*. Academic Press; 1991 Feb 1;284(2):245–56.
140. Yoshimura A, Yoshida T, Seguchi T, Wakis M, Ono M, Kuwano M. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Low Binding Capacity and Altered O-Linked Glycosylation of Low Density Lipoprotein Receptor in a Monensin-resistant Mutant of Chinese Hamster Ovary Cells*. 1987;262(27):13299–308.
141. Burgazli KM, Behrendt MA, Mericliler M, Chasan R, Parahuleva M, Erdogan A. The Impact of Statins on FGF-2—Stimulated Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Postgrad Med*. 2014 Jan 13;126(1):118–28.
142. Zheng C, Azcutia V, Aikawa E, Figueiredo J-L, Croce K, Sonoki H, et al. Statins suppress apolipoprotein CIII-induced vascular endothelial cell activation and monocyte adhesion. *Eur Heart J*. Oxford University Press; 2013 Feb;34(8):615–24.
143. Wu K, Tian S, Zhou H, Wu Y. Statins protect human endothelial cells from TNF-induced inflammation via ERK5 activation. *Biochem Pharmacol*. 2013 Jun;85(12):1753–60.
144. Chu UB, Duellman T, Weaver SJ, Tao Y, Yang J. Endothelial protective genes induced by statin is mimicked by FTI-277 and GGTI-298 drug combination-mediated ERK5 activation HHS Public Access. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1850(7):1415–25.
145. Dove DE, Ru Su Y, Zhang W, Gray Jerome W, Swift LL, Linton MF, et al. ACAT1 Deficiency Disrupts Cholesterol Efflux and Alters Cellular Morphology in Macrophages.

146. Byfield FJ, Aranda-Espinoza H, Romanenko VG, Rothblat GH, Levitan I. Cholesterol depletion increases membrane stiffness of aortic endothelial cells. *Biophys J*. 2004;87(5):3336–43.
147. Sun M, Northup N, Marga F, Huber T, Byfield FJ, Levitan I, et al. The effect of cellular cholesterol on membrane-cytoskeleton adhesion. *J Cell Sci*. 2007;120(Pt 13):2223–31.
148. Fielding CJ, Fielding PE. Intracellular cholesterol transport. *J Lipid Res*. 1997 Aug;38(8):1503–21.
149. Simons. Kai, Ehehalt R. Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J Clin Invest*. 2002;110(5):597–603.
150. Park H, Go YM, St. John PL, Maland MC, Lisanti MP, Abrahamson DR, et al. Plasma membrane cholesterol is a key molecule in shear stress-dependent activation of extracellular signal-regulated kinase. *J Biol Chem*. 1999;273(48):32304–11.
151. Ferraro JT, Daneshmand M, Bizios R, Rizzo V. Depletion of plasma membrane cholesterol dampens hydrostatic pressure and shear stress-induced mechanotransduction pathways in osteoblast cultures. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004;286(4):C831–9.
152. Wang T, Chen Z, Wang X, Shyy JY-J, Zhu Y. Cholesterol loading increases the translocation of ATP synthase β chain into membrane caveolae in vascular endothelial cells. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*. 2006 Oct;1761(10):1182–90.
153. Guo WX, Yang QD, Liu YH, Xie XY, Wang-Miao, Niu RC. Palmitic and Linoleic Acids Impair Endothelial Progenitor Cells by Inhibition of Akt/eNOS Pathway. *Arch Med Res*. 2008;39(4):434–42.
154. Gustavo Vazquez-Jimenez J, Chavez-Reyes J, Romero-Garcia T, Zarain-Herzberg A, Valdes-Flores J, Manuel Galindo-Rosales J, et al. Palmitic acid but not palmitoleic acid induces insulin resistance in a human endothelial cell line by decreasing SERCA pump expression. *Cell Signal*. Elsevier Inc.; 2016 Jan;28(1):53–9.

155. Liu X, Miyazaki M, Flowers MT, Sampath H, Chu K, Paton CM, et al. inflammation : effects of adipocyte-derived oleate. 2011;30(1):31–8.
156. Kim F, Tysseling KA, Rice J, Pham M, Haji L, Gallis BM, et al. Free fatty acid impairment of nitric oxide production in endothelial cells is mediated by IKKbeta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. American Heart Association, Inc.; 2005 May 1;25(5):989–94.
157. Bolognesi A, Chatgililoglu A, Polito L, Ferreri C. Membrane Lipidome Reorganization Correlates with the Fate of Neuroblastoma Cells Supplemented with Fatty Acids. 2013;
158. Murthy S, Albright E, Mathur SN, Field FJ. Modification of CaCo-2 cell membrane fatty acid composition by eicosapentaenoic acid and palmitic acid: effect on cholesterol metabolism.
159. Hatzakis NS, Bhatia VK, Larsen J, Madsen KL, Bolinger P-Y, Kunding AH, et al. How curved membranes recruit amphipathic helices and protein anchoring motifs. *Nat Chem Biol*. 2009 Nov 13;5(11):835–41.
160. Hecker M, Sommer N, Voigtmann H, Pak O, Mohr A, Wolf M, et al. Impact of Short- and Medium-Chain Fatty Acids on Mitochondrial Function in Severe Inflammation. *J Parenter Enter Nutr*. 2014 Jul;38(5):587–94.
161. Apweiler R, Bairoch A, Wu CH, Barker WC, Boeckmann B, Ferro S, et al. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(D1):D158–D169.
162. Ten Dijke P, Egorova AD, Goumans M-JTH, Poelmann RE, Hierck BP. TGF- β signaling in endothelial-to-mesenchymal transition: the role of shear stress and primary cilia. *Sci Signal*. American Association for the Advancement of Science; 2012 Feb 21;5(212):pt2.
163. Lee D-Y, Li Y-SJ, Chang S-F, Zhou J, Ho H-M, Chiu J-J, et al. Oscillatory flow-induced proliferation of osteoblast-like cells is mediated by α v β 3 and β 1 integrins through synergistic interactions of focal adhesion kinase and Shc with phosphatidylinositol 3-kinase and the Akt/mTOR/p70S6K pathway. *J Biol Chem*. American Society for

- Biochemistry and Molecular Biology; 2010 Jan 1;285(1):30–42.
164. Nakajima H, Yamamoto K, Agarwala S, Terai K, Fukui H, Fukuhara S, et al. Flow-Dependent Endothelial YAP Regulation Contributes to Vessel Maintenance. *Dev Cell*. Elsevier; 2017 Mar;40(6):523–536.e6.
 165. Bailey KA, Haj FG, Simon SI, Passerini AG. Atherosusceptible Shear Stress Activates Endoplasmic Reticulum Stress to Promote Endothelial Inflammation. *Sci Rep*. Nature Publishing Group; 2017 Aug 15;7(1):8196.
 166. Pan L, Hong Z, Yu L, Gao Y, Zhang R, Feng H, et al. Shear stress induces human aortic endothelial cell apoptosis via interleukin-1 receptor-associated kinase 2-induced endoplasmic reticulum stress. Vol. 16, *Molecular Medicine Reports*. D.A. Spandidos; 2017. 7205-7212 p.

