

**Patrícia Nolasco Santos**

**Correlação entre a mecanobiologia da VSMC com reprogramação  
fenotípica e respostas exacerbadas ao estresse no fenótipo  
cardiovascular da síndrome de Marfan**

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

Programa de Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Francisco Rafael Martins

Laurindo

**São Paulo**

**2019**

**Patrícia Nolasco Santos**

**Correlação entre a mecanobiologia da VSMC com reprogramação  
fenotípica e respostas exacerbadas ao estresse no fenótipo  
cardiovascular da síndrome de Marfan**

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

Programa de Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Francisco Rafael Martins

Laurindo

**São Paulo**

**2019**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Santos, Patricia Nolasco

Correlação entre a mecanobiologia da VSMC com reprogramação fenotípica e respostas exacerbadas ao estresse no fenótipo cardiovascular da síndrome de Marfan / Patricia Nolasco Santos. -- São Paulo, 2019.

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

Programa de Cardiologia.

Orientador: Francisco Rafael Martins Laurindo.

Descritores: 1.Síndrome de Marfan 2.Aneurisma aórtico 3.Doenças cardiovasculares 4.Aorta 5.Células musculares 6.Fenótipo

USP/FM/DBD-048/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

***Dedico essa tese à Mainha (Altenisia Nolasco) e vovô (Rogaciano Nolasco)***  
*Meus avós maternos que partiram no meio dessa caminhada, mesmo antes de concluir o doutorado eles já se enchiam de orgulho de dizer que tinham uma neta doutora, eu os amo com todo meu coração*

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Francisco Laurindo, pela oportunidade, confiança e principalmente por me ensinar o significado real da palavra orientar, eu só tenho a agradecer pela experiência de ter tido Chico como meu orientador/mentor.

À minha tripla linda Tiffany e Percília, além da ajuda nos experimentos, agradeço vocês pelo companheirismo nesse caminho, todas nós passamos por dificuldades, mas sempre fomos apoio umas das outras.

Aos companheiros de laboratório LBV presentes e passados, Ana Moretti, Ana Garipo, Arruda, Cecilia, Daniela, Denise, Fernando, Jessica, João, Maria Bertoline, Leonora, Luciana, Laurinha.

Em especial a Carolina, por sempre me encorajar sem dúvidas esse trabalho não teria saído sem sua ajuda. Victor pelo suporte no laboratório, e por ser um amigo em que sempre posso contar. Leonardo por todos os bons conselhos os quais ajudaram a dar forma esse trabalho. Thais pelos ensinamentos e amizade. Thayna pela oportunidade. Lázaro pela ajuda.

Ao grupo do Professor Adriano Alencar pelo suporte com os experimentos de força de tração. Em especial Isis e Mariana que atuaram diretamente ajudando em meus experimentos.

Aos meus amigos Luciana, Samir, Marcela, Marcus Túlio, Fabi, João, Nanda, Darlanis pelo apoio sempre, dentro e fora do laboratório.

Sobretudo, gostaria de agradecer à minha família:

Minha mãezona por sempre me encorajar a ir mais longe que eu puder, meu irmão Rafa que me faz querer ser a cada dia um exemplo melhor pra ele seguir.

Ao meu amor Keize, por estar ao meu lado durante esses 4-5 anos, aturando meus surtos psicóticos em cada véspera de entrega de relatório, congresso, apresentação. Muito obrigada por me aguentar. Também à minha Sogra, Noêmia, pelo apoio e marmitinhas, sempre me fez sentir membro de sua família.

À toda minha família, em especial Tete e Titia, por serem um ombro amigo, no qual eu sempre pude desabafar e reconfortar mesmo estando longe de casa.

À minha filha de quatro patas Goku que entrou em minha vida há um ano, mas sempre esteve do meu lado, literalmente. Enquanto eu escrevo essa dedicatória, ela tá dormindo colada em mim.

# SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

SUMMARY

1.

INTRODUÇÃO.....**Er**

**ro! Indicador não definido.**

1.1. Síndrome de Marfan: aspectos moleculares e fisiopatológicos..... 2

1.3. Reprogramação fenotípica de células musculares lisas e fisiopatologia de doença  
cardiovascular ..... 4

1.4. Mecanossinalização em VSMC ..... 7

1.5. O estresse do Retículo Endoplasmático e a Síndrome de Marfan..... 8

2. OBJETIVOS ..... 12

2.1. Objetivo geral..... 12

2.2. Objetivos específicos..... 12

3.MATERIAIS E MÉTODOS..... 13

3.1. Modelo animal ..... 14

3.2. Isolamento das células musculares lisas VSMC de aorta..... 14

3.3. Modelo de estiramento mecânico cíclico Uniaxial - STREXCELL 140 ..... 15

3.4. Traction Force Microscopy (TFM) ..... 16

3.5. Microscopia Confocal ..... 17

3.6. Lisado protéico..... 18

3.7. Expressão proteica Western Blotting ..... 18

3.8. Expressão gênica por RT-PCR..... 19

3.9. Experimentos de substituição de matriz extracelular ..... 19

3.10. Análise proteômica..... 20

3.11. Quantificação das adesões focais ..... 21

3.12. Ensaio de adesão celular ..... 21

3.13. Análise da densidade de fibras de estresse..... 22

3.14. Ensaio de senescência ..... 22

3.15. Análise estatística..... 23

4. RESULTADOS.....24

4.1. Transição das MFS-VSMC para um fenótipo mesenquimal..... 25

4.2 Expressão de marcadores de estresse do retículo endoplasmático..... 28

4.3. Análise proteômica de proteínas diferencialmente expressas em MFS-VSMC.....	30
4.4. Análise das vias de enriquecimento funcional dos dados proteômicos em MFS-VSMC e WT-VSMC.....	33
4.5. MFS-VSMC demonstram menor capacidade de gerar força de tração quando comparadas a WT-VSMC .....	36
4.6. Perfil de adesão e análise de fibras de estresse de actina .....	41
4.7. Respostas fenotípicas e funcionais em MFS-VSMC isoladas de camundongos com 6 meses de idade.....	44
5. DISCUSSÃO.....	50
6. ANEXO.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
7. REFERÊNCIAS.....	62
8. CURRICULUM VITAE.....	68

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- estrutura modular da fibrilina-1.....	3
Figura 2- Representação da ECM saudável e derivada de MEFs portadores da mutação $mg\Delta lpn$ , que origina a Síndrome de Marfan.....	3
Figura 3- O TGF- $\beta$ e a patogenia da MFS.....	4
Figura 4- Figura esquemática de uma <i>chamber</i> do STREXCELL STB 140-04.....	16
Figura 5: Análise da morfologia e área de MFS-VSMC e WT-VSMC cultivadas a partir de aortas de camundongos de 3 meses de idade.....	25
Figura 6- Microscopia Confocal de MFS-VSMC e WT-VSMC.....	26
Figura 7-Expressão de marcadores fenotípicos em MFS-VSMC e WT-VSMC cultivadas a partir de aortas de camundongos de 3 meses de idade, em resposta ou não ao estresse mecânico.....	27
Figura 8- Marcadores de transição mesenquimal em MFS-VSMC e WT-VSMC cultivadas a partir de aortas de camundongos de 3 meses de idade.....	28
Figura 9- Expressão de marcadores de estresse do RE em MFS-VSMC vs. WT-VSMC.....	29
Figura 10- Análise de marcadores fenotípicos de MSF-VSMC e WT-VSMC de 3 meses após a restituição da matriz.....	30
Tabela 1- Proteínas apenas expressas na MFS-VSMC.....	31
Tabela 2- Proteínas apenas expressas na WT-VSMC.....	31
Figura 11- Análise proteômica comparativa das MSF-VSMC e WT-VSMC cultivadas a partir da aorta de camundongos com 3 meses de idade.....	32
Figura 12- Processos biológicos de proteínas apenas expressas em MSF-VSMC e WT-VSMC cultivadas a partir da aorta de camundongos com 3 meses de idade.....	33
Figura 13- Análise de Ontologias Funcionais de proteínas reguladas negativamente em MSF-VSMC e WT-VSMC.....	34
Figura 14- Análise de Ontologias Funcionais de proteínas reguladas positivamente nas MSF-VSMC e WT-VSMC cultivadas a partir da aorta de camundongos com 3 meses de idade.....	35
Figura 15 - Imagens obtidas da TFM.....	37

Figura 16- Análise da força de tração em MFS-VSMC e WT-VSMC em cultura a partir da aorta de camundongos com 3 meses de idade.....	38
Figura 17- Energia de deformação avaliada em MFS-VSMC e WT-VSMC em cultura a partir da aorta de camundongos com 3 meses de idade.....	39
Figura 18- Momento contrátil em MFS-VSMC e WT-VSMC cultivadas a partir da aorta de camundongos com 3 meses de idade, em matrizes com diferentes graus de rigidez..	40
Figura 19- Momento contrátil e energia de deformação em MFS-VSMC e WT-VSMC cultivadas a partir da aorta de camundongos com 3 meses de idade, em <i>coating</i> de fibronectina.....	41
Figure 20- Análise de adesão focal celular nas MFS-VSMC e WT-VSMC em cultura a partir da aorta de camundongos com 3 meses de idade.....	42
Figure 21- Ensaio de adesão das MFS-VSMC e WT-VSMC em cultura a partir da aorta de camundongos com 3 meses de idade.....	43
Figura 22- Análise da densidade da rede de actina das MFS-VSMC e WT-VSMC em cultura a partir da aorta de camundongos com 3 meses de idade.....	44
Figura 23- Morfologia e área das MFS-VSMC e WT-VSMC cultivadas a partir de aortas de camundongos de 6 meses de idade.....	45
Figura 24- Marcadores de estresse do retículo endoplasmático em MFS-VSMC e WT-VSMC cultivadas a partir de aortas de camundongos de 6 meses de idade.....	46
Figura 25- Marcadores de transição mesenquimal em MFS-VSMC e WT-VSMC cultivadas a partir de aortas de camundongos de 6 meses de idade.....	46
Figura 26- Perfil de forças das MFS-VSMC e WT-VSMC cultivadas a partir de aortas de camundongos de 6 meses de idade.....	47
Figure 27- Análise das adesões focais em MFS-VSMC e WT-VSMC cultivadas a partir de aortas de camundongos de 6 meses de idade.....	48
Figure 28- Análise de senescência.....	48
Figura 29 - Modelo de como as alterações de força, ECM alterada e alterações fenotípicas convergem geração de aneurismas em MFS-VSMC.....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ang II - Angiotensina II

AT1 – Receptor de angiotensina - I

AT2 - Receptor de angiotensina - II

ATF4- Activating transcription factor 4

ATF6 - activating transcription factor 6

cbEGF - binding EGF-like motif

CHOP - CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein

DMEM- Dulbecco's Modified Eagle's Medium

ECM- extracellular matrix

EGF - epidermal growth factor-like

eIF2 $\alpha$  - eukaryotic translation initiation factor 2 subunit  $\alpha$

ERAD- ER-associated degradation

ERK- extracellular signal–regulated kinases

GAGs - glicosaminoglicanos e

GAPDH- Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

GRP78 - 78 kDa glucose-regulated protein

GRP94- 94 kDa glucose-regulated protein

IRE1 - Inositol-requiring protein-1

ITGA5- Integrin alpha 5

Lam1 – Laminin 1

LAP - latency associated peptide

Lox1- Lysyl oxidase 1

LTPB - latent TGF- $\beta$  binding protein

MFS- Marfan syndrome

MEF - Mouse embryonic fibroblats

NOX1- NADPH oxidase 1

PBS- tampão fosfato

PCNA- Proliferating cell nuclear antigen

PCR- Polymerase Chain Reaction

PDIA1- Protein disulfide isomerase A 1

PERK - protein kinase RNA-likeER kinase

PFA- paraformaldeído  
pFAK – phosphorylated Focal adhesion kinase  
PGs - proteoglicanos  
pJ- pico Joule  
RAC1 - ras-related C3 botulinum toxin substrate 1  
RE- Reticulo endoplasmático  
RhoA- Ras homolog family member A  
ROS- reactive species oxygen  
SFB - soro fetal bovino  
MFS- Síndrome de Marfan  
SM22- transgelin  
SMA-  $\alpha$ -smooth muscle actin  
SPF- Specific Pathogen Free  
TAAD- Thoracic aortic aneurysm and dissections  
TFM – Traction force Microscopy  
TGF- $\beta$  - transforming growth factor  $\beta$   
UPR – Unfolded protein response  
vs. - versus  
VSMC - vascular smooth muscle cells  
WT - Wild type  
XBP-1- X-box binding protein 1

## RESUMO

Santos PN. Santos PN. *Correlação entre a mecanobiologia da VSMC com reprogramação fenotípica e respostas exacerbadas ao estresse no fenótipo cardiovascular da síndrome de Marfan* [tese] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

A Síndrome de Marfan (MFS) é uma doença autossômica dominante do tecido conjuntivo, que acomete principalmente os sistemas esquelético, ocular e cardiovascular. O fenótipo cardiovascular, em especial o aneurisma de aorta, é responsável pela maior parte da morbi-mortalidade. MFS é resultante da mutação da fibrilina-1, uma glicoproteína que além de ser um dos principais componentes estruturais da matriz extracelular, tem como função a regulação da atividade do TGF- $\beta$ , por meio de seu sequestro mecânico na matriz extracelular. No entanto, os mecanismos pelos quais a mutação da fibrilina-1 determina aneurismas de aorta torácica com elevada variabilidade fenotípica são ainda pouco elucidados. Um alvo central na fisiopatologia do aneurisma são células musculares lisas vasculares (VSMC), que constituem a maior porção da camada média da aorta. Por meio do controle do tônus contrátil da aorta, da estrutura do citoesqueleto e da interação com a matriz extracelular controlam a estrutura da aorta e a resposta a estímulos patológicos. Mutações que geram perda de função no aparato contrátil de VSMCs prejudicam força contrátil e respostas mecanoadaptativas. No entanto, o papel da VSMC na MFS foi pouco estudado. Neste estudo, investigamos se alterações do fenótipo de VSMCs correlacionam-se a prejuízos na geração de força e alterações em respostas biomecânicas em VSMC cultivadas a partir de aortas obtidas de camundongos com ou sem a mutação  $mg\Delta^{pn}$  para MFS na fase inicial (3 meses) e tardia (6 meses). Aos 3 meses de evolução, detectamos importantes alterações fenotípicas nas MFS-VSMC, com maior proliferação celular e redução de alguns marcadores de diferenciação (calponina-1), porém aumento de outros (alfa-actina e SM22). Ao mesmo tempo, ocorreu mudança morfológica, com aumento da área da célula e perda do formato fusiforme. Tais alterações foram consistentes com transição para fenótipo mesenquimal, que foi confirmada pela expressão de vários marcadores. Marcadores de estresse do retículo endoplasmático (RE) aumentaram em MFS-VSMC vs. WT (wild-type) -VSMC condição basal, sem aumento pós estiramento mecânico. Correção da matriz de fibrilina-1 defeituosa em MFS-VSMC promoveu reversão de alguns aspectos

do fenótipo, mas não do estresse do RE. MFS-VSMC mostra perfil proteômico divergente de WT-VSMC, em particular menor expressão de proteínas regulatórias do citoesqueleto. Importante, MFS-VSMC têm reduzida capacidade de gerar força de tração quando semeadas em matriz com rigidez fisiológica e geram momento contrátil *in vitro*, no entanto, sem perda na capacidade de adesão. Importante, MFS-VSMC têm forte atenuação da resposta de tração a aumentos da rigidez da matriz. Em paralelo, MFS-VSMC exibem menor densidade em fibras de estresse de actina em relação às WT-VSMC. A maioria destas alterações não foram observadas aos 6 meses de evolução da doença. Os dados indicam que na fase precoce da doença, MFS-VSMC exibem mudanças fenotípicas que vão além de uma simples modulação fenotípica, com aspectos de transição mesenquimal e reduzida capacidade de geração de força tensional associada não à adesão celular, porém à menor capacidade de geração de fibras de estresse de actina. Estes mecanismos, descritos pela primeira vez, contribuir para elucidar a fisiopatologia da MFS, com alguns aspectos comuns, porém outros distintos de outras modalidades de aneurisma de aorta.

**Descritores:** síndrome de Marfan; aneurisma aórtico; doenças cardiovasculares; aorta; células musculares; fenótipo.

## SUMMARY

Santos PN. *Correlation between the VSMC mechanobiology with phenotypic reprogramming and exacerbated responses to stress in Marfan syndrome cardiovascular phenotype* [thesis] São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2019.

Marfan Syndrome (MFS) is an autosomal dominant connective tissue disease affecting to variable extents the musculoskeletal, ocular and cardiovascular systems. Cardiovascular phenotype and in particular thoracic aorta aneurysm/dissection (TAAD), is responsible for the bulk of disease morbimortality. MFS is due to mutations in fibrillin-1, one of the main structural proteins of the extracellular matrix (ECM), which in addition regulates TGF- $\beta$  activity by means of its physical retention in the ECM. However, mechanisms by which fibrillin-1 mutation determines TAAD with elevated phenotypic variability are yet poorly understood. Vascular smooth muscle cells (VSMC), the main component of aortic medial layer, are central targets of aneurysm pathophysiology in general. By exerting regulation of contractile tone, cytoskeletal structure and ECM interaction, VSMC control aortic structure and response to pathologic stimuli. Mutations that promote loss of VSMC contractile apparatus impair contractile function and mechanoadaptive responses and associate with distinct types of TAAD. However, the role of VSMC mechanobiology in MFS pathophysiology is poorly known. In this study, we investigated whether VSMC loss of force-generating capacity occurs in MFS and whether it associates with specific changes in cell phenotype. Biomechanical VSMC responses were assessed in cells cultured from aortas collected from mice with the  $mg^{\Delta lpn}$  MFS mutation at early (3-month-old mice, the main focus of our study) and advanced (6-month-old mice) stages of disease evolution. At 3 months of disease evolution, we detected important phenotypic alterations in MFS-VSMC, with enhanced expression of markers for cellular proliferation and lower expression of some differentiation markers (calponin-1), but, increase in others (SM  $\alpha$ -actin and SM22). In parallel, there were important morphologic changes, with increased VSMC area and loss of its fusiform shape. Such alterations are consistent with a transition towards a mesenchymal-like phenotype, which was confirmed through the expression of several markers. Endoplasmic reticulum (ER) stress markers increased in MFS-VSMC vs. WT (wild-type)-VSMC in basal condition, without augmentation

after cyclic mechanical stretching. Replacement of defective fibrillin-1 ECM from MFS-VSMC with a normal fibroblast-derived ECM promoted reversion of some aspects of the phenotype but not of ER stress. MFS-VSMC exhibited a proteomic profile divergent from that of WT-VSMC, particularly with respect to the lower expression of cytoskeleton regulatory proteins. Importantly, MFS-VSMC displayed a lower traction force-generating capacity when seeded in ECM under physiological stiffness and generated an impaired contractile moment in this situation. In particular, MFS-VSMC depicted a strong attenuation of the traction force response to enhanced ECM stiffening. These defects did not occur as a result of lower adhesion structure and decreased adhesion capacity of MFS-VSMC. In parallel, MFS-VSMC exhibited lower density of actin stress fiber vs. WT-VSMC. With 6 months of disease evolution, several of these alterations were not detectable. Both WT-VSMC and MFS-VSMC showed reduced capacity of force generation, without evidence of cell senescence. In summary, starting already in the early stages of disease evolution, MFS-VSMC display important phenotypic changes which go beyond a simple reversible phenotypic modulation, with some aspects suggesting a transition mesenchymal-like phenotype, accompanied by reduced force-generating capacity not linked to loss of cell adhesion properties but rather to impaired organization of action stress fibers. These mechanisms, described for the first time, contribute to elucidate MFS pathophysiology, depicting both some aspects in common with the pathophysiology of other types of aortic aneurysm and some aspects peculiar to MFS.

**Descriptors:** Marfan syndrome; aortic aneurysm; cardiovascular diseases; aorta; muscle cells; phenotype.

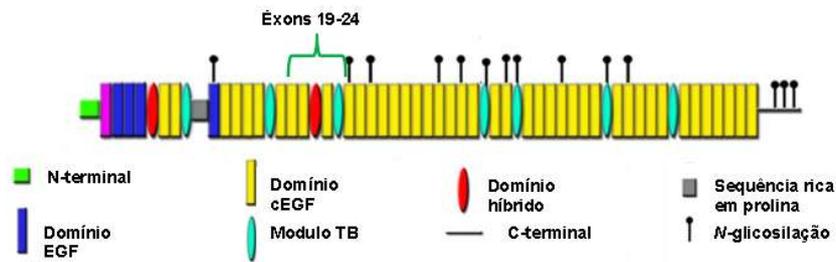
# **1. INTRODUÇÃO**

### 1.1. Síndrome de Marfan: aspectos moleculares e fisiopatológicos

A Síndrome de Marfan (MFS) é a mais comum das doenças hereditárias do tecido conjuntivo, de transmissão autossômica dominante, que acomete principalmente os sistemas esquelético, ocular e cardiovascular (Dietz et al., 1991). Os fenótipos incluem deformidades ósseas, subluxação do cristalino e, no sistema cardiovascular, disfunções valvares, alargamento progressivo da raiz da aorta e da aorta ascendente, levando ao desenvolvimento de aneurismas aórticos (Robinson et al., 2006, Judge & Dietz, 2005), principais responsáveis pela morbi-mortalidade da síndrome. A patogênese da MFS é bastante complexa (Dietz, 2010), e as bases celulares e moleculares da origem dos aneurismas aórticos continuam pouco elucidadas (Collins et al., 2008).

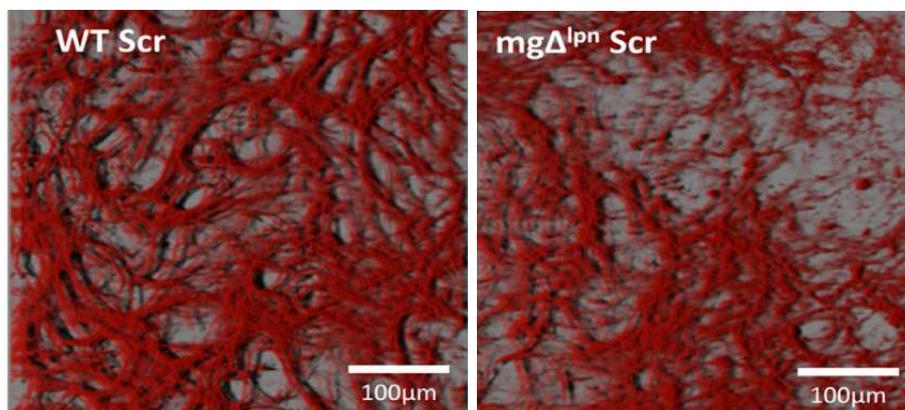
A MFS afeta indivíduos de todas as raças e gêneros com igual frequência, tendo prevalência estimada em 2-3: 10000 (Ammash et al., 2008). A MFS é causada por mutações no gene FBN-1, que codifica a proteína fibrilina-1, um dos principais componentes de microfibrilas da matriz extracelular (ECM, do inglês *extracellular matrix*) (Ramirez e Pereira, 1999; Kielty, 2006). São descritas cerca de 1500 mutações da FBN1 relacionadas à MFS. Apesar de a mutação ser um claro requisito para o desenvolvimento da doença, não há associação direta entre o genótipo e o fenótipo clínico nos indivíduos acometidos (Kirschner et al., 2011). Este aspecto constitui a principal lacuna no entendimento da fisiopatologia da síndrome, isto é, de que modo a mutação determina o fenótipo.

A fibrilina-1 é uma glicoproteína com peso molecular de 350 kDa, cuja estrutura modular é dominada por dois tipos de domínios compostos por diferentes motivos. O primeiro tipo motivo é o *epidermal growth factor-like* (EGF), que possui 6 resíduos de cisteína altamente conservados. Este domínio ocorre 47 vezes na fibrilina-1, dos quais 43 contêm uma sequência consensual para a ligação de cálcio, constituindo o *calcium-binding EGF-like motif* (cbEGF). O segundo tipo de motivo apresenta 8 resíduos de cisteína e é análogo à proteína de ligação ao TGF- $\beta$  (LTPB, do inglês *latent TGF- $\beta$  binding protein*) (Pereira et al., 1993) (Figura 1).



**Figura 1- estrutura modular da fibrilina-1.** Modificado de Strydom et al. *Archives for oral biology*, 2012

Duas propostas são discutidas para compreender como a mutação na fibrilina-1 interfere na montagem e organização da ECM, originando uma matriz quebradiça e defeituosa (Fig.2). O efeito dominante negativo, proposto com base padrão de herança dominante da doença, sugere que a secreção da proteína mutante interfere na deposição, estabilidade e função da proteína normal na ECM. Em contraste, a proposta alternativa é da haploinsuficiência, isto é, a produção insuficiente da proteína normal seria a principal responsável pela perda de função da ECM e consequente desenvolvimento das manifestações (Judge & Dietz, 2005; 2008).



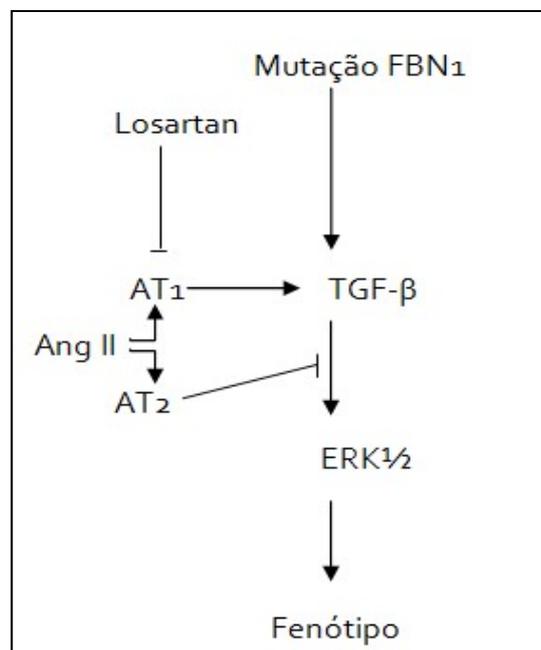
**Figura 2- Representação da ECM saudável e derivada de MEFs portadores da mutação  $mg\Delta^{lpn}$ , que origina a Síndrome de Marfan** (Meirelles et al., 2016)

Além de ser um dos principais componentes estruturais da matriz extracelular, a fibrilina-1 tem como uma de suas funções a regulação da atividade do TGF- $\beta$ , por meio de seu sequestro mecânico na ECM. Esse fator de crescimento é mantido no seu estado inativo por associação a um peptídeo de latência (LAP, do inglês *latency associated peptide*), que por sua vez, se associa ao LTBP. Através dessa ligação, a fibrilina-1 regula a atividade do TGF- $\beta$ , mantendo-o aprisionado na ECM (Isogai et al., 2003).

Formas mutadas da fibrilina-1 podem resultar na liberação do TGF- $\beta$  da ECM e consequente aumento da sua atividade, por meio de associação a receptores específicos na superfície celular.

A sinalização excessiva pelo TGF- $\beta$  é associada com o desenvolvimento do aneurisma em modelo de camundongo. O uso de antagonistas de TGF- $\beta$  tais como anticorpo neutralizante e bloqueadores AT1 (Losartan) leva à reversão das manifestações cardíacas e inclusive das não cardíacas da MFS (Habashi et al., 2006).

De forma resumida, a fisiopatologia na MFS via sinalização de TGF- $\beta$  está representada na figura 2.



**Figura 3- O TGF- $\beta$  e a patogenia da MFS:** As vias conhecidas associadas à mutação da fibrilina-1. Estas vias envolvem aumento na sinalização do TGF- $\beta$ , que ativa uma das vias não canônicas do TGF- $\beta$ , a fosforilação de ERK $\frac{1}{2}$ , sendo esta responsável por grande parte das características do fenótipo da MFS. Losartan diminui a ativação de ERK $\frac{1}{2}$ , inibindo o receptor AT1, com desvio da sinalização para o receptor AT2, que por sua vez inibe a via da ERK  $\frac{1}{2}$  pelo TGF- $\beta$ , levando a uma regressão no fenótipo.

### 1.3. Reprogramação fenotípica de células musculares lisas e fisiopatologia de doença cardiovascular

As células vasculares de músculo liso (VSMC, do inglês *Vascular smooth muscle cells*) constituem a maior porção da camada média da aorta e são um foco central da fisiopatologia de aneurismas (Nguyen et al., 2013), inclusive na MFS. Recentes avanços indicam que um aspecto central na pato-fisiologia dos aneurismas

aórticos é a desregulação das mecanorespostas, convergindo com o prejuízo na regulação da unidade VSMC-ECM (Milewicz et al., 2017). Uma das características peculiares à VSMC é sua capacidade de modulação fenotípica, alternando com graus intermediários entre dois diferentes fenótipos, o contrátil e o sintético. O fenótipo contrátil tem pouca capacidade de proliferação e migração, exibindo uma morfologia alongada em forma de fuso. Além disso, essas células possuem uma habilidade limitada de produzir ECM. O fenótipo contrátil é o mais comum em vasos saudáveis, participando primariamente do controle do diâmetro dos vasos e, nas arteríolas, regulação do fluxo sanguíneo e estabilização a pressão sanguínea (Ogut & Brozovich, 2003).

VSMC com fenótipo sintético apresentam uma proliferação aumentada e maior capacidade de migração, além de aparência hipertrófica e crescimento variável. O perfil sintético é eminentemente um perfil de desenvolvimento e reparação, maior quantidade de retículo endoplasmático associado à produção de componentes da ECM (e.g. colágeno, elastina e proteoglicanos). Nesta capacidade, VSMC sintéticas desempenham papel importante na manutenção da integridade vascular, que, particularmente no caso da aorta, traduz-se por importante função de manter a complacência e capacidade de compressão da parede normal desse vaso (Owens et al, 2004; Frismantiene et al., 2018).

A reprogramação fenotípica da VSMC traduz, assim, sua importante capacidade adaptativa frente aos diversos estímulos a que vasos sanguíneos são submetidos, tais como hormonais e/ou ambientais, incluindo citocinas, contato célula-célula, adesão celular, lesão vascular e exacerbações ou mudanças de forças mecânicas (Maul et al., 2011). A plasticidade da VSMC é importante durante o desenvolvimento vascular normal. Durante este processo, as VSMC, inicialmente em estado desdiferenciado, exibem taxa elevada de proliferação, migração e produção de componentes da matriz extracelular, constituindo a porção principal da parede dos vasos sanguíneos, ao mesmo tempo adquirindo capacidade contrátil. Neste contexto, a modulação fenotípica é uma importante alteração fisiopatológica em várias doenças cardiovasculares que cursam com recapitulação de fenômenos de desenvolvimento associados à formação de uma camada neointima, por exemplo aterosclerose e reestenose pós-angioplastia (Wipff et al., 2008). Além disso, a formação de uma camada neointima ocorre em distintas vasculopatias, p.ex., associadas à hipertensão arterial ou diabetes *mellitus* e ao

remodelamento vascular ocorrendo nos aneurismas e dissecções aórticas (Wagenseil & Mecham, 2009).

VSMC são capazes de controlar o tônus contrátil da aorta a partir da expressão diferencial de proteínas ligadas à função contrátil, a partir da regulação das propriedades visco-elásticas dependentes do citoesqueleto e particularmente pela relação ECM- respostas relacionadas à mecanossinalização (Zhu et al., 2018; Peyton & Putnam, 2005; Steucke et al., 2015; Milewicz et al., 2017). Assim, na aorta, a função primordial de VSMC é modular a arquitetura do citoesqueleto e produzir e manter a ECM de modo que, em conjunto, o vaso exerça o papel de condutor de altos volumes de sangue e amortecedor direto da onda de pulso gerada pela contração cardíaca (Wagenseil & Mecham, 2009). Esta função contrasta com a de VSMC arteriolas de resistência, capazes de modular a pressão sanguínea por alterações dinâmicas do tônus contrátil, bem como da estrutura vascular. De fato, o aparato contrátil da VSMC de uma artéria de condutância está envolvido principalmente no controle de interações com a ECM (Beamish et al., 2010).

Como discutido acima, os estímulos desencadeantes de modulação fenotípica da VSMC são inúmeros. Em particular, TGF- $\beta$  é capaz de desdiferenciar VSMC, gerando proliferação, migração e mudanças morfológicas (Zhu et al., 2015). Outro dado interessante trata da relação entre o estiramento cíclico, gerando aumento da produção de ROS (espécies reativas de oxigênio) mediado pela NOX1 NADPH Oxidase, gerando uma reprogramação fenotípica para o perfil sintético (Rodriguez, et al., 2015). A detecção do ambiente extracelular é de grande importância para controlar a produção e manutenção adequadas da matriz extracelular pela VSMC. Os defeitos nessa função podem levar à desregulação do controle matricial e a mudanças na diferenciação e proliferação das VSMC (Lindsay & Dietz, 2014). Mutações que geram perda de função no aparato contrátil de VSMC são capazes de promover prejuízo na força de contração e em respostas mecanoadaptativas (Milewicz et al. 2008). Em contrapartida, um recente estudo mostrou que tanto em tecido como em cultura celular, isoladas de pacientes com MFS, as alterações na sinalização de TGF- $\beta$ , são capazes de alterar o fenótipo contrátil das VSMCs, associando-o a maior rigidez celular. Essas alterações são associadas à rigidez aórtica que antecede ou acompanha a formação do aneurisma na MFS (Crosas-Molist et al., 2015).

#### 1.4. Mecanossinalização em VSMC

Mecanossinalização é um processo de resposta de vias de sinalização celular a forças mecânicas. Uma etapa crucial deste processo envolve a interação célula-ECM, em que a regulação de integrinas e citoesqueleto ocorre em sinergismo com a deposição, rearranjo e remoção de ECM para manutenção da homeostase mecânica do tecido (Humphrey et al., 2014). A ECM é um componente fundamental do tecido conjuntivo, responsável pela manutenção de sua forma e função. Tipos celulares presentes em tecidos moles, i.e fibroblastos e VSMC, são responsáveis pelo estabelecimento da ECM durante o desenvolvimento, manutenção e remodelamento em caso de reparo em resposta a lesões (Lu et al., 2011). Ao mesmo tempo, a ECM influencia importantes funções celulares, tais como migração, crescimento, diferenciação e sobrevivência (Schwartz et al., 1995). É importante ressaltar que as interações célula-matriz não estão apenas relacionadas à composição química e à organização da ECM, mas também a suas propriedades mecânicas.

As propriedades mecânicas da ECM dependem de seus principais constituintes: fibras elásticas, colágenos fibrilares, glicosaminoglicanos (GAGs) e proteoglicanos (PGs). Esses componentes são responsáveis pela sustentação celular e transmissão de forças. Desta maneira, o modo como os complexos transmembrana e as estruturas do citoesqueleto respondem às cargas mecânicas é fundamental para as interações célula-matriz, sendo estas responsáveis pela homeostase mecânica em condições saudáveis (Humphrey et al., 2014).

Importante, a perda na capacidade de gerar de força em VSMC é cada vez mais relatado como um elemento comum na gênese de aneurismas de aorta torácica (TAAD) (Milewicz et al., 2017; Nogi et al., 2018). De fato, mutações em genes relacionados à geração de força de VSMC ou ao acoplamento de força VSMC-ECM associam-se ao desenvolvimento de TAAD. Esses incluem *alpha-smooth muscle actin* (ACTA2), *myosin-11* (MYH11), *myosin light chain kinase* (MYLK), *transforming growth factor  $\beta$ -2* (TGFB2), *TGF- $\beta$  receptor-1* (TGFB1), SMAD3, PRKG1, *fibulin-4* (FBLN4) e colágeno-3 (COL3A1) (Milewicz et al., 2017). Além disso, a regulação negativa na expressão de componentes contráteis análogos, à nível de gene/proteína, também foram apresentados em TAAD associados à prejuízos na atividade de RhoA em VSMC (Nogi et al., 2018) ou em modelo de inibição de Lysyl oxidase (Jia et al., 2015), bem como em processos ligados ao envelhecimento celular na aorta (Humphrey & Milewicz, 2017).

O envelhecimento pode modificar o fenótipo da VSMC além de alterar a composição da ECM, induzindo modificações na parede do vaso e, conseqüentemente, nas propriedades mecânicas da aorta (Humphrey & Milewicz, 2017). Mutações nos genes de glicoproteínas de elastina ou associada à elastina (i.e. fibrilina-1) são responsáveis por síndromes tais como Williams e síndrome de Marfan (Kielty, 2006). Em humanos, além da MFS, mutações na fibrilina-1 resultam em doenças com fenótipos eventualmente superponíveis, porém distintos da MFS. Em geral, mutações da fibrilina-1 que desestabilizam a estrutura das microfibras produzem fenótipo da MFS, enquanto mutações não desestabilizantes de microfibrilas têm fenótipos distintos (Charbonneau et al., 2010).

Apesar da importância da mecanossinalização na biologia da VSMC, pouco se conhece sobre a mecanossinalização da VSMC na MFS. Cook et al. (2014) mostraram alterações na mecanossinalização em um outro tipo celular na MFS, os cardiomiócitos. Este estudo evidenciou que a cardiomiopatia dilatada em camundongos com MFS é uma manifestação resultante da mecanossinalização anormal dos cardiomiócitos induzida pela diminuição de fibrilina-1 na ECM. Essa molécula é a responsável por dar suporte à função cardíaca e participa da adaptação para resistência ao aumento da carga de trabalho, conferindo propriedades físicas fundamentais para o tecido do miocárdio. Havia a hipótese de que a sinalização de TGF- $\beta$  contribuísse aos danos cardíacos na MFS, contudo não foi encontrada essa correlação. Contudo, o conhecimento sobre a modulação fenotípica da VSMC vs. respostas da sinalização mecânica na MFS ainda é escasso. Há evidências disponíveis, no entanto, nem todas se sustentam e de certa forma contrastam entre si (Parker et al., 2018; Crosas-Molist et al., 2015; Dale et al., 2017; Granata et al., 2017).

### **1.5. O estresse do Retículo Endoplasmático e a Síndrome de Marfan**

O retículo endoplasmático (RE) é a estrutura central para a biossíntese, enovelamento e tráfego de proteínas para posterior envio para o complexo de Golgi (Lee & Ozcan, 2014). Entretanto, diferentes perturbações podem alterar a homeostase dessa organela, levando ao acúmulo de proteínas desenoveladas ou mal enoveladas dentro do RE. Normalmente, essas proteínas retidas seriam removidas pela via de degradação associada ao RE (do inglês ERAD, *ER-associated degradation*), no entanto,

quando essas falhas excedem a capacidade da via ERAD, caracteriza-se uma condição celular conhecida como estresse do RE (Walter et al., 2011; Yoshida, 2007).

Defeitos intracelulares intrínsecos relacionados à falha na síntese proteica, como retenção intracelular da fibrilina-1 em VSMC isoladas de aneurismas de pacientes (Nataatmadja et al, 2003) e aumento do volume do RE em VSMC isoladas de aortas de camundongos com MFS (McLoughlin et al, 2011) foram descritos associados à MFS. A ativação dos diferentes mecanismos da UPR afeta alguns aspectos da via secretória para restaurar a homeostase do enovelamento proteico, mutuamente, se o dano celular for muito severo, a sinalização da UPR leva a célula à morte pela ativação das vias apoptóticas (Tabas & Ron, 2011).

O primeiro papel da UPR é aumentar a expressão de proteínas que estão envolvidas na maquinaria de enovelamento proteico no RE, tanto para elevar o correto processamento de proteínas como para atenuar a sobrecarga gerada por essas proteínas no RE (Lee & Ozcan, 2014). Desta forma, a UPR envolve 3 diferentes ramos: PERK (do inglês, *protein kinase RNA-likeER kinase*), ATF6 (do inglês, *activating transcription factor-6*) e IRE1 (do inglês, *inositol-requiring protein-1*), que então regulam a resposta ao estresse do RE pela indução de chaperonas (GRP78 e GRP94), fosforilação do eIF2 $\alpha$ , ativação ATF-4 e *splicing* alternativo do XBP-1 (Yoshida, 2007; Schroder & Kaufman, 2005). Quando os mecanismos relacionados à UPR não são suficientes para restabelecer a homeostase celular, mecanismos indutores de morte são induzidos através da indução da CHOP, caspase 12-específica do RE e outros fatores (Tabas & Ron, 2011; Yamaguchi & Wang, 2004).

Nosso grupo investigou a presença de estresse do RE em diferentes modelos murinos para MFS (mg $\Delta^{lpn}$  e C1039G). No modelo celular estabelecido, fibroblastos de embriões murinos (do inglês *Mouse embryonic fibroblasts*, MEF), observou-se que não há retenção proteica nem estresse do RE mesmo na presença da fibrilina-1 mutada, ao invés disso foi visto que a PDIA-1 participa de algum mecanismo relacionado com o controle fino de qualidade dessa proteína no RE (Meirelles et al., 2016).

Por outro lado, Wan et al. constatou que o estresse do RE é causado pelo estresse mecânico em células vasculares de rato, esse mecanismo pode estar relacionado com a desdiferenciação das células vasculares sendo esse o potencial mecanismo do remodelamento vascular na hipertensão. Muito recentemente um estudo mostrou evidências de estresse do RE em uma mutação específica da MFS, a FBN1 3'UTR. Em

contrapartida, os marcadores clássicos apenas variam em áreas não dilatadas, ou seja, o estresse do RE aparentemente está relacionado com o início da progressão da doença (Sieger et al., 2019).

Na Síndrome de Marfan as alterações estruturais na ECM são o foco principal da doença, sendo diretamente responsáveis pelo fenótipo cardiovascular clássico, além disso, contribuem secundariamente para tal fenótipo pelo aumento na sinalização de TGF- $\beta$  (Franken et al., 2015). Neste contexto, como discutido até o momento, a (pató)biologia da VSMC é fortemente ligada à interação com forças biomecânicas e o papel da mecanossinalização nas VSMCs no contexto da fisiopatologia da MFS ainda é, entretanto, pouco conhecido. Visto a importância da mecanotransdução para o desenvolvimento de TAAD, outros estímulos de natureza biomecânica sinérgicos ao defeito da ECM podem contribuir para o desenvolvimento e evolução do fenótipo MFS, principalmente pelo fato da mecanotransdução depender diretamente da unidade VSMC-ECM (Zhu et al., 2018; Peyton & Putnam, 2005). Além disso a perda de força da VSMC é um fator convergente da patogênese de TAAD, sendo a perda de força associada à perda do fenótipo contrátil em vários modelos de aneurismas (Milewicz et al., 2017). No entanto no MFS diversos estudos indicam a progressão do fenótipo com fenótipo contrátil (Parker et al., 2018; Crosas-Molist et al., 2015, 2015; Dale et al., 2017; Granata et al., 2017), além disso nenhum estudo avaliou o perfil de força no contexto da MFS. Deste modo, neste estudo propomos caracterizar alguns marcadores do fenótipo da VSMC e principalmente, avaliar o perfil de geração de força de tração da ECM em VSMC cultivadas a partir de modelo de camundongo com MFS. Com esta abordagem, procuramos entender se até que ponto a MFS compartilha mecanismos fisiopatológicos comuns a outras etiologias de aneurisma torácico e em que medida estes mecanismos divergem.

## **2.OBJETIVOS**

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Investigar alterações fenotípicas e resposta a forças biomecânicas em células musculares lisas vasculares cultivadas a partir de camundongos portadores de Síndrome de Marfan (MFS-VSMC) em distintos estágios da doença.

### 2.2. Objetivos específicos

- Investigar, em MFS-VSMC cultivadas de camundongos com 3 meses de idade, comparadas a WT-VSMC (células musculares lisas *wild-type*):
  - Caracterização de marcadores fenotípicos e sinalização de resposta a estresse na condição basal e após exposição a forças biomecânicas de estiramento cíclico.
  - Efeito em marcadores fenotípicos da substituição da ECM defeituosa por ECM fisiológica.
  - Perfil proteômico de expressão proteica e análise de enriquecimento funcional.
  - Quantificação de forças de tração em ECM com distintos graus de rigidez por microscopia e análise computacional.
  - Perfil de adesão celular e organização do citoesqueleto.
- Investigar algumas destas variáveis em MFS-VSMC cultivadas de camundongos com 6 meses de idade.

# **3.MATERIAIS E MÉTODOS**

### 3.1. Modelo animal

Foram utilizados camundongos da linhagem C57Bl6 com a mutação  $mg^{\Delta lpn}$  para a fibrilina-1 cedidos pela Prof.<sup>a</sup> Lygia Pereira do Instituto Biológico – USP. Esses animais possuem um alelo mutante para fibrilina-1, que apresenta uma deleção dos éxons 19 ao 24 no gene FBN1 substituídos por um cassete de expressão do gene de resistência à neomicina (figura 1), essa deleção resulta na perda de 5 domínios inteiros na fibrilina-1 estando associada a fenótipos mais graves da MFS em humanos. Essa mutação possui efeito dominante, assim com a MFS em humanos e, portanto, os animais apresentam o fenótipo compatível com humanos. Além disso, começam a apresentar alterações aos 3 meses e início das dissecções e rompimentos aórticos aos 6 meses, por outro lado o fenótipo avançado é considerado aos 9 meses, reproduzindo a variabilidade fenotípica encontrada em pacientes com MFS (Lima et al., 2010).

Os camundongos foram criados e mantidos em local SPF no Biotério Central da Faculdade de Medicina – USP e alimentados com ração balanceada e água *ad libitum*. Após o nascimento, os animais foram genotipados para a identificação dos animais heterozigotos dominantes que desenvolverão a MFS e os animais homozigotos recessivos foram utilizados como controle. Em princípio, a aorta ascendente foi coletada em animais com até três meses de idade. Os animais foram submetidos à eutanásia com a mistura de xilazina (3,5mg/Kg) e ketamina (30mg/Kg). Este estudo foi realizado de acordo com as normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e pelo *The Universities Federation for Animal Welfare*. O projeto foi aprovado pelo comitê de ética da FMUSP (Processo 142/14).

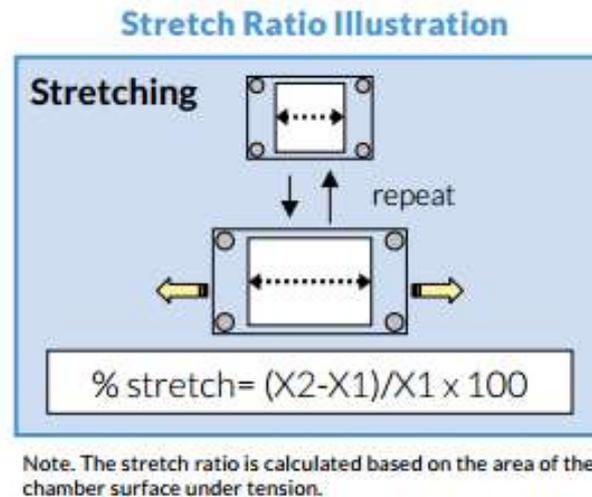
### 3.2. Isolamento das células musculares lisas VSMC de aorta

Após a eutanásia as aortas foram retiradas de maneira minuciosa e de maneira mais asséptica possível, separadas por genótipo, e posteriormente transferidas para HBSS (com  $CaCl_2$  1.261 Mm) estéril com penicilina (60mg/L), estreptomicina (1000 mg/L) e anfotericina (0,5 mg/L). Os vasos foram mantidos em gelo até o processamento em fluxo laminar. Após a limpeza para retirada de toda a gordura, as aortas foram digeridas com colagenase Worthington (30u) em HBSS, por 20 minutos a 37°C (5%

CO<sub>2</sub>). A camada adventícia foi retirada e as aortas foram incubadas “overnight” em DMEM *low glucose* suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB). No segundo dia de cultura cada aorta foi cortada e digerida com colagenase (300u) e elastase (3u) por 40 minutos a 37°C (5% CO<sub>2</sub>). Após essa etapa os tecidos foram pipetados por repetidas vezes com uso de uma pipeta de 1000 µL, para separação das células totalmente do tecido. As células foram centrifugadas para retirada das enzimas, em seguida foram plaqueadas em no mesmo DMEM que permaneceram *overnigh*. As células foram caracterizadas pela presença de *α-smooth muscle* actina e SM22. As células foram congeladas em nitrogênio líquido na segunda ou terceira passagem, e utilizadas até a sétima passagem.

### 3.3. Modelo de estiramento mecânico cíclico Uniaxial - STREXCELL 140

As VSMCs de aorta de camundongos foram plaqueadas em chambers de um elastômero de silicone PDMS (polidimetilsiloxano) e revestidas com colágeno I (200µg/mL) seguindo as indicações do fabricante. A quantidade de células plaqueadas por chambers variou de acordo com o objetivo do experimento, para avaliação de expressão protéica por *Western Blotting* foram plaqueadas 8x10<sup>4</sup> células por chamber, já para confocal onde a confluência não pode ser alta plaqueamos 4x10<sup>4</sup> células por chamber, ambas em um volume final de 2 ml de DMEM low com 10% SFB. Após 24 horas de plaqueamento o meio de cultura foi trocado para o mesmo acrescido de apenas 0,5% SFB. Em seguida essas chambers foram inseridas entre duas estruturas metálicas dentro do aparelho STREXCELL de estiramento mecânico cíclico (ST-140, Strex, Osaka, Japão) como mostra a figura 2. O estiramento uniaxial é alcançado utilizando o sistema STREX de duas fases capaz de movimentar as estruturas metálicas, onde as chambers estão encaixadas, trazendo-as para perto ou longe do eixo central do STREXCELL. Todos os experimentos de estiramento mecânico cíclico foram executados nos seguintes parâmetros: 10% de extensão, na frequência de 1Hz, por 8 horas. Esses experimentos ocorreram em incubadoras de cultivo celular à 37°C (5% CO<sub>2</sub>). O sistema de estiramento STREXCELL possui um sistema de resfriamento baseado na circulação de água, esse foi utilizado seguindo as indicações do fabricante.



**Figura 4- Figura esquemática de uma chamber do STREXCELL STB 140-04:** Trata-se de uma superfície de um elastômero de silicone PDMS (polidimetilsiloxano). O modelo de estiramento mecânico uniaxial STREXCELL STB 140-04 suporta até 8 chambers de 4 cm<sup>2</sup> simultaneamente e possui uma combinação de até 64 padrões de estiramento combinando diferentes frequências e extensões. Modelo retirado do *Stretching System Handbook Strexcell*, disponível em: [strexcell.com](http://strexcell.com)

### 3.4. Traction Force Microscopy (TFM)

Os experimentos em Microscopia de força de tração foram realizados em colaboração com o laboratório de Microrreologia e Fisiologia Molecular do Instituto de Física da Universidade de São Paulo, coordenado pelo Prof. Adriano M. Alencar. A preparação do Gel de TFM é realizada em três etapas, a primeira consiste na preparação da superfície que recebe o gel. Nesse caso placas de Petri de 35mm (com lamínulas de vidro no fundo) foram tratadas com silano, lavadas e posteriormente com tratadas com glutaraldeído 0,5%. Após a secagem seguimos com a preparação da primeira camada de gel, nesse caso utilizamos a preparação adequada para VSMC (4,8 kPa). O gel de acrilamida foi preparado seguindo as proporções da preparação seguida. Antes de polimerizar, foram pipetados 3,2 µL da solução na superfície de vidro pré-tratada, e imediatamente coberto com uma lamínula de vidro. Após polimerizar, a lamínula foi retirada meticulosamente e a segunda camada de gel (com *beads* fluorescentes 4,6 x 10<sup>10</sup> partículas/mL) foi adicionada no primeiro gel, dessa vez foi pipetado apenas 1µL da solução. Seguindo o passo anterior da lamínula de vidro. Após a polimerização do gel o mesmo foi observado no microscópio de fluorescência para analisar a qualidade do gel

frente à quantidade e distribuição das *beads* fluorescentes. Após certificar a qualidade do gel partimos para etapa de ativação do mesmo, que consiste na aplicação de uma solução de sulfo-SANPAH por 20 minutos na presença da luz UV. Em seguida foi feito o *coating* do gel com colágeno tipo 1 (200µg/mL) ou fibronectina (10 µg/mL) por 1,5 horas. Finalmente as células foram plaqueadas, padronizamos  $1 \times 10^3$  células por placa, sendo o experimento feito em duplicata para cada tipo celular (MFS e WT). Após 24 horas na incubadora a 37°C (5% CO<sub>2</sub>) as células foram evidenciadas em microscópio de força de tração Leica. São adquiridas três diferentes imagens de cada célula, na mesma localização, a primeira em contraste de fase, a segunda apenas das *beads* fluorescentes e a terceira das *beads* fluorescentes após o tratamento com tripsina para descolamento das células. Posteriormente essas imagens foram sobrepostas para análise pelo software MatLab que calcula a força de tração a partir do deslocamento das *beads*. As matrizes de poli(acrilamida) com diferentes rigidezes foram preparadas como mostrado anteriormente, apenas alterando as proporções de acrilamida/bisacrilamida: 1,2 kPa 5,5% de acrilamida e 0,05% de bisacrilamida; 11 kPa, 10% de acrilamida e 0,07% de bisacrilamida; 90 kPa, 12% de acrilamida e 0,3% de bis-acrilamida (Chen et al., 2014).

### 3.5. Microscopia Confocal

As VSMCs foram plaqueadas, diferindo apenas na confluência celular, visto que para evidenciar melhor as células optamos por uma menor confluência, em torno de 60%, desta maneira foram plaqueadas  $4 \times 10^4$  células (WT e MFS) por *chamber*. Em cada *chamber* foram plaqueadas células, tratadas e expostas a estímulos seguindo a divisão do item 4.4. Após o estiramento, o meio de cultura foi retirado das *chambers* e as células lavadas com PBS, três vezes. Após esse passo as células foram fixadas com PFA 4% por 20 minutos, lavadas mais três vezes com PBS e permeabilizadas com triton 0,1% por 10 minutos em T.A. Após mais uma rodada de lavagens com PBS, as células foram bloqueadas com BSA 4% por 30 minutos, em seguida incubadas com os anticorpos primários numa razão de 1:100 pFAK (Abcam, ab39967), paxilina (Abcam ab32084) e Calponina (Sigma c-2687) em 1% BSA, *overnight* em câmara úmida. No dia seguinte as células foram lavadas três vezes com PBS e em seguida incubadas com os anticorpos secundários (ALEXA 488 rabbit e 546 mouse) 1:200, juntamente com o

Dapi 1:50 (marcação do núcleo) e Faloidina 1:100 (marcação do citoesqueleto de actina) por 1 hora em T.A. Após esses passos as células foram lavadas três vezes com PBS, e nelas adicionado o meio de montagem (1:1 glicerol com PBS) e por fim foi adicionada uma lamínula circular, o processo foi feito sem selagem. A leitura das lâminas foi feita no mesmo dia da montagem, em um microscópio confocal (ZEISS LSM510-Meta) - Multiusuários Fapesp 04/08908-2 – Rede Premium/FMUSP.

### **3.6. Lisado protéico**

As células foram cultivadas por 24 horas em meio DMEM contendo 10% de soro fetal bovino (SFB). O lisado total foi obtido após raspagem das células em tampão de lise A (Hepes 20mM, NaCl 150mM, glicerol 10%, triton 1% EGTA 1mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5mM) na presença de inibidores de protease (aprotinina 1 µg/ml, leupeptina 1 µg/ml e fenilmetil-sulfonil 10 mM) as amostras foram incubadas 30 min em 4°C, posteriormente sonicadas e em seguida elas foram centrifugadas 10 min em 12000 rpm para retirada dos debris.

### **3.7. Expressão proteica Western Blotting**

A dosagem de proteínas dos lisados foi realizada pelo método de Bradford (1976). As amostras (30 – 40 µg) de proteína diluídas em tampão de amostra contendo azul de bromofenol 0,02%, mercaptoetanol 10 mM e dodecil sulfato de sódio 10%) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida. Em seguida, as proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose em sistema semi-seco (Semiphor, Hoefer-Pharmacia, Suécia). O bloqueio foi realizado com uma solução de leite 5%. A detecção de proteínas específicas foi feita pela incubação com os anticorpos primários específicos: KDEL (Enzo Life Science SPA-827), GRP78 (Abcam ab21685), Calponin (Sigma c-2687), PCNA (Abcam ab29),  $\alpha$ -actina de músculo liso (Sigma A2547), SM22, GAPDH (Abcam ab8245), por 12-16 h em 4°C, sendo posteriormente incubados com anticorpos secundários fluorescentes e detectados o sinal pelo Odyssey (Licor System). A quantificação das bandas foi feita pelo software do Licor pela densitometria das bandas geradas por cada proteína.

### 3.8. Expressão gênica por RT-PCR

O RNA total foi extraído com Trizol (Invitrogen) e feita a transcrição reversa usando Super Script II e primers aleatórios. Real-time-PCR foi realizado usando Platinum SYBR Green qPCR super Mix-UDG (Invitrogen) em um sistema de PCR em tempo real Step One Plus™. Todas as reações foram acompanhadas por um controle negativo e as comparações foram realizadas utilizando o valor de (Ct) (gene alvo - controle). Os resultados foram expressos como *fold-change* ( $2^{\Delta\Delta Ct}$ ), de acordo com o guia da Applied Biosystems. As sequências de primer estão listadas na tabela 1.

### 3.9. Experimentos de substituição de matriz extracelular

A cultura primária de Fibroblastos Embrionários Murinos (MEF) foi obtida como descrita por Meirelles et al., 2016. Os MEFs foram incubados com 10 µg/mL de um inibidor mitótico, Mitomicina C, por 2 horas e depois cuidadosamente lavados com solução salina tamponada com fosfato (PBS) seis vezes, seguido por tripsinização e três lavagens adicionais com meio para remover completamente os resquícios de Mitomicina. Após esse passo foram plaqueados a uma densidade de  $3 \times 10^5$  células/poço em uma placa de 6 poços. A ECM foi depositada após 6 a 8 dias de cultivo em 100% de confluência. Para descelularização, as placas foram lavadas com água destilada estéril para promover a lise celular e remover vestígios de meio de cultura, seguido de uma exposição curta (1 minuto) a uma solução de  $\text{NH}_3$  20 mM para expor a ECM depositada. A matriz acelular então cuidadosamente lavada com PBS para evitar efeitos prejudiciais da solução de amônia alcalina às células foram posteriormente plaqueadas sobre a matriz. MFS-VSMC e WT-VSMC ( $2 \times 10^5$  células) foram plaqueadas e cultivadas durante 3 dias para obtenção do lisado proteico para WB.

### 3.10. Análise proteômica

#### Preparação da amostra

MFS-VSMC e WT-VSMC foram cultivados em condições normais (DMEM low com 10% de FBS). O lisado total foi obtido após a raspagem das células em tampão de lise contendo desoxicolato de sódio a 1% em Tris-HCl, na presença de inibidores de protease (cOmplete-Roche). A quantificação de proteínas foi realizada pelo método BCA. A redução da amostra foi alcançada por incubação com ditioneitol 5 mM (DTT) em 100 mM de bicarbonato de amônio por 60 minutos a rotação constante a 37 ° C. As amostras foram então alquiladas com 15 mM de iodoacetamida por 30 minutos no escuro à temperatura ambiente e depois por 15 minutos com DTT 2,5 mM. A digestão com tripsina foi realizada na razão enzima: substrato de 1:40 sob controle de pH (7-8) em rotação constante a 37 ° C por 16 horas.

#### Aquisição de espectrometria de massa

Os peptídeos (1-5 µg) foram automaticamente carregados numa amostra de alto rendimento LC-MS/MS num Sistema nanoACQUITY UPLC (Waters Corporation, Milford, MA), acoplado on-line a um espectrômetro de massa AB-Sciex Triple-TOF 6600 (SCIEX). Os peptídeos capturados foram eluídos com gradiente de acetonitrilo de 98% (v/v) durante 10 minutos a um fluxo de 3,5 µL/min e analisados diretamente no espectrômetro de massa. Os peptídeos foram ionizados utilizando uma fonte de nano-electrospray positiva. Os resultados foram obtidos em Aquisição de Dependentes da Informação (Information Dependent Acquisition - IDA).

#### Identificação e quantificação de proteínas

As proteínas foram identificadas usando algoritmos do Mascot (Matrix Science Limited, Londres, Reino Unido) e quantificados por Maxquant (Instituto Max-Planck de Bioquímica, 2018). Os dados foram buscados em relação ao banco de dados de proteômica do UniProt contra a sequência de *Mus musculus* (versão: 2017\_10). Os seguintes parâmetros foram considerados para identificar peptídeos em todas as amostras: 1) Digestão por tripsina com no máximo uma clivagem perdida; 2) modificações variáveis por oxidação (M) e modificação fixa por carbamidometil (C); 3) taxa de descoberta falsa calculada (FDR) menor que 1% em todas as condições e

replicações; 4) erro de massa inferior a 20 ppm. Dois ou mais fragmentos iônicos por peptídeo, cinco ou mais fragmentos por proteína e um único ou mais peptídeo por proteína foram necessários para a correspondência iônica. As identificações que não satisfizeram esses critérios foram rejeitadas. A lista final confirmada de proteínas apenas considerou proteínas identificadas por pelo menos 2 peptídeos. As diferenças entre os grupos foram analisadas usando *one-way* ANOVA ao nível de significância de 0,05. Proteínas de queratina foram excluídas dos dados.

#### Análise de enriquecimento

A interpretação biológica dos dados foi realizada usando os softwares GO Consortium (Huaiyu et al., 2017) e David Gene Ontology (Huang et al., 2009), que foram usados para realizar a análise de enriquecimento funcional e criar clusters biológicos de proteínas. Vias enriquecidas foram consideradas significativas com valor de  $p < 0,05$ .

### **3.11. Quantificação das adesões focais**

A análise quantitativa de adesões focais foi realizada conforme descrito por U. Horzum et al. (2014). As imagens marcadas com o anticorpo contra paxilina ou pFAK, capturadas no aumento de 20x, foram processadas pelo software ImageJ, com plugins CLAHE e Log3D. Resumidamente, o background da imagem foi extraído usando o plug-in CLAHE, seguido por algoritmos Exp e Log3D, para obter imagens *threshold* com tamanho real e número de adesões focais. A quantificação foi realizada com a opção "implementar partículas medidas" e os resultados expressos como tamanhos de adesão focal e área total ocupada pelas adesões.

### **3.12. Ensaio de adesão celular**

Cada placa de 96 foi tratada com fibronectina (Sigma) (10  $\mu\text{g/mL}$ ) ou colágeno tipo I (Sigma) (10  $\mu\text{g/mL}$ ) *overnigt* a 4°C e depois bloqueadas por 2 h com a 1% BSA/PBS. MFS-VSMC e WT-VSMC foram lavados com PBS e soltas com PBS-EDTA (2 mM, pH 7,4). Depois disso, as células foram ressuspensas em DMEM contendo 0,2% de

BSA (tampão de adesão), adicionadas a poços tratados a um volume de 150  $\mu\text{L}$  (com  $4 \times 10^4$  células/poço) e deixadas aderir por 1h (fibronectina) ou 4h30min (colágeno) a 37°C. As células não aderidas foram removidas por lavagem com PBS (3 vezes). As células que sobraram aderidas foram fixadas com glutaraldeído a 2% durante 30 min. As placas foram lavadas três vezes com PBS e coradas com cristal violeta a 0,1% (30 min t.a.), seguido de lise com SDS a 1%. A absorbância foi então medida a 600 nm num leitor de microplacas (SpectraMax-340, Molecular Devices).

### 3.13. Análise da densidade de fibras de estresse

A plataforma de análise foi construída com base em duas etapas principais: primeiro, imagens de confocal oriundas do LSM marcadas com faloidina foram pré-processadas, separando os canais e convertendo o respectivo canal de fluorescência marcado com F-actina em escala de cinza. Para cada grupo, WT-VSMC e MFS-VSMC, foi utilizado um conjunto de 10 imagens. Utilizando o software Matlab®, definiu-se um *threshold* com intensidade semi-máxima para eliminar possíveis artefatos. Uma máscara à mão livre interativa foi então aplicada sobre a imagem de uma célula individual e a intensidade média [ $I^-$  (célula)] calculada. Simplificando, [ $I^-$  (célula)] foi normalizado para intensidade de campo máximo previamente definida pelo limiar [ $I^-$  (max)]. Trinta células foram selecionadas para cada grupo.

### 3.14. Ensaio de senescência

O ensaio de  $\beta$ -galactosidase associada a senescência foi realizada seguindo Itahana et al., 2013. Resumidamente as VSMCs foram plaqueadas ( $2 \times 10^5$  células) em uma placa de 6 poços e cultivadas por 2 dias. Após a lavagem, as células foram fixadas em paraformaldeído a 4% durante 3 min à temperatura ambiente, depois foram novamente lavadas e adicionaram-se solução de coloração de SA- $\beta$  gal e incubou-se durante 16 h a 37°C. Depois da cor azul estar completamente desenvolvida, as placas foram montadas e as células positivas para o SA- $\beta$  gal (azuis) contadas sob um microscópio. Em geral, as células em culturas são consideradas senescentes se  $> 80\%$  forem positivas para SA-

βgal. Como controle positivo foi utilizado o CaCo2, uma linhagem celular naturalmente senescente.

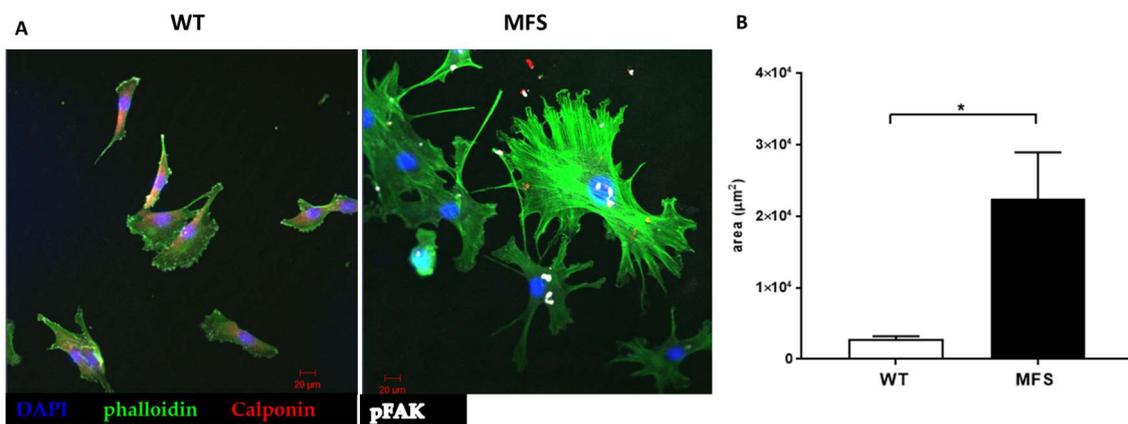
### **3.15. Análise estatística**

Os dados foram expressos em média ± erro padrão. O tipo de distribuição e a hipótese de igualdade das variáveis foram testados em todos os casos. A análise de variância e o *test-t* foram utilizados para comparações dos grupos. O método de Dunn's foi utilizado para a realização de comparações múltiplas. GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc., CA, USA). O nível de significância foi estabelecido pelo valor  $p < 0,05$ .

## **4.RESULTADOS**

#### 4.1. Transição das MFS-VSMC para um fenótipo mesenquimal

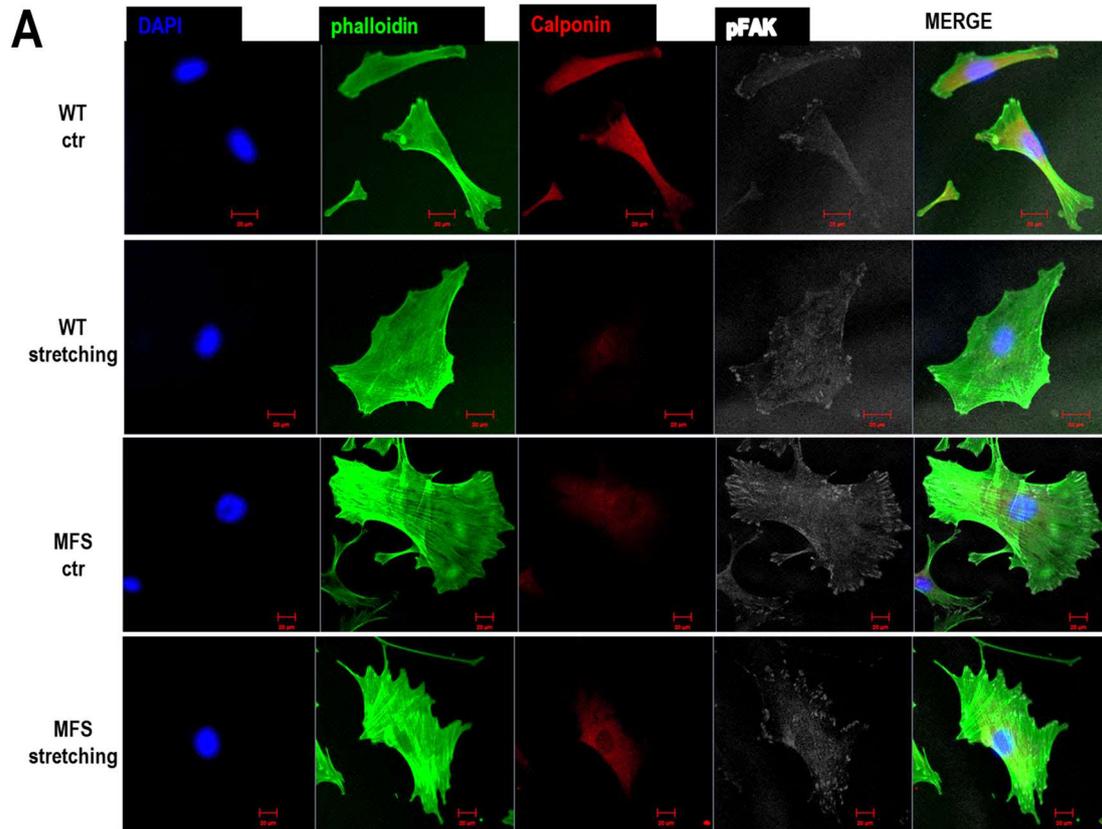
MFS-VSMC isoladas de aorta coletadas de camundongos aos 3 meses de idade, mimetizando o estágio inicial da doença, foram cultivadas como descrito em Métodos. A análise morfológica revelou diferenças importantes em MFS-VSMC vs. WT-VSMC. Como mostrado nas Figs. 5A-B, MFS-VSMC mostraram aumento significativo nas áreas das células, ca. 7 vezes maior que a das WT-VSMC. Em paralelo, MFS-VSMC mostram um acentuado espalhamento com perda de forma fusiforme e mudança para formas irregulares complexas (Fig. 5A). A perda da arquitetura fusiforme é típica de mudança fenotípica da VSMC para um fenótipo sintético/proliferativo. Além disso, tais interruptores fenotípicos são sabidamente exacerbados por estresse mecânico (Rodriguez et al., 2015; Wang et al, 2018).



**Figura 5: Análise da morfologia e área de MFS-VSMC e WT-VSMC cultivadas a partir de aortas de camundongos de 3 meses de idade:** As células primárias foram cultivadas como usual, fixadas e marcadas com Dapi (azul), faloidina (verde), calponina (vermelho) e pFAK (branco). Imagem representativa de cada grupo (WT e MFS), no entanto foram retiradas ao menos 6 fotos de cada grupo em 3 experimentos independentes. A área de ao menos 5 células por grupo foi calculada com uso do software imageJ. As imagens foram obtidas na objetiva de 20x. \*P<0,005 N=3

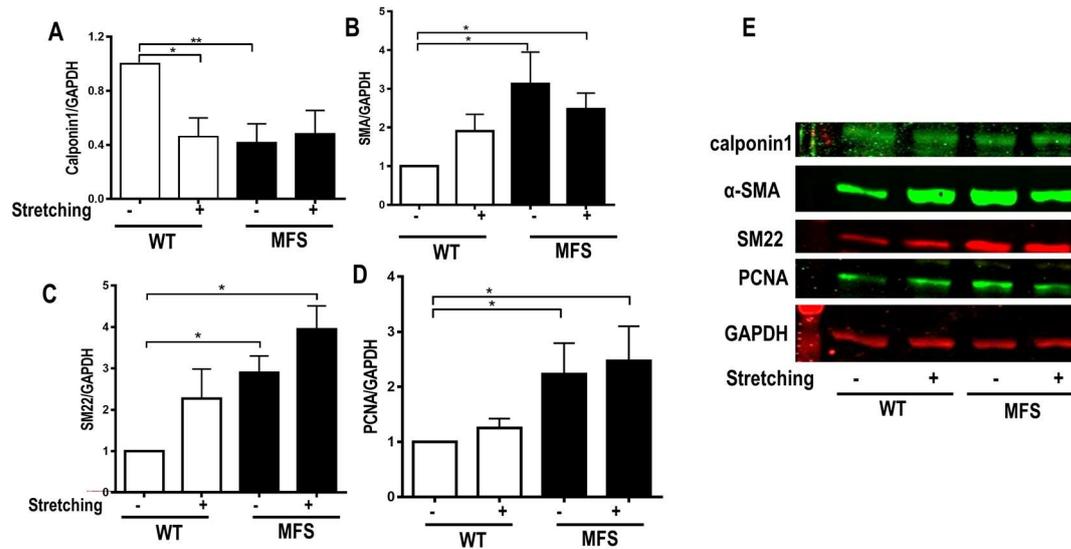
Para abordar tais questões, avaliamos a expressão de marcadores fenotípicos de VSMC de fenótipos contráteis e proliferativos/sintéticos sob condições estáticas e após a exposição ao estiramento cíclico uniaxial. No início do estudo, os níveis de expressão de calponina, um marcador proteico de fenótipo contrátil, estavam diminuídos em MFS-

VSMC vs. WT-VSMC (Fig.7A), enquanto a expressão do marcador proliferativo PCNA nas mesmas condições se mostrou aumentada (Fig.7D).



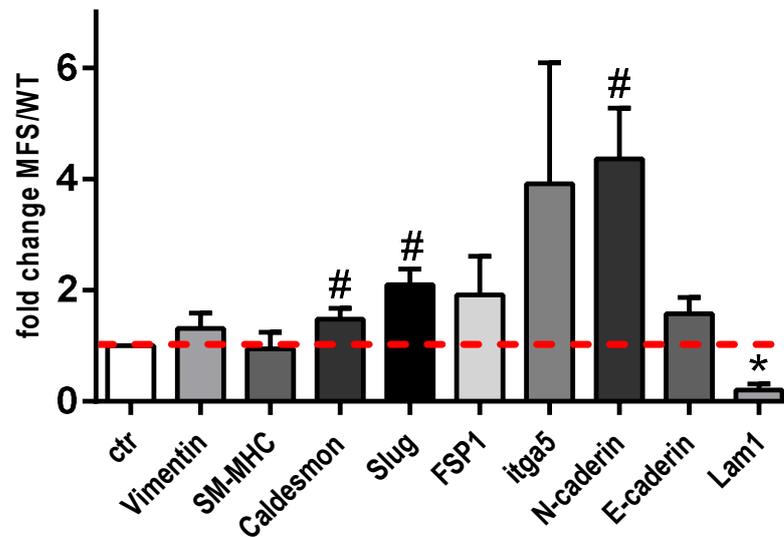
**Figura 6- Microscopia Confocal de MFS-VSMC e WT-VSMC-** As células primárias foram expostas ao estiramento mecânico cíclico uniaxial de 10%, 1 Hz, por 8 horas, ou não (ctr) e posteriormente marcadas com Dapi (azul), faloidina (verde), calponina (vermelho) e pFAK (branco). As imagens foram obtidas na objetiva de 20x e posteriormente submetidas ao aumento de três vezes. N=3. A barra de escala- 20μm.

No entanto, os marcadores de fenótipos contráteis SM22 e SMA também foram aumentados (Fig.7B e C), indicando que o fenótipo MFS-VSMC é mais complexo do que simplesmente um "switch" fenotípico. Em paralelo, o estiramento cíclico não teve influência clara na expressão de marcadores fenotípicos em MFS-VSMC. Enquanto calponina-1 diminuiu em WT-VSMC após o estiramento, consistente com resultados anteriores (Fig.6), não houve mudança adicional em MFS-VSMC (Fig. 7A). Além disso, as alterações associadas ao fenótipo MFS no PCNA, SM22 e SMA não foram significativamente afetadas pelo estiramento cíclico (Fig.7A-E).



**Figura 7- Expressão de marcadores fenotípicos em MFS-VSMC e WT-VSMC cultivadas a partir de aortas de camundongos de 3 meses de idade, em resposta ou não ao estresse mecânico.** As células primárias foram expostas ao estiramento mecânico cíclico uniaxial de 10%, 1 Hz, por 8 horas, ou não (ctr). A expressão proteica de (A) Calponina, (B) SMA, (C) SM22 e (D) PCNA avaliadas por Western blot, GAPDH foi usado como controle endógeno: (E) Imagens representativas da expressão proteica. Todos os resultados estão representados como média  $\pm$  s.e.m; \*  $p < 0,05$  vs. WT, \*\* vs. WT,  $p < 0,05$ .

Portanto, enquanto a morfologia foi significativamente modificada (Figs.5A e 6) em MFS-VSMC cultivadas, as diferenças morfológicas observadas, bem como os marcadores bioquímicos e a resposta ao estiramento mecânico parecem extrapolar uma mera mudança fenotípica simples (i.e., "switch fenotípico") e apontam para outro tipo de mudança. Dada a aparente forma mesenquimal, avaliamos a expressão de mRNA de alguns marcadores de transição mesenquimal (Fig.8). A expressão de caldesmona, Slug e em particular N-caderina aumentou, enquanto Lam-1 diminuiu em MFS-VSMC vs. WT. Estas alterações são consistentes com uma transição mesenquimal, indicando que MFS-VSMC apresentam algum grau de transformação/transição para um fenótipo semelhante ao mesenquimal.

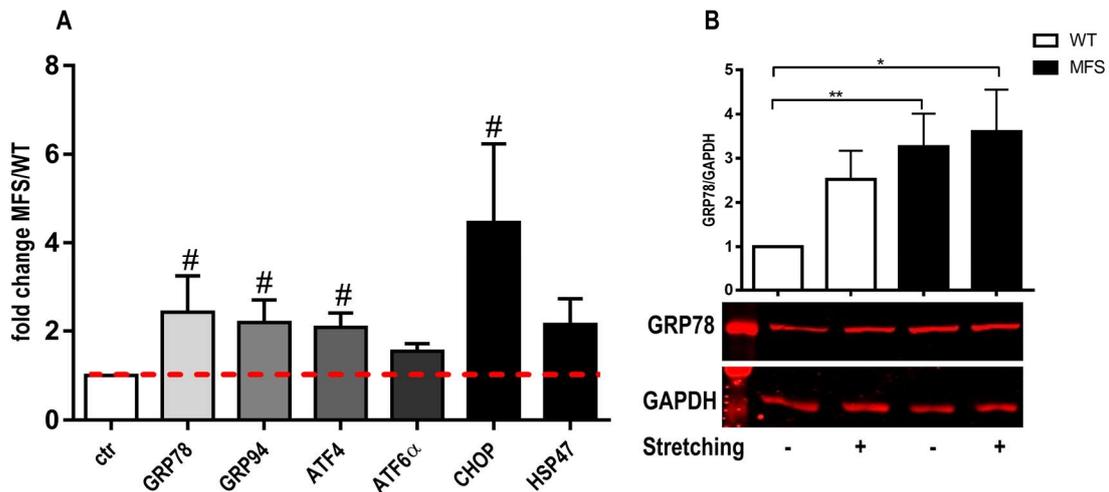


**Figura 8- Marcadores de transição mesenquimal em MFS-VSMC e WT-VSMC cultivadas a partir de aortas de camundongos de 3 meses de idade:** Marcadores de transição mesenquimal avaliados pelos níveis de mRNA de vimentina, SM-MHC, caldesmon, Slug, FSP-1, itga5, N-caderina e Lam1 por qPCR. A expressão do gene HPRT serviu como controle positivo endógeno. Os dados foram expressos como *fold-change*, normalizados pelos níveis de mRNA do controle (WT). Todos os resultados estão representados como média  $\pm$  s.e.m; \*  $p < 0,05$  vs. ctr, #  $p < 0,05$  vs. ctr.

#### 4.2 Expressão de marcadores de estresse do retículo endoplasmático

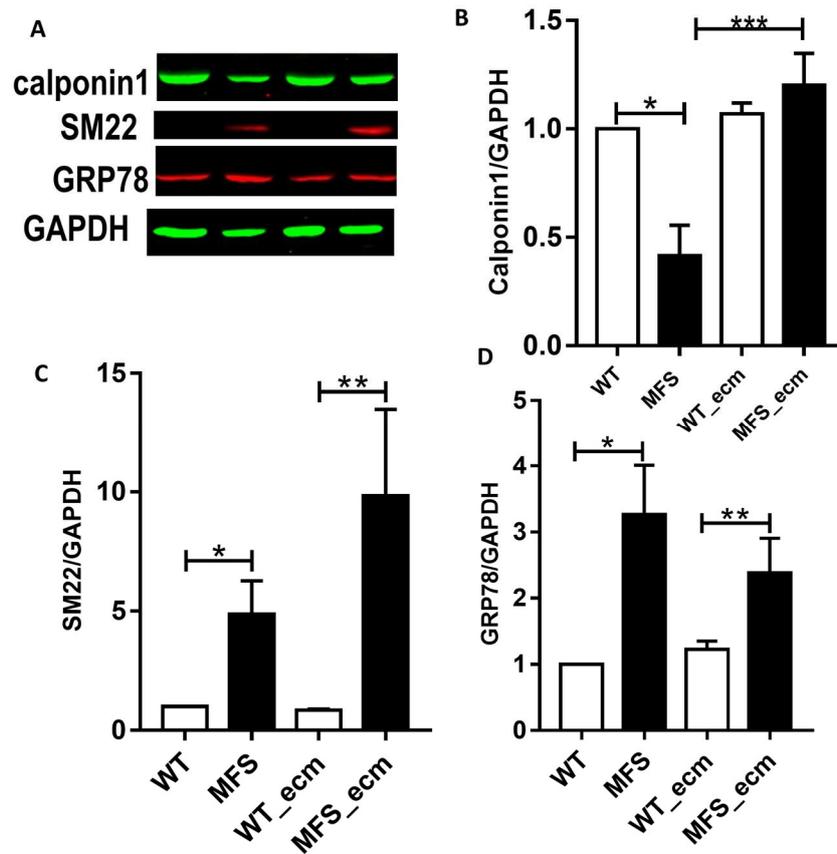
A fibrilina-1 é uma proteína secretada de alto peso molecular e seu processamento ocorre no retículo endoplasmático (Whiteman & Handford, 2003). Logo, mutações na sequência da fibrilina 1 podem originar estresse de RE, embora não tenhamos sido capazes previamente de documentar disfunção do RE em fibroblastos embrionários de camundongos (Meirelles et al., 2016). Por outro lado, o fenótipo do tipo mesênquima VSMC envolve remodelamento de RE e síntese aumentada de proteínas (por exemplo de ECM), potencialmente sobrecarregando o RE. Além disso, o estiramento mecânico pode desencadear o estresse RE em outro modelo de aneurisma (Jia et al., 2015). Por conseguinte, avaliamos as expressões de mRNA dos marcadores de estresse do RE GRP78/BIP, GRP94, CHOP e ATF4 e mostramos aumento significativo em MFS-VSMC vs. WT-VSMC (Fig.9A), ao contrário dos resultados em

MEFs do mesmo modelo (Meirelles et al., 2016). Em contrapartida, o estiramento cíclico aumentou a expressão de Grp78 em WT-VSMC, mas nenhuma alteração adicional foi observada em MFS-VSMC (Fig.9B). Desta maneira, enquanto o estiramento mecânico desencadeou mudança fenotípica e estresse do ER em WT-VSMC, MFS-VSMC parecem menos responsivas a tais sinais mecânicos.



**Figura 9- Expressão de marcadores de estresse do RE em MFS-VSMC vs. WT-VSMC:** As células MFS e WT foram expostas ou não a 8 horas de estiramento para avaliação de estresse do RE. A presença de estresse do RE foi avaliada pela marcação do anticorpo anti-KDEL, conseqüentemente da chaperona GRP 78. A marcação com  $\beta$ -actina foi usada como controle endógeno. N=3 \* p < 0,05 vs. WT, \*\* p < 0,05 vs. WT, # p < 0,05 vs. ctr.

Como a composição e rigidez da ECM sustentam os eventos de sinalização celular relacionados à diferenciação (Kim et al., 2011), investigamos se a ECM defeituosa associada à MFS está diretamente associada às alterações fenotípicas do MFS-VSMC ou à expressão de marcadores de stress do RE. Com esse objetivo, MFS-VSMC foram cultivadas por 72h em uma ECM acelular produzida por WT-MEF saudáveis (conforme descrito em Métodos). Como mostrado nas Fig.10A-D, a expressão de calponina foi normalizada e a expressão de SM22 aumentada ainda mais em MFS-VSMC cultivadas em ECM saudável, enquanto a expressão de GRP78 exibiu alterações insignificantes, indicando que o fenótipo, mas não o estresse do RE, está diretamente correlacionado à ECM desorganizada.



**Figura 10** Análise de marcadores fenotípicos de MFS-VSMC e WT-VSMC de 3 meses após a restituição da matriz. VSMC primárias foram plaqueadas por 72 horas em matriz acelular obtida através de MEFs (ecm) ou não, como descrito em Métodos. A expressão proteica de (A,B) Calponina, (A,C) SMA e (A,D) SM22 avaliadas por Western blot, GAPDH foi usado como controle endógeno: (E) Imagens representativas da expressão proteica. Todos os resultados estão representados como média  $\pm$  s.e.m; \*  $p < 0,05$  vs. WT, \*\*  $p < 0,05$  vs. WT\_ecm, \*\*\* $p < 0,05$  vs. MFS.

#### 4.3. Análise proteômica de proteínas diferencialmente expressas em MFS-VSMC

Dadas as alterações fenotípicas observadas em MFS-VSMC, investigamos o perfil proteômico dessas células a fim de esclarecer mais profundamente os programas fisiológicos subjacentes e possíveis implicações funcionais. Foi realizada uma abordagem *bottom-up* tipo *shotgun* comparando MFS-VSMC e WT-VSMC, em que a digestão com tripsina foi seguida por análise por LC/MS-MS, como descrito em Métodos. Tal análise revelou um total de 1620 proteínas em ambas as amostras, dentre

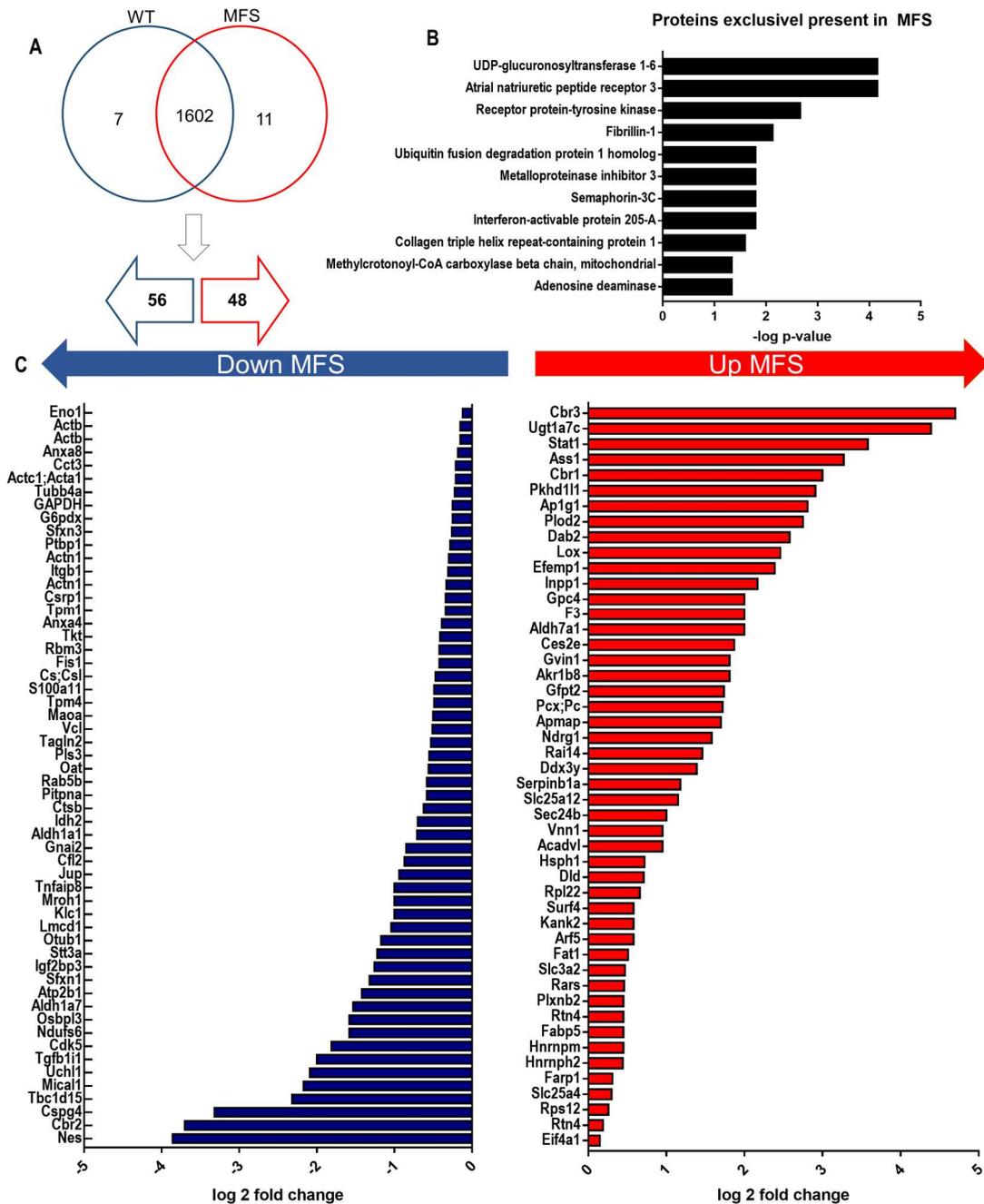
as quais 11 proteínas foram detectadas exclusivamente em MFS-VSMC (fig.11B) (Tabela 1) e 7 detectadas exclusivamente em WT-VSMC (Tabela 2). Dentre 1602 proteínas expressas em ambos os genótipos, 48 foram positivamente reguladas (Anexo3-Tabela 3), enquanto 63 foram negativamente reguladas (Anexo2-Tabela 2) em MFS-VSMC vs. WT-VSMC com  $p < 0,05$  (Fig.11C). A análise de proteínas relacionadas ao fenótipo mesenquimal mostrou que EGFR foi detectado exclusivamente em MFS-VSMC, enquanto LOX e Stat1 foram positivamente reguladas em MFS-VSMC, corroborando a ocorrência de transição mesenquimal em células MFS.

**Tabela 1- Proteínas apenas expressas na MFS-VSMC**

<i>Entry</i>	<i>Gene name</i>	<i>Number of proteins</i>	<i>Peptides</i>	<i>log p-value</i>	<i>description</i>
P03958	ADA CTHRC	3	2	1,33	Adenosine deaminase
Q9D1D6	1	5	3	1,59	Collagen triple helix repeat-containing protein 1 Receptor protein-tyrosine kinase;Epidermal growth factor receptor
Q01279	EGFR	4	4	2,66	
Q61554	FBN1	7	3	2,12	Fibrillin-1
Q3ULD5	MCCC2 MNDA	5	2	1,33	Methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial
P0DOV1	L	6	2	1,79	Interferon-activable protein 205-A; Myeloid cell nuclear differentiation antigen-like protein
P70180	NPR3 SEMA3	4	7	4,15	Atrial natriuretic peptide receptor 3
Q62181	C	1	2	1,79	Semaphorin-3C
P39876	TIMP3	3	4	1,79	Metalloproteinase inhibitor 3
P70362	UFD1L UGT1A	4	2	1,79	Ubiquitin fusion degradation protein 1 homolog
Q64435	6A	5	8	4,15	UDP-glucuronosyltransferase 1-6

**Tabela 2- Proteínas apenas expressas na WT-VSMC**

<i>Entry</i>	<i>Gene name</i>	<i>Number of proteins</i>	<i>Peptides</i>	<i>log p-value</i>	<i>description</i>
D3YVF0	AKAP5	2	4	2,18	A-kinase anchor protein 5 Coxsackievirus and adenovirus receptor
P97792	CXADR FAM213	2	3	2,88	homolog
Q9CYH2	A	8	2	1,79	Redox-regulatory protein FAM213A Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase;Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP3
Q62446	FKBP3	6	2	2,13	Ribosylidihyronicotinamide dehydrogenase
Q9JI75	NQO2	5	2	1,79	[quinone]
Q9QX96	SALL2	4	2	1,79	Sal-like protein 2
Q8VCX5	MICU1	2	2	1,33	Calcium uptake protein 1, mitochondrial

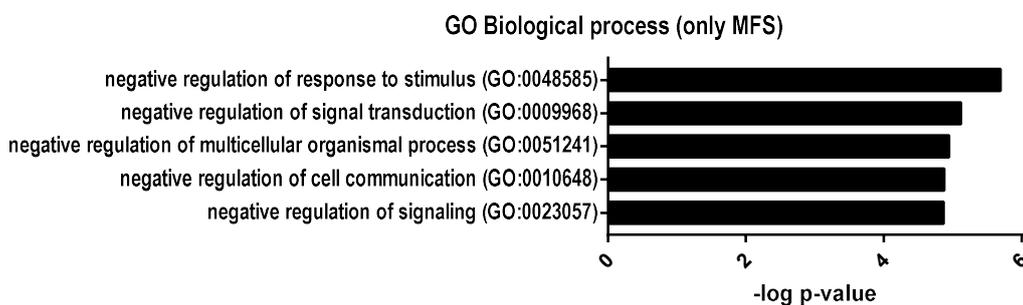


**Figura 11- Análise proteômica comparativa das MSF-VSMC e WT-VSMC cultivadas a partir da aorta de camundongos com 3 meses de idade. (A) Esquema representativo do número de proteínas diferencialmente expressas ou reguladas positiva/negativamente nas amostras MFS-VSMC e WT-VSMC. (B) Proteínas exclusivamente expressas em MFS-VSMC. (C) Proteínas positivamente reguladas e negativamente reguladas em MFS-VSMC, conforme indicado; expressão diferencial entre MFS e WT foi definida com base em valor de  $p < 0,05$  e  $FDR < 1\%$ . O gráfico representa os nomes de genes que codificam cada uma das proteínas observadas e os**

dados de alteração foram expressos em *log2 fold-change*. Uma descrição detalhada de todas essas proteínas é fornecida nas Tabela 2-5.

#### 4.4. Análise das vias de enriquecimento funcional dos dados proteômicos em MFS-VSMC e WT-VSMC

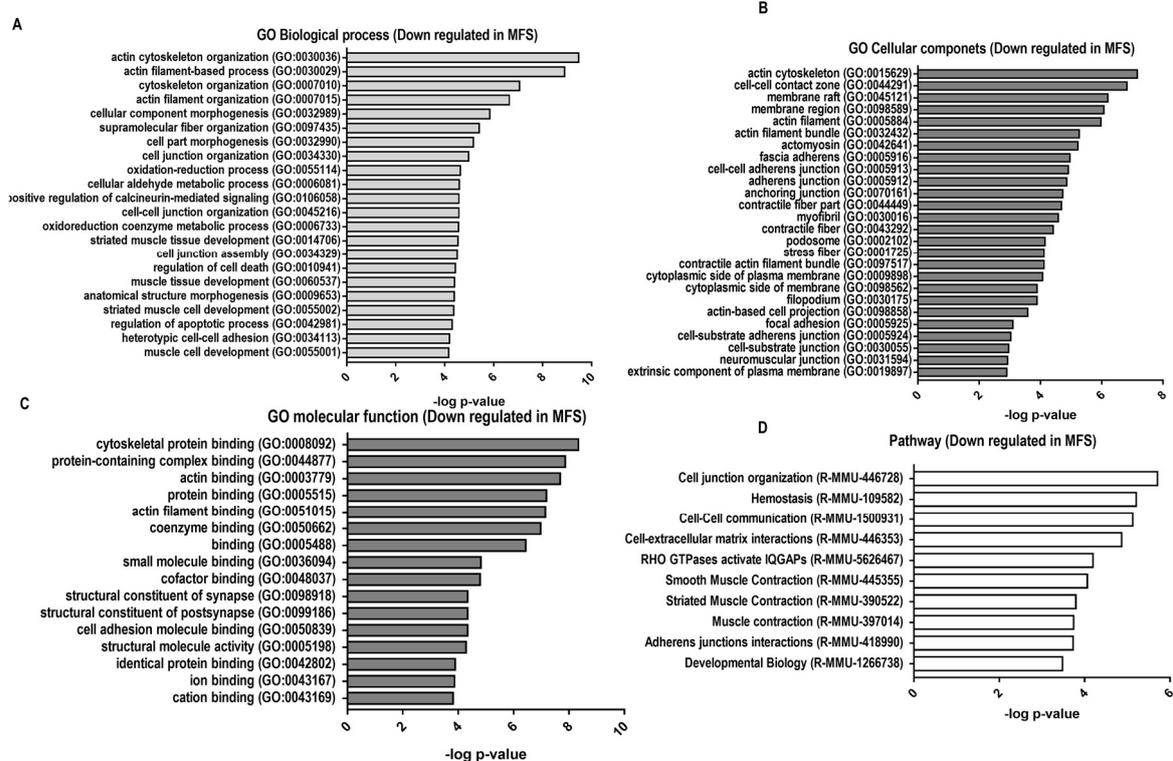
Em seguida, realizamos a análise das vias de enriquecimento dos dados proteômicos (como descrito em Métodos), com o fim de conectar proteínas positiva ou negativamente reguladas em MFS-VSMC a processos biológicos, função molecular, componentes celulares e vias ativadas. Proteínas detectadas exclusivamente em MFS-VSMC não se associaram a processos específicos além de "regulação de dados de processos biológicos", indicando regulação negativa de diferentes processos, aparentemente desconectados entre si (Fig. 12). Apenas sete proteínas foram expressas exclusivamente em WT-VSMC e não apresentaram nenhum alinhamento capaz de gerar processos GO.



**Figura 12- Processos biológicos de proteínas apenas expressas em MSF-VSMC e WT-VSMC cultivadas a partir da aorta de camundongos com 3 meses de idade.** Para todos os dados de enriquecimento, as proteínas foram alinhadas de acordo com a sua associação com um ou mais dos principais clusters funcionais do Gene Ontology identificados a partir da análise de bioinformática de David e Panther. Para todos os dados, FDR <1% e valor de p <0,05 foram critérios obrigatórios.

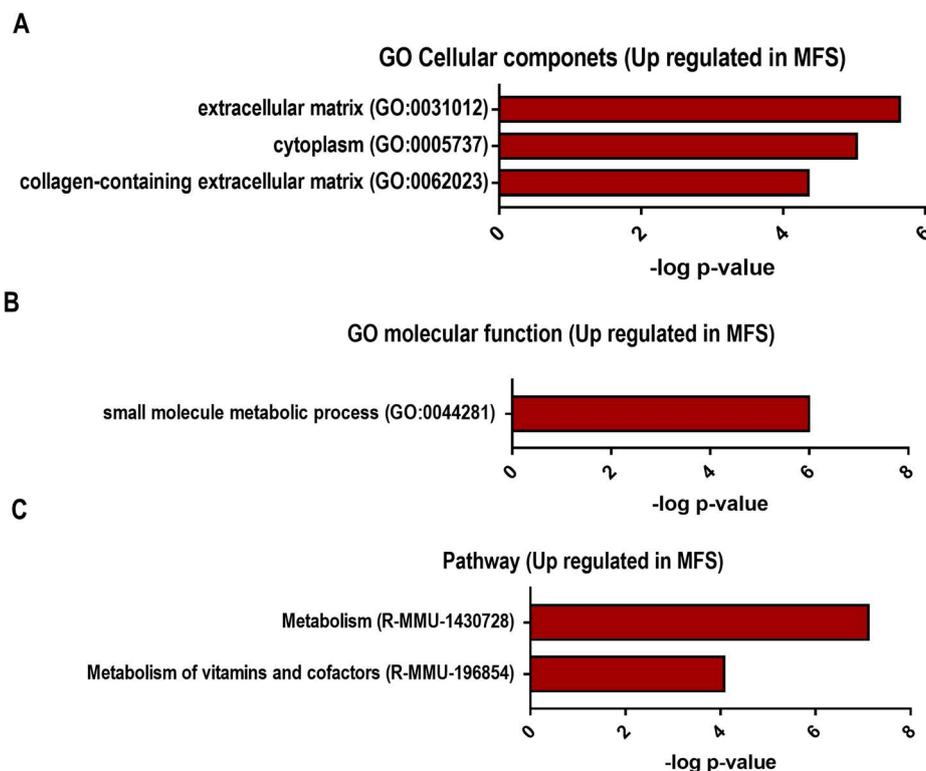
A Fig. 13 A-D descreve os resultados da análise de enriquecimento de proteínas reguladas negativamente em MFS-VSMC vs. WT-VSMC, que se associaram estatisticamente a vários processos detectáveis por este tipo de análise. Dentre processos biológicos e funções moleculares negativamente regulados, os principais se associaram

à organização do citoesqueleto, regulação do citoesqueleto de actina, junção celular e desenvolvimento/diferenciação de células musculares. A análise de componentes celulares (que indica se o conjunto de proteínas associa-se a algum componente específico da célula) mostrou como principais "hits" negativamente regulados citoesqueleto de actina, junções célula-célula, domínios de membrana, fibras de actina e estruturas de adesão (Fig.13B). Por fim, as vias negativamente reguladas convergem para organização de junção celular, homeostasia e interações célula-célula e célula-EC (Fig 13D).



**Figura 13- Análise de Ontologias Funcionais de proteínas reguladas negativamente em MSF-VSMC e WT-VSMC cultivadas a partir da aorta de camundongos com 3 meses de idade.** Mais importantes (A) Processos Biológicos *Gene Ontology*, (B) Componentes Celulares, (C) Função Molecular de *Gene Ontology* e (D) Análise de vias de Enriquecimento a partir de proteínas *down* reguladas em MFS-VSMC em comparação com WT-VSMC. Para todos os dados de enriquecimento (A-D), as proteínas foram alinhadas de acordo com a sua associação com um ou mais dos principais clusters funcionais do Gene Ontology identificados a partir da análise de bioinformática de David e Panther. Para todos os dados, FDR <1% e valor de p <0,05 foram critérios obrigatórios.

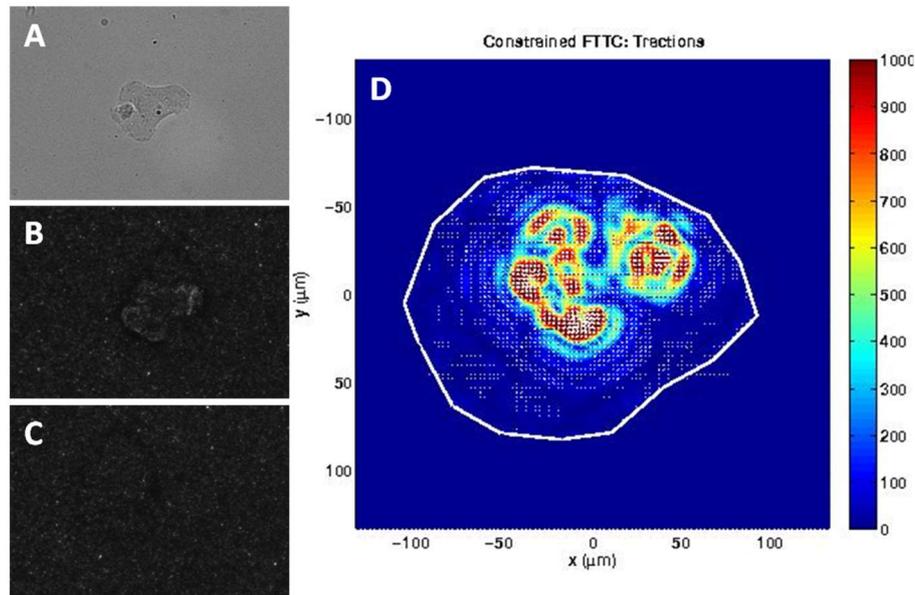
Contrastando com a análise de proteínas negativamente reguladas em MFS-VSMC, as proteínas reguladas positivamente nas MFS-VSMC não produziram associação significativa detectável com processos biológicos específicos. Os componentes celulares representaram basicamente as proteínas da matriz extracelular (Fig. 14A). A única função e via molecular regulada positivamente em MFS-VSMC relacionou-se a processos metabólicos de moléculas pequenas (Fig. 14B) com um número significativo de proteínas relacionadas à mitocôndria (Fig. 14C).



**Figura 14- Análise de Ontologias Funcionais de proteínas reguladas positivamente nas MSF-VSMC e WT-VSMC cultivadas a partir da aorta de camundongos com 3 meses de idade.** (A) Componentes Celulares, (B) Função Molecular de *Gene Ontology* e (C) Análise de vias de Enriquecimento a partir de proteínas *up* reguladas em MFS-VSMC em comparação com WT-VSMC. Para todos os dados de enriquecimento (A-C), as proteínas foram alinhadas de acordo com a sua associação com um ou mais dos principais clusters funcionais do Gene Ontology identificados a partir da análise de bioinformática de David e Panther. Para todos os dados, FDR <1% e valor de p <0,05 foram critérios obrigatórios.

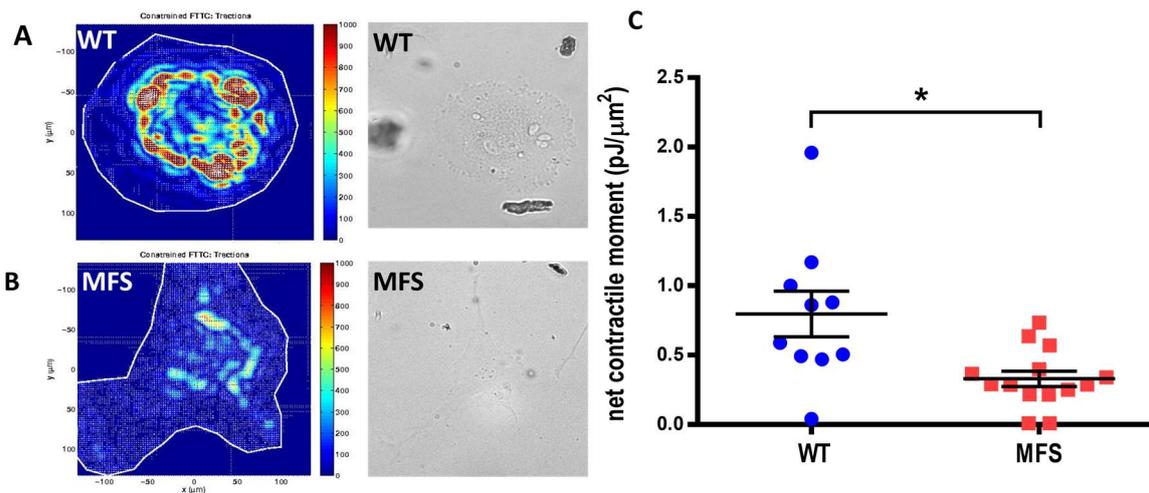
#### **4.5. MFS-VSMC demonstram menor capacidade de gerar força de tração quando comparadas a WT-VSMC**

Dadas as alterações fenotípicas com perfil de transição mesenquimal, a regulação negativa de proteínas relacionadas ao citoesqueleto (Fig.11) e o fato de que a perda de geração de força muscular é um ponto convergente da fisiopatologia da maioria dos tipos de aneurisma de aorta torácica (Milewicz et al., 2017; Nogi et al., 2018), foram realizados experimentos funcionais para explorar respostas de sinalização mecânica em MFS-VSMC e entender o perfil de geração de força dessas células. A capacidade de geração de força foi analisada por Microscopia de Força de Tração, que é baseada no deslocamento de microesferas fluorescentes embebidas em matrizes de rigidez conhecida. Este método envolve a aquisição de três imagens da mesma célula. A primeira imagem é um contraste de fase para o delineamento da área celular (Fig.15A) e a segunda para análise de fluorescência das microesferas presentes na área onde a célula é aderida (Fig.15B). A terceira imagem é adquirida na fase fluorescente após o descolamento da célula usando tripsina (Fig.15C). O software MatLab sobrepõe as três imagens de cada célula e identifica a mudança da localização das microesferas, calculando assim a força que a célula aplica no gel de acrilamida. Essa análise gera dados numéricos e um *heat map*, tal como na figura 15-D. A partir dos dados numéricos, é possível calcular o momento contrátil, que expressa a força de tração que a célula exerce no momento em que as fotos foram feitas.



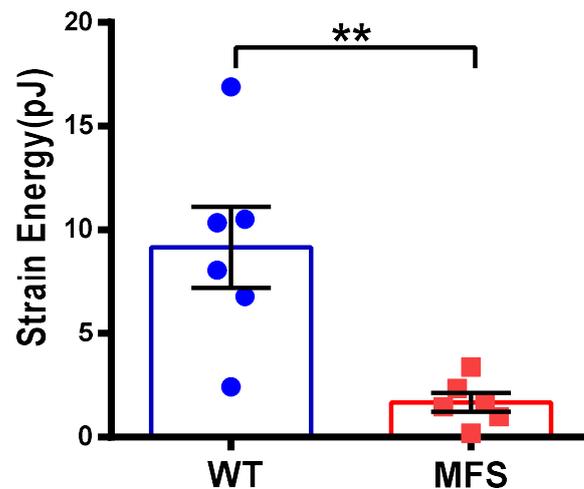
**Figura 15 - Imagens obtidas da TFM:** (A) foto da célula em contraste de fase. (B) Imagem na fase de fluorescência para evidenciar as *beads* fluorescentes presentes na área que a célula está aderida. (C) Imagem na fase fluorescente após o descolamento da célula pós-tratamento com tripsina, usada para calcular o deslocamento das microesferas antes e depois da adesão da célula. (D) Após as análises, o software gera essa imagem, além de dados numéricos, que em conjunto são usados para quantificar a força exercida na matriz de acrilamida.

A análise do *heat map* (Fig.16A-B) indicou claramente uma diminuição global na força de tração exercida pela MFS-VSMC vs. WT-VSMC, ambas semeadas em matriz de poliacrilamida com *coating* de colágeno (Fig.16) ou fibronectina (Fig.19) em viscosidade fisiológica (4,8 kPa). Esses dados foram corroborados pelas análises numéricas. O momento contrátil líquido (*Net contractile moment*), que é a força de tração exercida pelas células na matriz no momento em que as imagens foram adquiridas, foi significativamente menor em MFS-VSMC vs. WT-VSMC (Fig.16C).



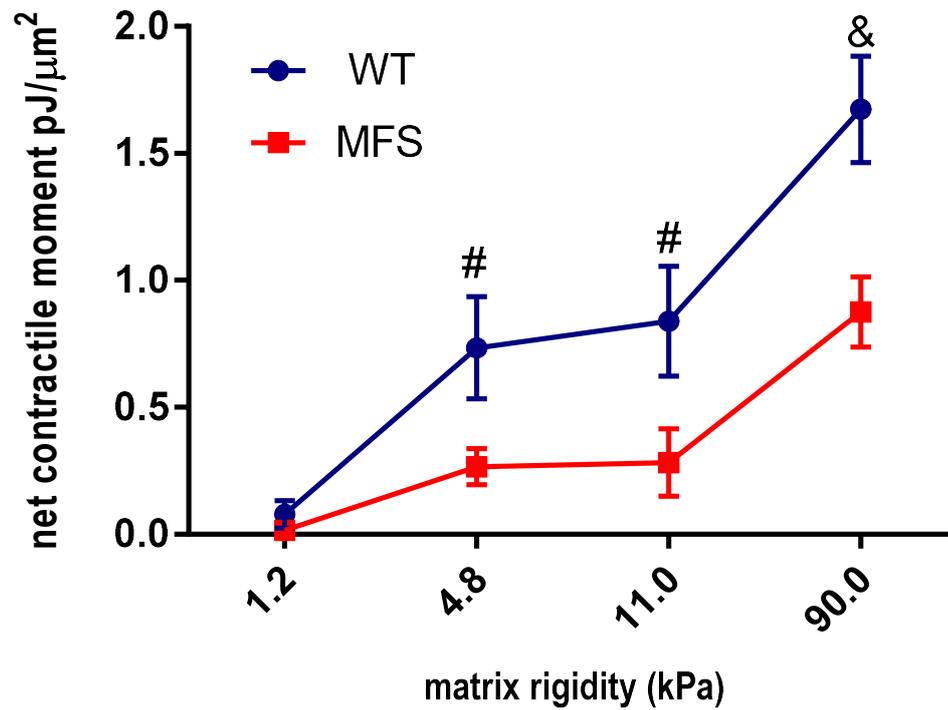
**Figura 16- Análise da força de tração em MFS-VSMC e WT-VSMC em cultura a partir da aorta de camundongos com 3 meses de idade.** VSMC de aorta de camundongos foram plaqueadas a baixa confluência em matriz de acrilamida embebida com microesferas fluorescentes, cujo deslocamento foi analisado por Microscopia de Força de Tração e dados processados como descrito em Métodos. (A) Forças de tração de WT-VSMC e (B) MFS-VSMC (C): Momento contrátil de cada célula na rigidez da matriz de 4,8 kPa, normalizada por área ( $\mu\text{m}^2$ ), calculada através do software imageJ. Resultados de 3 experimentos independentes avaliando pelo menos 5 células por experimento. Dados expressos como média  $\pm$  s.e.m. \*  $p < 0,002$ .

Resultados semelhantes foram obtidos com a análise da *Strain energy*, também conhecida como energia de deformação, refletindo a plasticidade de um corpo quando ele é deformado e quanta energia é consumida para retorná-lo ao estado inicial (Fig.17). Esses resultados indicam que tanto a força de tração quanto a energia envolvida no processo de deformação são consideravelmente menores na MFS-VSMC.

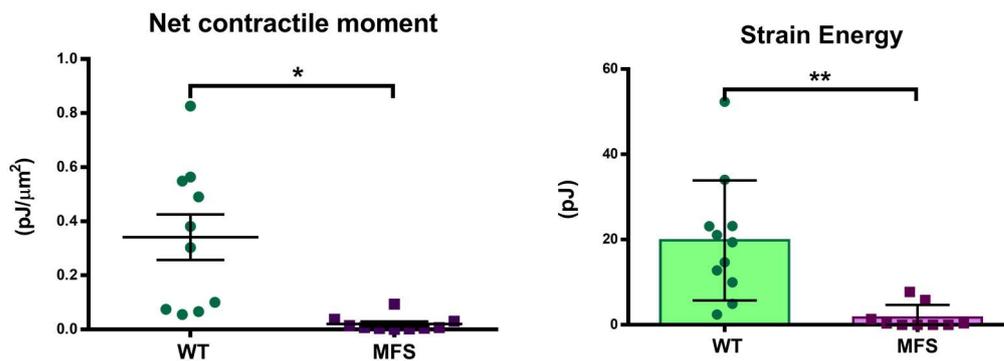


**Figura 17- Energia de deformação avaliada em MFS-VSMC e WT-VSMC em cultura a partir da aorta de camundongos com 3 meses de idade:** As células musculares lisas foram plaqueadas em baixa confluência em uma matriz de acrilamida (4,8 kPa) embebida de microesferas fluorescentes, responsáveis por captar a força exercida pelas células à matriz. Foram feitos 3 experimentos independentes, buscando avaliar ao menos 5 células independentes por experimento. \*\*P<0,004

Sabe-se que o aumento na rigidez da ECM é capaz de desencadear uma tensão aumentada nas células aderidas, não muito diferente das forças aplicadas externamente à VSMC (Steucke et al., 2015). Deste modo, investigamos se a menor força de tração reflete uma incapacidade intrínseca da MFS-VSMC para gerar força em qualquer rigidez da ECM. Para isso, mensuramos forças de tração em diversos valores de rigidez da ECM abaixo ou acima dos valores fisiológicos. A Fig.18 mostrou que em todos os valores da rigidez da ECM a força de tração permaneceu menor em MFS-VSMC vs. WT-VSMC. Ao mesmo tempo em alta viscosidade (90 kPa) MFS-VSMC atingiu valores de força análogos aos observados para níveis fisiológicos (4,8 kPa) de ECM no WT-VSMC. Assim, as menores forças exercidas por MFS-VSMC não refletem uma incapacidade intrínseca para gerar força, mas sim um forte amortecimento da curva de resposta de rigidez da ECM/força de tração.



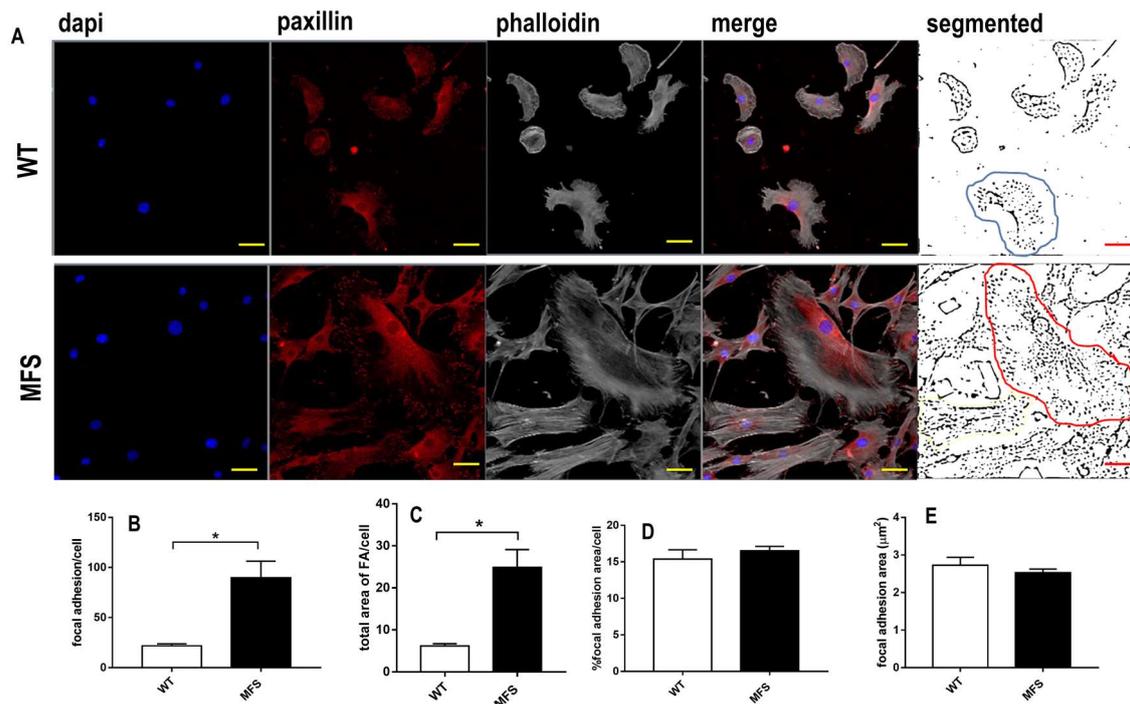
**Figura 18- Momento contrátil em MFS-VSMC e WT-VSMC cultivadas a partir da aorta de camundongos com 3 meses de idade, em matrizes com diferentes graus de rigidez:** As células musculares lisas foram plaqueadas em baixa confluência em matriz de acrilamida de 1,2 kPa, 4,8 kPa, 11 kPa ou 90 kPa. Foram obtidos dados numéricos e um gráfico com valores em Pa, nos quais as cores indicam a força exercida. O momento contrátil de cada célula foi normalizado por sua área calculada pelo software imageJ. Foram feitos 3 experimentos independentes, buscando avaliar ao menos 5 células independentes por experimento. Dados expressos como média ± s.e.m, #<0.05, \* p <0.002. \*\* p <0.004



**Figura 19- Momento contrátil e energia de deformação em MFS-VSMC e WT-VSMC cultivadas a partir da aorta de camundongos com 3 meses de idade, em *coating* de fibronectina-** As células musculares lisas foram plaqueadas em baixa confluência em uma matriz de acrilamida (4,8 kPa) embebida de *beads* fluorescentes, com *coating* de fibronectina (responsáveis por captar a força exercida pelas células à matriz). Foram obtidos dados numéricos e um gráfico com valores em Pa, nos quais as cores indicam a força exercida. O momento contrátil de cada célula foi normalizado por sua área calculada pelo software ImageJ. Foram feitos 3 experimentos independentes, buscando avaliar ao menos 5 células independentes por experimento. \*P<0,002

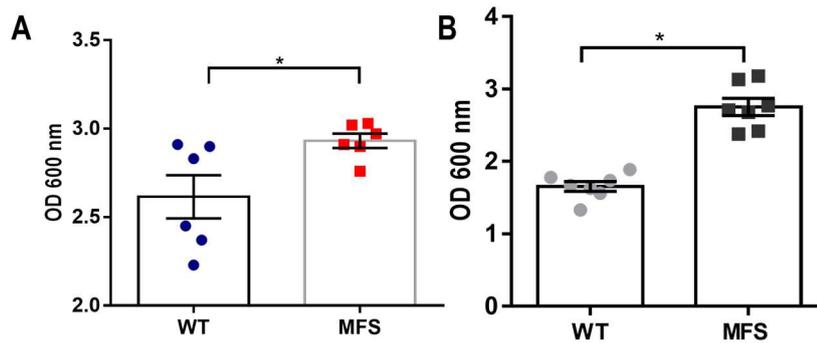
#### 4.6. Perfil de adesão e análise de fibras de estresse de actina

Um dos principais mecanismos que podem comprometer a geração de força de tração celular é a perda de estrutura/função de adesão, como observado anteriormente em relação à modulação tiol-redox da superfície celular (Tanaka et al, 2018). Assim, para avaliar mecanismos de prejuízo na força de tração em MFS-VSMC, analisamos o perfil de adesões focais (FA). O número absoluto de FA (Fig.20-B), bem como a área total de FA (Fig.20C) foram aumentados em MFS-VSMC vs. WT-VSMC, enquanto o número de FA normalizado pela área das células não mostrou diferenças entre esses tipos de células (Fig.20D) , sugerindo que MFS-VSMC mostrou maior número absoluto de FA devido à sua maior área (Fig.20A-D). Uma vez que o tamanho do FA tem sido associado à sua maturação (Heng, 2014), investigamos o tamanho de cada FA para analisar as diferenças no estado de maturação. Mais uma vez, nossos resultados indicaram que não há diferenças significativas entre MFS-VSMC e WT-VSMC no tamanho da FA ( $\mu\text{m}^2$ ) (Fig.20E).



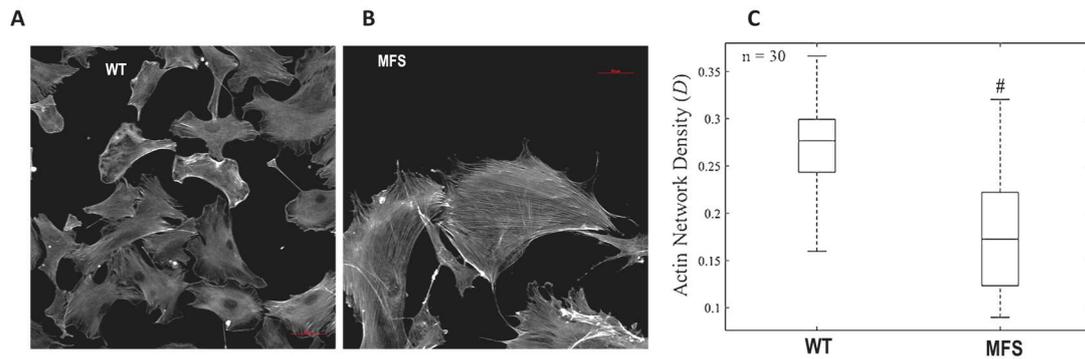
**Figure 20- Análise de adesão focal celular nas MFS-VSMC e WT-VSMC em cultura a partir da aorta de camundongos com 3 meses de idade:** As células foram cultivadas em condições padrão por 24 h, fixadas/permeabilizadas e coradas para fibras de estresse de F-actina (faloidina-branco), paxilina (vermelho) e núcleos (DAPI-azul). (A) Imagens representativas de quantificação de adesão focal (FA) usando ImageJ e plugins específicos, como descrito em Métodos, para WT-VSMC ou MFS-VSMC, produzindo as seguintes variáveis: (B) Número de FA por célula. (C) área total de FA por célula. (D) Área relativa de FA pela área da célula. (E) Tamanho individual de FA. (A) - (E): os dados foram recolhidos a partir de três replicados biológicos com 8-12 células visualizadas por dados de condição expressos como média  $\pm$  s.e.m. \*  $p < 0,05$ . A barra de escala- 50 $\mu$ m.

Finalmente, foi realizado um ensaio de adesão. Como mostrado na Fig.21A-B, MFS-VSMC não mostraram perda de capacidade de adesão e de fato aderiram mais rapidamente que WT-VSMC à matriz de colágeno (Fig.21A), bem como de fibronectina (Fig.21B). Assim, contrariamente às nossas expectativas iniciais, MFS-VSMC não exibiram perfil de adesão prejudicado e na verdade apresentados aumento em alguns aspectos da função adesiva.



**Figure 21- Ensaio de adesão das MFS-VSMC e WT-VSMC em cultura a partir da aorta de camundongos com 3 meses de idade:** Ensaio de adesão feito como descrito em Métodos (A) ensaio de adesão usando colágeno tipo 1 (10 $\mu$ g/ml) como *coating* (B) usando fibronectina (10 $\mu$ g/ml) ensaio de adesão dados expressos como média  $\pm$  s.e.m. \*  $p < 0,05$ .

Diante desses resultados, e de acordo com a análise proteômica, questionamos se a função do citoesqueleto da actina poderia estar prejudicada quanto à formação de fibras de estresse, pois há uma correlação geral entre densidade de fibras de actina e geração de força de tração celular (Okeyo et al., 2015). Usando um algoritmo para análise da densidade das fibras de estresse de actina, como descrito em métodos, mostramos menor densidade de rede de fibra de actina em MFS-VSMC quando comparado a WT-VSMC (Fig.22). Uma vez que a expressão total da SMA-actina foi aumentada (Fig.7B-E), propomos que a perda da força de tração na MFS-VSMC é provavelmente devida ao prejuízo da regulação da polimerização/organização da F-actina, em vez da perda da expressão da actina em si. De fato, várias proteínas reguladoras de F-actina foram menos expressas em MFS-VSMC, incluindo actinina-1, cofilina-2, MICAL-1, CSPG4, Nestina-1, KLC1, plastina e integrina  $\beta$ -1 (Fig.11C e Anexo 2-Tabela 2)

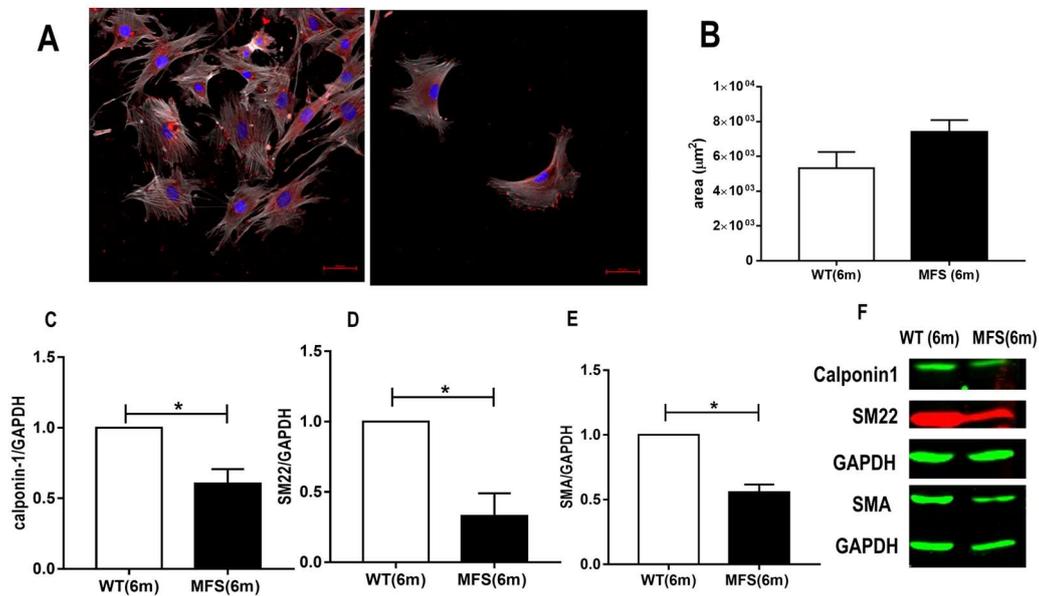


**Figura 22- Análise da densidade da rede de actina das MFS-VSMC e WT-VSMC em cultura a partir da aorta de camundongos com 3 meses de idade: WT-VSMC corada com faloidina (A) ou MFS-VSMC (B). (C) Distribuição do *Boxplot* da densidade de filamentos de F-actina calculada pelo software Matlab® (ver Métodos). As imagens foram obtidas na objetiva de 20x, #  $p < 0,05$ . A barra de escala- 50 $\mu$ m.**

#### **4.7. Respostas fenotípicas e funcionais em MFS-VSMC isoladas de camundongos com 6 meses de idade**

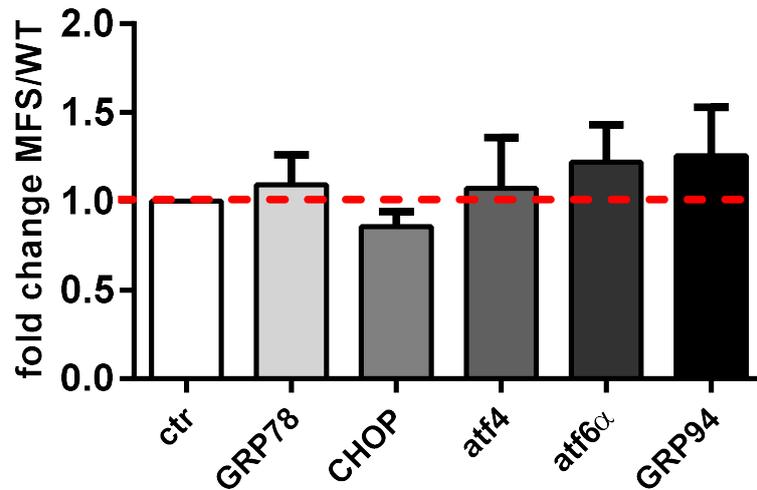
Como a MFS é uma doença evolutiva com mecanismos patogênicos potencialmente distintos em suas fases iniciais e avançadas, como de fato sugerido recentemente (Parker et al, 2019), realizamos análises do fenótipo da VSMC, morfologia celular e mecanismos funcionais em VSMC coletadas de camundongos MFS e WT aos 6 meses de idade. Curiosamente, a maior parte das importantes alterações presentes em MFS-VSMC coletadas de camundongos com 3 meses de idade não foi observada nas células isoladas aos 6 meses. Nestas, a morfologia e a área das células não mostraram diferenças com o WT-VSMC (Fig.23A-B). A área média de espalhamento em WT-VSMC aos 3 meses ( $4\text{-}5 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ ) e aos 6 meses ( $4\text{-}6 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ ) não diferiram. Por outro lado a área das MFS-VSMC de 3 meses e 6 meses foram significativamente divergentes, enquanto as MFS-VSMC de 3 meses apresentaram área em torno de  $2 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ , as MFS-VSMC(6m) exibiram área de  $6\text{-}8 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ . Avaliamos também a expressão de marcadores fenotípicos em VSMC de 6 meses (Fig.23C-F), todos marcadores associados ao fenótipo contrátil foram menos expressos em MFS-VSMC(6m) vs. WT-VSMC(6m). Ao contrário dos achados de 3 meses, MFS-VSMC(6m) mostraram diminuição de todos marcadores contráteis avaliados, inclusive SM22 e SMA que se expressaram aumentados em MFS-VSMC de 3 meses. Já as WT-

VSMC de 6 meses parecem estar mais diferenciadas que na mesma condição em 3 meses, expressando Calponina, SM22 e SMA em quantidades aumentadas comparadas à WT-VSMC.



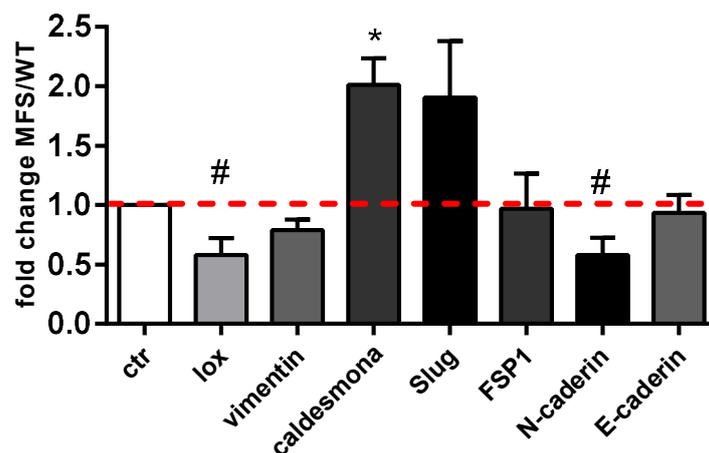
**Figura 23- Morfologia e área das MFS-VSMC e WT-VSMC cultivadas a partir de aortas de camundongos de 6 meses de idade:** (A) Análise morfológica de WT-VSMC e MFS-VSMC: fibras de F-actina (branco), núcleos (DAPI - azul) e paxilina (vermelho) analisados em células fixadas em paraformaldeído. (B) Área celular total, avaliada de pelo menos 5 células por grupo, em 3 experimentos independentes, calculada usando o software ImageJ, imagens capturadas em objetiva 20x. A barra de escala- 50µm. A expressão proteica de (C) Calponina, (D) SM22 e (E) SMA avaliadas por Western blot, GAPDH foi usado como controle endógeno: (F) Imagens representativas da expressão proteica. Todos os resultados estão representados como média ± s.e.m; \* p <0,05 vs. WT (6m)

A expressão de RNAm de marcadores de estresse de ER não mostrou diferenças quando avaliados em MFS-VSMC vs. WT-VSMC (Fig.24).



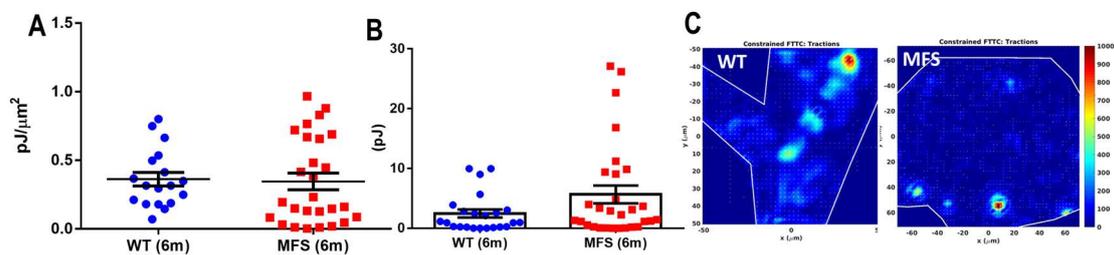
**Figura 24-** Marcadores de estresse do retículo endoplasmático em MFS-VSMC e WT-VSMC cultivadas a partir de aortas de camundongos de 6 meses de idade: (A) Marcadores de estresse do retículo endoplasmático foram avaliados através dos níveis de mRNA de GRP78 (BIP), GRP94, CHOP, ATF4 e ATF6 $\alpha$  por qPCR. O HPRT serviu como controle positivo interno.

Os marcadores de transição mesenquimal também exibiram alterações atenuadas em MFS-VSMC vs. WT-VSMC, por exemplo, apenas o caldesmona manteve-se aumentado enquanto a N-caderina e Lox diminuíam (Fig.25).



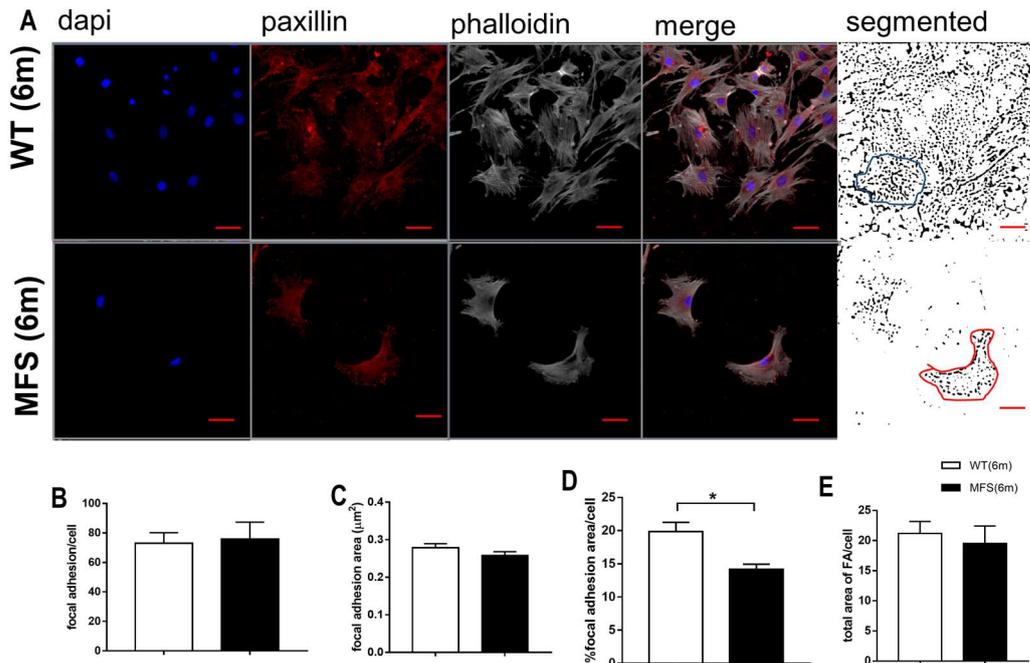
**Figura 25-** Marcadores de transição mesenquimal em MFS-VSMC e WT-VSMC cultivadas a partir de aortas de camundongos de 6 meses de idade: Marcadores de transição mesenquimal avaliados pelos níveis de mRNA de vimentina, loxl, caldesmona, E-caderina, N-caderina, Slug e FSP-1 por qPCR. A expressão do gene HPRT serviu como controle interno. Os dados foram expressos como *fold-change*, normalizados pelos níveis de mRNA do controle (WT). \*, #  $p < 0,05$  vs. ctr

Em paralelo, observamos relações análogas nas diferenças funcionais. O perfil de força de tração expresso por *Net contractile moment* e *Strain energy* não mostrou diferenças entre MFS-VSMC e WT-VSMC (Fig.26-B). É importante observar que as mecanorespostas foram atenuadas significativamente mesmo em WT-VSMC. Este estado pode ser devido ao envelhecimento das células. De fato, observamos (dados não mostrados) que MFS-VSMC aos 6 meses crescem bem mais lentamente que MFS-VSMC aos 3 meses. Em paralelo, para investigar se esses resultados foram influenciados pela senescência, realizamos ensaios de beta-galactosidase (Fig.28), que não mostraram evidência de senescência em MFS-VSMC (6m) ou WT-VSMC (6m).

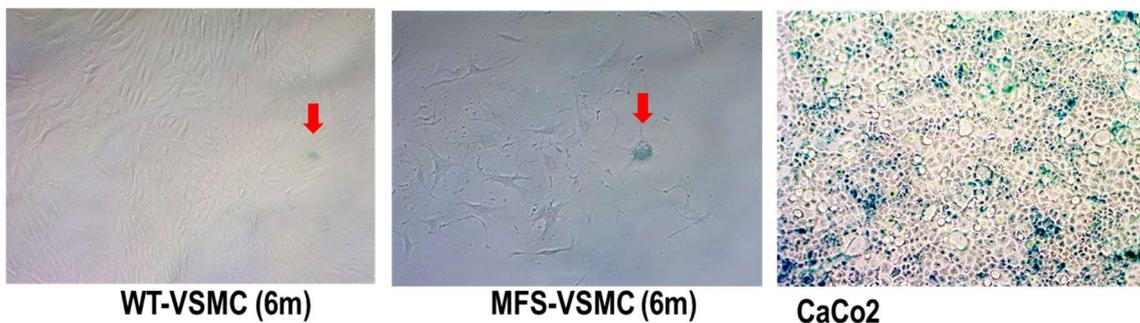


**Figura 26- Perfil de forças das MFS-VSMC e WT-VSMC cultivadas a partir de aortas de camundongos de 6 meses de idade:** (A) Momento contrátil na rigidez da matriz de 4,8 kPa, normalizado pela área de cada célula ( $\mu\text{m}^2$ ), calculado através do software de imagem-J. Resultados de 3 experimentos independentes avaliando pelo menos 5 células por experimento. (B) Energia de deformação medida simultaneamente com o momento contrátil nas mesmas amostras que (A). (C) Imagens representativas das forças de tração em WT-VSMC e MFS-VSMC.

A análise de adesões focais mostrou que embora MFS-VSMC tivessem área de FA/área de células diminuída (Fig.27D), a área, o tamanho e o número de FA não apresentaram diferenças vs. WT-VSMC (Fig.27A, B, C, E).



**Figure 27- Análise das adesões focais em MFS-VSMC e WT-VSMC cultivadas a partir de aortas de camundongos de 6 meses de idade:** (A) Imagens representativas da quantificação de adesões focal (FA) utilizando ImageJ e plugins específicos, como descrito em métodos, para WT-VSMC ou MFS- VSMC, obtendo as seguintes variáveis: (B) número de FA por célula. (C) área total de FA por célula. (D) Tamanho individual de FA. (E) Área relativa de FA para área da célula. (B) - (E): os dados foram coletados de três repetições biológicas com 8-12 células visualizadas por condição. Os dados são expressos como média ± s.e.m.; \*  $p < 0,05$  vs. WT(6m). A barra de escala- 50µm.



**Figure 28- Análise de senescência:** As células primárias foram marcadas com SA-βgal em MFS-VSMC e WT-VSMC cultivadas a partir de aortas de camundongos de 6 meses de idade como descrito em métodos. Como controle positivo, células de linhagem CaCo2. Imagens obtidas no aumento de 10x. Marcado pela seta vermelha, coradas em azul as células senescentes.

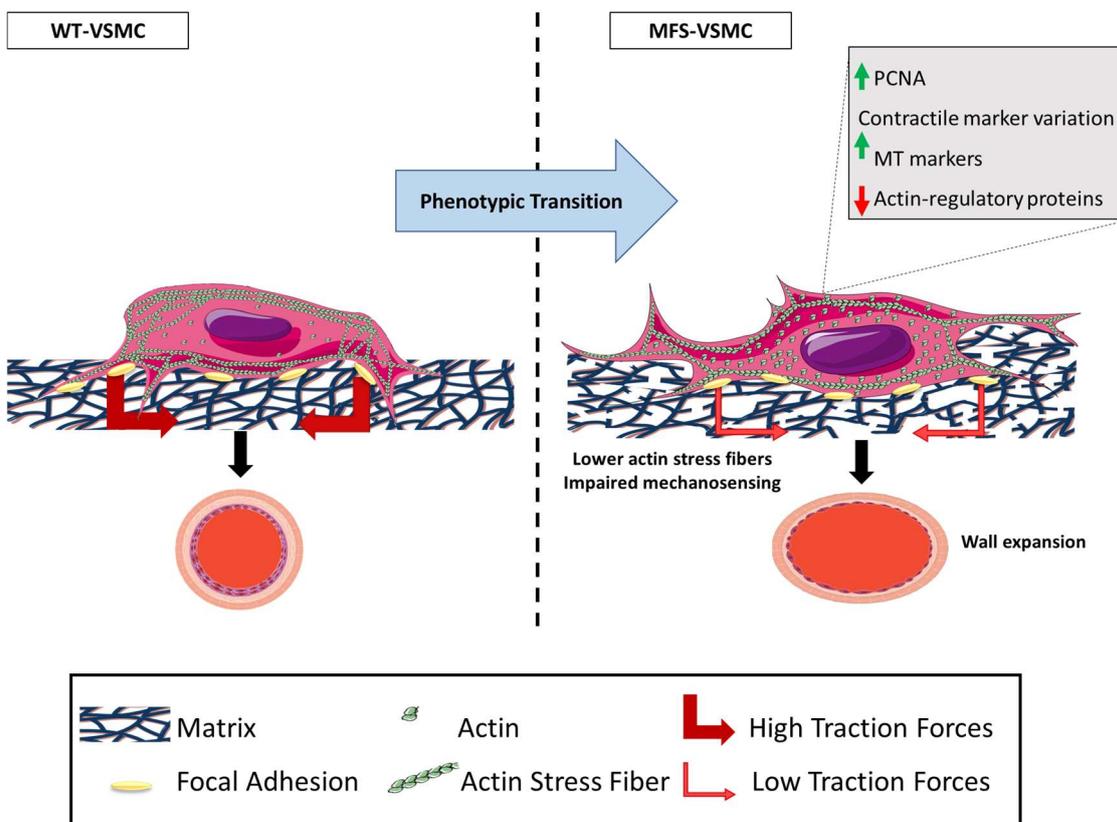
## **5.DISSCUSSÃO**

## 5. DISCUSSÃO

Os resultados encontrados nesse estudo mostram a ocorrência de significantes alterações fenotípicas nas VSMC com a mutação  $mg\Delta^{lpn}$  para MFS. Aos 3 meses de evolução, detectamos alterações fenotípicas nas MFS-VSMC, com maior proliferação celular e redução de alguns marcadores de diferenciação (calponina-1), porém aumento de outros (SMA e SM22). Ao mesmo tempo, ocorreu mudança morfológica, com aumento da área aderida da célula e perda do formato fusiforme. Tais alterações foram consistentes com transição para fenótipo mesenquimal, que foi confirmada pela expressão de vários marcadores. Os marcadores de estresse RE aumentaram em MFS-VSMC vs. WT-VSMC condição basal, sem aumento pós estiramento mecânico. A correção da matriz de fibrilina-1 defeituosa em MFS-VSMC promoveu reversão de alguns aspectos do fenótipo, mas não do estresse do RE. MFS-VSMC mostra perfil proteômico divergente de WT-VSMC, em particular menor expressão de proteínas regulatórias do citoesqueleto. Importante, MFS-VSMC têm reduzida capacidade de gerar força de tração quando semeadas em matriz com rigidez fisiológica e geram menor momento contrátil *in vitro*, no entanto, sem perda na capacidade de adesão. Importante, MFS-VSMC têm forte atenuação da resposta de tração a aumentos da rigidez da matriz. Em paralelo, MFS-VSMC exibem menor densidade em fibras de estresse de actina em relação às WT-VSMC. A maioria destas alterações não foram observadas aos 6 meses de evolução da doença.

O principal achado do nosso estudo é a validação de que MFS-VSMC exibem, durante os estágios iniciais da evolução da doença (camundongos de 3 meses de idade), prejuízo na capacidade de geração de força de tração, no contexto de um fenótipo tipo de transição. Esses resultados têm várias implicações. Primeiro, eles reforçam a ideia da VSMC como fator central no desenvolvimento de TAAD na MFS, tendo em vista que a perda na capacidade de gerar de força em VSMC é cada vez mais reconhecido como um elemento comum na gênese de aneurismas de diferentes etiologias (Milewicz et al., 2017). Em segundo lugar, o fenótipo estável observado em VSMC em cultura sugere que os programas de genes desregulados, em vez de apenas mudanças fenotípicas específicas do contexto reversíveis, contribuem para a desregulação da mecanoresposta em VSMC. Isto é ainda mais consistente com o fenótipo de transição observado em nosso trabalho, que difere de uma simples mudança fenotípica. Além disso, o prejuízo

significativo da resposta de força em VSMC ao aumento de rigidez da ECM, implica numa mecanossinalização alterada como um fator subjacente na pato-biologia MFS-VSMC (Fig. 29). Além disso, nossos resultados indicam que a capacidade de geração de força prejudicada não se associa com a perda na capacidade de adesão nem com a menor expressão de genes geradores de força, mas sim com a organização prejudicada do citoesqueleto de actina. Além disso, embora os danos na capacidade de geração de força também ocorram em mais estágios da doença (camundongos de 6 meses de idade), isso parece se associar ao envelhecimento e à redução da diferenciação de VSMC.



**Figura 29 - Modelo de como as alterações de força, ECM alterada e alterações fenotípicas convergem geração de aneurismas em MFS-VSMC**

A modulação fenotípica em VSMC é subjacente à doença vascular, mas em paralelo é essencial para o desenvolvimento cardiovascular adequado. O complexo fenotípico de nossas MFS-VSMC apresenta características de fenótipo tanto contrátil quanto sintético e parece ir além de mudanças fenotípicas simples e reversíveis. Nossos resultados são remanescentes de outros trabalhos mostrando que o fenótipo MFS-VSMC exibe marcadores contráteis tanto em células cultivadas e espécimes humanos (Crosas e

Molist et al., 2015), como em modelos de células pluripotentes induzíveis (Granata et al., 2017) e modelos animais (Parker et al., 2018). Nossos resultados estendem esses achados revelando um fenótipo de transição semelhante à mesenquimal, sugerindo que a expressão de marcadores contráteis pode estar por trás de uma possível alteração em programas de desenvolvimento. Ainda não é claro se nossos dados representam uma recapitulação de um fenótipo dormente da VSMC, ou a manifestação “de novo” de um fenótipo transformado. Essa é uma questão relevante a ser perseguida. Um fenótipo misto dormente nessas VSMC não é improvável, considerando que VSMC coletadas de aortas de camundongos com 3 meses de idade estão nos estágios finais de uma fase de transição de maturação, de tal modo, esse fenótipo não é incomum. Além disso, não podemos excluir que possíveis artefatos de cultura tenham contribuído para a mudança do tipo mesênquima, pois é bem sabido que VSMC em cultura sofrem espontaneamente uma mudança para um fenótipo sintético, independente da estimulação mitogênica externa (Shanahan & Weissberg, 1998). Por outro lado, VSMC em geral são capazes de manter seus fenótipos estáveis em cultura e os fenótipos de regiões distintas (Owens et al., 2004), bem como de origens embriológicas distintas (Wang et al., 2015), podem ser fielmente recapitulados *in vitro*. De maneira geral, os novos achados de um fenótipo semelhante ao mesênquima observado por nós enfatiza a importância dos programas genéticos de desenvolvimento em VSMC e podem esclarecer os fenótipos discordantes de VSMC entre a MFS e outras etiologias de aneurisma.

Os mecanismos relacionados com a falha na capacidade de geração de força em MFS-VSMC podem envolver dois modelos principais. No primeiro modelo, a ECM defeituosa promove alterações fenotípicas por meio de sinais bioquímicos e isso levaria a uma menor geração de força. No segundo modelo, a ECM defeituosa levaria a prejuízos tanto na mecanossensibilização como na mecanossinalização, que em paralelo se associariam ao fenótipo alterado. É provável que uma combinação desses dois modelos seja responsável pelas mudanças observadas. Mostramos que a substituição de uma ECM defeituosa por uma corrigida induz uma reversão parcial do fenótipo da MFS, o que é consistente com ambos os modelos. Em paralelo, a menor capacidade de geração de força da MFS não refletiu uma incapacidade intrínseca de gerar força, mas sim um amortecimento significativo da resposta da força da VSMC ao aumento de rigidez da ECM. Isso implica na mecanossensibilização prejudicada como um fator importante na menor capacidade de geração de força. Essas considerações estão de

acordo com a fisiopatologia de outros tipos de aneurismas aórticos, nos quais a mecanossensibilização prejudicada é o principal mecanismo subjacente patogênico, convergindo para a menor capacidade de geração de força das VSMC. Uma menor capacidade de geração de força da VSMC pode perturbar significativamente a unidade VSMC-ECM (Zamir & Geiger, 2001) levando à danos no remodelamento da ECM, alteração da distribuição de força e acoplamento de tensões mecânicas a respostas de sinalização apropriadas. É bem conhecido que mutações que levam a uma menor expressão de genes contráteis promovem TAAD (Milewicz et al., 2017). Em outros modelos de TAAD, foi documentado que a expressão prejudicada de SMA gera a modificação fenotípica para o perfil sintético. Em contraste, embora a expressão de proteínas contráteis, como SMA e SM22, seja conhecida estarem relacionadas à força de tração celular aumentada (Chen, 2007), tanto a expressão da proteína SMA quanto a SM22 em nosso estudo, aumentaram em MSF-VSMC. Ao mesmo tempo, apesar da presença de fibras de estresse de actina bem organizadas em MFS-VSMC (Fig.5), a densidade da rede de actina foi diminuída vs. WT-VSMC (Fig.22), sugerindo que a regulação prejudicada de F-actina em vez de menor expressão SMA, foi responsável pela menor geração de força. A formação de tais feixes contráteis estreitamente acoplados para geração de força e coordenar as forças recíprocas responsáveis pela deformabilidade celular e interação das fibras de actomiosina. De fato, os dados de análise proteômica mostraram menor expressão de várias proteínas associadas à polimerização de fibra actina ou *turnover*/estabilização em MFS (Fig.11). Exemplos destes incluem a *cross linker* de actina, a actinina-1 (Roca-Cusachs et al., 2013), a cofilina, que sustenta o *turnover* de actina nos lamelipódios (Zimmermann & Kovar, 2019), MICAL, que é responsável pela despolimerização de actina (Grintsevich et al., 2016), CSPG4 suporta a formação de F-actina (Tang et al., 2018) e plastina, um dos principais reguladores da formação do citoesqueleto de actina e actina cortical (Ding et al., 2017). Curiosamente, a nestina-1, a proteína mais negativamente regulada na MFS, é uma proteína filamentar intermediária conhecida por despolimerizar vimentina e apoiar a proliferação de VSMC pulmonar (Saboore et al., 2017). Assim, em comum com outros tipos de TAAD, o MFS-VSMC apresenta menor capacidade de geração de força, mas a fisiopatologia parece envolver a prejuízos na regulação de F-actina ao invés de menor expressão de proteínas contráteis.

Um aspecto relevante do nosso trabalho foi que a adesão celular não foi prejudicada nas MFS-VSMC vs. WT-VSMC e, na verdade, melhorada em alguns aspectos. Isso não é apenas consistente com o fenótipo de transição mista observado por nós, mas também indica que a capacidade de geração de força prejudicada não envolve a danos na formação de estruturas de adesão. De fato, embora a adesão seja associada à força, a FA pode se tornar apenas um dispositivo passivo de ancoragem à medida que amadurece e nessa situação pode produzir força insignificante (Beningo et al., 2001). Observações recentes também impõem restrições espaço-temporais ao crescimento aderências (Stricker et al., 2011) indicando que o crescimento de FA não é necessário para transmitir grandes tensões de tração à ECM. Neste contexto, o comprometimento na geração de força de tração parece preferencialmente associado à sinalização de fora para dentro (*outside-in*), envolvendo integrinas, em vez de capacidade de adesão. De fato, um modelo de “embreagem molecular” foi proposto para entender como as células acoplam sua adesão integrina-ECM aos feixes de actina intracelular, com base no acúmulo de força e no número de unidades de fixação (Owen et al., 2017). Isso reforça ainda mais a mecanossensação prejudicada como uma característica crucial da MFS-VSMC.

Embora o foco principal de nosso trabalho fosse sobre VSMC pós-maturação nos estágios iniciais da evolução da MFS, nós também avaliamos a VSMC coletada de camundongos de 6 meses de idade, um estágio avançado, considerando a evolução da MFS com desenvolvimento de TAAD. Nossos resultados demonstram a manutenção da menor capacidade de geração de força, porém não distinta da WT-VSMC. Apesar de evidências que as VSMC de 6 meses não são senescentes (Fig.28), suspeitamos que o envelhecimento esteja por trás da menor capacidade de geração de força do WT-VSMC. De fato, o envelhecimento é um fator de risco bem conhecido para o desenvolvimento de aneurismas e tem sido associado à capacidade de geração de força prejudicada e alterações mecânicas na aorta (Humphrey & Milewicz, 2017). Isto sugere que o envelhecimento em VSMC pode acelerar o fenótipo MFS. Paralelamente, observamos que MFS-VSMC exibem uma menor expressão de genes contráteis vs. seus correspondentes WT-VSMC, entretanto a expressão de marcadores contráteis em MFS-VSMC foi bastante robusta e acima dos marcadores correspondentes em 3 meses de idade das WT-VSMC. Assim, os marcadores contráteis permanecem bem expressos ao longo da evolução da MFS, reforçando ainda mais os fenótipos observados nos modelos

anteriores da MFS (Parker et al., 2018; Crosas-Molist et al., 2015, 2015; Dale et al., 2017; Granata et al., 2017). Um estudo recente em camundongos indicou perfis proteômicos em evolução na MFS avançada, indicando uma expressão proeminente/papel funcional para a integrina  $\beta 3$  na capacidade migratória de MFS (Parker et al., 2018).

Em resumo, nossos resultados descrevem um comprometimento da força de tração em MFS-VSMC em todos os estágios de evolução da doença no modelo de camundongo MFS, com amortecimento da resposta à rigidez da matriz em MFS-VSMC de 3 meses de idade. Em termos gerais, este resultado está de acordo com a evolução observada de outros modelos de TAAD. Outras características da MFS comuns a outros modelos de TAAD incluem alteração estável no fenótipo de VSMC além de deformações na regulação da unidade VSMC-ECM. Em paralelo, nossos resultados mostram várias características específicas das MFS-VSMC, algumas em desacordo com os achados descritos em outros modelos. Um dado importante é que a perda na capacidade de geração de força na MFS não é devida à redução de proteínas contráteis, associado com mudanças para o fenótipo sintético. Além disso, MFS-VSMC não exibem falhas em respostas de adesão. Em vez disso, mostramos que o prejuízo na geração de força na MFS se correlaciona com a regulação prejudicada na formação de fibras de estresse de actina, num contexto de um complexo fenótipo de transição com características mesenquimais. Estas novas observações levantam a importância de alterações em programas gênicos de desenvolvimento como mediadores de mudanças fenotípicas em MFS-VSMC. Esses resultados ajudarão a esclarecer a história mecanobiológica da fisiopatologia da MFS e poderão abrir caminho para uma melhor compreensão da patobiologia da VSMC na MFS.

## **6. ANEXOS**

Anexo 1- Tabela 1-Sequencias dos primers usados no RT-PCR

<b>Protein name</b>	<b>Foward sequence</b>	<b>Reverse sequence</b>
<i>Atf4</i>	GAGCTTCCTGAACAGCGAAGTG	TGGCCACCTCCAGATAGTCATC
<i>Atf6a</i>	CTTCCTCCAGTTGCTCCATC	CAACTCCTCAGGAACGTGCT
<b>BiP/GRP78</b>	TTCAGCCAATTATCAGCAAACCTCT	TTTTCTGATGTATCCTCTTCACCAGT
<b>GRP94</b>	AAGAATGAAGGAAAAACAGGACAAAA	CAAATGGAGAAGATTCCGCC
<b>CHOP</b>	CCACCACACCTGAAAGCAGAA	AGGTGAAAGGCAGGGACTCA
<b>Caldesmon</b>	AGAGATCGAAAGGAGAAGGG	CTATCTTGAGAGACGAGCCT
<b>SM-MHC</b>	CATGGACCCGCTAAATGACA	CAATGCGGTCCACATCCTTC
<b>Vimentin</b>	CTTGAACGGAAAGTGGAATCCT	GTCAGGCTTGGAACGTCC
<b>N-cadherin</b>	AGGGTGGACGTCATTGTAGC	CTGTTGGGGTCTGTCAGGAT
<b>E-cadherin</b>	AGGTTTTCGGGCACCCTTA	TGATGTTGCTGTCCCAAGT
<b>Slug</b>	CTCACCTCGGGAGCATAACAG	GACTTACACGCCCCAAGGATG
<b>FSP-1</b>	GGCAAGACCCTTGAGGAG	CCTTTTCCCAGGAAGCTAG
<b>Lox</b>	CCACAGCATGGACGAATTCA	AGCTTGCTTTGTGGCCTTCA
<b>Integrin <math>\alpha</math>-5</b>	TGCAGTGGTTCGGAGCAAC	TTTTCTGTGCGCCAGCTATAC
<b>Laminin-1</b>	CCTGGACTTACGGCAGGTC	AGGGTTTGAACCTTGACGCCAT
<b>HPRT</b>	GCAGCGTTTCTGAGCCATTG	AAAGCGGTCTGAGGAGGAAG

Anexo 2- Tabela 2- Proteínas menos expressas nas MFS-VSMC

<i>Entry</i>	<i>Gene name</i>	<i>Number of proteins</i>	<i>Peptides</i>	<i>log 2 fold change</i>	<i>log p-value</i>	<i>description</i>
P60710	ACTB	2	36	-0,15	1,71	Actin, cytoplasmic 1
P68033	ACTC1; ACTA1	12	34	-0,21	2,54	Actin, alpha cardiac muscle 1;Actin, alpha skeletal muscle
Q7TPR4	ACTN1	4	68	-0,33	2,56	Alpha-actinin-1
Q7TPR4	ACTN1	2	68	-0,30	2,20	Alpha-actinin-1
P24549	ALDH1 ALDH1	3	20	-0,71	1,31	Retinal dehydrogenase 1
Q62148	A7	2	12	-1,53	2,04	Aldehyde dehydrogenase, cytosolic 1
P97429	ANXA4	9	20	-0,39	2,64	Annexin A4;Annexin
O35640	ANXA8	2	21	-0,18	1,88	Annexin A8;Annexin
G5E829	ATP2B 1	28	8	-1,42	2,13	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1
P08074	CBR2	3	5	-3,70	2,24	Carbonyl reductase [NADPH] 2
P80318	CCT3	8	21	-0,21	1,60	T-complex protein 1 subunit gamma
P49615	CDK5	4	4	-1,81	1,62	Cyclin-dependent-like kinase 5
P45591	CFL2	3	9	-0,87	2,13	Cofilin-2
Q9CZU6	CS;CSL	4	16	-0,47	2,24	Citrate synthase, mitochondrial; Citrate synthase
Q8VHY0	CSPG4	2	16	-3,32	2,65	Chondroitin sulfate proteoglycan 4
P97315	CSRP1	2	8	-0,34	2,13	Cysteine and glycine-rich protein 1
P10605	CTSB	4	8	-0,62	2,11	Cathepsin B;Cathepsin B light chain; Cathepsin B heavy chain
P17182	ENO1	18	31	-0,12	1,60	Alpha-enolase
Q9CQ92	FIS1	3	4	-0,42	1,33	Mitochondrial fission 1 protein
Q00612	G6PDX	1	19	-0,25	1,41	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase
P16858	GAPDH	21	24	-0,25	1,71	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
P08752	GNAI2	20	12	-0,85	1,59	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2
P54071	IDH2	3	11	-0,70	2,68	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial
Q9CPN8	IGF2BP 3	3	5	-1,26	1,60	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3
P09055	ITGB1	2	13	-0,31	1,30	Integrin beta-1
Q02257	JUP	1	14	-0,94	1,36	Junction plakoglobin
O88447	KLC1	18	7	-1,00	1,59	Kinesin light chain 1
Q8VEE1	LMCD1	3	14	-1,04	3,16	LIM and cysteine-rich domains protein 1
Q64133	MAOA	4	17	-0,50	1,36	Amine oxidase [flavin-containing] A
Q8VDP3	MICAL 1	2	9	-2,17	1,39	Protein-methionine sulfoxide oxidase MICAL1
E0CZ22	MROH1 NDUFS	1	3	-1	1,33	Maestro heat-like repeat family member 1 NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 6, mitochondrial
P52503	6	3	2	-1,58	1,33	
Q6P5H2	NES	1	15	-3,86	2,42	Nestin
P29758	OAT	4	25	-0,56	1,89	Ornithine aminotransferase, mitochondrial

Q9DBS9	OSBPL 3	6	4	-1,58	1,59	Oxysterol-binding protein;Oxysterol-binding protein-related protein 3
Q7TQI3	OTUB1	3	3	-1,17	2,13	Ubiquitin thioesterase OTUB1
P53810	PITPNA	8	6	-0,58	2,13	Phosphatidylinositol transfer protein alpha isoform
Q99K51	PLS3	12	24	-0,55	1,81	Plastin-3
P17225	PTBP1	25	12	-0,28	1,62	Polypyrimidine tract-binding protein 1
P61021	RAB5B	6	3	-0,58	1,33	Ras-related protein Rab-5B
O89086	RBM3	5	4	-0,42	1,33	RNA-binding protein 3
P50543	S100A1 1	1	8	-0,49	1,59	Protein S100-A11
Q99JR1	SFXN1	2	8	-1,32	1,67	Sideroflexin-1
Q91V61	SFXN3	2	9	-0,26	1,79	Sideroflexin-3
P46978	STT3A TAGLN	13	5	-1,22	1,79	Dolichyl-diphosphooligosaccharide- protein glycosyltransferase subunit STT3A
Q9WVA4	2 TBC1D	4	18	-0,53	1,94	Transgelin-2
Q9CXF4	15 TGFB1I	4	4	-2,32	2,32	TBC1 domain family member 15
Q62219	1	2	5	-2,00	2,18	Transforming growth factor beta-1-induced transcript 1 protein
P40142	TKT TNFAIP	5	26	-0,41	2,52	Transketolase
Q3TBL6	8	8	3	-1	1,33	Tumor necrosis factor alpha-induced protein 8
P58771	TPM1	3	29	-0,34	1,79	Tropomyosin alpha-1 chain
Q6IRU2	TPM4 TUBB4	1	28	-0,49	2,50	Tropomyosin alpha-4 chain
Q9D6F9	A	1	29	-0,22	1,37	Tubulin beta-4A chain
Q9R0P9	UCHL1	3	9	-2,09	1,46	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase; Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1
Q64727	VCL	4	62	-0,51	2,30	Vinculin

Anexo 3- Tabela 3- Proteínas mais expressas nas MFS-VSMC

<i>Entry</i>	<i>Gene name</i>	<i>Number of proteins</i>	<i>Peptides</i>	<i>log<sub>2</sub> fold change</i>	<i>log p-value</i>	<i>description</i>
P50544	Acadvl	3	14	0,95	1,83	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial
P45377	Akr1b8	1	5	1,81	2,68	Aldose reductase-related protein 2
Q9DBF1	Aldh7a1	5	9	2,00	2,22	Alpha-amino adipic semialdehyde dehydrogenase
P22892	Ap1g1	5	3	2,81	1,88	AP-1 complex subunit gamma-1
Q9D7N9	Apmap	1	5	1,70	2,51	Adipocyte plasma membrane-associated protein
P84084	Arf5	1	5	0,58	1,33	ADP-ribosylation factor 5
P16460	Ass1	3	11	3,27	3,69	Argininosuccinate synthase
B2RXY7	Cbr1	3	5	3,00	2,11	Carbonyl reductase [NADPH] 1
Q8K354	Cbr3	1	12	4,70	1,54	Carbonyl reductase [NADPH] 3
Q8BK48	Ces2e	1	6	1,87	1,79	Pyrethroid hydrolase Ces2e
P98078	Dab2	12	8	2,58	1,75	Disabled homolog 2
Q62095	Ddx3y	2	10	1,39	1,30	ATP-dependent RNA helicase DDX3Y
O08749	Dld	2	8	0,71	1,60	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial;Dihydrolipoyl dehydrogenase
Q8BPB5	Efemp1	5	9	2,39	2,52	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1
P60843	Eif4a1	15	20	0,15	1,62	Eukaryotic initiation factor 4A-I
P20352	F3	3	3	2,00	1,88	Tissue factor
Q05816	Fabp5	3	11	0,45	1,45	Fatty acid-binding protein, epidermal
F8VPU2	Farp1	7	15	0,31	1,60	FERM, RhoGEF and pleckstrin domain-containing protein 1
Q9QXA3	Fat1	8	17	0,51	2,00	Fat 1 cadherin
Q9Z2Z9	Gfpt2	2	8	1,74	2,21	Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 2
P51655	Gpc4	1	6	2,00	2,18	Glypican-4;Secreted glypican-4
Q80SU7	Gvin1	3	4	1,81	1,62	Interferon-induced very large GTPase 1
P70333	Hnrnp2	2	8	0,44	1,88	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2
Q9D0E1	Hnrnpm	11	14	0,45	1,79	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M
Q61699	Hsph1	6	13	0,72	1,37	Heat shock protein 105 kDa
P49442	Inpp1	4	4	2,17	1,60	Inositol polyphosphate 1-phosphatase
Q8BX02	Kank2	1	7	0,58	1,79	KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein 2
P28301	Lox	7	5	2,46	1,80	Protein-lysine 6-oxidase
Q62433	Ndrp1	5	2	1,58	1,79	Protein NDRG1
Q05920	Pcx;Pc	9	12	1,72	1,54	Pyruvate carboxylase;Pyruvate carboxylase, mitochondrial
Q80ZA4	Pkhd11	3	9	2,91	2,54	Fibrocystin-L
Q9R0B9	Plod2	4	20	2,75	3,84	Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2
B2RXS4	Plxn2	4	16	0,45	2,13	Plexin-B2
Q9EP71	Rai14	2	5	1,46	2,11	Ankycorbin

Q9D0I9	Rars	3	22	0,46	1,94	Arginine--tRNA ligase, cytoplasmic
P67984	Rpl22	2	7	0,66	1,60	60S ribosomal protein L22
Q6ZWZ6	Rps12	4	11	0,26	2,13	40S ribosomal protein S12
Q99P72	Rtn4	1	10	0,45	2,11	Reticulon-4
Q8BHF5	Rtn4	4	9	0,19	2,11	Reticulon
Q80ZX0	Sec24b	6	3	1,00	1,33	Sec24-related gene family, member B (S. cerevisiae)
Q9D154	Serp1b1a	5	19	1,18	3,03	Leukocyte elastase inhibitor A
Q8BH59	Slc25a1	1	8	1,15	2,27	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar1
P48962	Slc25a4	4	23	0,30	1,60	ADP/ATP translocase 1
P10852	Slc3a2	11	7	0,47	2,13	4F2 cell-surface antigen heavy chain
P42225	Stat1	12	6	3,58	1,60	Signal transducer and activator of transcription 1
Q64310	Surf4	5	3	0,58	1,33	Surfeit locus protein 4
Q6ZQM8	Ugt1a7c;Ugt1a6a	30	10	4,39	4,43	UDP-glucuronosyltransferase 1-7C;UDP-glucuronosyltransferase 1-9;UDP-glucuronosyltransferase 1-2;UDP-glucuronosyltransferase 1-1
Q9Z0K8	Vnn1	2	11	0,95	1,55	Pantetheinase

## **7. REFERÊNCIAS**

- Ammash, N. M. et al. Marfan syndrome-diagnosis and management. *Curr Probl Cardiol.* 33(1):7-39 (2008).
- Beamish, J. A., He, P., Kottke-Marchant, K., & Marchant, R. E. Molecular Regulation of Contractile Smooth Muscle Cell Phenotype: Implications for Vascular Tissue Engineering. *Tissue Engineering. Part B, Reviews*, 16(5), 467–491. (2010).
- Beningo, K. A. Dembo, M. Kaverina, I. Small, J. V. Wang, Y. Nascent Focal Adhesions Are Responsible for the Generation of Strong Propulsive Forces in Migrating Fibroblasts; *The Journal of Cell Biology*, 2001, 881-888-10.1083/jcb.153.4.881
- Charbonneau, N. L. Carlson, E. J. Tufa, S. Sengle, G. Manalo, E. C. Carlberg, V. M. Ramirez, F. Keene, D. R. Sakai, L. Y. *In vivo* studies of mutant fibrillin-1 microfibrils. *J. Biol. Chem.*, 285 (2010), pp. 24943–24955.
- Collins, M. J. et al. Variation in the histopathological features of patients with ascending aortic aneurysms: a study of 111 surgically excised cases. *J Clin Pathol.* 2008 Apr;61(4):519-23. Epub (2008).
- Cook, J. R. Carta, L. Bénard, L. Chemaly, E. R. Chiu, E. Rao, S. K. Hampton, T. G. Yurchenco, P. Costa, K. D. Hajjar, R. J. Ramirez, F. Abnormal muscle mechanosignaling triggers cardiomyopathy in mice with Marfan syndrome; *The Journal of Clinical Investigation*-2014-0021-9738, 10.1172/JCI71059; <https://doi.org/10.1172/JCI71059>
- Crosas-Molist, E., Meirelles, T., López-Luque, J., Serra-Peinado, C., Selva, J., Caja, L., ... & Hernández, V. Vascular smooth muscle cell phenotypic changes in patients with Marfan syndrome. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 35(4), 960-972. (2015).
- Dale, M. Fitzgerald, M. P. Liu, Z. Meisinger, T. Karpisek, A. et al. Premature aortic smooth muscle cell differentiation contributes to matrix dysregulation in Marfan Syndrome. (2017). *PLOS ONE* 12(10): e0186603. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186603>
- Dietz, H. C. et al. et al. Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene. *Nature*.352 (6333):337-9 (1991)
- Dietz, H. C. TGF- $\beta$  in the pathogenesis and prevention of disease: a matter of aneurysmic proportions. *J Clin Invest.* 120(2):403-7 (2010).
- Ding, W. Y. Ong, H. T. Hara, Y. Wongsantichon, J. Toyama, Y. Robinson, R. C. Nédélec, F. Zaidel-Bar, R. Platin increases cortical connectivity to facilitate robust polarization and timely cytokinesis. *The Journal of Cell Biology*; 2017- 1371-1386 10.1083/jcb.201603070
- Franken, R., Radonic, T., den Hartog, A. W., Groenink, M., Pals, G., van Eijk, M., COMPARE study group. (2015). The revised role of TGF- $\beta$  in aortic aneurysms in Marfan syndrome. *Netherlands Heart Journal*, 23(2), 116–121.
- Frismantiene, A. Philippova, M. Erne, P. Resink, T. J. Smooth muscle cell-driven vascular diseases and molecular mechanisms of VSMC plasticity, *Cellular Signalling*, Volume 52, 2018, Pages 48-64, ISSN 0898-6568, <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.08.019>.
- Granata, A. Serrano, F. Bernard, W. G. McNamara, M. Low, L. Sastry, P. Sinha, S. An iPSC-derived vascular model of Marfan syndrome identifies key mediators of smooth muscle cell death. *Nature Genetics*; 2016/11/28/online. <https://doi.org/10.1038/ng.3723>

- Grintsevich, E. E. Yesilyurt, H. G. Rich, S. K. Hung, R. Terman, J. R. Reisler, E. F-actin dismantling through a redox-driven synergy between Mical and cofilin *Nature Cell Biology*. 2016/07/25/online – 18 – 876 10.1038/ncb3390; <https://doi.org/10.1038/ncb3390>
- Habashi, J. P. et al. Losartan, an AT1 antagonist, prevents aortic aneurysm in a mouse model of Marfan syndrome. *Science*. 312:117–121 (2006).
- Heng. (2014). Focal Adhesions Function as a Mechanosensor. *Progress in molecular biology and translational science*. 126. 55-73. 10.1016/B978-0-12-394624-9.00003-8.
- Horzum, U. Ozdil, B. Pesen-Okvur, D. Step-by-step quantitative analysis of focal adhesions, *MethodsX*, Volume 1, 2014, Pages 56-59, ISSN 2215-0161, <https://doi.org/10.1016/j.mex.2014.06.004>.
- Huaiyu, M. Xiaosong, H. Anushya, M., Haiming, T. Caitlin, M. Diane, K. Thomas, P. D. PANTHER version 11: expanded annotation data from Gene Ontology and Reactome pathways, and data analysis tool enhancements, *Nucleic Acids Research*, Volume 45, Issue D1, 4 January 2017, Pages D183–D189, <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1138>
- Huang, D. W. Sherman, B. T. Lempicki, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources; *Nature Protocols*- 2008/12/18/online- 4
- Humphrey, J. D., Dufresne, E. R., & Schwartz, M. A. Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 15(12), 802–812. (2014).
- Humphrey, J. D. and Milewicz D. M. Aging, Smooth Muscle Vitality, and Aortic Integrity. *Circulation Research*; 2017 doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311075
- Isogai, Z. et al. Latent transforming growth factor  $\beta$  -binding protein 1 interacts with fibrillin and is a microfibril-associated protein. *J Biol Chem*. 278(4):2750-7 (2003).
- Itahana, K. & Itahana, Y & Dimri, G. P. (2013). Colorimetric Detection of Senescence-Associated  $\beta$  Galactosidase. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). 965. 143-56. 10.1007/978-1-62703-239-1\_8.
- Jia, L. Zhang, W. Zhang, H. Li, T. Wang, Y. Qin, Y. Gu, H. and Du, J. (2015), Mechanical stretch-induced endoplasmic reticulum stress, apoptosis and inflammation contribute to thoracic aortic aneurysm and dissection. *J. Pathol.*, 236: 373-383. doi:10.1002/path.4534
- Judge, D. P. & Dietz, H. C. Therapy of Marfan syndrome. *Annu. Rev. Med.*, (2008).59, 43-59.
- Judge, D.P. & Dietz, H. C. Marfan's syndrome. *Lancet*. Dec 3;366 (9501):1965-76. Review. (2005).
- Kielty, C. M. Elastic fibres in health and disease. *Expert Rev Mol Med*. 8(19):1-23. (2006).
- Kim, S. Turnbull, J. & Guimond, S. (2011). Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor, *Journal of Endocrinology*, 209(2), 139-151.
- Kirschner, R. et al. Classical and neonatal Marfan syndrome mutations in fibrillin-1 cause differential protease susceptibilities and protein function. *J Biol Chem* 286:32810–32823 (2011)
- Lee, J. & Ozcan, U. Unfolded protein response signaling and metabolic diseases. *Jornal of Biological Chemistry*.vol, 289, no.3, pp.1203-1211, jan 17 (2014).

- Lima, B. L. Santos, E. J. Fernandes, G. R. Merkel, C. Mello, M. R. Gomes, J. P. ... & Pereira, L. V. (2010). A new mouse model for marfan syndrome presents phenotypic variability associated with the genetic background and overall levels of Fbn1 expression. *PLoS one*, 5(11), e14136.
- Lindsay, M.E. and Dietz, H.C. The Genetic Basis of Aortic Aneurysm, *Cold Spring Harb Perspect Med* (2014);4:a015909.
- Lu P, Takai K, Weaver VM, Werb Z. Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* (2011);
- Maul, T.M., Chew, D.W., Nieponice, A. et al. *Biomech Model Mechanobiol* (2011) 10: 939. <https://doi.org/10.1007/s10237-010-0285-8>
- McLoughlin, D. et al. Pravastatin reduces Marfan aortic dilation. *Circulation*. Sep 13;124(11 Suppl):S168-73. (2011).
- Meirelles, T. Araujo, T. L. Nolasco, P. Moretti, A. I. Guido, M. C. Debbas, V., ... & Laurindo, F. R. (2016). Fibrillin-1 mgΔ lpn Marfan syndrome mutation associates with preserved proteostasis and bypass of a protein disulfide isomerase-dependent quality checkpoint. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 71, 81-91.
- Milewicz D. M. et al. Altered Smooth Muscle Cell Force Generation as a Driver of Thoracic Aortic Aneurysms and Dissections. (2017). *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, doi: 10.1161/ATVBAHA.116.303229
- Milewicz, D. M. Guo, D. C. Tran-Fadulu, V. Lafont, A. L, Papke CL, Inamoto S, Kwartler CS, Pannu H. Genetic basis of thoracic aortic aneurysms and dissections: Focus on smooth muscle cell contractile dysfunction. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 9: 283–302. 2008.
- Nataatmadja, M. et al. Abnormal extracellular matrix protein transport associated with increased apoptosis of vascular smooth muscle cells in marfan syndrome and bicuspid aortic valve thoracic aortic aneurysm. *Circulation*. Sep 9;108 Suppl 1:II329-34. (2003).
- Nguyen, A. T. Gomez, D. Bell, R. D. et al Smooth muscle cell plasticity: fact or fiction? *Circ Res* 112(1):17–22. (2013)
- Nogi M. et al., Small GTP-Binding Protein GDP Dissociation Stimulator Prevents Thoracic Aortic Aneurysm Formation and Rupture by Phenotypic Preservation of Aortic Smooth Muscle Cells. *Circulation* 2018-11-20 138(21): 2413-2433
- Ogut, O. & Brozovich, F.V. Regulation of force in vascular smooth muscle. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, Volume 35 , Issue 4 , 347 - 355
- Okeyo K. O. Innovative Approaches to Cell Biomechanics: From Cell Migration to On-Chip Manipulation. *Frontiers of Biomechanics 1*, DOI 10.1007/978-4-431-55163-8\_1 Finney, A. C., &
- OwenS, G. K., Kumar, M S. and Wamhoff, B. R. (2004) Molecular Regulation of Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation in Development and Disease. *Physiol Rev* 84: 767–801, 2004; 10.1152/physrev.00041.2003
- Owen, L. M. Adhikari, A. S. Patel, M. Grimmer, P. Leijnse, N. Kim, M. C. Notbohm, J. Franck, C. Dunn, A. R. A cytoskeletal clutch mediates cellular force transmission in a soft, three-dimensional extracellular matrix; *Molecular Biology of the Cell* 2017 28:14, 1959-1974

- Parker, S. J. et al. Proteomics reveals Rictor as a noncanonical TGF- $\beta$  signaling target during aneurysm progression in Marfan mice. (2019) *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 0363-6135. doi: 10.1152/ajpheart.00089.2018
- Pereira, L. D'Alessio, M. Ramirez, F. Lynch, J. R. Sykes, B. Pangilinan, T., & Bonadio, J. Genomic organization of the sequence coding for fibrillin, the defective gene product in Marfan syndrome. *Human molecular genetics*, (1993). 2(7), 961-968.
- Peyton, S. R. and Putnam, A. J. (2005), Extracellular matrix rigidity governs smooth muscle cell motility in a biphasic fashion. *J. Cell. Physiol.*, 204: 198-209. doi:10.1002/jcp.20274
- Ramirez, F. & Pereira, L. The fibrillins. *The international journal of biochemistry & cell biology*, (1999). 31(2), 255-259.
- Robinson, P. N. et al. The molecular genetics of Marfan syndrome and related disorders. *J Med Genet*. 43(10):769-87. Epub 2006 Mar 29. Review (2006)
- Roca-Cusachs, P. del Rio, A. Puklin-Faucher, E. Gauthier, N. C. Biais, N., & Sheetz, M. P. (2013). Integrin-dependent force transmission to the extracellular matrix by  $\alpha$ -actinin triggers adhesion maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(15), E1361-70.
- Rodríguez, A. I. Csányi, G. Ranayhossaini, D. J. et al. MEF2B-Nox1 signaling is critical for stretch-induced phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;35(2):430-8.
- Saboore, F. Reckmann, A. N. Tomczyk, C. U. M. Peters, D. M. Weissmann, N. Kaschtanow, A. Schermuly, R. T. Middendorff, Ralf et al. Nestin-expressing vascular wall cells drive development of pulmonary hypertension. *European Respiratory Journal* 2016; 876-888; doi 10.1183/13993003.00574-2015
- Schwartz, M. A. Schaller, M. D. Ginsberg, M. H. Integrins: emerging paradigms of signal transduction. *Annu Rev Cell Dev Biol*. (1995); 11:549-99.
- Shanahan, C. M., & Weissberg, P. L. Smooth muscle cell heterogeneity patterns of gene expression in vascular smooth muscle cells *in vitro* and *in vivo*. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, (1998). 18(3), 333-338.
- Siegert, A. Díaz-Barriga, G. G. Esteve-Codina, A. Navas-Madroñal, M. del Blanco, D. G. Alberch, J. Heath, S. Galán, M. Egea, G. A FBN1 3'UTR mutation variant is associated with endoplasmic reticulum stress in aortic aneurysm in Marfan syndrome, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, Volume 1865, Issue 1, 2019, Pages 107-114, ISSN 0925-4439, <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.10.02>
- Steucke K. E., Paige Tracy V., Hald E. S., Hall J. L., Alford P. W. Vascular smooth muscle cell functional contractility depends on extracellular mechanical properties. *Journal of Biomechanics*, V48, Issue 12, 2015, Pages 3044-3051, ISSN 0021-9290.
- Stricker, J. et al. Spatiotemporal Constraints on the Force-Dependent Growth of Focal Adhesions, *Biophysical Journal*, Volume 100 , Issue 12 , 2883 - 2893
- Strydom, J.C. Maltha, A.M. Kuijpers-Jagtman, J.W. Von den Hoff. The oxytalan fibre network in the periodontium and its possible mechanical function *Arch. Oral Biol.*, 57 (2012), pp. 1003-1011

- Tabas, I. & Ron, D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nature Cell Biol.* **13**, 184–190 (2011)
- Tanaka, L. Y. Araujo, T. L.S. Rodriguez, A. I. Ferraz, M. S. Pelegati, V. B. Morais, M.C. Cafundó, dos Santos, A.M. Cesar, C. L. Ramos, A. F. Alencar, A. M. Laurindo, F. R. Peri/epicellular Protein Disulfide Isomerase-A1 Acts as an Upstream Organizer of Cytoskeletal Mechanoadaptation in Vascular Smooth Muscle Cells; *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*- 2018/11/30-doi: 10.1152/ajpheart.00379.2018
- Tang, F Lord, M. S. Stallcup, W. B. Whitelock, J. M. Cell surface chondroitin sulphate proteoglycan 4 (CSPG4) binds to the basement membrane heparan sulphate proteoglycan, perlecan, and is involved in cell adhesion, *The Journal of Biochemistry*, Volume 163, Issue 5, 1 May 2018, Pages 399–412, <https://doi.org/10.1093/jb/mvy008>
- Wagenseil, J. E., & mecham, R. P. Vascular Extracellular Matrix and Arterial Mechanics. *Physiological Reviews*, *89*(3), 957–989. (2009).
- Walter, P. & Ron, D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* **334**, 1081–1086 (2011)
- Wan X. J., Zhao H. C., Zhang P, Huo B, Shen BR, Yan ZQ, et al. Involvement of BK channel in differentiation of vascular smooth muscle cells induced by mechanical stretch. *Int J Biochem Cell Biol.* (2015);59:21–9
- Wang, G. Jacquet, L. Karamariti, E. & Xu, Q. (2015). Origin and differentiation of vascular smooth muscle cells. *The Journal of physiology*, *593*(14), 3013-30.
- Wang, Y. Cao, W. Cui, J. Yu, Y. Zhao, Y. Shi, J. Wu, J. Xia, Z. Yu, B. Liu, J. Arterial Wall Stress Induces Phenotypic Switching of Arterial Smooth Muscle Cells in Vascular Remodeling by Activating the YAP/TAZ Signaling Pathway. *Cell Physiol Biochem.* 2018;51(2):842-853. doi: 10.1159/000495376. Epub 2018 Nov 22.
- Whiteman, P. and Handford P.A. Defective secretion of recombinant fragments of fibrillin-1: implications of protein misfolding for the pathogenesis of Marfan syndrome and related disorders. *Hum Mol Genet.* 2003 Apr 1;12(7):727-37.
- Wipff, P. J. Hinz, B. Integrins and the activation of latent transforming growth factor beta1—an intimate relationship. *Eur J Cell Biol* (2008) 87(8–9):601–615.
- Yamaguchi, H. & Wang, H. G. CHOP is involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by enhancing DR5 expression in human carcinoma cells. *J Biol Chem.* 279(44):45495–45502 (2004)
- Yoshida, H. ER stress and diseases. *FEBS J.* 274(3):630–658 (2007)
- Zamir, E. Geiger, B. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci* (2001); **114**: 3583–90.
- Zhu, W., Kim, B. C., Wang, M., Huang, J., Isak, A., Bexiga, N. M., Monticone, R., Ha, T., Lakatta, E. G., ... An, S. S. (2018). TGFβ1 reinforces arterial aging in the vascular smooth muscle cell through a long-range regulation of the cytoskeletal stiffness. *Scientific reports*, *8*(1), 2668. doi:10.1038/s41598-018-20763-w
- Zimmermann, D. & Kovar, D. R. Feeling the force: formin's role in mechanotransduction, *Current Opinion in Cell Biology*, Volume 56, 2019, Pages 130-140, ISSN 0955-0674, <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2018.12.008>.

## ***8. Curriculum Vitae***

## Lattes

<http://lattes.cnpq.br/9566987690430390>

## FORMAÇÃO

- **Desde outubro de 2014:** Doutorado em Cardiologia pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
- **Março de 2014:** Graduação em Biotecnologia pela Universidade Federal da Bahia

## EXPERIÊNCIA ACADÊMICA

### Desde 2014- Doutorado em cardiologia- InCor- FMUSP

- Correlação entre a mecanobiologia da VSMC com reprogramação fenotípica e respostas exacerbadas ao estresse no fenótipo cardiovascular da síndrome de Marfan

### Bolsista Capes – 2013-2014- Estágio acadêmico- InCor- FMUSP

- Efeito da PDI e ERp57 na secreção da fibrilina 1 mutada (mg<sup>ΔloxPneo</sup>)

### Bolsista CNPq – 2010-2013- UFBA

- Desenvolvimento de modelo experimental para o estudo de infecções pulmonares por *Ureaplasma diversum*;
- Estudo de interação entre alergia respiratória e esquistossomose mansônica em modelo murinho;

## APRESENTAÇÃO EM CONGRESSOS

- **North American Vascular Biology Organization- Newport, RI oct, 2018**  
Vascular Biology is the annual meeting of the North American Vascular Biology Organization.  
Poster e apresentação oral no seminário de trainees: Evolving mechano-responsive phenotypic switches in vascular smooth muscle cells from Marfan Syndrome mice
- **39º Congresso da Sociedade de Cardiologia do estado de São Paulo- 2018**

Trabalho apresentado na sessão de temas livres, modalidade apresentação oral: Modulação fenotípica da célula muscular lisa vascular na Síndrome de Marfan altera a homeostase mecânica celular.

- **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology | Peripheral Vascular Disease Scientific Sessions conference, Minneapolis, Mn – 2017**  
Poster: Phenotype switch and altered mechanosignaling in Vascular Smooth Muscle cells from Marfan syndrome mice  
[https://www.ahajournals.org/doi/abs/10.1161/atvb.37.suppl\\_1.259](https://www.ahajournals.org/doi/abs/10.1161/atvb.37.suppl_1.259)

## PUBLICAÇÕES

- Guido, Maria C.; Debbas, Victor; Salemi, Vera M.; Tavares, Elaine R.; Meirelles, Thayna; Araujo, Thaís L. S.; **Nolasco, Patricia**; Ferreira-Filho, Julio C. A.; Takimura, Celso K.; Pereira, Lygia V.; Laurindo, Francisco R. Effect of the Antioxidant Lipoic Acid in Aortic Phenotype in a Marfan Syndrome Mouse Model. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v.2018, p.1 - 16, 2018.
- Moretti, Ana I. S.; Pavanelli, Jessyca C.; **Nolasco, Patrícia**; Leisegang, Matthias S.; Tanaka, Leonardo Y.; Fernandes, Carolina G.; Wosniak, João; Kajihara, Daniela; Dias, Matheus H.; Fernandes, Denise C.; Jo, Hanjoong; Tran, Ngoc-Vinh; Ebersberger, Ingo; Brandes, Ralf P.; Bonatto, Diego; Laurindo, Francisco R. M. Conserved Gene Microsynteny Unveils Functional Interaction Between Protein Disulfide Isomerase and Rho Guanine-Dissociation Inhibitor Families. *Scientific Reports*, v.7, p.1/ - 18, 2017.
- Meirelles, Thayna; Araujo, Thaís L.S.; **Nolasco, Patrícia**; Moretti, Ana I.S.; Guido, Maria C.; Debbas, Victor; Pereira, Lygia V.; Laurindo, Francisco R. Fibrillin-1 mg-lpn Marfan Syndrome Mutation Associates with Preserved Proteostasis and Bypass of a Protein Disulfide Isomerase-dependent Quality Checkpoint. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*., v.71, p.81 - 91, 2015.