

Leonardo Yuji Tanaka

**Dissulfeto isomerase proteica como via integrativa entre estresse oxidativo e
resposta a proteínas mal-enoveladas na reparação à lesão vascular**

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

Programa de Cardiologia

**Orientador: Prof. Dr. Francisco
Rafael Martins Laurindo**

São Paulo

2013

Leonardo Yuji Tanaka

**Dissulfeto isomerase proteica como via integrativa entre estresse oxidativo e
resposta a proteínas mal-enoveladas na reparação à lesão vascular**

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

Programa de Cardiologia

**Orientador: Prof. Dr. Francisco
Rafael Martins Laurindo**

São Paulo

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Tanaka, Leonardo Yuji

Dissulfeto isomerase proteica como via integrativa entre estresse oxidativo e resposta a proteínas mal-enoveladas na reparação à lesão vascular / Leonardo Yuji Tanaka. -- São Paulo, 2013.

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

Orientador: Francisco Rafael Martins Laurindo.

Descritores: 1.Isomerasas de dissulfetos de proteínas 2.Angioplastia com balão 3.Estresse oxidativo 4.Estresse do retículo endoplasmático 5.Espaço extracelular 6.Neointima 7.Espécies de oxigênio reativas 8.Lesões do sistema vascular 9.Músculo liso-vascular

USP/FM/DBD-445/13

Dedicatória

Aos meus pais pelo amor e apoio incondicional; aos meus irmãos Gustavo e Renato pela torcida; e à minha esposa Letícia pela paciência, amor e incentivo.

Agradecimentos

Ao professor Francisco Laurindo pela orientação, inspiração, exemplo de cientista e por permitir/contribuir para que este estudo tomasse caminhos inimagináveis.

Aos meus pais por nunca medirem esforços para minha formação pessoal e profissional.

A Letícia por estar ao meu lado durante mais esta etapa da minha vida que certamente será importante para futuras etapas em nossa vida.

À tia Ká pelo incentivo e familiares presentes pela torcida, bem como àqueles que me ajudaram de alguma maneira que ainda não sou capaz de compreender.

Aos colegas de trabalho: Ana Moretti, Ana Lúcia, André, Angélica, prof. Arruda, Ariane, Célio, Cláudia, Daniela, Denise, Diana, Elenice, D. Elídia, Jéssyca, João, Júlia, Maria Bertoline, Mario, Marina, Mônica, Nelsinho, Leonora, Luciana, Mateus, Patrícia, Percília, Raimunda, Raquel, Renata, Richard, Phelipe, Thayna, Thiago, Tiffany, Thais e Viviane.

Às pessoas que conviveram de modo mais próximo a mim durante o doutorado: Ângela, Carol, Laura, Marcus, Maria Cristina, Thalita, Vanda e Victor. Alguns não tão próximos no momento, mas sempre com a mesma torcida.

Aos colabores e coautores do presente estudo: Haniel Araújo, Annelise Casagrande, Celso Takimura, Paulo Gutierrez, Gustavo Hironaka, Pedro Lemos, e respectivas unidades Experimental, Hemodinâmica e Anatomia Patológica.

Às agências de fomento Fapesp e CNPQ pelo apoio financeiro.

A Deus por tudo.

NORMALIZAÇÃO

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

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

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

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

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Estresse oxidativo na resposta vascular à lesão.....	02
1.2 Estresse do RE, PDI e resposta vascular à lesão.....	03
1.3 PDI na superfície celular e implicações para resposta vascular à lesão.....	05
2. HIPÓTESE.....	07
3. OBJETIVOS.....	12
3.1 Objetivo geral.....	12
3.2 Objetivos específicos.....	12
4. MÉTODOS.....	13
4.1 Reagentes.....	14
4.2 Ética.....	14
4.3 Artérias coronárias humanas.....	15
4.4 Amostra e modelo de reparação vascular.....	15
4.5 Arteriografia.....	16
4.6 Tomografia de coerência óptica.....	17
4.7 Cultura e isolamento de células musculares lisas primárias da aorta de coelhos.....	17
4.8 Estiramento cíclico equibiaxial.....	18
4.9 Experimentos com meio condicionado.....	18
4.10 Migração randômica de células únicas.....	19
4.11 Cultura do anel vascular.....	19
4.12 Expressão proteica por Western Blot.....	20
4.13 Detecção proteica por imunofluorescência.....	21
4.14 Histologia e detecção proteica por imunohistoquímica.....	21
4.15 Alinhamento dos filamentos de actina (F-actina).....	22
4.16 Expressão do mRNA por RT-PCR em tempo real.....	22
4.17 Detecção de Nitrato (NO ₃ ⁻) vascular.....	23
4.18 Detecção de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂).....	23
4.19 Detecção de radicais livres por adutos de DMPO.....	24
4.20 Detecção de tióis de superfície.....	24
4.21 Atividade de RhoA.....	24
4.22 Morte celular.....	25
4.23 Reatividade Vascular.....	25
4.24 Propriedades viscoelásticas vasculares.....	25
4.25 Análise estatística.....	26
5. RESULTADOS.....	28
5.1 Intracelular e peri/epicelular (pec)PDI são fortemente aumentadas durante reparação vascular à lesão.....	28
5.2 Perda de função da PDI total/intracelular acentua estresse do RE e morte celular em vasos lesados.....	33
5.3 Estresse do RE contribui para o aumento da pecPDI.....	34
5.4 PecPDI exerce efeitos específicos em artérias lesadas que não simplesmente refletem o pool total da PDI.....	37
5.5 Pec PDI contribui para manutenção do calibre vascular após lesão.....	39

5.6 Perda do caliber após neutralização da pecPDI correlaciona com alterações na arquitetura da matriz e do citoesqueleto.....	41
5.7 Neutralização da pecPDI reduz a quantidade de ROS e óxido de nitrogênio em artérias lesadas.....	44
5.8 Alterações em propriedades viscoelásticas de artérias lesadas após inibição da pecPDI.....	46
5.9 Efeito da pecPDI em modelo celular recapitula alterações no citoesqueleto observadas em artérias lesadas.....	47
5.10 PecPDI sustenta distribuição localizada de RhoA.....	50
5.11 Expressão da PDI é inversamente relacionada ao remodelamento constrictivo em placas coronarianas humanas.....	53
6. DISCUSSÃO.....	56
7. CONCLUSÃO.....	64
8. ANEXOS.....	66
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
CURRICULUM VITAE	

Lista de abreviaturas

Ab	anticorpo
ACh	acetilcolina
ADAM17	desintegrina e metaloproteinase17
AI	após lesão (<i>after injury</i>)
ALM	alexa maleimido
ATF4	ativador de transcrição 4
cav-3	caveolina-3
CN01	calpeptina
CO ₂	dióxido de carbono
Cult	cultivada
DAB	"3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride"
DAPI	"4',6-diamidino-2-phenylindole"
DMEM	"Dulbecco's modified Eagle's medium"
DMPO	"5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide"
eNOS	óxido nítrico sintase endotelial
EPR	espectro de ressonância paramagnética eletrônica
ERO1	oxidase de retículo endoplasmático1 (<i>endoplasmic reticulum oxidoreductin</i>)
Fak	cinase de adesão focal (<i>focal adhesion kinase</i>)
Fib	fibroso
FR	recém-colhida (<i>freshly-removed</i>)
GAPDH	"Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase"
Gpx1	glutathiona peroxidase1
Grp	proteína regulada por glicose (<i>Glucose-regulated protein</i>)

GTP	trifosfato de guanosina
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HE	hematoxilina e eosina
HPRT	"Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase"
HRP	peroxidase de rabanete (<i>horseradish peroxidase</i>)
IEL	lâmina elástica interna
IF	imunofluorescência
IgG	imunoglobulina G
IHC	imunohistoquímica
iNOS	óxido nítrico sintase induzível
MC	meio condicionado
Neg	negativo
NO ₃ ⁻	nitrato
NOA	analisador de óxido nítrico (<i>nitric oxide analyser</i>)
NOGO	inibidor de crescimento de neurito (<i>Neurite outgrowth inhibitor</i>)
Nox	isoforma da NADPH oxidase (<i>Non-phagocytic oxidase</i>)
OCT	tomografia de coerência óptica (<i>optical coherency tomography</i>)
PBS	solução salina de fosfato
PCNA	antígeno nuclear de proliferação celular (<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>)
PDGF	fator de crescimento derivado de plaquetas (<i>platelet-derived growth factor</i>)
pec	peri/epicelular
PEG	polietilenoglicol
Pos	positivo
QSOX	quiescina sulfidril oxidase
RC	recém-colhida

RE	retículo endoplasmático
RhoA	membro A da família de proteínas de homologia a Ras
RNA	ácido ribonucléico
RTN	"reticulon"
Scr	embaralhado (<i>scrambled</i>)
siRNA	RNA de interferência (<i>small interfering RNA</i>)
SFB	soro fetal bovino
SOD3	superóxido dismutase extracelular
TERT	transcriptase reversa da telomerase (<i>Telomerase reverse transcriptase</i>)
TNF α	fator de necrose tumoral alfa
Trx	tiorredoxina
Tu	tunicamicina
TUNEL	"Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling "
VSMC	célula muscular lisa vascular (<i>vascular smooth muscle cell</i>)
Vul	vulnerável

Lista de símbolos

μl	microlitro
μm	micrometro
μM	micromolar
h	hora
Hz	hertz
kg	quilograma
M	molar
mg	miligrama
min	minuto
mm	milímetro
mM	milimolar
mm^2	milímetro quadrado
ng	nanograma
nm	nanômetro
nM	nanomolar
RFU	unidade de fluorescência relativa
rpm	rotações por minuto
seg	segundo
U	unidade

Lista de figuras

Figura 1	Evolução típica da resposta vascular à lesão.....	04
Figura 2	Superexpressão da PDI durante reparação vascular após lesão.....	29
Figura 3	Indução de estresse do RE durante reparação vascular à lesão.....	30
Figura 4	PDI intracelular e peri/epicelular(pec)PDI são aumentadas durante reparação vascular à lesão.....	32
Figura 5	Silenciamento da PDI em cultura de tecidos reduz expressão do mRNA em artérias controle e lesadas, expressão proteica em artérias controle (refletindo em menor quantidade de tióis livres) e acentua expressão da pecPDI em artérias lesadas.....	34
Figura 6	Silenciamento da PDI em cultura de tecidos acentua estresse do RE, morte celular e secreção de PDI; e estressor do RE aumenta pecPDI artérias controle.....	36
Figura 7	Inibição pecPDI não mimetiza efeito do silenciamento da PDI.....	38
Figura 8	Neutralização da pecPDI in vivo induz perda do calibre por remodelamento constrictivo.....	40
Figura 9	PecPDI influencia organização da matriz extracelular e arquitetura do citoesqueleto em artérias lesadas.....	43
Figura 10	Inibição da pecPDI afeta produção de peroxide de hidrogênio e óxido nítrico em artérias lesadas.....	45
Figura 11	Inibição da pecPDI afeta propriedades viscoelásticas em vasos lesados.....	47
Figura 12	PecPDI sustenta organização do citoesqueleto durante mecanoresposta em células expostas ao estiramento cíclico e ajustes direcionais finos em células em migração estimuladas por PDGF.....	49
Figura 13	PecPDI sustenta ativação localizada de RhoA.....	52
Figura 14	Expressão da PDI na média de artérias humanas com placas de aterosclerose é inversamente correlacionada com remodelamento constrictivo e instabilidade da placa.....	54

Lista de anexos

Anexo A	Tabelas suplementares.....	67
Anexo B	Figuras suplementares.....	69
Anexo C	Discussão suplementar.....	75

Resumo

Tanaka LY. Dissulfeto isomerase proteica como via integrativa entre estresse oxidativo e resposta a proteínas mal-enoveladas na reparação à lesão vascular. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

O remodelamento vascular é um determinante fundamental do lúmen em doenças vasculares, porém os mecanismos envolvidos não estão completamente elucidados. Nós investigamos o papel da chaperona redox residente do retículo endoplasmático Dissulfeto Isomerase Proteica (PDI) e sua fração localizada na superfície celular (peri/epicelular=pecPDI) no calibre e arquitetura vascular durante reparação à lesão. Em artérias ilíacas de coelho submetidas à lesão in vivo, houve importante aumento do mRNA e expressão proteica (~25x aumento 14 dias pós-lesão vs. controle) da PDI. O silenciamento da PDI por siRNA (cultura de órgãos) acentuou o estresse do retículo e apoptose, diferentemente da inibição da pecPDI com anticorpo neutralizante (PDI Ab). Bloqueio in vivo da pecPDI por aplicação de gel perivascular contendo PDI Ab no 12º dia após lesão, com análise após 48 h, promoveu *ca.*25% redução no calibre vascular analisado por arteriografia e diminuição similar na área total do vaso detectada por tomografia de coerência óptica. Neste processo, não ocorreu alteração no tamanho da neointima, indicando assim, que PDI Ab acentuou remodelamento constrictivo. Neutralização da pecPDI promoveu importantes alterações na arquitetura da matriz de colágeno e citoesqueleto, resultando em fibras com orientação invertida e desorganizadas. Diminuição na produção de espécies reativas de oxigênio e óxidos de nitrogênio também ocorreu. Análise de propriedades viscoelásticas nas artérias indicou redução na ductilidade vascular, evidenciada pela menor distância para ruptura. As alterações subcelulares no citoesqueleto observadas in vivo após PDI Ab foram recapituladas em um modelo de estiramento cíclico em células musculares lisas vasculares, com importante redução na formação das fibras de estresse. Em modelo de migração randômica de células musculares lisas, a exposição a PDI Ab reduziu a resiliência de regulação da polaridade. Embora a neutralização da pecPDI não tenha afetado a atividade global de RhoA, ela promoveu alterações no padrão de marcação em resposta ao estiramento, na redistribuição de RhoA na superfície celular e na associação com regiões contendo caveolina. Além

disso, em aterosclerose nativa em humanos, a expressão da PDI correlacionou-se inversamente com remodelamento constrictivo. Dessa forma, PDI é fortemente expressa após a lesão e sua fração peri/epicelular remodela a arquitetura da matriz e citoesqueleto, promovendo um efeito anti-remodelamento constrictivo.

Descritores: 1. Isomerasas de dissulfetos de proteínas 2. Angioplastia com balão 3. Estresse oxidativo 4. Estresse do retículo endoplasmático 5. Espaço extracelular 6. Neointima 7. Espécies de oxigênio reativas 8. Lesões do sistema vascular 9. Músculo liso-vascular.

Summary

Tanaka LY. Protein disulfide isomerase as an integrative way between oxidative stress and unfolded protein response during vascular repair to injury. [thesis]. "São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo", 2013.

Whole-vessel remodeling is a critical lumen caliber determinant in vascular disease, but underlying mechanisms are poorly understood. We investigated the role of endoplasmic reticulum chaperone Protein Disulfide Isomerase(PDI) and cell-surface PDI(peri/epicellular=pecPDI) *pool* in vascular caliber and architecture during vascular repair after injury(AI). After rabbit iliac artery balloon injury, there was marked increase in PDI mRNA and protein (25-fold vs. basal at day 14AI), with increase in both intracellular and pecPDI. Silencing PDI by siRNA (organ culture) induced ER stress augmentation and apoptosis, contrarily to pecPDI neutralization with PDI-antibody(PDI Ab). PecPDI neutralization in vivo with PDIAb-containing perivascular gel from days 12-14AI promoted ca.25% decrease in vascular caliber at arteriography and similar decreases in total vessel circumference at optical coherence tomography, without changing neointima, indicating increased constrictive remodeling. PecPDI neutralization promoted marked changes in collagen and cytoskeleton architecture, with inverted fiber orientation and disorganization. Decreased ROS and nitrogen oxide production also occurred. Viscoelastic artery properties assessment showed decreased ductility, evidenced by decreased distance to rupture. Subcellular cytoskeletal disruption by PDI Ab was recapitulated in vascular smooth muscle cell stretch model, with marked decrease in stress fiber buildup. Also, PDI Ab incubation promoted decreased regulation resilience of vascular smooth muscle migration properties. While pecPDI neutralization did not affect global RhoA activity, there was altered RhoA redistribution to the cell surface and association with caveolin-containing clusters, which mislocalized after stretch. In human coronary atheromas, PDI expression inversely correlated with constrictive remodeling. Thus, strongly-expressed PDI after injury reshapes matrix and cytoskeleton architecture to support an anticonstrictive remodeling effect.

Descriptors: 1. Protein disulfide isomerase 2. Balloon-angioplasty 3. Oxidative stress 4. Endoplasmic reticulum stress 5. Extracellular space 6. Neointima 7. Reactive oxygen species 8. Vascular diseases 9. Vascular smooth muscle.

1. Introdução

A resposta vascular a uma lesão mecânica recapitula uma série de eventos presentes em várias doenças vasculares, tais como aterosclerose, alterações vasculares da hipertensão arterial e diabetes, e particularmente a reestenose pós-angioplastia. A integração dos diversos processos que compõem esta resposta está associada a várias vias de sinalização celular e fatores secretados por células em reparação (1). Estas vias são orquestradas por moduladores tais como estresse oxidativo, que tem sido objeto de atenção de nosso grupo por um longo tempo (2-4).

Em sinergia com estresse oxidativo, o estresse do retículo endoplasmático (RE), também pode influenciar a resposta vascular à lesão (5). Uma vez que a dissulfeto isomerase proteica (PDI), conforme demonstrado pelo grupo, influencia a expressão e atividade da NADPH oxidase (6, 7), importante fonte de ROS em células vasculares, e também é induzida em certas condições que afetam a homeostase do RE (8), a PDI pode ser um ponto de convergência entre estresses (oxidativo e do RE), afetando de modo importante a resposta vascular à lesão. De fato, estudos indicaram a indução de marcadores de estresse do RE, inclusive PDI, em placas de aterosclerose (9, 10). Entretanto, o papel da PDI em processos fisiopatológicos básicos, tais como proliferação, diferenciação e senescência – característicos da formação da neointima em doenças -, assim como do remodelamento vascular – o principal determinante do calibre do lúmen em várias condições (11, 12) - ainda é pouco explorado. Apesar da PDI ser uma chaperona residente do RE, diversos estudos indicam efeitos da PDI em outros compartimentos, principalmente na superfície celular (13, 14). Aqui, nós demonstramos que tanto a PDI recém-sintetizada ou intracelular bem como a de superfície ou extracelular (aqui denominada pecPDI=peri/epicelular), influenciam a biologia neointimal e remodelamento vascular, respectivamente. Dados em modelo de células isoladas, cultura de tecidos e no modelo de lesão vascular experimental, apontam a pecPDI como um potencial modulador de mecanoadaptação em convergência com ativação localizada de RhoA.

1.1 Estresse oxidativo na resposta vascular à lesão

A resposta vascular a uma lesão mecânica é um modelo de inúmeras doenças vasculares e é caracterizada por uma sequência canônica de eventos, ilustrada na figura abaixo (Fig. 1).

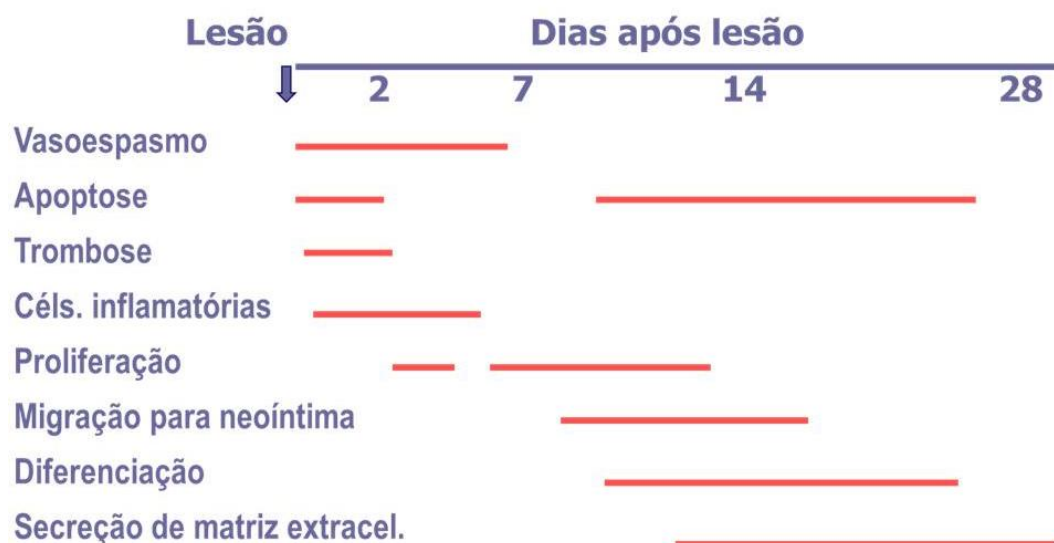


Fig. 1. Evolução típica da resposta vascular à lesão. Os eventos que ocorrem imediatamente após a lesão mecânica são caracterizados por vasoespasmo e pela presença aumentada de leucócitos e plaquetas, participando do processo inflamatório e formação do trombo mural, respectivamente. Paralelamente, ocorre ativação da primeira onda de apoptose de células vasculares e, após aproximadamente 48 h, proliferação das células musculares lisas vasculares (VSMC) que passam a expressar marcadores do fenótipo sintético/proliferativo. Esta transformação contribui para o surgimento de uma nova camada íntima ou neointima, formada principalmente pela migração de células da camada média, pela segunda onda proliferativa de células neointimais e por processos dinâmicos envolvendo a matriz extracelular. Apesar de ainda ocorrer proliferação e crescimento da neointima, estes eventos já estão em processo de estabilização por volta do 14º dia, fase em que as VSMC iniciam o processo de rediferenciação. Nesta fase mais tardia da reparação, ocorre secreção acentuada de componentes da matriz, contribuindo de forma importante para formação da neointima bem como para os processos envolvendo o remodelamento vascular, que correspondem a alterações na área do vaso (3).

O envolvimento de processos redox na resposta vascular à lesão tem sido demonstrado em vários de seus eventos. Existe importante aumento da geração de ROS imediatamente após a lesão (15). Tanto o vasoespasmo inicial como a trombose mural são favorecidos pelo aumento da produção de superóxido (16) e, juntamente com a apoptose maciça das células musculares lisas, que também apresenta um componente redox-sensível importante, são inibidos por certos antioxidantes (17). O remodelamento construtivo tardio durante a reparação vascular é reduzido pela reposição dos níveis da enzima antioxidante superóxido dismutase na parede vascular, que se encontram reduzidos nesta fase (4). Além disso, um importante estudo clínico demonstrou que o tratamento com o antioxidante probucol foi capaz

de reduzir a perda tardia do lúmen vascular após angioplastia principalmente por inibição do remodelamento vascular constritivo (12).

O papel de ROS durante a reparação vascular está provavelmente relacionado ao seu conhecido efeito em vários processos de sinalização celular relevantes a esta situação, tais como proliferação e apoptose (3). Há evidências do nosso (15) e de outros laboratórios (18), indicando que uma fonte relevante de ROS após lesão vascular é o complexo NADPH oxidase. De fato, NADPH oxidases da família Nox são a principal fonte de ROS com finalidade de sinalização compartimentalizada em várias células (19), particularmente células vasculares (20). A expressão diferencial de isoformas catalíticas da NADPH oxidase podem influenciar as alterações fenotípicas que ocorrem nas células musculares lisas (VSMCs) durante a progressão da reparação vascular (21). A expressão de Nox1, isoforma que aumenta inicialmente e perdura durante fases intermediárias da reparação (até aproximadamente 7 dias) (18), está associada com a indução do fenótipo migratório, proliferativo e secretor, característico de células neointimais (20). Ao contrário, a indução de Nox4, isoforma que está aumentada em fases mais tardias da reparação (acima de 10 dias), está associada à indução do fenótipo diferenciado e quiescente de células musculares lisas vasculares (22). Entretanto, uma vez que a função das NADPH oxidases se restringe basicamente à produção de ROS, a obtenção de especificidade pela compartimentalização do sistema enzimático gerador de ROS, é determinada pela especificidade de ativação à agonistas, proximidade aos alvos (19) e uma possível inativação temporária localizada de sistemas antioxidantes tais como peroxirredoxina I (23). Neste sentido, a PDI pode contribuir para a especificidade da sinalização redox, atuando como um potencial adaptador de sinais redox (13).

1.2 Estresse do RE, PDI e resposta vascular à lesão

PDI é uma chaperona do retículo endoplasmático (RE), pertencente à superfamília da tioredoxina, com importante atividade redox (oxidase, redutase ou isomerase) e cuja principal função conhecida é o enovelamento de proteínas no RE (24, 25). Uma das situações em que a PDI tem sua expressão aumentada e migra para

a membrana é o *estresse do RE*, uma situação decorrente de um desbalanço entre a carga de proteínas sintetizadas pelo RE e a capacidade da organela em processá-las corretamente (8). O estresse do RE gera um acúmulo de proteínas mal-enoveladas no lúmen do RE, que é o desencadeante canônico da *Resposta a Proteínas Mal-enoveladas (UPR, “unfolded protein response”)*. A UPR é uma complexa rede de sinalização celular cuja função é principalmente homeostática, mas pode também desencadear apoptose. A UPR está fortemente ativada em inúmeras doenças, particularmente em doenças vasculares como aterosclerose e seus fatores de risco como diabetes e resistência à insulina (26). O estresse do RE converge estreitamente com o estresse oxidativo por mecanismos que incluem oxidoredutases do RE (tais como a PDI), disfunção mitocondrial e indução de isoformas da NADPH oxidase, p.ex., Nox4 (8).

Myoishi et al. (2007) (10), demonstraram que a expressão de marcadores da via apoptótica dependente do estresse do RE está associada ao fenótipo instável de placas de ateroma. Além disso, estudo recente (9) relatou que a inibição da PDI por modificação oxidativa está associada à vulnerabilidade de placas de aterosclerose. Diversos estudos já observaram que a PDI atua como mecanismo de proteção em diversas patologias como doenças neurodegenerativas e cardíacas (27, 28). Entretanto, em alguns casos a PDI pode favorecer o processo patológico, como demonstrado em modelo experimental de doença de Huntington (29) e na indução de malignidade de tumores (30).

O potencial aumento da PDI durante reparação vascular pode estar associado à indução de Nox1, fenômeno observado em VSMCs (6). Importaneamente, estudos do laboratório demonstraram que a PDI sustenta ativação da oxidase por agonistas como angiotensina II e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), participando no efeito migratório de células vasculares. Além disso, a ação da PDI no enovelamento oxidativo gera espécies oxidantes, em associação com a oxidase do RE (“Endoplasmic reticulum oxidoreductin” ou ERO1) durante o enovelamento oxidativo. Embora ainda pouco elucidado, este mecanismo tem o potencial de acentuar a produção de ROS durante a indução da UPR na resposta vascular à lesão. Um estudo indicou que o fator de transcrição ATF4, um componente da UPR, tem

sua expressão aumentada durante a reparação vascular (5). Portanto, o modelo de reparação após lesão representa um ambiente ideal para o estudo da convergência entre os estresses oxidativo e do retículo e conseqüentemente da ação da PDI. Além da ativação de ambos (2, 5), o modelo possibilita avaliar o efeito desta conexão na indução de alterações de programas auto-determinísticos ativados por estresse como apoptose (17) e senescência (31).

1.3 PDI na superfície celular e implicações para resposta vascular à lesão

Todas as proteínas da família da PDI são encontradas no retículo endoplasmático, em alguns casos em quantidades elevadas. Entretanto, tem sido demonstrado que pelo menos alguns membros da família exercem funções fora do retículo (14). Dentre esses locais alternativos, a superfície celular e o espaço extracelular são frequentemente reportados por apresentar ação da PDI em determinadas condições (13).

A função clássica da PDI no enovelamento oxidativo se deve ao fato do RE representar um ambiente propício para esta ação. O fato de ser mais oxidante em relação a outros compartimentos e a presença marcante de parceiros redox como a ERO1 faz com que a PDI participe ativamente na oxidação de proteínas não enoveladas ou parcialmente enoveladas (25). De modo diferente, sua função na superfície tem sido mais frequentemente relatada como redutase de tióis proteicos (32, 33), embora em pelo menos uma situação a atividade isomerase tenha sido demonstrada (34). O conjunto de informações a respeito da PDI de superfície ou extracelular, aqui denominada coletivamente como PDI peri/epitelial (pecPDI), faz com que a ela seja um candidato ainda mais potencialmente interessante nos processos desencadeados pela resposta de reparo vascular. Alguns exemplos merecem destaque como: importância da PDI de superfície nos eventos precoces da coagulação após lesão vascular (35); associação com integrinas e trombospondina (36, 37), importantes mediadores no contato célula-célula e sinalização de fora para dentro; e regulação da desintegrina e metaloproteínase ADAM17 (34), que conhecidamente tem papel importante na formação neointimal (38). Em conjunto,

tanto a pecPDI endotelial como plaquetária podem contribuir para acelerar a trombose (39, 40), fazendo com que o antagonismo da pecPDI seja uma alvo terapêutico potencial bastante promissor e muito investigado no presente (35, 39-42). De fato, camundongos com indução seletiva de nocaute da PDI plaquetária mostram redução da formação de trombo, sem evidência de alteração da hemostasia (40).

Embora a ação da pecPDI tenha sido amplamente demonstrada, os mecanismos envolvidos na translocação da PDI do lúmen do RE para a superfície celular não estão elucidados. Sabe-se que a secreção e posterior reassociação na superfície contribui para o *pool* da pecPDI (43). Além disso, sua ligação na superfície celular parece depender de interações eletrostáticas, uma vez que o tratamento com altas concentrações de carbonato removeram a PDI na superfície (44).

Além dos efeitos diretos conhecidos da pecPDI em alguns processos relacionados à reparação vascular, discutidos acima, outras evidências mais indiretas apontam para o papel de tíóis redox nesses eventos. Por exemplo, recentemente foi identificado um efeito da dissulfeto oxidase quiescina sulfidril oxidase (QSOX) na maturação de laminina (45). É interessante ressaltar que a PDI é um substrato da QSOX (46) e que a QSOX tem sua expressão aumentada durante a resposta vascular à lesão e sustenta a formação da neoíntima (Nakao L e colaboradores, Universidade Federal do Paraná, dados não publicados). Um importante alvo potencial de regulação redox da superfície celular é a RhoA, uma GTPase envolvida em mecanoapdatação (47), que tem forte dependência funcional da PDI em modelos de migração celular (7) e pode ser fortemente regulada por processos redox (48). A ação de RhoA está associada a várias condições patológicas, inclusive proliferação neointimal em resposta à lesão mecânica (49) e durante processo de aterosclerose (50). Entretanto, o efeito potencial da pecPDI na modulação de RhoA não foi investigado.

2. Hipótese

O conjunto das considerações feitas até o momento nos levou à hipótese de que a PDI pode exercer importante influência no processo de reparação vascular e estar correlacionada com alterações fenotípicas em doenças vasculares caracterizadas pela formação de uma neoíntima e por remodelamento vascular. Neste sentido, investigamos também a hipótese de que distintos *pools* de PDI, a saber, o intracelular e a pecPDI, poderiam exercer efeitos diferenciais nesses processos. Em particular, um dos focos específicos de nossa investigação foi o efeito da pecPDI no remodelamento vascular durante a resposta de reparação à lesão.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Investigar o papel da PDI como potencial modulador de eventos celulares associados ao desenvolvimento da neoíntima e remodelamento vascular.

3.2 Objetivos específicos

- 1) Investigar a ocorrência de estresse do RE e caracterizar a expressão da PDI em modelo de reparação vascular à lesão mecânica.
- 2) Avaliar, mediante experimentos de perda de função, a influência do *pool* intracelular da PDI ou do *pool* peri/epicelular (pecPDI) na resposta vascular à lesão.
- 3) Analisar o efeito da pecPDI como potencial modulador em mecanoadaptação frente a estímulos mecânicos *in vivo* e *in vitro*.
- 4) Investigar a possível relação entre o padrão de expressão da PDI com remodelamento vascular e fenótipo da placa de ateroma em artérias coronárias humanas.

4. Métodos

4.1 Reagentes

Todos os reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich, com exceção do especificado a seguir. Alexa Maleimido, Amplex Red, Kit de Transcriptase Reversa, Sybr Green, Faloidina e kit de TUNEL fluorescente foram adquiridos da Invitrogen; gel para congelamento de tecido Tissue Tek da Fisher Scientific e Sakura; Rho inibidor e ativador CN01 da Cytoskeleton; anticorpos primários e diluições usadas para Western Blot (WB), imunohistoquímica (IHC) e imunofluorescência (IF) foram da: Abcam (PCNA, 1:1000 para WB; Integrina α_2 1:200 para IF; RhoA, 1:200 para IF; Colágeno I, 1:1000 para WB, 1:200 para IF; Collagen III, 1:1000 para WB); Enzo (PDI de camundongo, 1:1000 para WB, de 1:1000 -1:32000 para IHC, 1:200 para IF; PDI de coelho, 1:200 para IF; chaperonas KDEL, 1:1000 para WB); RD (FAK total, 1:1000 para WB); Santa Cruz (RhoA, 1:1000 para WB; FAK fosforilada na tirosina 397, 1:500 para WB); Sigma (β -actina, 1:5000 para WB; Calponina, 1:1000 para WB; Vinculina, 1:200 para IF) and Thermo-Pierce (PDI, 1:1000 para WB/IF). Anticorpos secundários anti-mouse and anti-rabbit conjugados com peroxidase (HRP) usados para WB (Calbiochem); fluorescência em espectro visível para IF (Invitrogen); fluorescência em espectro infravermelho para WB (Licor) e conjugado com peroxidase para IHC (Vectastain Elite). Meio de cultura Dubelcos Modified Eagle Medium (DMEM), penicilina, estreptomicina e tripsina da Gibco BRL-Life technologies; soro fetal bovino da Cultilab; colagenase, elastase tipo IV da Worthington Biochemical Corporation. Imunoglobulina de camundongo controle (IgG da Pierce-Thermo e Santa Cruz). Para procedimentos cirúrgicos: ketamina sódica e pentobarbital sódico da Cristália e hidrocloreto de xilazina da (Bayer).

4.2 Ética

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo possuindo o n° de protocolo 1086/09.

4.3 Artérias coronárias humanas

Foram examinadas amostras coletadas em 20 necropsias realizadas entre 2008 e 2011 no Laboratório de Patologia do Instituto do Coração (InCor) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Todos os pacientes faleceram de infarto agudo do miocárdio. Para análises histológicas, seções foram cortadas perpendicularmente ao eixo longo dos vasos em modo serial, aproximadamente a cada 10 mm, na artéria coronária descendente anterior e circunflexa esquerda. Para classificação do tipo de remodelamento presente em seções mais distais, a lâmina elástica interna (IEL) de cada seção foi comparada à IEL de referência na região proximal, assumida como o calibre vascular normal. Remodelamento positivo (ou expansivo) foi definido como qualquer aumento na área da IEL em seções sucessivas. Remodelamento negativo (ou constrictivo) foi identificado pela redução na área da IEL em relação ao segmento de referência proximal, de acordo com método descrito por (51).

Detecção da PDI por imunohistoquímica foi realizada como descrito em maiores detalhes a seguir. A análise e quantificação da imunomarcagem foi realizada as cegas, sendo utilizando o sistema ImagePro Plus 5.1 (Media Cybernetics).

4.4 Modelo experimental de reparação vascular

O modelo que mimetiza a lesão vascular por angioplastia foi realizado em artéria ilíaca de coelhos (52), utilizando coelhos machos albinos da raça New Zealand com peso entre 3,5-4,0 kg. Como controle, foram utilizados coelhos não submetidos à intervenção cirúrgica.

Inicialmente, os animais foram sedados por injeção intramuscular de cloridrato de ketamina 35-50 mg/kg e 3,5 mg/kg de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina. Posteriormente, com anestesia intravenosa (i.v.) de pentobarbital sódico (25 mg/kg) as artérias ilíacas direita e esquerda foram expostas e um cateter-balão para angioplastia de 20,0 mm de comprimento e 3,0 mm de diâmetro (Baxter) introduzido retrogradamente. Aproximadamente dez minutos antes da colocação do cateter foram administradas (i.v.) 250 UI/kg de heparina sódica (i.v.). O balão foi insuflado por toda a extensão das ilíacas comuns e parte da artéria femoral utilizando 8 atm de pressão por 30 seg com intervalo de 15 seg. Ao término das lesões, foram

aplicadas uma dose de penicilina-benzatina e gentamicina intramuscular. Ao término de 14 dias os animais lesados, juntamente com coelhos do grupo controle, foram eutanasiados com dose excessiva de pentobarbital sódico (i.v.) para a retirada dos vasos.

Alternativamente, para tratamento com anticorpo neutralizante da PDI, o modelo de lesão vascular por distensão de cateter-balão foi realizado introduzindo-se o cateter pela artéria carótida. Os procedimentos iniciais de anestesia foram os mesmos como descrito acima. Após exposição e dissecação da artéria carótida esquerda, foram introduzidos guias e cateteres por meio de fluoroscopia. O cateter de angioplastia (40,0 mm de comprimento e 2,5 ou 3,0 mm de diâmetro, Baxter) foi posicionado na artéria femoral, sendo realizadas insuflações (8 atm, 3 insuflações de 1 min com intervalo de 30 s) para lesão vascular. Os animais foram previamente heparinizados (250 UI/kg de heparina sódica) antes da colocação do cateter. Após sutura da região exposta para exposição da artéria carótida, os animais foram tratados com antibióticos (penicilina-benzatina e gentamicina intramuscular).

No 12º dia após a lesão, a região lesada foi dissecada para aplicação do gel plurônico (25%), que é mantido em estado líquido em baixas temperaturas e gelifica temperatura ambiente. Dois a quatro mililitros do gel contendo 1 µg/ml do anticorpo monoclonal feito em camundongo anti-PDI (Thermo-Pierce) ou o controle da imunoglobulina de camundongo IgG (Santa Cruz ou Thermo-Pierce) foram aplicados de maneira tópica cobrindo todo o segmento lesado. Poucos segundos após o contato com o animal o gel se gelifica ao redor do vaso. Ao completar 14 dias após lesão, os animais foram reavaliados para análise de parâmetros morfométricos *in vivo* e, após o sacrifício, os segmentos são removidos para utilização em outras medidas. Paralelamente, alguns animais mantidos como controle (sem lesão) foram utilizados para o estudo do efeito da inibição da pecPDI em situação basal, sendo os anticorpos aplicados da mesma maneira descrita anteriormente.

4.5 Arteriografia

Após infusão intra-arterial de nitroglicerina (200 µg), análise angiográfica foi realizada utilizando infusão de contraste/salina (1:1 v/v) registradas em aparelho Phillips BV Pulsera. Arteriografias foram realizadas antes, durante, imediatamente após e 14 dias após lesão mecânica. Análise do diâmetro do calibre foi medida em 5

locais distintos ao longo do segmento tratado, sendo realizado às cegas e utilizando o software Image J para quantificação.

4.6 Tomografia de coerência óptica

A técnica de tomografia de coerência óptica foi realizada com auxílio do Dr. Celso Kyochi Takimura. O cateter de imagem com recuo automatizado ImageWire (LightLab Imaging) foi introduzido pela artéria carótida direita. Utilizando o registro angiográfico, realizado no momento da lesão, avançou-se com o cateter até o ponto distal do segmento lesado/tratado. Nitroglicerina e papaverina foram administradas previamente às medidas, para permitir a colocação do cateter e minimizar vasoespasmos. O escaneamento das artérias foi feito durante sistema de puxada automatizado, sendo infundida solução salina (NaCl 0,9 %) durante os registros. A calibração do aparelho foi realizada antes de cada medida.

Na porção de aproximadamente 30 mm em que o aparelho realiza o registro, foram analisados o diâmetro bem como a área do vaso, lúmen e parede em 5 segmentos com intervalo de aproximadamente 5 mm de intervalo entre as medidas. As análises foram feitas no próprio aparelho de OCT (St Jude Medical) sendo realizadas às cegas.

4.7 Cultura e isolamento de células musculares lisas primárias da aorta de coelhos

Coelhos da raça New Zealand com peso entre 3,5 – 4 kg foram eutanasiados por injeção letal de anestésico (pentobarbital), em seguida, a porção descendente da aorta torácica foi removida e dissecada, para retirada substancial da camada adventícia visível. Posteriormente, o tecido foi submetido à digestão enzimática com solução contendo: colagenase IV (1 mg/ml), elastase (0,125 mg/ml) e inibidor de tripsina (0,375 mg/ml) diluída em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle (DMEM) sendo mantidos em 37°C por 2h (adaptado de ref. 53). O tecido parcialmente digerido foi lavado em tampão fosfato salino (PBS) estéril contendo antibióticos (estreptomicina 100 µM e penicilina 100 U/ml), cortado em pequenos fragmentos, o endotélio foi removido mecanicamente por leve raspagem e os fragmentos foram colocados em placas de 6-poços com a face luminal voltada para baixo contendo DMEM suplementado com soro fetal bovino (SFB, 10%) e antibióticos. Os

fragmentos foram mantidos em sistema de cultura com temperatura e CO₂ controlados (37°C – CO₂ 5%, respectivamente). A cada 3 dias, o meio foi trocado, sendo que, ao atingir confluência local, foram feitas sementeiras secundárias para realização dos experimentos.

4.8 Estiramento cíclico equibiaxial

A indução de estiramento equibiaxial foi realizada utilizando o sistema FX-4000TM Flexercell Tension Plus em colaboração com o Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular coordenado pelo Prof Dr. José Eduardo Krieger. Células musculares primárias da aorta de coelho (1×10^5) em passagens entre 3 – 8 foram plaqueadas com meio completo (antibióticos e SFB 10%) em placas de 6 poços formada por uma membrana flexível, contendo colágeno do tipo I. Após 24 h, as células foram carenciadas (0,1% de SFB) durante 12 h. Posteriormente, o meio de cultura foi trocado contendo imunoglobulina controle (IgG) ou o anticorpo neutralizante da PDI (PDI Ab) 1 h antes do início do estiramento. As células foram mantidas estáticas ou estiradas em 12%, na frequência de 1 Hz durante 24 h por meio de um aparato conectado a uma bomba de vácuo e monitorado por sistema computadorizado (54). Após o período do estiramento, as células foram imediatamente fixadas com paraformaldeído 4% para realização de imunofluorescência, ou lisadas com tampões específicos, dependendo da análise. Em alguns experimentos, o meio de cultura foi coletado, centrifugado (2000 rpm, 10 min em 4°C) e o sobrenadante utilizado para tratamento em células estáticas como descrito a seguir.

4.9 Experimentos com meio condicionado

VSMCs primárias da aorta de coelho foram cultivadas em placas de 24 poços em lamínulas de vidro estéreis em meio completo (soro 10% e antibióticos) durante 12 h. Após este período inicial, as células foram carenciadas (meio sem SFB) por 12h e incubadas com meio condicionado (MC) coletado previamente, como descrito anteriormente. Em alguns casos o anti-PDI ou IgG foi removido por meio de ligação à proteína G acoplada à beads magnéticas seguida por separação magnética.

Alternativamente, foi adicionado ao MC já previamente (30 min) incubado nas células o ativador de RhoA (CN01, 0,5 U/ml por 30 min).

4.10 Migração randômica de células únicas

VSMCs da aorta de ratos previamente estabelecidas de uma linhagem de células imortalizadas A7R5 foram cultivadas em meio de cultura completo. Para transfecção de siRNA, as células foram plaqueadas em baixa confluência (30%) em placas de 6 poços. Após carenciamento por 12 h, as células foram transfectadas com uma mistura de siRNAs contra PDI ou com siRNA embaralhado, ambas 50 nM e utilizando lipofectamina (3 μ l). As sequencias estão descritas na seção de anexos (Anexo A, Tab.1). A transfecção foi feita em meio sem soro e antibióticos durante 6h. Posteriormente, o meio completo foi repostado e as células cultivadas durante 72 h.

O ensaio de migração foi realizado em placas de 12 poços cultivando as VSMCs em baixa confluência ($1,25 \times 10^3$ células/cm²). Após carenciamento por 12 h, as células foram mantidas em situação basal ou estimuladas com PDGF (25 ng/ml) sendo pre-incubadas ou não com anti-PDI (1 μ g/ml). A análise da migração foi realizada em condições fisiológicas (37°C, CO₂ 5%) utilizando microscópio de luz invertido (Zeiss Axiovert 200) com índice de aumento de 10x. O registro foi feito após 1 h de estímulo, medindo a cada 10 min durante 16 h. Os cálculos foram feitos em 4 – 5 campos por poço sendo analisados pelo menos 5 células por campo. Dentre os parâmetros analisados incluem distância total, distância da origem, velocidade média, taxa de migração e persistência direcional de migração, sendo apresentada na seção de resultados a medida da persistência que foi calculada pela razão entre distância da origem pela distância de migração (55).

4.11 Cultura do anel vascular

Após a excisão das ilíacas os vasos foram continuamente lavados em tampão fosfato salino em ambiente estéril contendo antibióticos (estreptomicina 100 μ M e penicilina 100 U/ml) e cortados em anéis de aprox. 3 mm. Os anéis foram mantidos em sistema de cultura a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂ por aproximadamente 12 h em meio DMEM suplementado com soro fetal bovino 10%, estreptomicina (100 μ M) e penicilina (100 U/ml). A cultura do anel vascular foi utilizada para análise da perda

de função da PDI com: 1) RNA de interferência e 2) anticorpo neutralizante. A seguir seguem as descrições de cada protocolo.

1) Transfecção na cultura do anel

Após a fase inicial de adaptação, o meio foi trocado por DMEM sem soro por 12 h (período de carenciamento) e então adicionados o siRNA da PDI ou a sequência embaralhada na presença de lipofectamina 5 µg/ml em DMEM sem SFB e antibióticos. As transfecções foram mantidas por 14h. Posteriormente, trocou-se para DMEM completo (soro e antibióticos) mantendo-se os tecidos por 48 h para análise da expressão do mRNA e 72 h para expressão proteica.

2) Inibição com anticorpo na cultura do anel

Neste protocolo a fase de adaptação foi reduzida para aprox. 1 h. Após este período, o meio de cultura foi trocado contendo 1 µg/ml do anticorpo monoclonal anti-PDI RL90 (PDI Ab, Thermo-Pierce) ou IgG controle (Santa Cruz ou Thermo-Pierce). As análises foram realizadas 48 h após a incubação dos anticorpos.

4.12 Expressão proteica por Western Blot

Anéis vasculares foram homogeneizados em N₂ líquido com pestil e gral sendo ressuspendidos em tampão de lise na presença de inibidores de protease (aprotinina 1 µg/ml, leupetina 1 µg/ml e fenil-metil-sulfonil 10 mM). Células isoladas foram lisadas utilizando-se o mesmo tampão descrito anteriormente. O rompimento de membranas foi otimizado por sonicação ultrassônica (Fisher). Após a sonicação, as amostras foram incubadas em tampão de lise em 4°C sob leve agitação e centrifugadas (12000 rpm, 20 min em 4°C) para retirada de debris. Determinação da concentração de proteínas foi feita pelo método de Bradford (1976), alíquotas de 30 µg foram diluídas em tampão de amostra contendo azul de bromofenol 0,02%, mercaptoetanol 10 mM e dodecil sulfato de sódio 10%-15%. As amostras, juntamente com um padrão de pesos moleculares, foram aplicadas em gel de poliacrilamida para separação das proteínas por eletroforese. Posteriormente, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em sistema semi-seco (GE Healthcare), ou sistema molhado (Biorad) para medida da expressão de Fak

(total e fosforilado). As membranas foram inicialmente incubadas com a solução de bloqueio (leite 5%). A detecção de proteínas específicas foi feita pela incubação com os anticorpos primários específicos (anticorpos e concentração descritos na seção reagentes) durante 12 h em 4°C, sendo posteriormente incubados com anticorpos secundários conjugados com peroxidase e revelados por método quimioluminescente (peroxidase-H₂O₂-luminol) com o kit ECL (GE Healthcare) expondo a membrana a um filme radiográfico e revelando em equipamento automatizado (Kodak). Parte dos experimentos foi feita detectando-se a luminescência com o Image Quant (GE) e uma parcela utilizando anticorpos secundários fluorescentes e detectando-se o sinal pelo Odyssey (Licor).

4.13 Detecção proteica por imunofluorescência

Anéis vasculares foram emblocados em gel de congelamento (TissueTek) para posterior corte (10 µm) em criostato. Os cortes foram fixados em acetona, sendo mantidos sem permeabilização ou permeabilizados com PBS contendo Triton 0,1%, por 10 – 15 min. Posteriormente, foi realizado o bloqueio com albumina 4% em temperatura ambiente. Anticorpos primários específicos (anticorpos e concentração descritos na seção reagentes) foram incubados por 12 h (4°C), diluídos em PBS contendo albumina 1 mg/ml. Após incubação com anticorpos secundários fluorescentes (1 h em temperatura ambiente), contendo o marcador de núcleo (DAPI) e contendo ou não o marcador de F-actina (faloidina), as lâminas foram montadas em presença de PBS/glicerol (1:1, v/v) e analisadas em microscópio confocal (Zeiss LSM510 Meta). Os experimentos realizados em células isoladas foram conduzidos de modo semelhante, porém fixando as células com paraformaldeído 4%.

4.14 Histologia e detecção proteica por imunohistoquímica

Anéis vasculares de aprox. 3 mm foram incubados em formaldeído 4% tamponado (aproximadamente 24 h) para fixação e posterior inclusão na parafina. Os blocos parafinados foram cortados em micrótomo na espessura de 3 µm e os segmentos posteriormente desparafinados. Para análise histológica, foram feitas colorações de hematoxilina-eosina (HE), Picrosíríus (para fibras de colágeno) e Verohoeff (para fibras elásticas). A avaliação diferencial das fibras de colágeno foi

realizada utilizando luz circularmente polarizada por meio de filtro polarizador acoplado ao microscópio (Leica). O filtro foi inicialmente ajustado para detectar fibras vermelhas/espessas (mais birrefringentes) e posteriormente fibras verdes/finas (menos birrefringentes), sendo os valores normalizados pela área analisada (adaptado de (56).

Para imunomarcações, peroxidases endógenas foram bloqueadas com peróxido de hidrogênio e a recuperação antigênica foi obtida por digestão com tripsina. Após bloqueio das proteínas com leite desnatado (2%), as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário anti-PDI (Enzo – 1:10000 para carótidas de ratos, 1:32000 para ílicas de coelho e 1:1000 para artérias humanas), seguido do secundário conjugado com peroxidase Vectastain Elite, e em seguida revelados pelo cromógeno 3,3-diaminobenzidine (DAB). As imagens de amostras de ratos e coelhos foram adquiridas em microscópio Leica utilizando o software Qwin e as artérias humanas como descrito anteriormente (seção *Artérias coronárias humanas*).

4.15 Alinhamento dos filamentos de actina (F-actina)

Para a análise do alinhamento da actina em vasos lesados, os filamentos de actina foram marcados pelo sensor fluorescente faloidina (Alexa-Phalloidin635nm). Toda a região da média e íntima foi selecionada de forma similar e a orientação foi medida utilizando a ferramenta Orientation J do software Image J e a coerência direcional da F-actina foi calculada. Valores próximos a 1 (representando elipses achatadas), indicam alto coeficiente de coerência do alinhamento em direção ao eixo longo da elipse (57).

4.16 Expressão do mRNA por RT-PCR em tempo real

Inicialmente, os tecidos são homogeneizados com N₂ líquido e, do pó obtido, realiza-se a extração do mRNA utilizando o kit RNA Extration Kit (Invitrogen) seguindo as orientações do fabricante. A única adaptação realizada no protocolo foi a eluição do mRNA retido nos filtros com 30 µl ao invés de 100 µl como sugerido pelo fabricante. O RNA é quantificado medindo-se a absorbância em 260 nm (NanoDrop, Applied Biosystems) e a pureza pela relação da absorbância entre 260/280 nm e por análise das bandas de rRNA em gel de agarose (0,8%) contendo brometo de etídio .

O mRNA (1 µg) é convertido em cDNA pela incubação com OligodT₍₁₂₋₁₈₎ (25 ng/µl), dNTP (500 µM de cada), DTT (5 µM), RNase OUT (2 U/µl) e SuperScript II, a 42°C por 50 min.

As soluções de reação para as corridas de PCR quantitativo foram realizadas com: primers (200 nM), reagente Sybr Green MasterMix (Invitrogen) e 0,5 µl de cDNA conforme especificações do fabricante. A parte inicial do estudo utilizou o termociclador acoplado ao detector fluorescente Corbett (modelo RG 3000). Entretanto, a maior parte das análises foi feita em PCR quantitativo de placas da Applied Biosystems, o que permitiu realizar a análise de um número maior de genes simultaneamente em número menor de corridas. Para tanto, os primers dos diferentes genes foram desenhados para que tivessem porcentagem de CG, temperatura de melting e outras propriedades físicas similares. A confirmação da eficiência da reação foi realizada em mRNA extraídos de aorta abdominal dos coelhos que já eram previamente sacrificados para utilização das ilíacas. Uma lista contendo as sequências dos primers está apresentada na seção de anexos (Anexo A, Tab.2).

4.17 Detecção de Nitrato (NO₃⁻) vascular

Homogenatos vasculares foram obtidos por maceração do tecido utilizando N₂ líquido. Após centrifugação (12000 rpm por 20 min em 4 °C), alíquotas de 20 µl do sobrenadante foram injetadas no detector quimioluminescente Nitric Oxide Analyzer (NOA 280, Sievers Instruments) utilizando o VCl₃ e HCl (em 95°C) como agente redutores, como previamente descrito (4). A quantidade de NO₃⁻ foi comparada com padrões e normalizada pela concentração de proteína.

4.18 Detecção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

A produção de H₂O₂ vascular foi quantificada pelo método de Amplex Red adaptado de estudos prévios (6, 58). De modo resumido, anéis vasculares (2-3 mm) foram incubados com Amplex Red (100 µM, Molecular Probes-Invitrogen) em solução de Krebs-HEPES (pH 7.4) com anti-PDI ou IgG controle (3 µg/ml). O produto fluorescente da oxidação (resorufina) foi detectado durante 60 min em 37°C com emissão em 590 nm e excitação em 560 nm no espectrofluorímetro MI5 (Perkin Elmer). Experimentos adicionais foram realizados incluindo peroxidase (*horseradish*

peroxidase, HRP 1 U/ml) no ensaio, mas os resultados foram similares aos sem HRP que estão apresentados na Fig. 10A. Controles com PEG-catalase foram realizados para validação do método.

4.19 Detecção de radicais livres por adutos de DMPO

A técnica empregada na detecção direta de radicais livres por espectrometria de ressonância paramagnética (EPR) utilizando o DMPO foi adaptada para detecção de adutos de DMPO em tiol-proteínas utilizando-se o anticorpo anti-DMPO (gentilmente cedido pelo Professor Ronald Mason, NIH). Brevemente, o tecido foi incubado na cultura com DMPO 40 mM durante 1h. Após 3 lavagens com PBS o anel vascular foi emblocado em gel de congelamento e imunofluorescência realizada como descrito anteriormente. Foram realizados controles negativos, pré-incubando anéis aórticos com Peg-SOD 250 U/ml e Catalase 100 U/ml por 30 min antes da adição do DMPO.

4.20 Detecção de tióis de superfície

A análise de tióis de superfície foi realizada usando o reagente de tióis impermeável Alexa Maleimido 647 nm (ALM, Invitrogen). Inicialmente, os tecidos foram lavados com PBS para limpeza e retirada de sangue residual e posteriormente incubados com ALM 5 μ M e DAPI 10 μ g/ml em solução contendo NaCl 92 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 1 mM e HEPES 10 mM (pH 7,2) durante 30 min em 4°C protegendo da luz. Após incubação, os tecidos foram novamente lavados (3x) com a solução acima e emblocados em gel de congelamento. Os cortes e análises em microscópio confocal foram realizados como descrito anteriormente. Controles positivos foram realizados pré-incubando os tecidos com Catalase 100 U/ml por 30 min.

4.21 Atividade de RhoA

Imediatamente após o período de estímulo de estiramento ou manutenção de células na condição estática, o meio foi removido, e as células lavadas (2x) com PBS gelado (4°C) e rapidamente processadas para o ensaio de absorvância utilizando o kit RhoA G-LISA de acordo com as orientações do fabricante (Cytoskeleton).

4.22 Morte Celular

O ensaio de morte celular *in situ* foi realizado em lâminas de segmentos vasculares pelo ensaio de TUNEL utilizando o kit de detecção de morte celular seguindo as especificações do fabricante (Roche). Após permeabilização dos tecidos com proteinase K 20 µg/ml, as lâminas foram incubadas com a solução de TUNEL, contendo nucleotídeos marcados, e com a enzima que transfere esses nucleotídeos aos locais de extensiva quebra de DNA. A detecção da fluorescência foi realizada em microscópio confocal em excitação de 488 nm e emissão em 525 nm (59). A quantificação foi realizada utilizando o software Image J medindo o número de núcleos positivo para TUNEL e corrigindo pelo número total de núcleos no campo analisado.

4.23 Reatividade Vascular

A análise da reatividade vascular foi realizada em anéis de artéria carótida de coelhos recém-colhidas ou após 4 dias de manutenção em cultura de tecidos. De modo breve, os anéis foram suspensos por um par de ganchos em banho de órgãos contendo solução nutriente e tamponadora Krebs-Henseleite (em mmol/L: NaCl 115, KCl 4,7, MgSO₄ 1,2, KH₂PO₄ 1,5, NaHCO₃ 25, CaCl₂ 2,5, glicose 11,1; pH 7,4). Um gancho foi conectado ao transdutor de tensão (transdutor isométrico BIOPAC) para a aquisição da tensão desenvolvida pelos anéis e o outro ao fundo da cuba, para que o vaso permanecesse constantemente banhado na solução de Krebs (60). Os anéis foram distendidos a uma tensão de repouso de 2 g. Após um período de estabilização de 60 minutos, trocando o tampão a cada 20 minutos e reajustando a tensão basal, os vasos foram contraídos com fenilefrina 1 µM e posteriormente relaxados com acetilcolina (ACh, 0,1 nM – 100 µM), sendo registrada a tensão após estabilização da resposta para cada agonista.

4.24 Propriedades viscoelásticas vasculares

Responsividade da tensão isométrica vascular foi testada em anéis vasculares (~4 mm de comprimento) recém-colhidos ou tratados em cultura de tecidos com ou sem inibição da pecPDI. Após breve período de estabilização (5 min) em banho de órgãos contendo solução salina (NaCl 0,9%) sendo adicionada papaverina (100 µM)

e utilizando 0,5 g de tensão de repouso, os anéis foram tensionados por rápida indução manual de estiramento (1 – 3 g) e o relaxamento passivo foi registrado durante os subsequentes 180 seg. Tensão de ruptura e distância de ruptura foram medidas no mesmo sistema após progressivo estiramento até atingir incapacidade de manter tensão ou em alguns casos romper. Métodos similares foram relatados na literatura (56).

4.25 Análise estatística

Os dados são apresentados como média \pm erro padrão. As comparações foram feitas utilizando teste t de *Student* (pareado ou não pareado) ou ANOVA de uma via com *post-hoc* de Bonferroni. A produção de peroxide de hidrogênio e o relaxamento passivo foram analisados por ANOVA de duas vias com *post-hoc* de Bonferroni. Os gráficos e testes foram realizados utilizando o software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc). Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

5. Resultados

5.1 Intracelular e peri/epicelular (pec)PDI são fortemente aumentadas durante reparação vascular à lesão

Ambos mRNA da PDI e expressão proteica estão aumentados 4, 7 e 14 dias após lesão, entretanto com distintos padrões: enquanto o pico do mRNA ocorre no 7º dia após lesão (Fig. 2A), a expressão proteica acumula durante os tempos analisados, principalmente entre o 7º e 14º dia, aumentando acima de 25x comparado à situação controle (Fig. 2B), particularmente na região neointimal (Fig. 2C). Resultados similares foram observados em modelo de lesão vascular em carótidas de ratos (Anexo B, Fig. Supl.1).

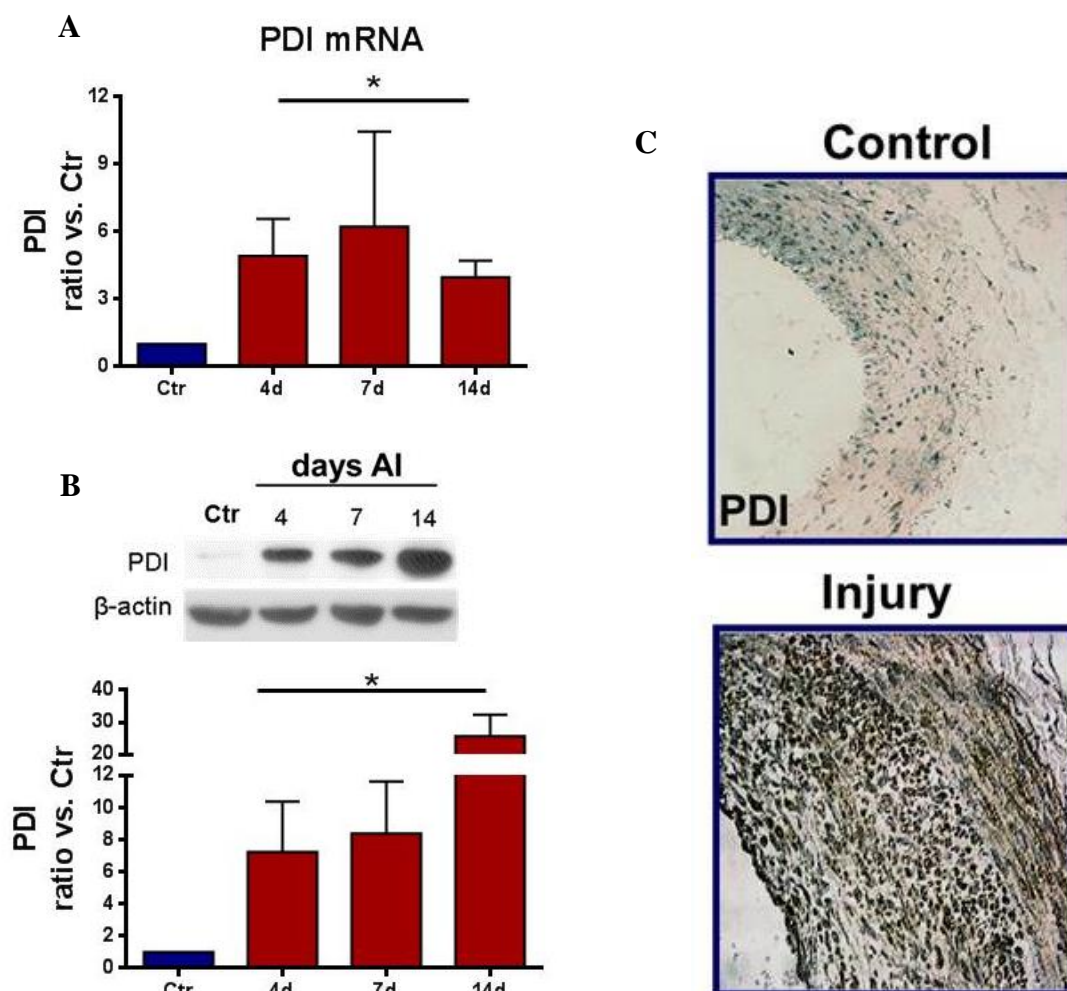


Fig. 2. Superexpressão da PDI durante reparação vascular após lesão. Artérias ilíacas e femorais de coelhos foram submetidas a lesão por superdistensão com cateter de angioplastia e a expressão do mRNA (Painel A) e proteica (Painel B) da PDI foram analisadas 4, 7 e 14 dias após lesão (AI). PDI mRNA e proteína foram normalizados por GAPDH e β -actin, respectivamente. Gráficos correspondentes demonstram quantificações da PDI representadas em relação a artérias controle (Ctr). Dados são média \pm erro padrão; * p <0.05 vs. Ctr, n =3-4. Painel C: Imunohistoquímica da PDI em artérias ilíacas de coelho controle e 14 dias após lesão (n =4). Aumento da imagem: 20x.

As chaperonas KDEL Grp94, Grp78 e calreticulina também aumentam durante a reparação vascular (Fig. 3A-C, respectivamente), porém apresentando um padrão diferente da PDI, atingindo pico em 7 dias após lesão e apresentando menor aumento em relação à PDI. O que sugere que a expressão da PDI não ocorre somente como um produto de adaptação ao estresse do RE. De fato, a PDI não é amplamente considerada um gene responsivo à UPR (61).

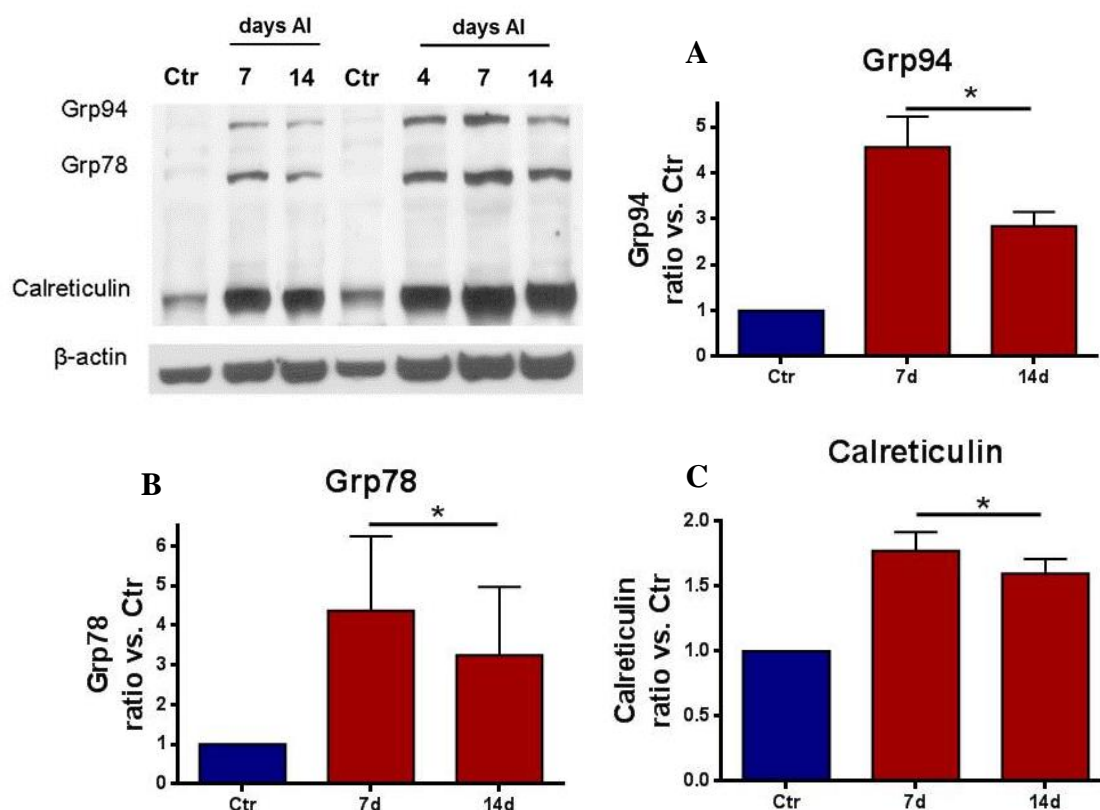


Fig. 3. Indução de estresse do RE durante reparação vascular à lesão. Artérias ilíacas e femorais de coelhos foram submetidas à lesão por superdistensão com cateter de angioplastia e a expressão das chaperonas KDEL Grp94 (*Painel A*), Grp78 (*Painel B*) e calreticulina (*Painel C*) foram analisadas 4, 7 e 14 dias após lesão (AI). Quantificações foram realizadas em artérias controle, 7 e 14 dias após lesão. Expressão de chaperonas foi normalizada por β -actina e foram expressas em relação a artérias controle. Dados são média \pm erro padrão; * $p < 0.05$ vs. Ctr, $n = 3-4$.

Para investigar se a pecPDI contribui para os elevados índices da expressão de PDI em artérias lesadas, foram realizadas imunofluorescências sem permeabilização dos tecidos. Os resultados demonstraram detecção da pecPDI em artérias normais, porém com expressivo aumento em artérias 14 dias após lesão (Fig.4A). A porção intracelular também apresentou marcação acentuada versus segmentos controle, porém o padrão de detecção foi diferente em lâminas permeabilizadas comparado à marcação peri/epicelular que parece acumular em blocos na região extracelular. Entretanto, uma vez que a marcação da pecPDI pode refletir um artefato causado pelo corte do tecido e consequentemente exposição do material intracelular, realizamos a imunodeteção em tecidos antes da inclusão em

gel de congelamento (tissue tek) incubando com anticorpos primário e secundário no tecido intacto. Apesar da ausência de marcação em camadas menos expostas, a detecção também foi aumentada em artérias lesadas com e sem permeabilização (Fig. 4B). Assim, esses dados confirmam a expressão aumentada da pecPDI durante reparação vascular à lesão. A fim de detectar se a expansão do RE e consequentemente aumento de conexões RE e membrana plasmática podem ter contribuído para marcação da pecPDI, sendo assim influenciada por uma porção cortical, realizamos a imunodeteção da cortactina, proteína expressa em porções distais da lamelipódia, extensões da membrana envolvidas em migração celular (62). Entretanto, a marcação da pecPDI não coincidiu com a cortactina (Fig. 4C), descartando a hipótese de contaminação por PDI do RE cortical.

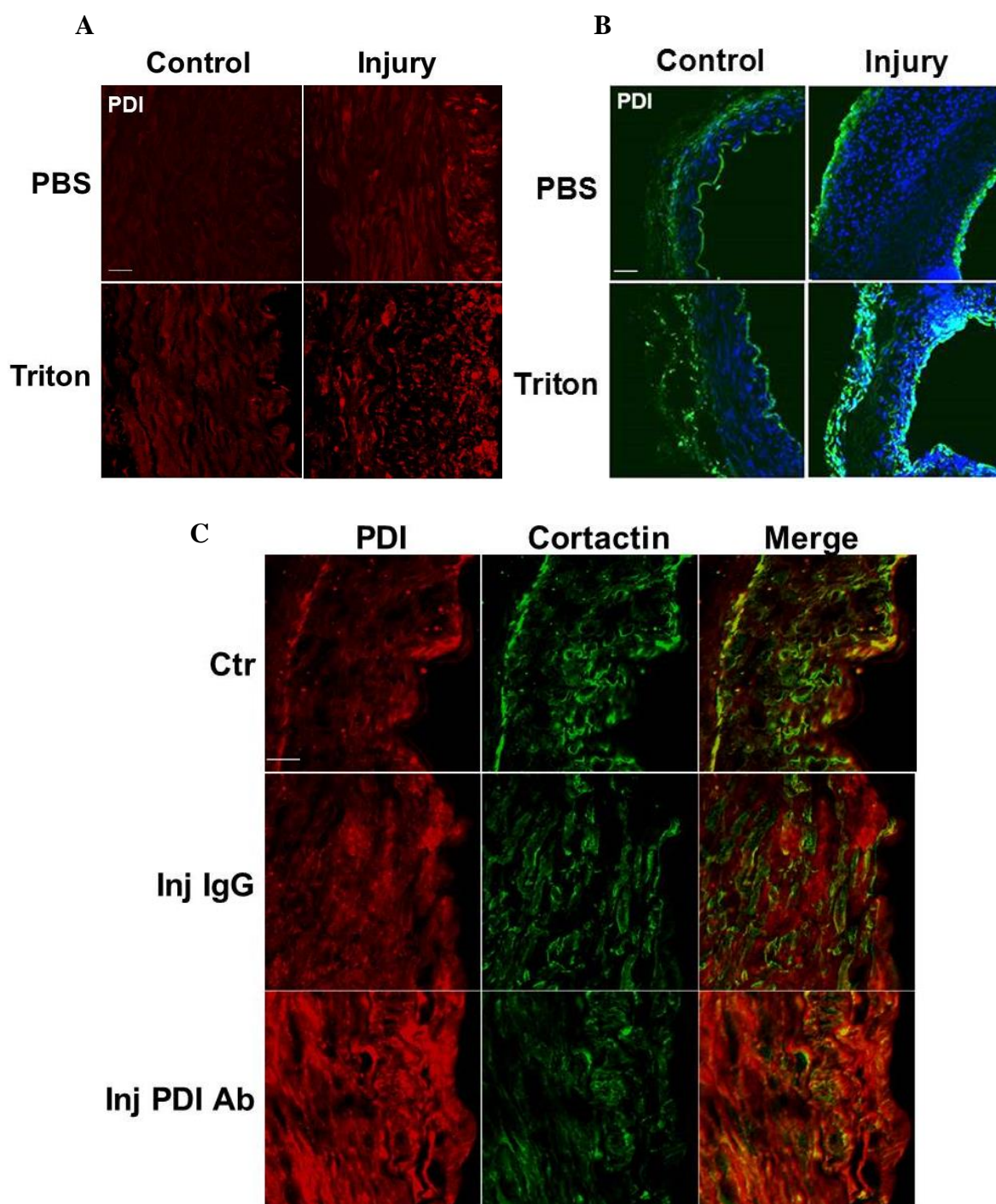


Fig. 4. PDI intracelular e peri/epicelular(pec)PDI são aumentadas durante reparação vascular à lesão. *Painel A:* Análise por microscopia confocal de imunofluorescência para PDI em artérias controle (control) e 14 dias após lesão (injury) em cortes não-permeabilizados (tampão fosfato salino, PBS) ou permeabilizados (Triton-X 0,1% por 10 min em temperatura ambiente). PDI é demonstrada em vermelho (anticorpo secundário Alexa546nm). Aumento da imagem: 40x. Barra de escala 20 μm, n=3. *Painel B:* Artérias controle e lesadas como em A e detecção da PDI por imunofluorescência realizando incubações com anticorpos no tecido antes de incluir em gel de congelamento (tissue tek). Após incubação com anticorpos primário (anti-PDI, Thermo-Pierce) e secundário (anticorpo secundário Alexa488nm, verde) mais o marcador de núcleo (DAPI), os tecidos foram emblocados em gel de congelamento, cortados em criostato (10 μm) e montados em PBS:Glicerol 1:1 (v/v). Aumento da imagem: 20x; n=2. *Painel C:* Artérias controle e lesadas

como em A e detecção por imunofluorescência da PDI e cortactina. PDI é demonstrada no quadro à esquerda (anticorpo secundário Alexa546nm, vermelho), cortactina no quadro central (anticorpo secundário Alexa488nm, verde) e dupla marcação no quadro à direita (Merge). Aumento da imagem: 40x. Barra de escala 20 μ m, n=3.

5.2 Perda de função da PDI total/intracelular acentua estresse do RE e morte celular em vasos lesados

A fim de investigar se a pecPDI afeta a resposta vascular à lesão, realizamos diversos experimentos inibindo o *pool* total e o *pool* peri/epicelular da PDI. Para tanto, anéis vasculares (2-3 mm de comprimento) de artérias controle e 14 dias após lesão foram coletados e mantidos em cultura por 2 – 5 dias, de acordo com o experimento. O sistema de cultura de tecidos foi capaz de manter a função vasomotora relaxante dependente do endotélio, bem como responsividade contrátil (Anexo B, Fig. Supl 2A e B, respectivamente), indicando viabilidade tecidual. Além disso, a validação da transfecção de RNA de interferência (siRNA) também foi demonstrada pela captação de oligonucleotídeo fluorescente por tecidos mantidos em cultura (Anexo B, Fig. Supl. 3). A neutralização da pecPDI por incubação com o anticorpo utilizado em nosso estudo (clone RL90, *Thermo-Pierce*) já foi relatada em diversos estudos tanto em células em cultura (32, 40) e plaquetas (63), como em modelo animal (35).

O silenciamento da PDI pela transfecção com siRNA foi capaz de reduzir a expressão do mRNA da PDI em artérias controle e lesadas (Fig. 5A) e a expressão proteica da PDI em segmentos controle (Fig. 5B). Entretanto, o siRNA contra PDI não induziu alteração da expressão proteica da PDI em segmentos arteriais lesados. A fim de analisar se algum problema técnico poderia estar envolvido na ineficácia em diminuir a PDI em artérias lesadas, diferentes protocolos foram testados, alguns estão demonstrados na figura suplementar 4 (Anexo B), porém com resultados semelhantes ao apresentado (Fig. 5B). Dentre as possíveis hipóteses levantadas para este fato, acreditamos que a mobilização do *pool* de PDI para uma porção mais protegida de degradação poderia estar ocorrendo em artérias lesadas com o silenciamento da PDI. Uma dessas possíveis regiões protegidas poderia ser a

superfície celular ou o compartimento extracelular. De fato, a transfecção com siRNA da PDI favoreceu a expressão da pecPDI (Fig. 5C).

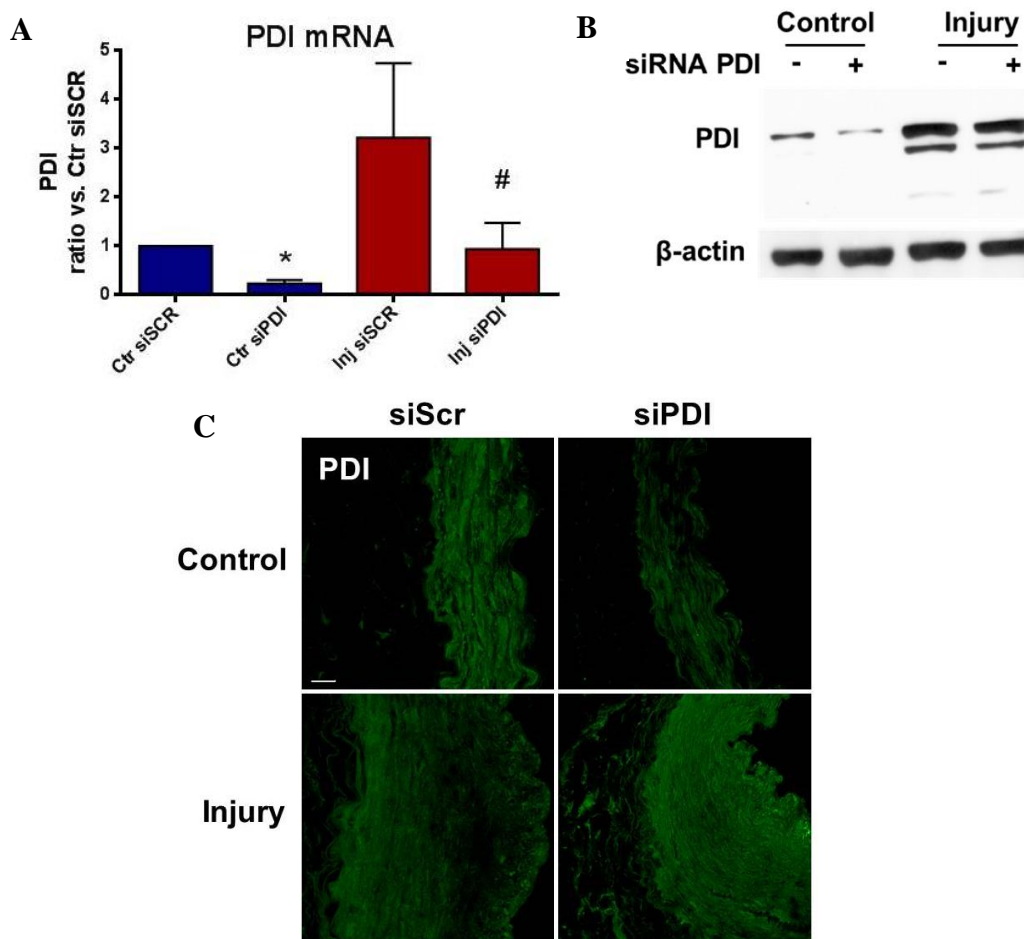


Fig. 5. Silenciamento da PDI em cultura de tecidos reduz expressão do mRNA em artérias controle e lesadas, expressão proteica em artérias controle (refletindo em menor quantidade de tióis livres) e acentua expressão da pecPDI em artérias lesadas. *Painéis A-D:* Segmentos arteriais ilio-femoral de coelhos controle e 14 dias após lesão foram cultivados para transfecção do siRNA contra PDI (siPDI, 100 nM) ou sequência controle/embaralhada (siScr, 100 nM) e análise após 48 h ou 72 h, para detecção do mRNA (*Painel A*) e proteica (*Painel B*) da PDI, respectivamente. Quantificação do mRNA da PDI foi normalizado por GAPDH e expresso em relação ao Ctr siScr. * $p < 0.05$ vs. Ctr siScr; # $p < 0.05$ vs. Inj siScr, $n = 4$. *Painel C:* Imunofluorescência para PDI em cortes não permeabilizados. PDI é demonstrada em verde (anticorpo secundário Alexa488nm, verde). Aumento da imagem: 40x. Barra de escala 20 μ m, $n = 2$.

5.3 Estresse do RE contribui para o aumento da pecPDI

Uma vez que o estresse do RE aumenta a externalização de Grp78 (64), nós investigamos se um mecanismo similar poderia estar ocorrendo para o aumento da pecPDI. O silenciamento da PDI acentuou o estresse do RE artérias lesadas, como

demonstrado pela maior expressão de chaperonas KDEL (Fig. 6A-C) bem como indução aumentada de morte celular, que permaneceu entretanto abaixo de 8% (Fig.6D). O tratamento de artérias controle com o estressor do RE tunicamicina (2 $\mu\text{g/ml}$), induziu de modo tempo-dependente a expressão da pecPDI e colocalização com a proteína de membrana integrina alfa2 (Fig. 6E). A secreção de PDI e posterior ligação na superfície poderia contribuir para expressão aumentada da pecPDI, como já reportado (43). No entanto, artérias lesadas não apresentam maior secreção da PDI que segmentos controle, porém a liberação de PDI no meio de cultura é acentuada pelo silenciamento da PDI (Fig. 6F). Tal efeito não deve ter ocorrido pelo vazamento de proteínas causado por aumento de morte celular, já que expressão de β -actina não foi detectada no meio de cultura. De modo geral, esses dados indicam o envolvimento de estresse do RE na indução de pecPDI.

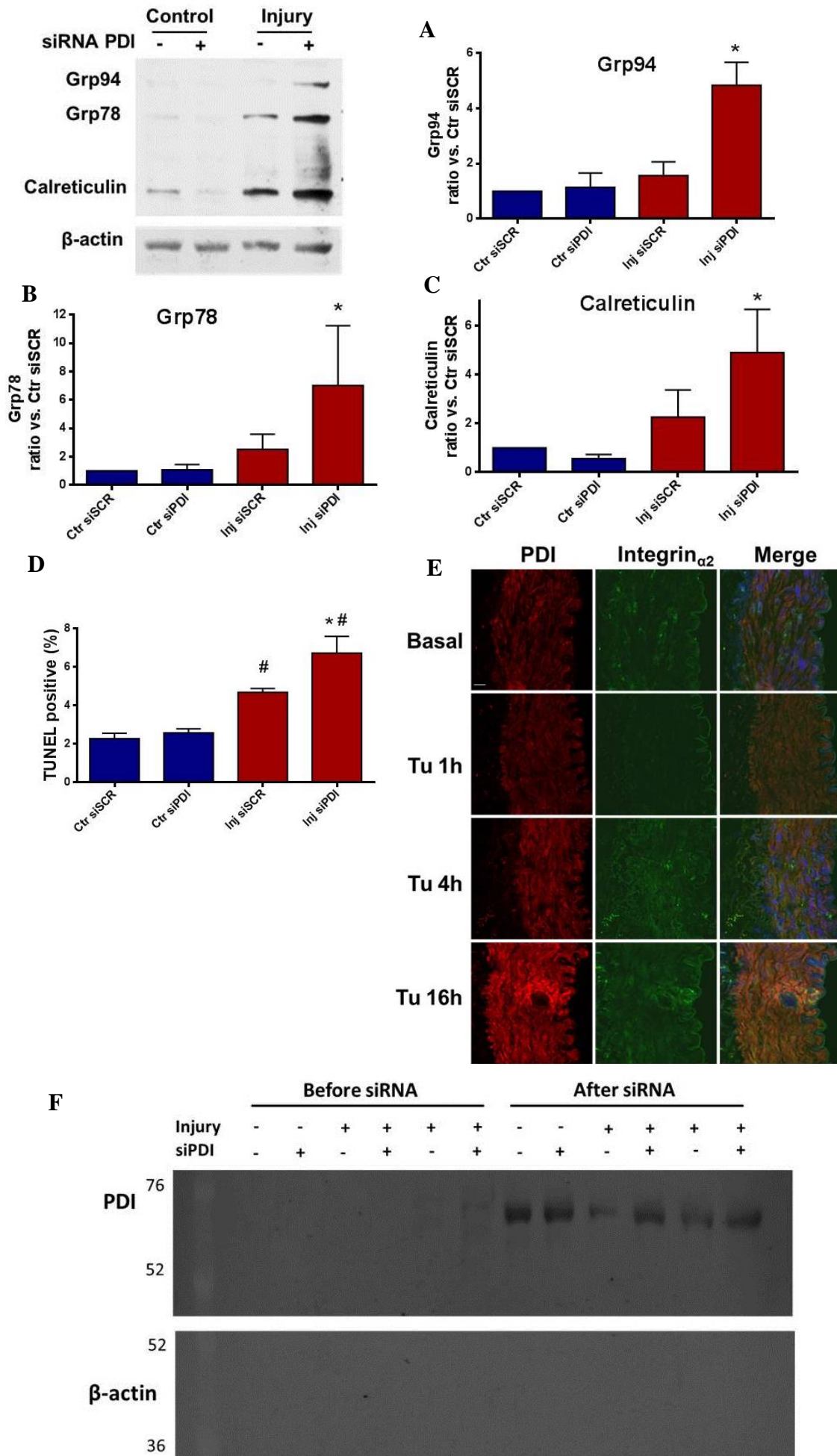


Fig. 6. Silenciamento da PDI em cultura de tecidos acentua estresse do RE, morte celular e secreção de PDI; e estressor do RE aumenta pecPDI artérias controle. *Painéis A - D:* Segmentos arteriais ilio-femoral de coelhos controle e 14 dias após lesão foram cultivados para silenciamento da PDI como descrito na figura 4. Detecção de chaperonas KDEL Grp94 (*Painel A*), Grp78 (*Painel B*) e calreticulina (*Painel C*). Quantificação da expressão proteica foi corrigida por actina e os valores são expressos em relação ao Ctr siScr. *Painel D:* Índice de apoptose medida pela contagem de núcleos positivo para TUNEL. * $p < 0.05$ vs. Inj siScr; # $p < 0.05$ vs. artérias controle, $n = 3-4$. *Painel E:* Artérias ilíacas controle foram mantidas em cultura de tecidos em situação basal ou tratadas com tunicamicina (2 $\mu\text{g/ml}$ por 1, 4 ou 16 h). Detecção por imunofluorescência para PDI e integrina $_{\alpha 2}$ em cortes não permeabilizados. PDI é demonstrada vermelho (anticorpo secundário Alexa546nm, esquerda), integrina $_{\alpha 2}$ em verde (anticorpo secundário Alexa488nm, meio) e dupla marcação a direita (merge). Índice de magnificação: 20x. Barra de escala 20 μm , $n = 2$. *Painel F:* Silenciamento da PDI como descrito na figura 4. Meio de cultura (sem soro fetal bovino) foi coletado antes da transfecção (before) e ao término das 72 h após transfecção (after) sendo que nas seis últimas horas meio de cultura foi trocado para meio sem soro fetal bovino. (-) corresponde a transfecção com siRNA controle/embaralhado e (+) ao siRNA contra PDI; $n = 2$.

5.4 PecPDI exerce efeitos específicos em artérias lesadas que não simplesmente refletem o pool total da PDI

Para estudar se a pecPDI exerce funções distintas da porção total ou intracelular da PDI nós conduzimos uma série de experimentos em cultura de tecidos. O silenciamento da PDI em artérias lesadas acentuou a queda no marcador de diferenciação calponina (Fig. 7A) e foi associado ao aumento na expressão da proteína envolvida em proliferação PCNA (Fig. 7B), indicando mudança para um fenótipo sintético. Ao contrário, a inibição da pecPDI em cultura não alterou nenhum desses marcadores, nem acentuou a indução de estresse do RE (Fig. 7C-E). De fato, a expressão de alguns genes, analisados por PCR quantitativa, apresentou algumas diferenças sensíveis à perda de função da PDI intracelular, em comparação com a pecPDI (Fig. 7F). Assim, esses dados indicam que a pecPDI não simplesmente reflete a ação da PDI total ou intracelular.

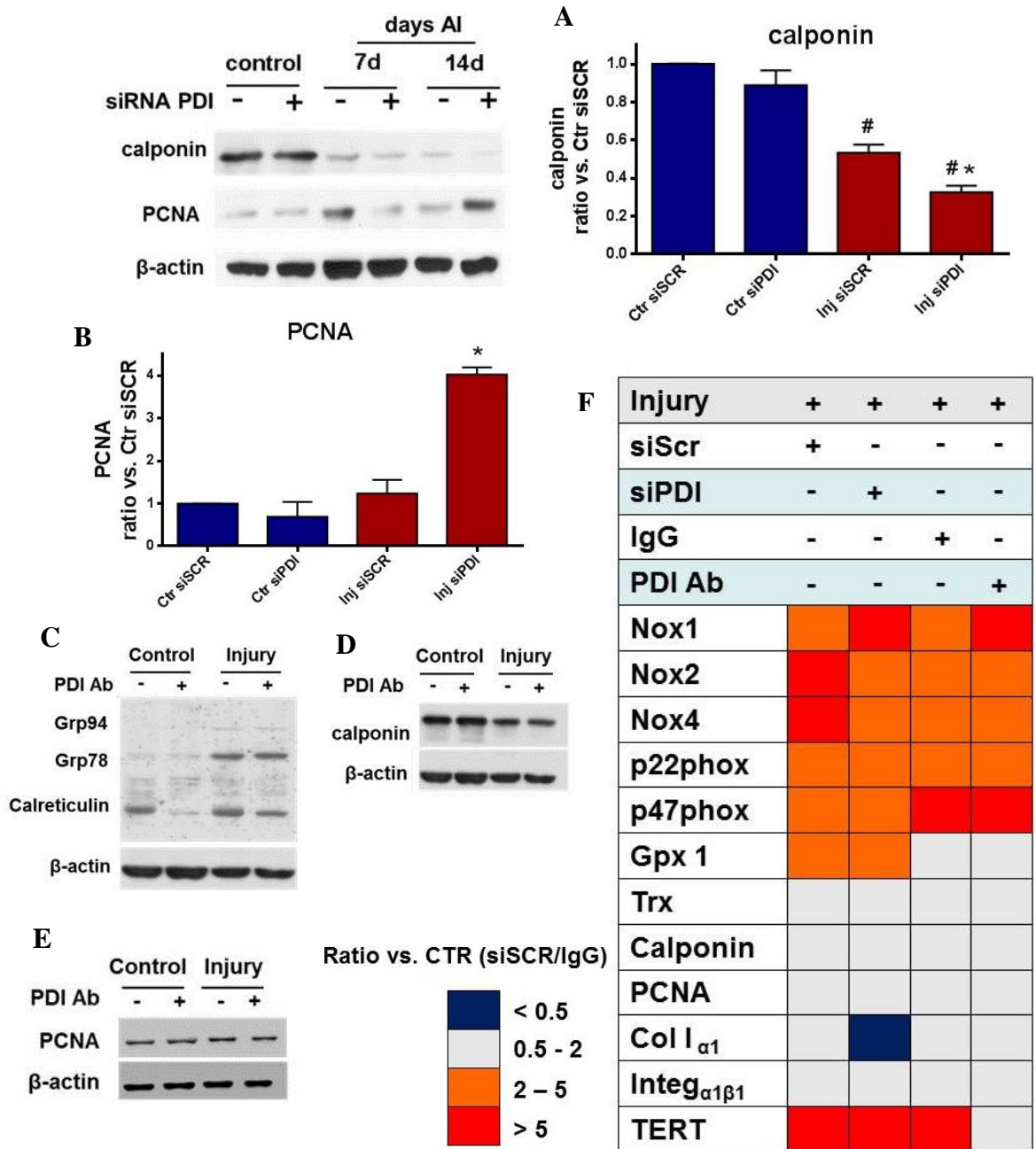


Fig. 7. Inibição pecPDI não mimetiza efeito do silenciamento da PDI. *Painéis A e B:* Silenciamento da PDI em cultura de tecidos como descrito na figura 4. Detecção de calponina (*Painel A*) e PCNA (*Painel B*). Expressão proteica foi corrigida por β-actina e expressa em relação ao Ctr siScr. *p<0.05 vs. Inj siScr; n=3-4. *Painéis C-E:* Artérias controle e 14 dias após lesão foram cultivados por 48 h na presença do anticorpo neutralizante anti-PDI (PDI Ab, 1 μg/ml) ou imunoglobulina controle (IgG, 1 μg/ml). Detecção de chaperonas KDEL (*Painel C*); calponina (*Painel D*) e PCNA (*Painel E*); n=2-3. *Painel F:* Silenciamento da PDI e neutralização da pecPDI em cultura de tecidos como descrito acima. Expressão do mRNA de vários genes envolvidos em diferentes eventos celulares. Escala de cores representando análise comparativa em relação ao Ctr siScr ou Ctr IgG; n≥3, exceto para calponina (n=2).

5.5 Pec PDI contribui para manutenção do calibre vascular após lesão

Para investigar os efeitos da pecPDI in vivo na reparação vascular, nós adaptamos o modelo de lesão vascular realizando, no 12^o dia após lesão, aplicação perivascular de gel plurônico contendo anti-PDI (PDI Ab) ou quantidade equivalente de IgG controle. Esta técnica foi validada pela detecção do PDI Ab em artérias, 48 h após aplicação do gel, por meio de imunofluorescência com anticorpo secundário somente (Fig.8A), ou seja, aproveitando o anticorpo primário aplicado in vivo. Após 48 h, os coelhos foram submetidos à análise angiográfica, seguida por tomografia de coerência óptica (OCT) e análise histológica. Imunoneutralização da pecPDI induziu em média redução de 25% no lúmen vascular detectado por arteriografia (Fig. 8B). Neste modelo, a perda do calibre pode resultar predominantemente de remodelamento constritivo, mas também por proliferação neointimal. Para investigar mecanismos envolvidos na perda do lúmen, foi realizada análise mais detalhada por tomografia de coerência óptica, confirmando a redução no lúmen com PDI Ab (Fig. 8E) e, adicionalmente, demonstrando que este efeito foi influenciado predominantemente por perda na área total da circunferência do vaso (Fig. 8F) ao invés de aumento na razão parede-lúmen (Fig. 8G). A análise histológica confirmou ausência de efeito do PDI Ab no tamanho neointimal (Fig. 8C). Assim, esses achados indicam um novo efeito da pecPDI na prevenção ou antagonismo do remodelamento constritivo. É importante notar que nenhum desses parâmetros foi afetado em artérias controle não lesadas (Anexo B, Fig. Supl. 5).

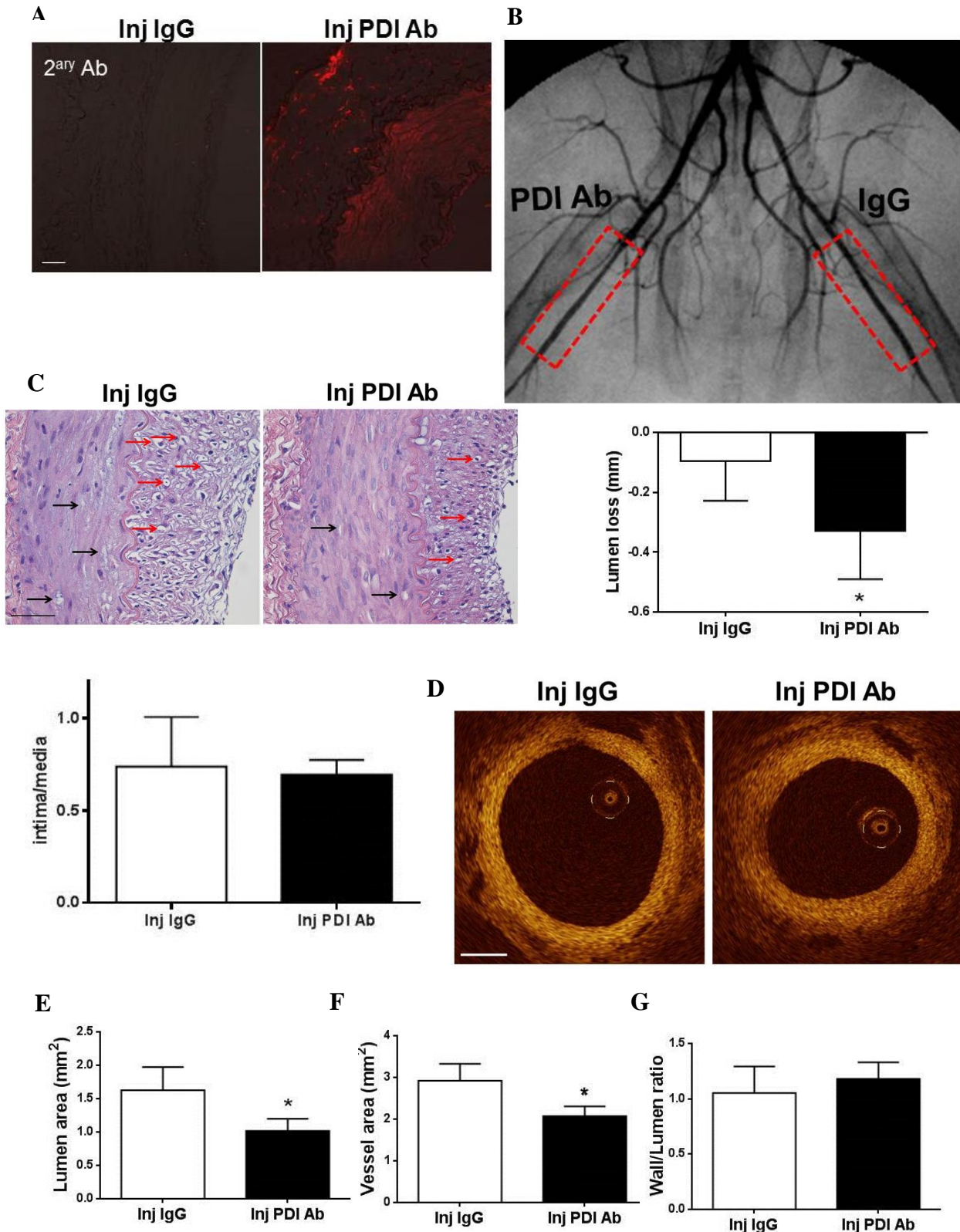


Fig. 8. Neutralização da pecPDI in vivo induz perda do calibre por remodelamento constritivo. Painéis A-F: Aplicação perivascular de gel plurônico contendo anti-PDI (PDIAb, 1 µg/ml) ou imunoglobulina controle (IgG) foram realizadas no 12º dia após lesão e análises após 48 h. Painel A: Imunofluorescência com anticorpo secundário somente (Alexa546nm, vermelho). Contraste de fase demonstrado em cinza. Aumento da imagem:

20x. Barra de escala 20 μm , n=2. *Painel B*: Angiografia representativa de artérias tratadas com PDI Ab (direita) e IgG (esquerda). Caixas em vermelho demonstram regiões tratadas/analizadas. Gráfico abaixo da imagem representa quantificação da perda do lúmen 14 dias após lesão comparada à medida basal antes da lesão por balão. Valores são a média de várias mediadas ao longo da região tratada. * $p < 0.05$ vs. Inj IgG, n=5. *Painel C*: Exemplos representativos de lâminas marcadas com HE e gráfico da relação da camada íntima pela média. Aumento da imagem: 40x. Barra de escala 20 μm , n=5. Setas pretas e vermelhas indicam espaços abertos na camada média e neointima, respectivamente. *Painel D*: Imagem representativa de análise por tomografia de coerência óptica de artérias 14 dias após lesão tratadas com PDI Ab ou IgG. Gráficos abaixo representam quantificação da área do lumen (*Painel E*), área do vaso (*Painel F*) e relação parede lúmen (*Painel G*). * $p < 0.05$ vs. Inj IgG, n=7.

5.6 Perda do calibrer após neutralização da pecPDI correlaciona com alterações na arquitetura da matriz e do citoesqueleto

Para investigar os mecanismos envolvidos na redução do calibre após inibição da pecPDI, analisamos possíveis alterações na matriz e no citoesqueleto de actina. O acúmulo de colágeno foi previamente associado ao remodelamento constrictivo (65). PDI intracelular é requerida para o processamento do colágeno e também constitui a subunidade beta da prolil-4-hidroxilase, enzima que participa no processamento do colágeno (66). Detecção do colágeno realizada pelo método de Picrosirius e analisado por luz polarizada indicou maior densidade de fibras vermelhas, mais densas e birrefringentes, representado principalmente por fibras de colágeno I, na média e neointima de artérias tratadas com PDI Ab, e menor densidade de fibras verdes menos birrefringentes, tipicamente representando colágeno tipo III (67) (Fig. 9A). Estes resultados indicam uma tendência para maior rigidez na matriz extracelular colágena. Posteriormente, investigamos se pecPDI controla a expressão de colágeno. A inibição in vivo com PDI Ab não detectou alterações na expressão de colágeno I e III após inibição da pecPDI (dado não mostrado). Entretanto, a abordagem em cultura de tecidos demonstrou que ambos, colágeno I e III, foram diminuídos após inibição da pecPDI em artérias 14 dias após lesão, enquanto o colágeno tipo I também foi afetado em artérias controle (Fig. 9B-C). Tratamento com PDI purificada aumentou de modo dependente de concentração a quantidade de colágeno tecidual e secretado (dado não mostrado). Análise histológica também apontou alterações com PDI Ab em artérias lesadas tanto in vivo como em cultura, apresentando diversas regiões em que as fibras, normalmente

orientadas de modo circunferencial (i.e., paralelas à disposição da parede vascular), foram alteradas para uma disposição radial (i.e., perpendicular à direção da parede vascular - setas brancas na Fig. 9A). Uma vez que a matriz extracelular influencia e até determina a orientação das células (68), investigamos se o PDI Ab também alterou a organização do citoesqueleto de actina. Importante, a inibição da pecPDI promoveu substancial alteração na arquitetura das fibras de estresse (Fig. 9D) formando blocos de disposição irregular. Tal irregularidade representou aproximadamente 30% de queda no coeficiente de coerência das fibras de actina na camada média, indicando menor índice de alinhamento entre células próximas. A alteração da orientação da actina na região neointimal foi menor, não sendo afetada pelo PDI Ab.

Apesar de a pecPDI prevenir ativação proteolítica da metaloproteinase ADAM17 (34), inibição da pecPDI não afetou a atividade gelatinolítica de metaloproteinases de matriz (dado não mostrado). Além disso, a análise da quantidade relativa e morfologia de fibras elásticas marcadas com Verhoeff, não evidenciou alterações devidas à incubação com PDI Ab (dado não mostrado).

Um dado intrigante à análise histológica foi a ocorrência de “espaços abertos” na média de artérias normais e um aumento 14 dias após lesão (dado não mostrado). Esses espaços parecem corresponder à ausência de uma ou mais células que sofreram processo de apoptose ou “*anoikis*”, apresentando em vários casos fragmentos de célula em seu interior. É interessante que esses espaços abertos são caracterizados por forte expressão da PDI, bem como RhoA (Anexo B, Fig. Sup. 6) em torno de sua margem. Inibição da pecPDI acarreta em diminuição da área relativa desses espaços (Fig. 9E), enquanto seu número absoluto foi inalterado (dado não mostrado). Esses dados indicam que a pecPDI afeta a organização/expressão de matriz de colágeno das fibras de actina durante reparação vascular, podendo estar envolvidas no efeito anti-remodelamento constrictivo causado pela pecPDI.

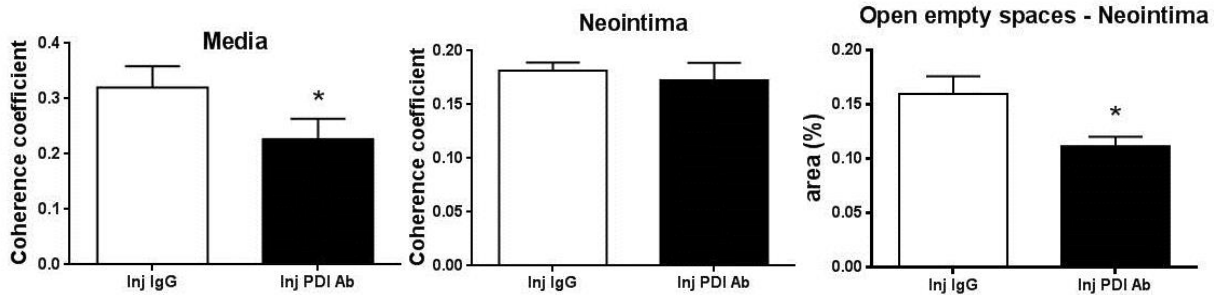
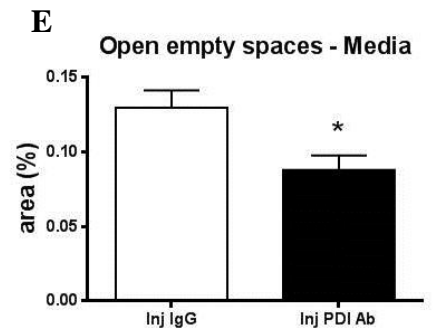
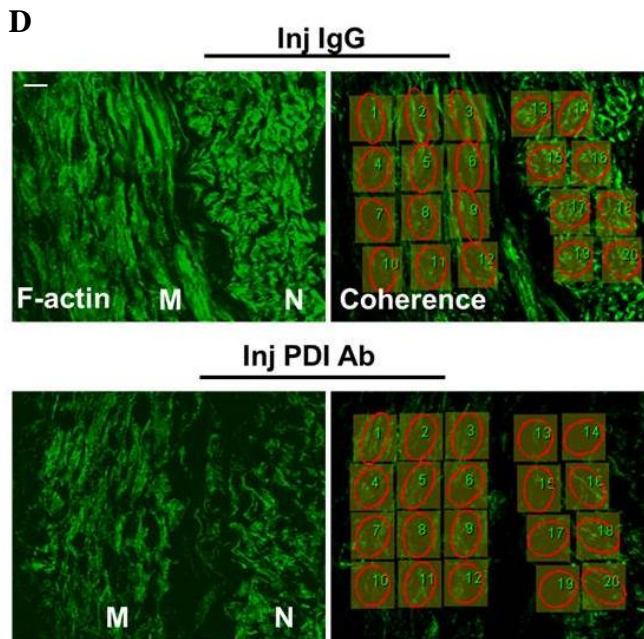
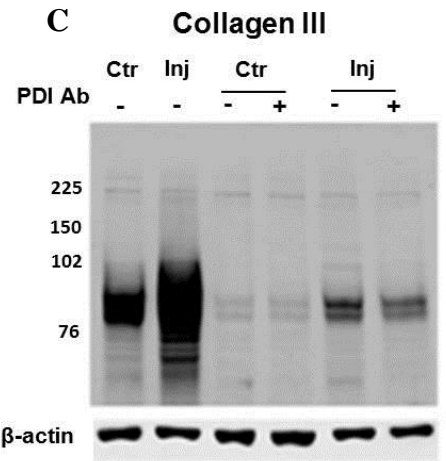
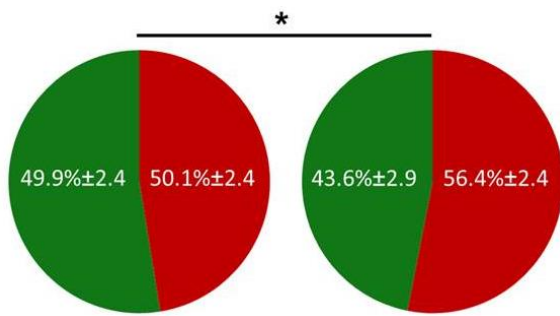
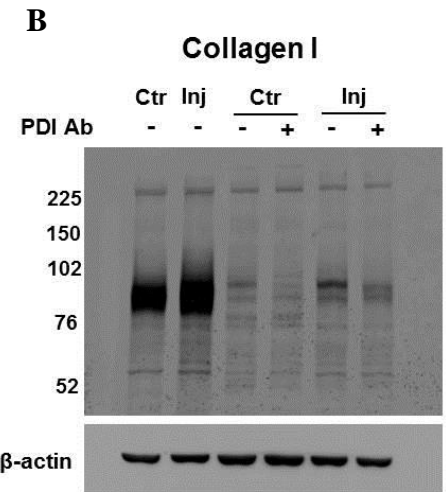
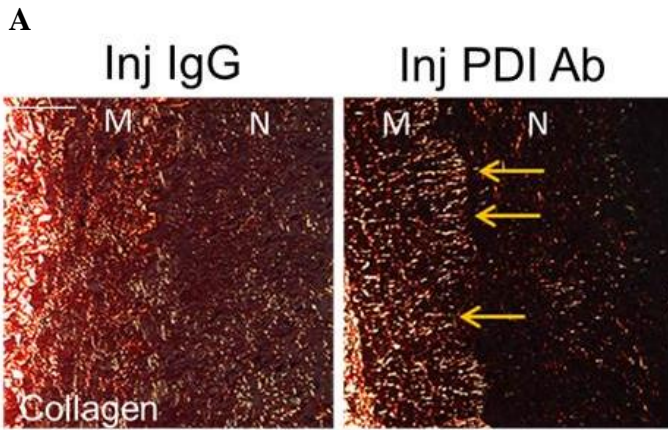


Fig. 9. PecPDI influencia organização da matriz extracelular e arquitetura do citoesqueleto em artérias lesadas. Inibição da pecPDI in vivo em artéria lesadas como descrito na figura 7. *Painel A:* Lâminas marcadas com Picosirius e análise das fibras de colágeno por microscopia acoplado a filtro polarizador de luz, sendo ajustado para medida de fibras de colágeno tipo I (vermelho/laranja) e para fibras do tipo III (verde/amarelo). Gráficos abaixo apresentam quantificação relativa da área do colágeno de cada tipo. Expressão proteica de colágeno tipo I (*Painel B*) e III (*Painel C*) em artérias controle e 14 dias após lesão recém-colhidas (duas primeiras lanes a esquerda) ou cultivadas na presença do PDI Ab ou IgG por 48 h; n= 2-3. *Painel D:* Artérias lesadas com inibição da pecPDI in vivo como em A foram analisadas por detecção fluorescente para F-actina (Alexa-Phalloidin 635nm, quadro a esquerda). Alinhamento das fibras de actina foi quantificado em áreas similarmente divididas em toda camada média e neoíntima (caixas amarelas) e o coeficiente de coerência foi calculado utilizando a ferramenta “orientation-J” do software Image J. As camadas dos vasos foram distinguidas por contraste de fase sendo as lâminas elásticas externa e interna excluídas da quantificação. Gráficos abaixo representam quantificação na média e neoíntima. *p<0.05 vs. Inj IgG, n=3. *Painel E:* Quantificação morfométrica da área dos espaços abertos, normalizada pela área total, na média e íntima de artérias lesadas tratadas in vivo com IgG ou PDI Ab. *p<0.05 vs. Inj IgG, n=5. Imagens representativas na Fig. 8C.

5.7 Neutralização da pecPDI reduz a quantidade de ROS e óxido de nitrogênio em artérias lesadas

PecPDI é conhecida por catalisar reações de transnitrosação (69) na superfície celular e PDI intracelular sustenta produção de ROS induzida por PDGF (7). Assim, investigamos se a inibição da pecPDI afeta a geração de peróxido de hidrogênio em vasos normais ou lesados (ensaiados imediatamente após a remoção). A incubação com PDI Ab foi capaz de prevenir o aumento de peróxido de hidrogênio induzido pela lesão (Fig. 10A). De modo similar, neutralização da pecPDI reduziu a concentração de nitrato em homogenato de artérias lesadas (Fig. 10B). Por meio de “*immunospintrapping*”, demonstramos que a neutralização da pecPDI in vivo diminuiu os sinais fluorescentes associados aos radicais proteicos em artérias controle e lesadas (Fig. 10C). Um dado intrigante foi o efeito da incubação com PDI Ab em promover diminuição de tióis livres na região extracelular (Fig. 10D), em aparente contraposição à redução na produção de peróxido de hidrogênio.

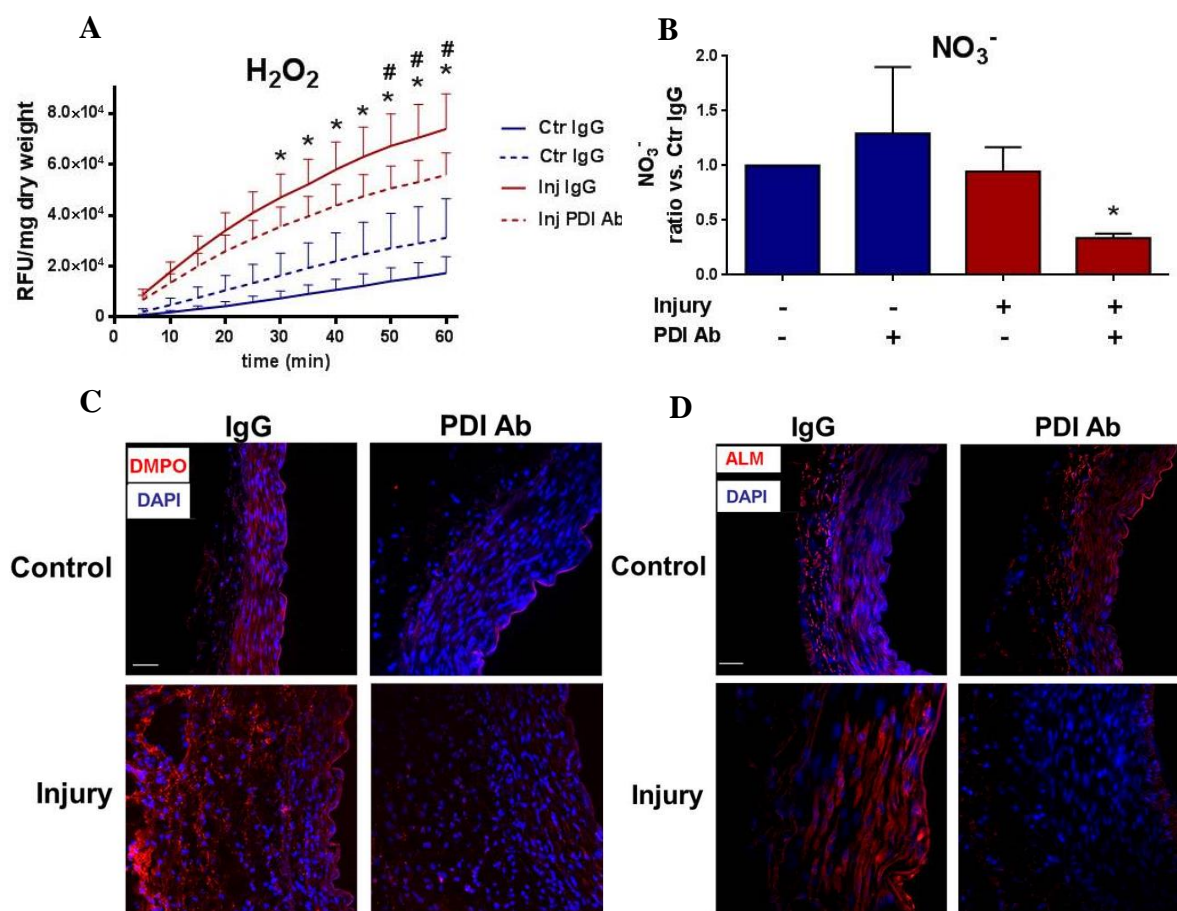


Fig. 10. Inibição da pecPDI afeta produção de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico em artérias lesadas. *Painel A:* Segmentos arteriais recém-colhidos foram imediatamente utilizados para detecção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por Amplex Red na presença do PDI Ab ou IgG, sendo medido por fluorescência durante 60 min. Dados são unidade relativa de fluorescência (RFU) corrigidos pelo peso seco dos anéis; *p<0.05 vs. Ctr IgG; #p<0.05 vs. Ctr PDI Ab. *Painel B:* Concentração de NO₃⁻ (quimioluminescência) em homogenatos vasculares em anéis arteriais cultivados durante 48 h na presença do PDI Ab ou IgG. Nitrato foi normalizado pela concentração de proteína e expressos em relação ao Ctr IgG; n=4. *Painel C-D:* Inibição da pecPDI in vivo em artérias controle e lesadas como descrito na figura 7. *Painel C:* Segmentos arteriais foram incubados em meio de cultura contendo DMPO 40 mM (40 min em sistema de cultura). Imunofluorescência para adutos proteicos reativos ao DMPO foi realizada com anticorpo específico (anti-DMPO), demonstrados em vermelho (anticorpo secundário Alexa546nm) e núcleo em azul (DAPI), n=2. *Painel D:* Anéis arteriais foram lavados e incubados com o reagente de tióis impermeável Alexa-Fluor Maleimido 635nm (ALM, 3 μM por 20 min em 4°C). Segmentos foram emblocados em gel de congelamento, cortados, montados em PBS/glicerol contendo DAPI e analisados por microscopia confocal. ALM é demonstrado em vermelho e núcleo em azul, n=2. Ambos os Painéis C e D, Aumento da imagem: 40x, barra de escala 20 μm.

5.8 Alterações em propriedades viscoelásticas de artérias lesadas após inibição da pecPDI

Para investigar se os efeitos dependentes da pecPDI na arquitetura vascular foram traduzidos em alterações nas propriedades viscoelásticas, analisamos o padrão de resposta de força isométrica à distensão aplicada externamente. Em ambos os casos, foram analisados vasos nos quais a neutralização da pecPDI foi realizada em cultura de órgãos (Fig. 11A) ou em modelo in vivo (Fig. 11B). A inibição da pecPDI em vasos lesados acentuou a perda de tensão após distensão. Em protocolo de tensão progressiva, apesar de não haver alteração na tensão de ruptura vascular (Fig. 11C), neutralização da pecPDI diminuiu a distância na qual os vasos romperam-se ou não puderam mais suportar tensão (Fig. 11D). Estes dados são consistentes com perda da ductilidade (57), ou seja, capacidade de deformação elástica sem quebra, possivelmente em associação com menor sustentação das adesões intercelulares. Em sentido amplo, sugerem o envolvimento da pecPDI em adaptação mecânica.

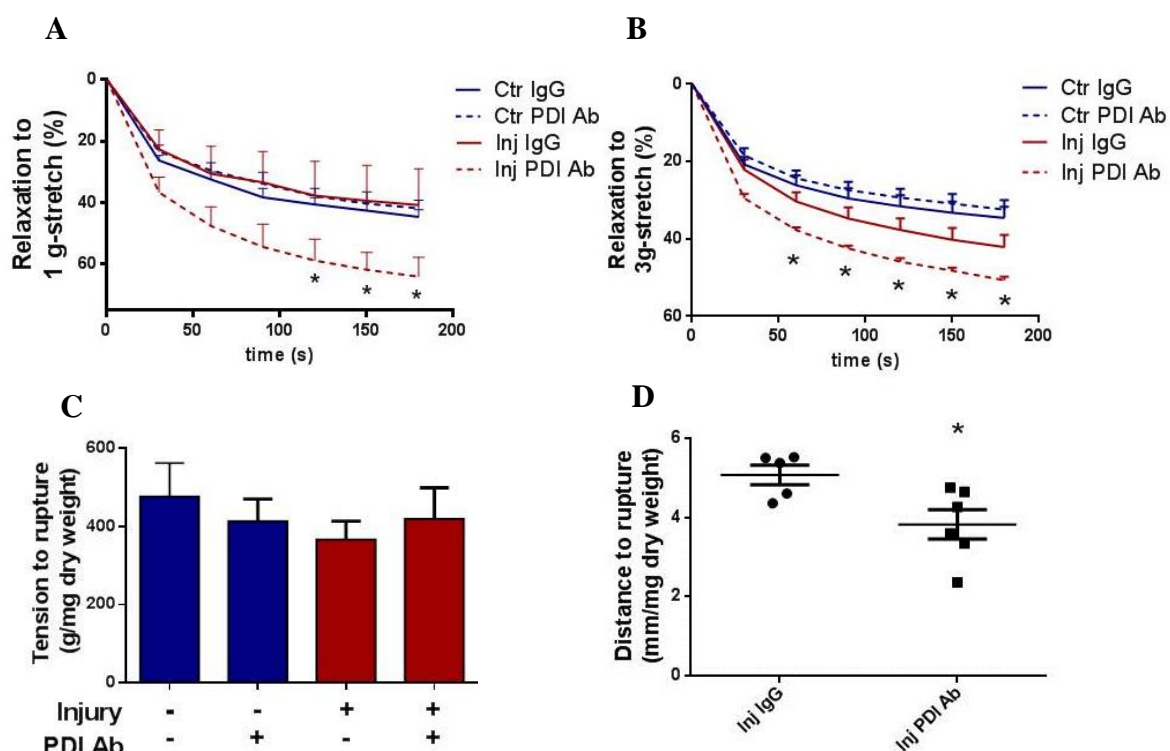


Fig. 11. Inibição da pecPDI afeta propriedades viscoelásticas em vasos lesados. Painel A: Inibição na pecPDI em artérias controle e 14 dias após lesão mantidas em cultura como descrito anteriormente (Fig. 7C). Anéis arteriais foram instalados em sistema de banho órgãos em solução salina contendo papaverina 100 μ M com tensão basal de 0,5 g. Após rápida indução de tensão (1 g) por distensão manual, foi registrada a perda de tensão isométrica durante 180 seg para o cálculo do índice de relaxamento passivo. Painéis B-D: Inibição da pecPDI in vivo como descrito acima (Fig.). *Painel B*: Análise do relaxamento passivo após indução de 3 g de tensão como descrito anteriormente em A. Para os painéis A e B, valores foram expressos como porcentagem de relaxamento passivo à tensão induzida * $p < 0.05$ vs artérias controle (Ctr IgG/PDI Ab), $n = 4-5$. *Painéis C e D*: Artérias lesadas com inibição da pecPDI in vivo foram distendidas até rompimento ou insuficiência de manter tensão e a medida da tensão máxima (*Painel C*) e distância de ruptura (*Painel D*) foram registradas. Valores de distância (mm) e tensão (g) foram corrigidos pelo peso seco dos tecidos. * $p < 0.05$ vs. Inj IgG, $n = 5$.

5.9 Efeito da pecPDI em modelo celular recapitula alterações no citoesqueleto observadas em artérias lesadas

Tanto modelo in vivo como em cultura de tecidos são intrinsecamente limitados para exploração de mecanismos mais aprofundados. Portanto, investigamos se a pecPDI afeta modelos celulares que recapitulam alguns aspectos observados em artérias em processo de reparação à lesão, principalmente envolvendo o citoesqueleto e adaptação mecânica. Para avaliar o envolvimento da pecPDI em mecanoresposta, nós submetemos VSMCs primárias cultivadas da aorta de coelho ao estresse de estiramento cíclico biaxial (12% durante 24 h), que promoveu aumento na formação de fibras de estresse, como já relatado (70). Tal efeito foi fortemente prevenido pela

incubação com PDI Ab em células estiradas, enquanto que em células estáticas existiu um discreto aumento no espalhamento celular, porém sem outras alterações (Fig. 12A). Posteriormente, nós investigamos o efeito da pecPDI no meio condicionado (MC) coletados de células submetidas ao estiramento (MC/estiramento) ou estáticas (MC/estático) como utilizado em outros estudos (71, 72). A incubação de células estáticas com MC/estiramento, mas não MC/estático, promoveu a formação de fibras de estresse e aumentou os pontos de adesão focal marcados com vinculina (Fig. 12B), efeito não observado em MC/estiramento de células tratadas com PDI Ab. Esse efeito inibitório dependeu da presença do PDI Ab, uma vez que a precipitação do PDI Ab restaurou a efeito do MC/stretch na formação de fibras de estresse (Fig. 12B). A coordenação da formação de adesões combinada à indução das fibras de estresse e tensão (ou relaxamento) são processos dinamicamente orquestrados durante a migração celular. A fim de analisar tais processos, investigamos se pecPDI afeta o padrão de migração induzido por PDGF em células expostas ao PDGF em sistema de análise de migração randômica em célula única (single-cell). Primeiramente, avaliando o efeito do siRNA da PDI, nós não somente confirmamos, mas estendemos resultados prévios em outros dois modelos de migração (7), demonstrando completa inibição da migração polarizada induzida por PDGF (Fig Sup. 7A). Em experimento análogo, observamos que o padrão de velocidade e distancia total não foram alterados pelo PDI Ab (dado não mostrado). Enquanto a média da persistência de migração foi marginalmente reduzida pelo PDI Ab (Fig. 12D), a variabilidade na persistência foi significativamente alterada, como evidenciado pela análise com transformação de Fourier, sugerindo perda na resiliência da coordenação do citoesqueleto celular (Fig. 12C). Esses dados reforçam o efeito subcelular da pecPDI em mecanoadaptação e sugerem um efeito geral na regulação de processos dinâmicos envolvendo o citoesqueleto celular.

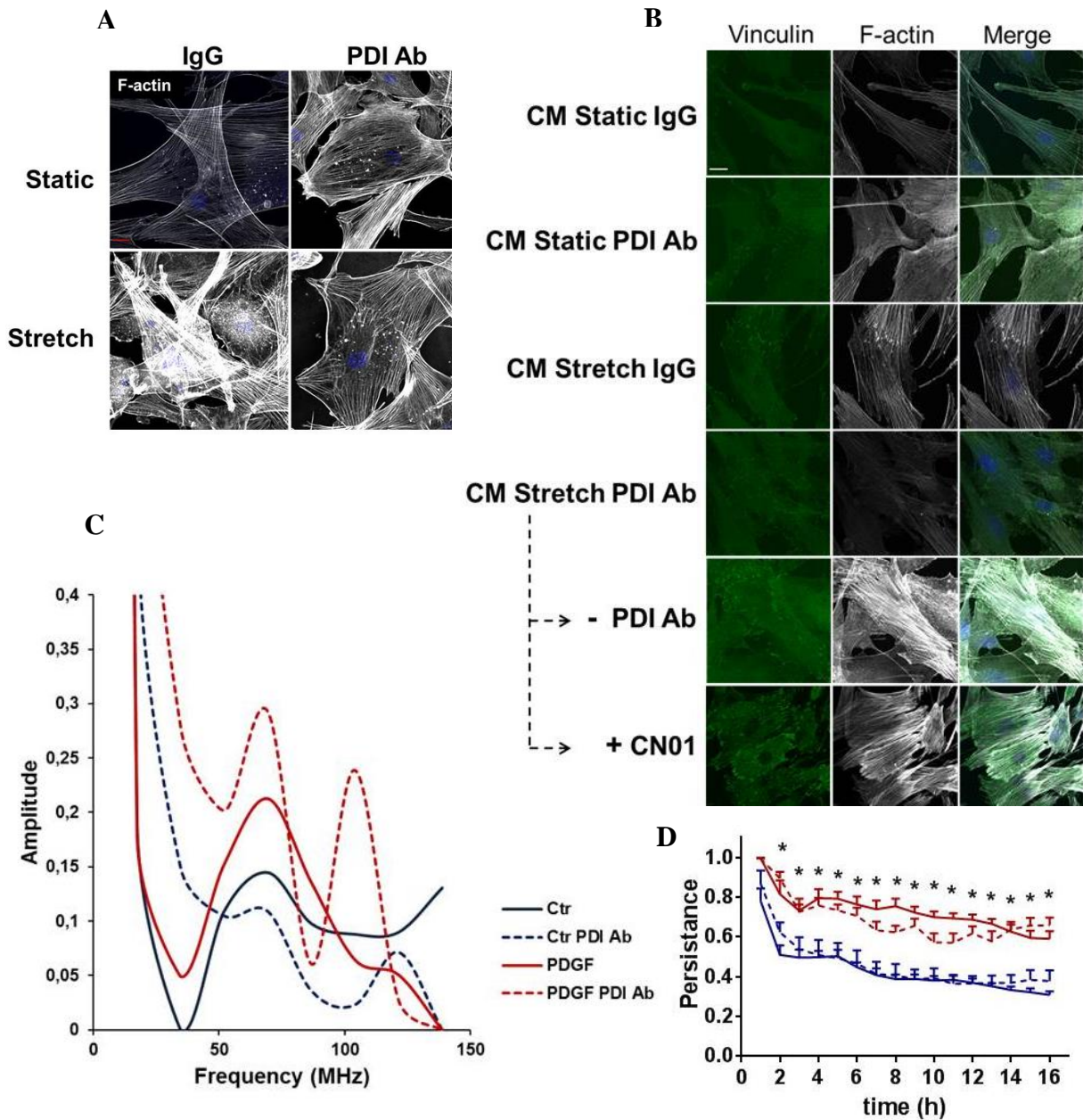


Fig. 12. PecPDI sustenta organização do citoesqueleto durante mecanoresposta em células expostas ao estiramento cíclico e ajustes direcionais finos em células em migração estimuladas por PDGF. *Painel A:* Células musculares lisas vasculares (VSMCs) primária da aorta de coelho foram mantidas em condição estática (*Static*) ou submetidas por 24 h ao estiramento cíclico biaxial (*Stretch*, 12%, 1 Hz) na presença de IgG controle ou PDI Ab (ambos 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, incubados 1 h antes do início de estiramento). Imediatamente após, células foram fixadas em paraformaldeído para análise dos filamentos de actina (F-actin, Alexa-Phalloidin 635nm, branco). Núcleos foram marcados com DAPI (azul). *Painel B:* Meio condicionado (CM) de células submetidas a condição estática (CM Static) ou de estiramento (CM Stretch) na presença de IgG controle ou PDI Ab como em A foram coletadas, centrifugadas (2000 rpm por 10 min em 4°C) e incubadas VSMCs estáticas. Marcação das adesões focais por vinculina (esquerda, Alexa488nm, verde), fibras de actina (centro, Alexa635nm, branco) foram registradas. Núcleos foram marcados com DAPI (azul) e múltiplas marcações são apresentadas nos quadros à direita; n=3. Magnificação da imagem: 126x, barra de escala 20 μm . *Painéis C e D:* Migração randômica de células únicas de VSMCs de rato mantidas em condições fisiológicas (37°C, CO₂ 5% por 16h) sendo avaliada em condição basal (Ctr) e estimuladas por PDGF 25 ng/ml. *Painel C:* Gráfico da

transformação de Fourier da análise da persistência de migração demonstrada em *D*. * $p < 0.05$ PDGF IgG/PDI Ab vs. Ctr IgG/PDI Ab $n \geq 7$. Trajetórias representativas das células são apresentadas nos dados suplementares.

5.10 PecPDI sustenta distribuição localizada de RhoA

Devido ao marcante efeito da PDI na ativação de RhoGTPases (7) e da PDI ou pecPDI sobre organização do citoesqueleto, investigamos se RhoA está envolvida nos efeitos mediados pela pecPDI em mecanoadaptação, uma vez que RhoA é um regulador crucial em mecanobiologia (47). Inicialmente, observamos que o ativador de RhoA CN01 (30 min) é capaz de restaurar a formação de fibras de estresse e adesões focais prevenidas pelo PDI Ab, sugerindo que a ação de RhoA no citoesqueleto é distal à PDI. A expressão de RhoA não foi diferentemente afetada pela neutralização da pecPDI em células isoladas e artérias lesadas (Figs. 13A/B). Como atividade da RhoA é difícil analisar em tecidos devido à grande sensibilidade ao tempo de processamento da amostra, avaliamos a atividade de RhoA em células isoladas, e observamos somente uma pequena redução pelo PDI Ab em células estáticas e nenhum efeito após estiramento (Fig. 13C). Em contraste, a fosforilação de Fak na tirosina 397, um conhecido alvo de RhoA/ROCK (73), foi prevenida pela inibição da pecPDI em células estiradas e artérias lesadas (Fig. 13D/E), possivelmente refletindo alteração focal e não global na sinalização de RhoA. Assim, formulamos a hipótese de que a pecPDI poderia afetar a distribuição subcelular de RhoA durante a mecanoresposta. Em cardiomiócitos submetidos ao estiramento, a ativação inicial de RhoA ocorre sabidamente em domínios lipídicos específicos como cavéolas/*lipid rafts* (74). De fato, em nosso estudo, a neutralização da pecPDI em células estáticas promoveu redistribuição subcellular de RhoA na superfície celular e colocalização com blocos contendo caveolina-3. O estiramento também favoreceu colocalização de RhoA e pecPDI na superfície celular. Entretanto, após inibição da pecPDI durante estiramento, o padrão foi alterado, com distribuição dos em blocos contendo caveolina-3/RhoA de forma centrípeta e não na periferia da célula (Fig. 13F). De modo similar, o ativador de RhoA CN01 também aumentou a colocalização de RhoA em domínios ricos em caveolina-3 em localizações subcelulares periféricas (Anexo B, Fig. Supl 8). Um efeito oposto foi observado com inibidor de RhoA (1 h). Resultados semelhantes foram observados para caveolina-1,

porém as marcações foram um pouco menos evidentes, possivelmente devido a aspectos relacionados ao anticorpo (dados não mostrados). Assim, pecPDI afeta a localização de RhoA, modulando o padrão de distribuição subcelular em regiões periféricas ricas em caveolina durante adaptação mecânica.

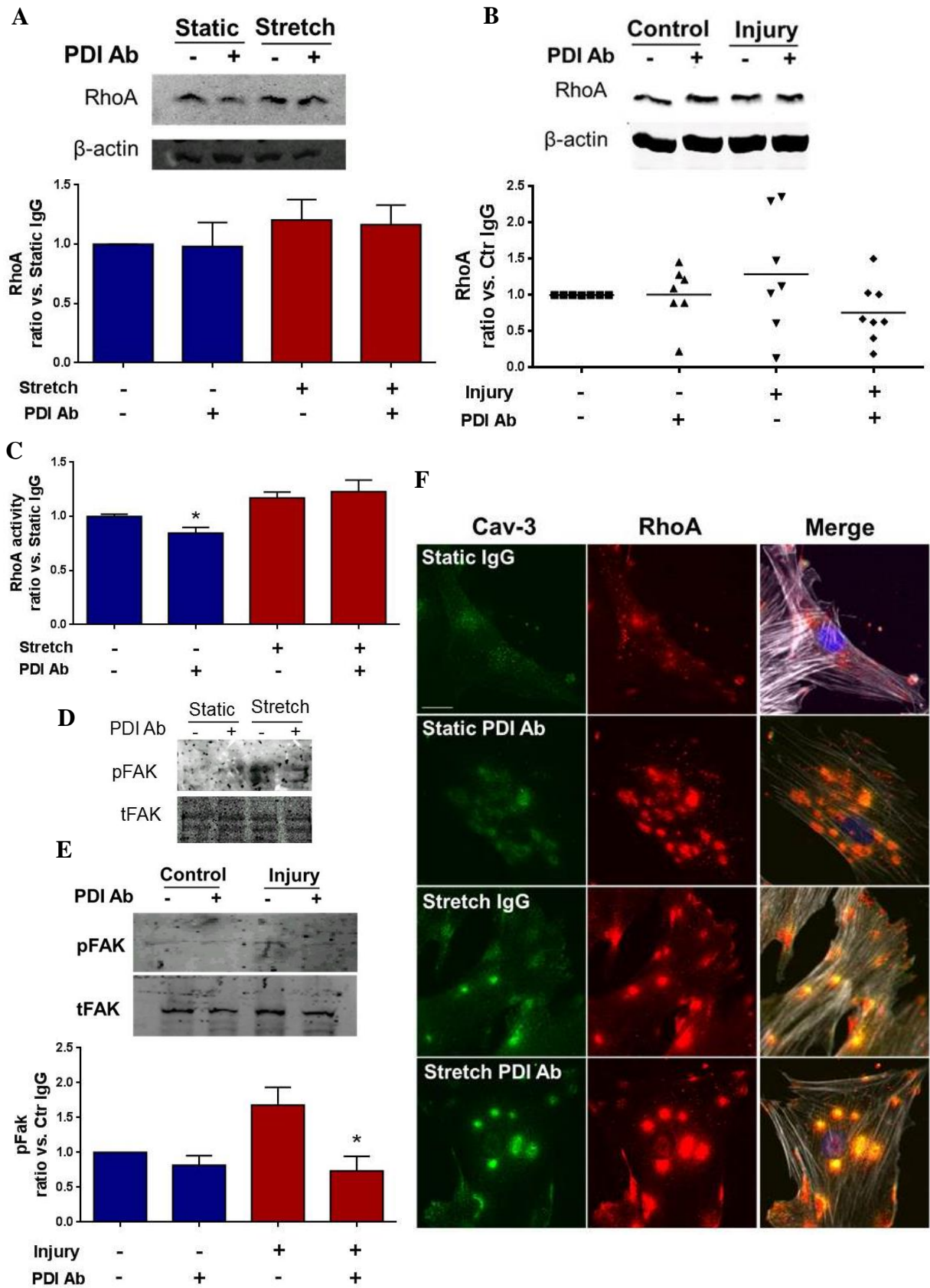


Fig. 13. PecPDI sustenta ativação localizada de RhoA. *Painel A:* VSMCs primária da aorta de coelho mantidas em condição estática ou submetidas ao estiramento expostas à IgG controle ou PDI Ab como na Fig. 6A. Análise da expressão proteica de RhoA. *Painel B:* Expressão de RhoA em anéis arteriais cultivados durante 48 h na presença de IgG controle

ou PDI Ab. Gráficos correspondentes aos *Painéis A e B* são demonstrados abaixo das imagens representativas representando a quantificação de RhoA normalizado por β -actina e expressos em relação ao Ctr/static IgG; n=3 para VSMCs e n=8 para cultura de tecidos. *Painel C*: Atividade de RhoA GTPase medida em VSMCs como em A. * $p < 0.05$ vs. Static IgG, n=4. *Painéis D e E*: Expressão proteica total (tFak) e porção fosforilada de Fak (pFak) na tirosina 397 em VSMCs e cultura de tecidos como em A e B, respectivamente, n=3. Gráfico representa quantificação de pFak em cultura de tecidos normalizada por β -actina e expressos em relação ao Ctr IgG. * $p < 0.05$ Inj IgG. *Painel F*: Imunofluorescência de células não permeabilizadas para caveolina-3 (cav-3, quadros à esquerda, Alexa488nm, verde) e RhoA (quadros centrais, Alexa546nm, vermelho) em VSMCs estáticas e estiradas como em A. Filamentos de actina foram marcados com Faloidina (Alexa-Phalloidin635nm, branco), núcleos com DAPI (azul) e múltiplas marcações são demonstradas nos quadros à direita; n=3. Aumento da imagem: 126x, barra de escala 20 μ m.

5.11 Expressão da PDI é inversamente relacionada ao remodelamento constritivo em placas coronarianas humanas

Uma vez que reparação à lesão envolve aspectos comuns a outras doenças vasculares, possivelmente pecPDI poderia influenciar o a fisiopatologia de outras doenças vasculares, particularmente, aterosclerose (9). Para analisar se PDI está associada com remodelamento vascular em placas de ateroma, investigamos por imunohistoquímica a expressão da PDI em artérias coronarianas de pacientes que morreram de infarto agudo do miocárdio. Como essas amostras foram fixadas em formalina e emblocados em parafina, não foi possível analisar especificamente a marcação da pecPDI. Entretanto, é possível obter inferências relevantes, uma vez que a expressão da pecPDI correlaciona-se à da PDI total (Fig. 4A), pelo menos em nosso modelo. A expressão da PDI na média e íntima de placas apresentando remodelamento negativo/constrictivo foi diminuída (Fig. 14A) e, ao contrário, aumentada na média de artérias com remodelamento positivo/expansivo, enquanto na íntima não houve diferença estatisticamente significativa (Fig. 14B). É conhecido que o grau de remodelamento correlaciona-se com o fenótipo instável da placa de ateroma (75). Assim, investigamos se a expressão da PDI também está associada com a instabilidade da placa (Fig. 14C). De fato, placas com fenótipo vulnerável apresentam marcante aumento da PDI na região intimal. Na camada média, por outro lado, tanto placas estáveis como instáveis apresentaram menor quantidade de PDI (Fig. 14C).

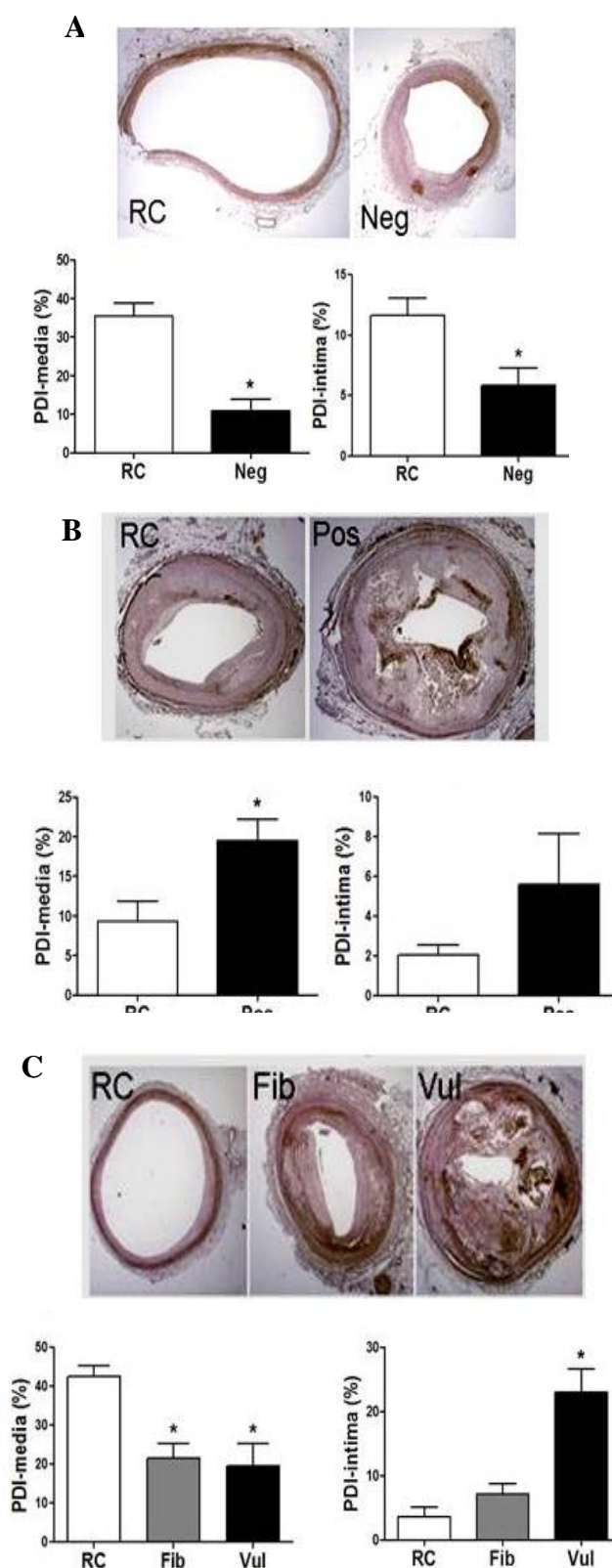


Fig. 14. Expressão da PDI na média de artérias humanas com placas de atheroma é inversamente correlacionada com remodelamento constritivo e instabilidade da placa. Detecção por imunohistoquímica da PDI e em artéria coronária descendente anterior esquerda ou circunflexa, sendo os segmentos proximais assumidos como controle de referência (RC) e regiões distais apresentando remodelamento constritivo/negativo (Neg, *Painel A*), remodelamento expansivo/positivo (Pos, *Painel B*) e com placas de aterosclerose com fenótipo estável/fibroso (Fib) ou instável/vulnerável (Vul) ambos no *Painel C*.

Quantificações da PDI foram corrigidas pela área da camada analisada (média ou íntima) e são expressas como porcentagem da área. * $p < 0.05$ vs. RC; $n = 20$.

6. Discussão

O presente estudo demonstra que PDI é fortemente superexpressa durante reparação vascular à lesão e que a porção peri/epicelular (pecPDI) coordena a arquitetura da matriz extracelular e do citoesqueleto de actina de forma a preservar o lúmen vascular e antagonizar remodelamento construtivo. PecPDI não simplesmente espelha a porção intracelular, que age na proteção contra estresse do RE, enquanto estresse do RE, por sua vez, aumenta a pecPDI. O remodelamento construtivo após neutralização da pecPDI está associado à diminuição da quantidade de ROS e derivados do NO e com profunda desorganização das fibras de estresse e colágeno, que resultam em menor ductilidade vascular. Efeitos da pecPDI no citoesqueleto são recapitulados em modelo *in vitro*, que evidencia uma distribuição subcelular alterada de RhoA e sua localização anormal em compartimentos contendo caveolina. Além disso, expressão da PDI na média correlaciona-se inversamente com remodelamento construtivo em placas de aterosclerose humana.

O marcante aumento da expressão da PDI durante reparação vascular é notório e não usual, ocorrendo tanto na região intracelular como peri/epicelular. Essencialmente, todas as células na parede vascular superexpressam PDI, incluindo VSMCs e fibroblastos na adventícia, embora a expressão seja mais evidente em células neointimais e neoendoteliais (Fig 1C). Esse padrão generalizado e coordenado de expressão em distintos tipos celulares é indicativo de um processo fundamental de reparação tecidual. Os mecanismos que coordenam esta resposta requerem ainda mais investigações. O aumento na expressão da PDI ocorre em diversas doenças, incluindo aterosclerose (revisado em ref. 13). Nossos resultados em vasos intactos, bem como outros estudos do laboratório (6, 7), indicam que em células não estimuladas PDI pode ser silenciada de forma significativa sem induzir UPR (revisado em ref. 8). Assim, o aumento observado do estresse do RE após siRNA durante reparação vascular, que foi associado à aumentada morte celular, indica, em sintonia com estudos prévios (13), que a PDI intracelular exerce papel importante na proteção contra a indução sustentada ou excessiva da UPR. De fato, a PDI é geralmente relatada como proteína pró-sobrevivência celular (76), embora em casos particulares possa induzir apoptose (29).

O aumento do *pool* da pecPDI após siRNA em artérias 14 dias após lesão indica que a PDI intracelular e a pecPDI diferem não somente na localização, mas também na meia-vida e outras funções. De fato, em relação à convergência da PDI com sinalização dependente de Nox, o silenciamento com siRNA, mas não a incubação com PDI Ab neutralizante, previne a ativação da oxidase induzida por angiotensina II (6) e dados não publicados), migração ativada por PDGF (7) (e presente estudo) e ativação de ERK induzida por TNF α (77). A pecPDI, por sua vez, apresenta funções específicas conhecidas, tais como ativação do sistema imune (32, 78), invasão de patógenos (78) e trombose (35). Os distintos efeitos da PDI intracelular e da pecPDI foram ainda evidentes no padrão de ativação de estresse do RE, morte celular e expressão gênica (Figs. 6 e 7). Apesar de efeitos diretos do silenciamento da PDI serem difíceis de separar dos efeitos advindos da indução paralela de estresse do RE, os resultados sugerem, de modo geral, que aos 14 dias após lesão, a PDI sustenta diferenciação e expressão da Nox4 e o silenciamento com siRNA induz fenótipo proliferativo (Fig. 7B). Em cultura de VSMCs, PDI é claramente requerida para ativação de Nox dependente de fator de crescimento (7), indicando que o efeito da PDI depende do contexto avaliado e não está vinculado a uma isoforma específica de Nox ou a eventos de proliferação e migração. De fato, em vasos coletados 7 dias após lesão, fase em que predomina proliferação celular (52), o silenciamento da PDI promove redução na proliferação, em sintonia com observações em cultura de células (dado não publicado). Ao contrário do silenciamento da PDI, inibição da pecPDI não altera marcadores de estresse do RE, proliferação/diferenciação e previne completamente a indução do mRNA da TERT, uma enzima que protege contra senescência celular. A senescência associada à reparação vascular foi reportada previamente (31), embora com papel ainda não esclarecido.

As rotas subcelulares de externalização da PDI são desconhecidas até o momento (13). Entretanto, está claro - na literatura (43, 44) e em observações não publicadas do nosso laboratório - que a externalização da PDI e secreção em distintos tipos celulares, incluindo endoteliais e VSMC, podem ocorrer na ausência de morte celular e não simplesmente representam vazamento de proteínas oriundas de células

mortas. Isso também é sugerido pela ausência de detectável secreção de PDI em vasos lesados, apesar da sua robusta indução na região peri/epicelular. O vazamento de PDI proveniente de células mortas poderia, por outro lado, explicar o aumento da pecPDI na lesão vascular já que foi evidenciada maior secreção de PDI e morte celular induzida por siRNA em artérias lesadas (Fig. 6 F e D, respectivamente). Assim, mecanismos de externalização da pecPDI envolvem vias subcelulares convencionais e não-convencionais de secreção ainda não esclarecidas e em casos específicos, extravazamento a partir de células mortas (13, 14).

Processos relevantes à patogênese de doenças vasculares associados à pecPDI incluem trombose e inflamação (35, 79). A indução de pecPDI endotelial é um sinal precoce de resposta à lesão (39), favorecendo, via sinalização por integrinas, acúmulo de plaquetas e formação de fibrina (36), embora seu efeito na decriptação do fator tecidual seja ainda debatido (80). PecPDI endotelial também regula recrutamento de neutrófilos mediado por integrinas (41, 79). Ainda, a pecPDI plaquetária participa na adesão mediada por integrinas (63) e silenciamento genético específico *in vivo* antagoniza a formação de trombose sem evidente alteração na homeostasia (40). PecPDI presente em leucócitos também regula processo de adesão (79), enquanto em linfócitos pecPDI sustenta a migração mediada por integrinas (32). Em nosso modelo, o acúmulo de leucócitos e plaquetas não é mais evidente no 14º dia após lesão (3). Assim, a pecPDI pode exercer funções específicas dependendo do estágio da reparação vascular.

Mecanismos estruturais dos efeitos da pecPDI estão relacionados ao remodelamento da matriz e a alterações no citoesqueleto. Vasoespasmo tônico, que contribui para o estreitamento do lúmen vascular durante fases iniciais do reparo (81), não está associado aos nossos resultados, já que as análises foram feitas após tratamento com nitroglicerina. Embora o curto período de observação (48 h) seja uma limitação do estudo, impossibilitando observações mais tardias do acúmulo de matriz, o efeito pronunciado sobre a matriz de colágeno e o citoesqueleto em curtos tempos de exposição ao PDI Ab sugere a influência de um efeito tônico da pecPDI durante reparação vascular. Neutralização da pecPDI em vasos promoveu alteração

para um estado mais rígido da matriz e uma visível alteração na disposição das fibras (Fig. 9A) . Diminuição da expressão do mRNA do colágeno tipo I com silenciamento da PDI e redução da expressão proteica dos colágenos tipos I e III em artérias lesadas sob inibição da pecPDI em cultura (Figs. 7F, 9B e C, respectivamente) podem estar atribuídas a alterações no processamento subcelular ou aumento da degradação. Neutralização da pecPDI promoveu capacidade reduzida de sustentar tensão induzida por estiramento, bem como menor resistência para rompimento estrutural, indicando diminuição na ductilidade da parede vascular. Estes resultados corroboram aos observados em modelo de perda de função de MMP13, em que o acúmulo de colágeno foi associado a artérias menos resistentes (57). Coletivamente, esses dados sugerem que pecPDI participa na formação da matriz em um modo relativamente complacente, sendo capaz de suportar tensão, porém ao mesmo tempo associada a maior resistência a colapso. Paralelamente, pecPDI parece sustentar organização do citoesqueleto (Fig. 9D) de modo a promover uma rede de integração otimizada. Esse efeito foi evidente pela incubação do PDI Ab na distribuição/organização de fibras de estresse e/ou quantidade, tanto em modelo de lesão vascular *in vivo* como em células isoladas. Além disso, PDI Ab promoveu menor resiliência no padrão de migração induzido por PDGF (Fig. 12C). Dessa forma, esses dados sugerem que pecPDI regula dinâmica da matriz e citoesqueleto, sustentando uma reformulação orquestrada da arquitetura vascular em uma estrutura expandida (i.e., com lúmen aberto), ao invés de uma cicatriz colapsada comum a outros tipos de reparo tecidual. Embora uma possibilidade importante, ainda não se sabe se mecanismos similares podem ser aplicados a outros tecidos.

Determinantes mecanobiológicos da reparação da arquitetura vascular são complexos, em analogia ao papel desempenhado por forças mecânicas no desenvolvimento (82). Nenhum modelo simples é capaz de integrar forma e tamanho da célula, tensão intrínseca de membrana, força, complacência e organização da matriz com elementos de tensão e rigidez do citoesqueleto e estruturas de adesão (descritas sob o âmbito do modelo de tensegridade (83)). Mudanças nas fibras de colágeno e orientação das fibras do citoesqueleto foram evidentes após incubação com PDI Ab *in vivo*, sugerindo perda significativa em mecanismos sensores e/ou

coordenadores da distribuição do estresse na parede vascular. De fato, as fibras de estresse realinham em direção ao eixo perpendicular na direção do estiramento por meio do deslocamento de adesões focais mediado por RhoA (84). De acordo com modelo de tensegridade, pecPDI poderia ser entendida como um sensor tensegral sustentando um remodelamento biomecânico otimizado, respeitando o princípio de minimização de energia em tensões de adesão (85).

Processos redox são possíveis reguladores dos efeitos da pecPDI, em sintonia com o papel da PDI em sinalização redox e homeostase (13) bem como o efeito anti-remodelamento construtivo da SOD3 durante eventos tardios na reparação vascular (4). PecPDI reconhecidamente catalisa transnitrosação e promove internalização de nitrosotíóis do meio extracelular (69, 86). De fato, a expressão relativamente maior da pecPDI em plaquetas vs. células vasculares pode contribuir para inibição seletiva da agregação plaquetária por S-nitrosotíóis (87). A neutralização da pecPDI, reduzindo a quantidade de óxidos de nitrogênio em artérias lesadas (Fig. 10B), não somente corrobora esse mecanismo, mas também está de acordo com o conhecido papel da eNOS no remodelamento vascular fisiológico (88) e do NO derivado da iNOS durante remodelamento após lesão (4). Inibição da pecPDI também reduz a produção de ROS e, em paralelo, detecção de tíóis livres no meio extracelular em artérias lesadas. Estes efeitos são aparentemente paradoxais e indicam que geração de ROS e atividade tiol redutase da PDI ocorrem em compartimentos e tempos distintos. Esse panorama não é fundamentalmente distinto daquele observado no lúmen do RE, embora neste caso a PDI apresente predominantemente atividade isomerase, enquanto na região peri/epicelular predomina atividade redutase (32, 33, 78), apesar da atividade isomerase da pecPDI afetar atividade proteolítica de ADAM17 (34). Pode-se especular que a superfície celular recapitula, em vários aspectos, o mesmo ambiente favorável ao envelhecimento proteico observado no RE. Embora ainda não se saiba a respeito das fontes de ROS na superfície, as Noxes são potenciais candidatos (ver discussão suplementar, Anexo C).

Recentemente, nosso grupo mostrou que a PDI é essencialmente requerida para sustentar migração induzida por PDGF, ativação de Nox1, ativação de RhoGTPases e organização do citoesqueleto (7). Aqui, demonstramos que este efeito

é atribuído à PDI intracelular, já que o silenciamento da PDI, mas não o PDI Ab, inibiu fortemente a migração de VSMC (Fig. Sup 7A e B). RhoA é um importante regulador em mecanobiologia (47, 89) e, na presente investigação obtivemos evidências que indiretamente implicam a participação de RhoA nos efeitos da pecPDI no citoesqueleto e arquitetura vascular (Fig. 9). De fato, formação do citoesqueleto de actina, adesões focais, fosforilação de Fak e polarização celular durante migração – todos estes eventos característicos da reparação vascular - são conhecidamente associados à RhoA (47, 89). RhoA sinergiza com estiramento mecânico para indução de fibras de actina, bem como sua organização (47) e orientação (84). Apesar de a pecPDI não alterar a expressão de RhoA em células e tecidos, nem atividade global em células após estiramento, pecPDI governa a distribuição de RhoA e associação com compartimentos como estruturas contendo caveolina (Fig. 13F), que provavelmente representam conjuntos de cavéolas ou lipid rafts. A translocação para cavéola passa por duas fases: recrutamento e retenção. O estiramento induz rápida ativação de RhoA, efeito que é dependente da sua localização inicial na cavéola (74). Modulação redox é uma possível forma de regulação pela pecPDI na sinalização de RhoA, uma vez que RhoA, dentre outras GTPases, sofre reversível modificação da formação de ponte dissulfeto nas cisteínas 16 e 20, escondendo o acesso do sítio de ligação à GTP (48).

O papel da pecPDI na arquitetura vascular, descrito no presente estudo, pode ser importante para o entendimento dos mecanismos que controlam remodelamento vascular não somente durante reestenose após lesão, mas também em outras doenças como aterosclerose. Tal efeito é consistente com os achados da maior expressão da PDI em artérias com placas de aterosclerose apresentando remodelamento vascular positivo, juntamente com sua menor detecção em artérias com remodelamento negativo. Os mecanismos de reparação à lesão não podem ser diretamente extrapolados à aterosclerose nativa, porém o processo inflamatório envolvido provê um cenário de eventos ligados à célula e matriz que são análogos aos observados no processo de reparo (90). Um dado importante foi o marcante aumento na expressão da PDI na região intimal em placas instáveis, comparada a placas estáveis (Fig. 14C). Devido ao importante papel da pecPDI na trombose (35), estas descobertas indicam

que a pecPDI é um possível alvo terapêutico em placas vulneráveis. Entretanto, nossos resultados indicam que a inibição da pecPDI acarreta um potencial remodelamento constrictivo, um fato que deve ser considerado no desenho de eventuais estudos clínicos envolvendo PDI. Nesse sentido, o presente estudo sugere importância da inibição específica da pecPDI, ao contrário da inibição total da PDI, já que esta última foi associada a piora do quadro de estresse do RE e apoptose (Fig. 6A-D) em artérias em reparação à lesão, o que poderia agravar a instabilização da placa. Esse mecanismo está de acordo com evidências de que a inativação da PDI por aldeídos eletrofílicos é aumentada por exposição à LDL oxidada e está presente em placas de ateroma com fenótipo vulnerável (9). A dualidade entre pecPDI, trombose e remodelamento não é inesperada, dado que o remodelamento constrictivo é uma característica da cicatrização vascular e é acentuado em terapias que estabilizam a placa (91). Nesse sentido, uma implicação mais geral de nosso estudo é que o melhor entendimento de mecanismos associados a eventos subcelulares e à matriz poderia fornecer informações importantes para elaboração de estratégias terapêuticas viáveis capazes de lidar com esta dualidade e melhorar um remodelamento constrictivo exacerbado.

7. Conclusão

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que a PDI aumenta de forma expressiva durante processo de reparação vascular à lesão e que tanto a porção intracelular como a peri/epicelular contribuem para este aumento. Coletivamente, PDI intracelular afeta mecanismos de adaptação à estresse e resolução da resposta reparativa, incluindo promoção do fenótipo diferenciado de VSMC. A pecPDI, por sua vez, sustenta a manutenção do calibre vascular por prevenir um efeito pró-remodelamento constrictivo. Os mecanismos envolvidos neste efeito envolvem sua influência na organização da matriz extracelular e citoesqueleto de actina, promovendo mecanoadaptações na arquitetura vascular, possivelmente em convergência com ativação localizada de RhoA. O efeito da PDI no remodelamento vascular é ainda reforçado pela correlação entre a expressão da PDI e o padrão de remodelamento em placas humanas. Estes resultados indicam que a pecPDI formata a arquitetura vascular para sustentar um efeito anti-remodelamento constrictivo.

8. Anexos

Anexo A**Tabelas suplementares****Tabela 1. Lista das sequências de siRNAs contra PDI (siPDI) ou controle embaralhada (siScr)**

siSCR449 senso: GACUUACAGUGGUCAGUCGAAGAGA antisenso: UCUCUUCGACUGACCACUGUAAGUC
siSCR1217 senso: GAGCCGGGUUUAGCAGAAGAUGAGA antisenso: UCUCAUCUUCUGCUAAACCCGGCUC
siPDI205 senso: CAAGCACCUGCUGGUGGAGUUCUAU antisenso: AUAGAACUCCACCAGCAGGUGCUUG
siPDI449 senso: GACGACAUUGUGAACUGGCUGAAGA antisenso: UCUUCAGCCAGUUCACAAUGUCGUC
siPDI1217 senso: GAGCCGGGUUUAGCAGAAGAUGAGA antisenso: UCUCAUCUUCUGCUAAACCCGGCUC

Tabela 2. Lista da sequencia dos primers utilizados para análise da expressão do mRNA por PCR quantitativa de genes envolvidos em diferentes eventos celulares

Name	Forward	Reverse
GAPDH	GGGCGTGAACCACGAGAA	GGTGCAGGATGCGTTGCT
HPRT	CGGCTTGCTCGAGATGTGAT	GAGCACACAGAGGGCTACAATG
PDI	CGGCTACCCCACGATCAA	CCTCCCTGCCAGCTGTGTAC
Nox1	TGGCTAAATCCCATCCATTCC	GCAATGCTGGTAAACGTCACA
Nox2	CTTCAACTGCCTGCTGATCCT	CTGGAACCCCTGAGAAAAGAGA
Nox4	AGCATCTGCATCTGCCTGAAC	GACTGTCCGGCACATAGGTAAAA
p22phox	GCTTCCTCCTTGCTACCATCCT	GGCAGCCAGCAGGTAGATGA
p47phox	AAAGACGCCAAGAGCAACGT	GCGCGATAGGTCTGCAGAAT
Calponin	AACTTCCAGCTGGGCCTAAAG	GGCTGCAGCTTGTGATGAG
PCNA	TGCCTTCTGGTGAATTTGCA	TACAACGGCATCTCCAATATGG
GPX 1	ACCGACCCCAAGTTCATCAC	CTCGAAGCTCCAGGAAACGT
TRX	GCTGCAGAGTGTGAAGTCAAATG	CCCACCTTTTGCCCTTTT
Col I _{α1}	ACTGGATTGACCCCAACCAA	CCATGTCGCAGAAGACCTTGA
Integrin _{α1β1}	GGCATGTGGGCCCTTATATG	GCTGACGTTAGAACAGATTCCAGTT
mTERT	CCTGTCTCCAGGCACAACAAG	TCCCCAGCGAGATGAACCT

Anexo B

Figuras suplementares

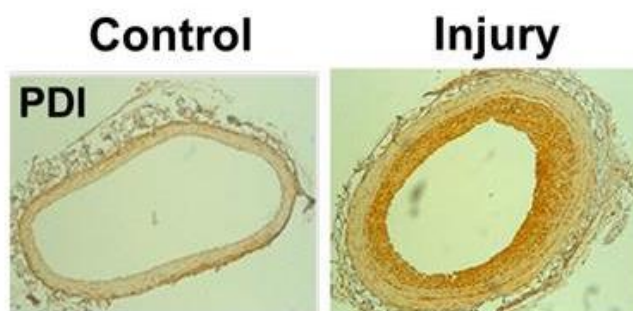


Fig. Supl. 1 – Superexpressão da PDI em modelo de lesão vascular mecânica em art. carótida de ratos. Ratos Wistar foram submetidos à lesão vascular por distensão de cateter de balão Forgarty (2F). Artéria carótida direita foi mantida intacta (Control) e carótida esquerda foi lesada (Injury). Detecção por imunohistoquímica da PDI foi realizada 14 dias após lesão, n=4. Aumento da imagem: 10x.

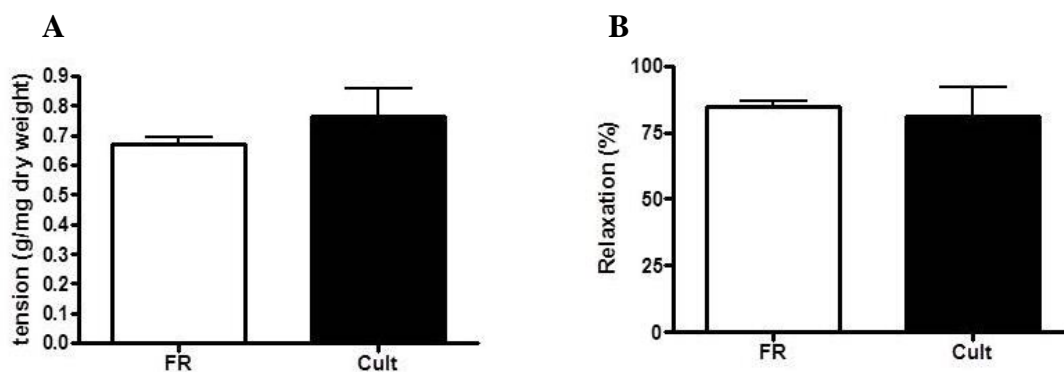


Fig. Supl. 2 – Viabilidade de anéis vasculares mantidos em cultura. Reatividade vascular em banho de órgãos em anéis de artéria carótida de coelho que foram recém-colhidas (FR) ou cultivadas durante 96 h (Cult) em meio completo (soro e antibióticos). Painel A: Contração à fenilefrina 10^{-6} M. Gráfico representa a máxima tensão atingida, expressa em g por mg peso seco, n=3. Painel B: Após estabilização da resposta contrátil à fenilefrina, vasos foram relaxados com concentrações cumulativa de acetilcolina (10^{-10} – 10^{-4} M). Gráficos representam relaxamento máximo; n=3. Diferenças não significantes foram observadas entre FR vs. Cult para ambos os agonistas.

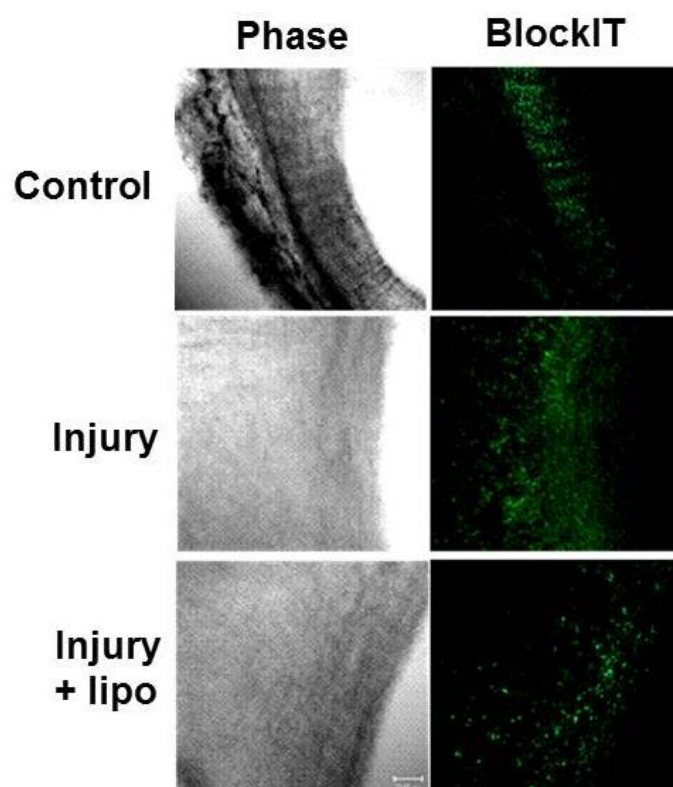


Fig. Supl. 3 – Viabilidade da transfecção de siRNA em anéis vasculares mantidos em cultura. Anéis vasculares de art. íliaca controle e 14 dias após lesão foram cultivados para transfecção do oligonucleotídeo de dupla fita fluorescente (BlockIT, 100 nM) durante 14 h na ausência e presença de lipofectamina 5 µg/ml (Injury + lipo). Análise da fluorescência foi realizada após 48 h da transfecção mantendo os tecidos em meio completo (soro e antibióticos); n=2. Anéis foram cortados com lâmina de bisturi e montados com excesso de PBS:glicerol. Tecidos são apresentados em cinza por contraste de fase e oligo fluorescente em verde. Aumento da imagem: 20x.

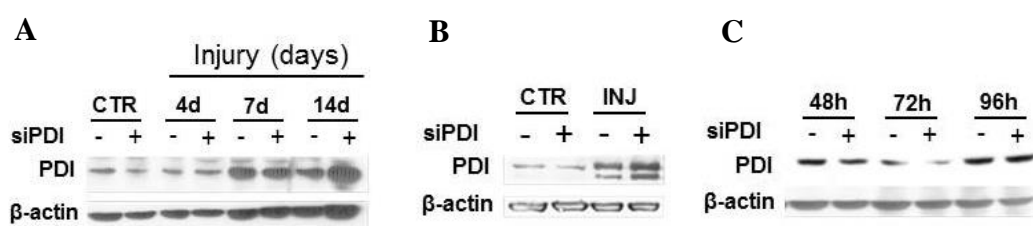


Fig. Supl. 4 – Lesão vascular aumenta a resistência ao silenciamento da PDI. Painéis A – C: Expressão proteica da PDI após diferentes protocolos de silenciamento da PDI em anéis arteriais mantidos em cultura. Painel A: Artérias ílio-femorais de coelhos coletadas em situação controle e em diferentes dias após lesão (4, 7 e 14 dias) foram cortadas em anéis (2-3 mm) e cultivadas para silenciamento da PDI como descrito na Fig. 4. Painel B: Protocolo de silenciamento da PDI em cultura de anéis foi realizado em artérias ílio-femorais em situação controle e 14 dias após lesão de modo similar ao descrito na Fig. 4, porém aumentando o tempo de adaptação à cultura de 24 h para 48 h. Painel C: Artérias ílio-femorais de coelho controle foram submetidas ao protocolo de silenciamento da PDI de modo similar ao descrito na Fig. 4 exceto pelo tempo de análise após transfecção (48, 72 e 96 h).

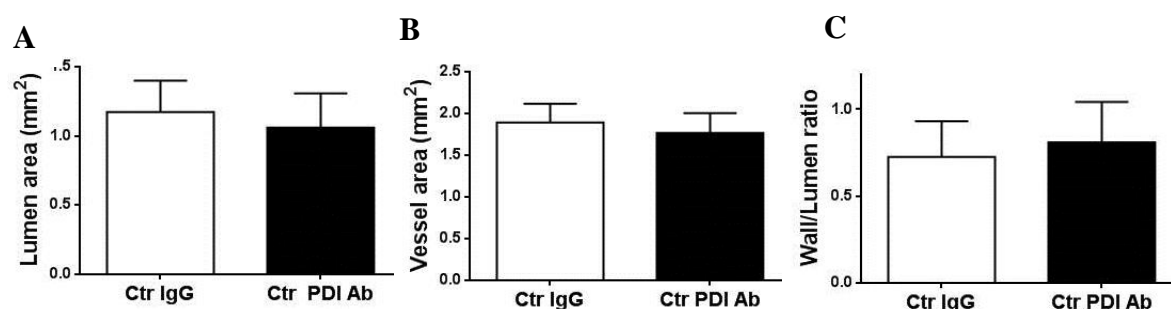


Fig. Supl. 5 – Inibição da pecPDI não altera o calibre vascular em artérias controle. *Painéis A – C*: Aplicação in vivo perivascular do anticorpo anti-PDI (PDI Ab, clone RL90) ou imunoglobulina controle IgG (ambos, 1 µg/ml) em gel plurônico e análise após 48 h de modo similar ao realizado em coelhos lesados. Os gráficos demonstram a quantificação da tomografia de coerência óptica do lúmen (*Painel A*), da área do vaso (*Painel B*), expressas em mm², e da relação parede-lúmen (*Painel C*); n=3.

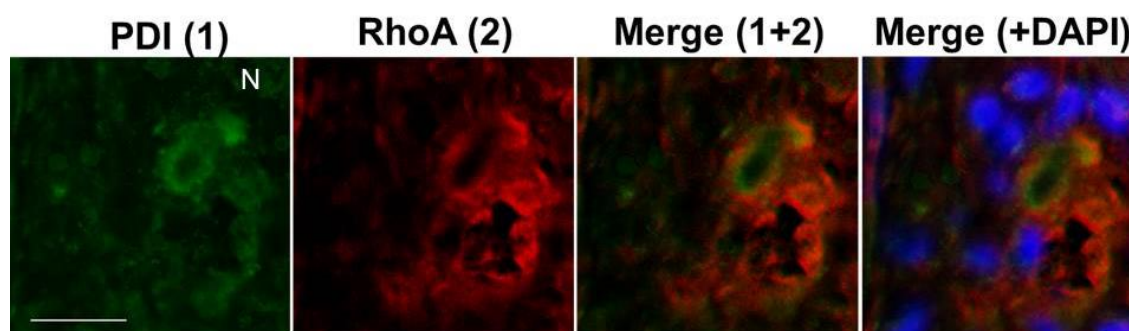
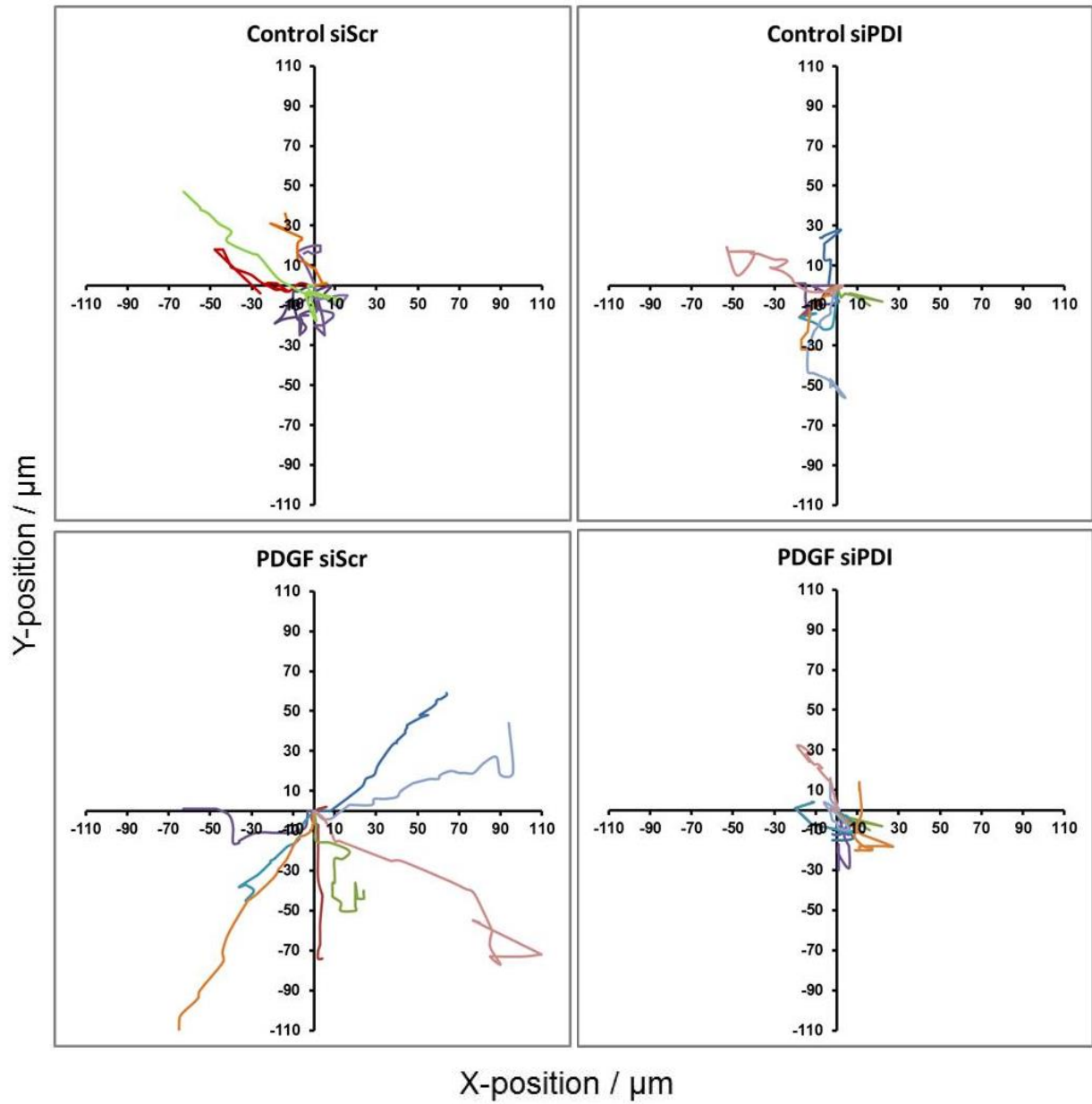


Fig. Supl. 6 – Proximidade entre PDI e RhoA em espaços abertos em artéria lesadas. Artérias ilíacas 14 dias após lesão foram processadas para análise por imunofluorescência da PDI (quadro 1, Alexa488nm, verde) e de RhoA (quadro 2, Alexa546nm, vermelho). Dupla marcação (Merge 1+2) e marcação nuclear (Merge +DAPI) são apresentadas nos quadros à direita. Espaços abertos expressam PDI e RhoA em sua margem apesar de não haver colocalização. Imagens estão focadas na região neointimal (N). Aumento da imagem: 80x, barra de escala 20 µm.

A



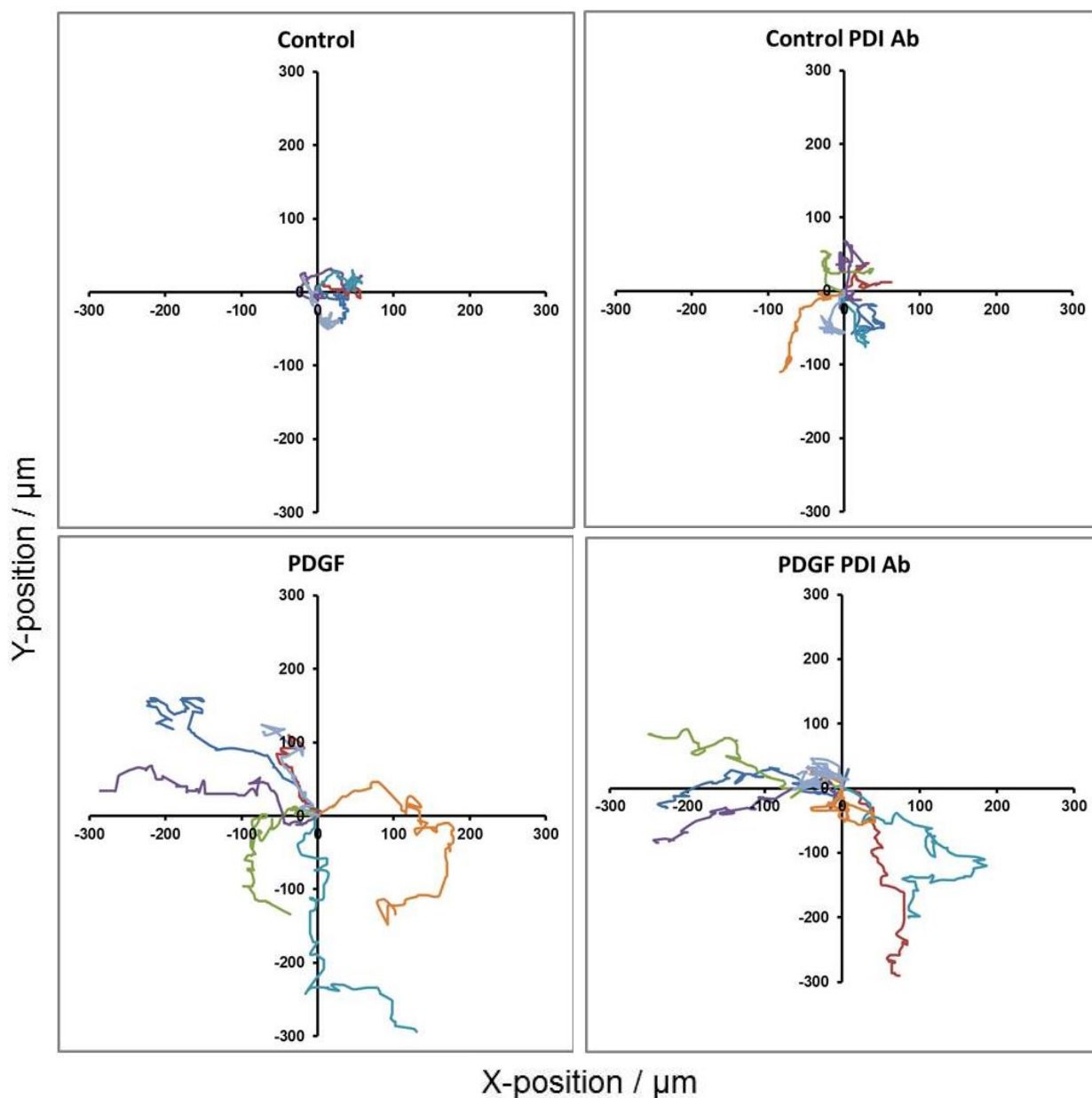
B

Fig. Supl. 7- Silenciamento da PDI, mas não bloqueio da pecPDI, inibe migração induzida por PDGF. Trajetórias das células foram analisadas durante 16 h em ensaio de migração randômica em células únicas em situação basa; (control) ou durante exposição à PDGF (25 ng/ml). Cada linha colorida (8) representa a trajetória de uma célula, medida em intervalo de 10 min, sendo plotada a sua posição central. *Painel A:* VSMCs foram transfetadas com siRNA contra PDI (siPDI) ou sequencia controle/scrambled (siScr). Após 72 h em meio completo (soro e antibióticos), células foram plaqueadas em baixa confluência para o ensaio de migração. *Painel B:* Inibição da pecPDI por PDI Ab (1 μg/ml) durante protocolo de migração. Experimentos foram realizados pelo menos 3 vezes com resultados similares. Imunoglobulina controle (IgG) não afeta migração.

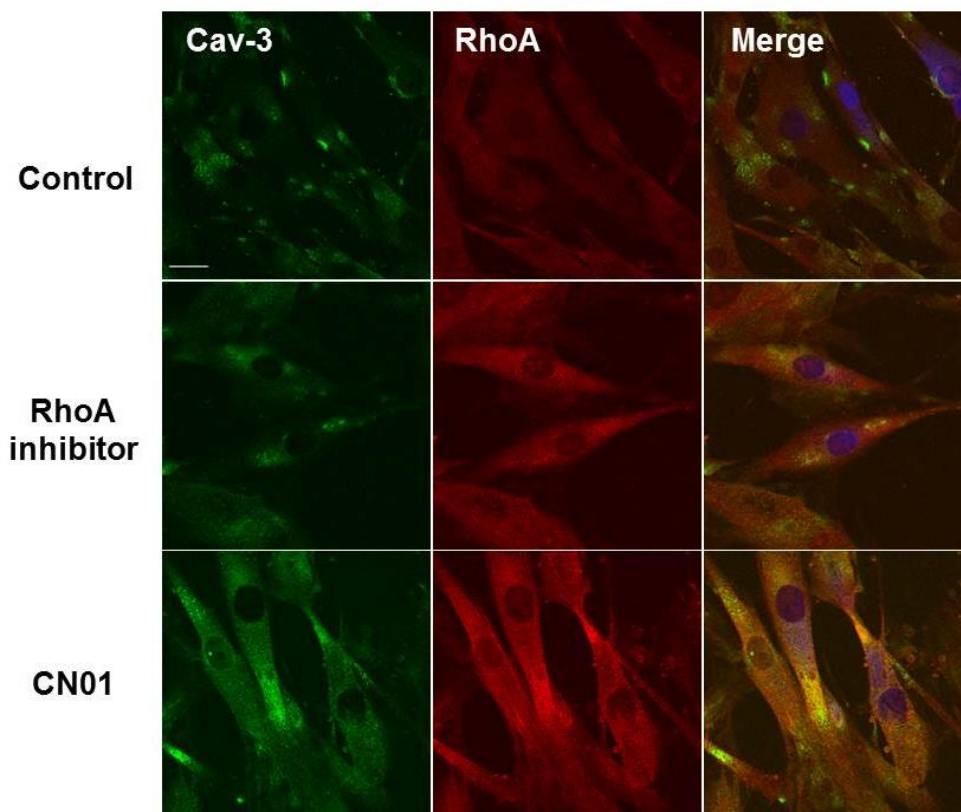


Fig. Supl. 8- Ativação de RhoA aumenta colocalização entre Cav-3 e RhoA. Imunofluorescência de Cav-3 (quadros à esquerda, Alexa488nm, verde) e RhoA (quadros centrais, Alexa546nm, vermelho) em células não permeabilizadas em situação basal/control e após incubação com inibidor de RhoA (1 $\mu\text{g/ml}$, 1 h) ou ativador de RhoA (CN01, 0,5 U/ml, 30 min). Núcleos foram marcados com DAPI (azul) e múltiplas marcações são demonstradas nos quadros à direita. Destaca-se que essas células foram cultivadas em lamínulas de vidro enquanto células da fig. 13F foram cultivadas em membranas de colágeno I durante o protocolo de estiramento; n=2.

Anexo C

Discussão suplementar

Mecanismos dependentes do RE na reparação vascular

A influência da PDI chama atenção para o envolvimento do RE na reparação vascular. De fato, o estresse do RE foi sugerido como um possível estímulo para externalização da PDI, pelo aumento da pecPDI durante tratamento com tunicamicina e pelo aumento do estresse do RE e pecPID pelo silenciamento da PDI (Fig. 6E e 5C, respectivamente). A exacerbação do estresse do RE indica que a UPR é um mecanismo de regulação comum à PDI intracelular e à porção peri/epicelular da PDI. Entretanto, as vias específicas destes mecanismos ainda não estão claras. Apesar de a neutralização da pecPDI não impactar nos marcadores da UPR, ela poderia potencialmente agir como um sinal responsivo ao estresse do RE, como relatado para calreticulina na superfície de fibroblastos embrionários, que participa na remoção de células apoptóticas (92), um mecanismo deficiente em placas de ateroma vulneráveis (93). Outra via relacionada ao estresse do RE que poderia afetar a reparação vascular envolve proteínas que regulam a morfologia do RE, como as reticulons (RTN/NOGO), que sabidamente modificam a distribuição subcelular de PDI e estão associadas ao efeito protetor da PDI em esclerose lateral amiotrófica (94). No sistema vascular, a isoforma NOGO-B atenua a formação neointimal após lesão e em modelo de alteração no fluxo. Baixos níveis de NOGO-B estão relacionados à estenose e vulnerabilidade de placas de aterosclerose em humanos (95).

Espaços abertos na parede vascular

Uma intrigante observação foi a ocorrência de espaços abertos espalhados em meio a média de vasos normais e acentuados em artérias lesadas. Surpreendentemente, estas estruturas não receberam atenção no passado (apesar de uma pesquisa satisfatória na literatura ser difícil neste caso), presumivelmente devido a esses espaços se assemelharem a artefatos da marcação por hematoxilina/eosina. No entanto, chamou atenção a presença de PDI na margem destes buracos. É

intrigante o motivo pelo qual os espaços abertos, que parecem refletir células em apoptose e/ou *anoikis*, não colapsarem. Interessantemente, as margens desses buracos são também marcadas para RhoA. Nós especulamos que eles poderiam otimizar a distribuição de forças, sustentar a estrutura do vaso e/ou servir como um nicho para diferenciação de células-tronco. Até o momento, não está claro se a redução desses espaços com a inibição da pecPDI seria uma causa ou consequência do remodelamento constrictivo.

Possíveis fontes de ROS durante reparação vascular à lesão

Noxes são candidatos naturais à geração de ROS na superfície celular (96). Entretanto, sua expressão proteica é difícil de investigar devido à baixa especificidade dos anticorpos e a expressão do mRNA não reflete sua atividade constitutiva (por ex. Nox4), especialmente em observações de curto prazo como o presente estudo. Dessa forma, não podemos excluir Noxes como fontes de ROS baseado nas observações que a neutralização da pecPDI não alterou o mRNA de Nox4, aumentou expressão de Nox1 e refletiu em redução na geração de ROS. Maior expressão de Nox1 poderia refletir adaptação inicial a um ambiente menos redutor (96) causado pela inibição da pecPDI. Adicionalmente, outras possíveis fontes de ROS incluem xantina oxidase (97), Ero1, conhecida pela presença na superfície de plaquetas (36), ou outras enzimas secretadas como quiescina sulfidril oxidase (46).

9. Referências bibliográficas

1. Schwartz RS, Chronos NA, Virmani R. Preclinical restenosis models and drug-eluting stents: still important, still much to learn. *J Am Coll Cardiol*. 2004 Oct 6;44(7):1373-85. PubMed PMID: 15464316. Epub 2004/10/07. eng.
2. Azevedo LC, Pedro MA, Souza LC, de Souza HP, Janiszewski M, da Luz PL, et al. Oxidative stress as a signaling mechanism of the vascular response to injury: the redox hypothesis of restenosis. *Cardiovasc Res*. 2000 Aug 18;47(3):436-45. PubMed PMID: 10963717. Epub 2000/08/30. eng.
3. Laurindo FR, de Souza HP, Pedro MeA, Janiszewski M. Redox aspects of vascular response to injury. *Methods Enzymol*. 2002;352:432-54. PubMed PMID: 12125370. eng.
4. Leite PF, Danilovic A, Moriel P, Dantas K, Marklund S, Dantas AP, et al. Sustained decrease in superoxide dismutase activity underlies constrictive remodeling after balloon injury in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003 Dec;23(12):2197-202. PubMed PMID: 12958042. eng.
5. Malabanan KP, Kanellakis P, Bobik A, Khachigian LM. Activation transcription factor-4 induced by fibroblast growth factor-2 regulates vascular endothelial growth factor-A transcription in vascular smooth muscle cells and mediates intimal thickening in rat arteries following balloon injury. *Circ Res*. 2008 Aug 15;103(4):378-87. PubMed PMID: 18617696. Epub 2008/07/12. eng.
6. Fernandes DC, Manoel AH, Wosniak J, Laurindo FR. Protein disulfide isomerase overexpression in vascular smooth muscle cells induces spontaneous preemptive NADPH oxidase activation and Nox1 mRNA expression: effects of nitrosothiol exposure. *Arch Biochem Biophys*. 2009 Apr;484(2):197-204. PubMed PMID: 19402212. eng.
7. Pescatore LA, Bonatto D, Forti FL, Sadok A, Kovacic H, Laurindo FR. Protein disulfide isomerase is required for platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell migration, Nox1 NADPH oxidase expression, and RhoGTPase activation. *J Biol Chem*. 2012 Aug;287(35):29290-300. PubMed PMID: 22773830. Pubmed Central PMCID: PMC3436193. eng.
8. Santos CXC, Tanaka LY, Wosniak J, Jr., Laurindo FRM. Mechanisms and Implications of Reactive Oxygen Species Generation During the Unfolded Protein Response: Roles of Endoplasmic Reticulum Oxidoreductases, Mitochondrial Electron Transport, and NADPH Oxidase. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2009 OCT 2009;11(10):2409-27. PubMed PMID: WOS:000269980200005.
9. Muller C, Bandemer J, Vindis C, Camare C, Mucher E, Gueraud F, et al. Protein disulfide isomerase modification and inhibition contribute to ER stress and apoptosis induced by oxidized low density lipoproteins. *Antioxid Redox Signal*. 2013 Mar 1;18(7):731-42. PubMed PMID: 23083489. Epub 2012/10/23. eng.
10. Myoishi M, Hao H, Minamino T, Watanabe K, Nishihira K, Hatakeyama K, et al. Increased endoplasmic reticulum stress in atherosclerotic plaques associated with acute coronary syndrome. *Circulation*. 2007 Sep 11;116(11):1226-33. PubMed PMID: 17709641. Epub 2007/08/22. eng.
11. Andersen HR, Maeng M, Thorwest M, Falk E. Remodeling rather than neointimal formation explains luminal narrowing after deep vessel wall injury: insights from a porcine coronary (re)stenosis model. *Circulation*. 1996 May;93(9):1716-24. PubMed PMID: 8653878. eng.
12. Côté G, Tardif JC, Lespérance J, Lambert J, Bourassa M, Bonan R, et al. Effects of probucol on vascular remodeling after coronary angioplasty. Multivitamins and Protocol Study Group. *Circulation*. 1999 1999 Jan 5-12;99(1):30-5. PubMed PMID: 9884376. eng.
13. Laurindo FR, Pescatore LA, Fernandes Dde C. Protein disulfide isomerase in redox cell signaling and homeostasis. *Free Radic Biol Med*. 2012 May 1;52(9):1954-69. PubMed PMID: 22401853. Epub 2012/03/10. eng.

14. Turano C, Coppari S, Altieri F, Ferraro A. Proteins of the PDI family: unpredicted non-ER locations and functions. *J Cell Physiol.* 2002 Nov;193(2):154-63. PubMed PMID: 12384992. Epub 2002/10/18. eng.
15. Souza HP, Souza LC, Anastacio VM, Pereira AC, Junqueira ML, Krieger JE, et al. Vascular oxidant stress early after balloon injury: evidence for increased NAD(P)H oxidoreductase activity. *Free Radic Biol Med.* 2000 Apr 15;28(8):1232-42. PubMed PMID: 10889453. Epub 2000/07/13. eng.
16. Laurindo FR, da Luz PL, Uint L, Rocha TF, Jaeger RG, Lopes EA. Evidence for superoxide radical-dependent coronary vasospasm after angioplasty in intact dogs. *Circulation.* 1991 May;83(5):1705-15. PubMed PMID: 1850666. eng.
17. Pollman MJ, Hall JL, Gibbons GH. Determinants of vascular smooth muscle cell apoptosis after balloon angioplasty injury. Influence of redox state and cell phenotype. *Circ Res.* 1999 Jan 8-22;84(1):113-21. PubMed PMID: 9915780. Epub 1999/01/23. eng.
18. Szöcs K, Lassègue B, Sorescu D, Hilenski LL, Valppu L, Couse TL, et al. Upregulation of Nox-based NAD(P)H oxidases in restenosis after carotid injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002 Jan;22(1):21-7. PubMed PMID: 11788456. eng.
19. Terada LS. Specificity in reactive oxidant signaling: think globally, act locally. *J Cell Biol.* 2006 Aug 28;174(5):615-23. PubMed PMID: 16923830. Pubmed Central PMCID: Pmc2064304. Epub 2006/08/23. eng.
20. Lee MY, San Martin A, Mehta PK, Dikalova AE, Garrido AM, Datta SR, et al. Mechanisms of vascular smooth muscle NADPH oxidase 1 (Nox1) contribution to injury-induced neointimal formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009 Apr;29(4):480-7. PubMed PMID: 19150879. Pubmed Central PMCID: Pmc2734189. Epub 2009/01/20. eng.
21. Lassegue B, San Martin A, Griendling KK. Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. *Circ Res.* 2012 May 11;110(10):1364-90. PubMed PMID: 22581922. Pubmed Central PMCID: Pmc3365576. Epub 2012/05/15. eng.
22. Clempus RE, Sorescu D, Dikalova AE, Pounkova L, Jo P, Sorescu GP, et al. Nox4 is required for maintenance of the differentiated vascular smooth muscle cell phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 Jan;27(1):42-8. PubMed PMID: 17082491. Pubmed Central PMCID: Pmc1868577. Epub 2006/11/04. eng.
23. Woo HA, Yim SH, Shin DH, Kang D, Yu DY, Rhee SG. Inactivation of peroxiredoxin I by phosphorylation allows localized H₂O₂ accumulation for cell signaling. *Cell.* 2010 Feb 19;140(4):517-28. PubMed PMID: 20178744. Epub 2010/02/25. eng.
24. Noiva R. Protein disulfide isomerase: the multifunctional redox chaperone of the endoplasmic reticulum. *Semin Cell Dev Biol.* 1999 Oct;10(5):481-93. PubMed PMID: 10597631. eng.
25. Wilkinson B, Gilbert HF. Protein disulfide isomerase. *Biochim Biophys Acta.* 2004 Jun 1;1699(1-2):35-44. PubMed PMID: 15158710. Epub 2004/05/26. eng.
26. Malhotra JD, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxid Redox Signal.* 2007 Dec;9(12):2277-93. PubMed PMID: 17979528. Epub 2007/11/06. eng.
27. Andreu CI, Woehlbier U, Torres M, Hetz C. Protein disulfide isomerases in neurodegeneration: from disease mechanisms to biomedical applications. *FEBS Lett.* 2012 Aug 31;586(18):2826-34. PubMed PMID: 22828277. Epub 2012/07/26. eng.
28. Severino A, Campioni M, Straino S, Salloum FN, Schmidt N, Herbrand U, et al. Identification of protein disulfide isomerase as a cardiomyocyte survival factor in ischemic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2007 Sep 11;50(11):1029-37. PubMed PMID: 17825711. Epub 2007/09/11. eng.

29. Hoffstrom BG, Kaplan A, Letso R, Schmid RS, Turmel GJ, Lo DC, et al. Inhibitors of protein disulfide isomerase suppress apoptosis induced by misfolded proteins. *Nat Chem Biol.* 2010 Dec;6(12):900-6. PubMed PMID: 21079601. Pubmed Central PMCID: Pmc3018711. Epub 2010/11/17. eng.
30. Goplen D, Wang J, Enger PO, Tysnes BB, Terzis AJ, Laerum OD, et al. Protein disulfide isomerase expression is related to the invasive properties of malignant glioma. *Cancer Res.* 2006 Oct 15;66(20):9895-902. PubMed PMID: 17047051. Epub 2006/10/19. eng.
31. Fenton M, Barker S, Kurz DJ, Erusalimsky JD. Cellular senescence after single and repeated balloon catheter denudations of rabbit carotid arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001 Feb;21(2):220-6. PubMed PMID: 11156856. Epub 2001/02/07. eng.
32. Bi S, Hong PW, Lee B, Baum LG. Galectin-9 binding to cell surface protein disulfide isomerase regulates the redox environment to enhance T-cell migration and HIV entry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Jun 28;108(26):10650-5. PubMed PMID: 21670307. Pubmed Central PMCID: Pmc3127870. Epub 2011/06/15. eng.
33. Gallina A, Hanley TM, Mandel R, Trahey M, Broder CC, Viglianti GA, et al. Inhibitors of protein-disulfide isomerase prevent cleavage of disulfide bonds in receptor-bound glycoprotein 120 and prevent HIV-1 entry. *J Biol Chem.* 2002 Dec 27;277(52):50579-88. PubMed PMID: 12218051. Epub 2002/09/10. eng.
34. Willems SH, Tape CJ, Stanley PL, Taylor NA, Mills IG, Neal DE, et al. Thiol isomerases negatively regulate the cellular shedding activity of ADAM17. *Biochem J.* 2010 Jun 15;428(3):439-50. PubMed PMID: 20345372. Epub 2010/03/30. eng.
35. Cho J, Furie BC, Coughlin SR, Furie B. A critical role for extracellular protein disulfide isomerase during thrombus formation in mice. *J Clin Invest.* 2008 Mar;118(3):1123-31. PubMed PMID: 18292814. Pubmed Central PMCID: PMC2248441. eng.
36. Swiatkowska M, Padula G, Michalec L, Stasiak M, Skurzynski S, Cierniewski CS. Ero1alpha is expressed on blood platelets in association with protein-disulfide isomerase and contributes to redox-controlled remodeling of alphaIIb beta3. *J Biol Chem.* 2010 Sep 24;285(39):29874-83. PubMed PMID: 20562109. Pubmed Central PMCID: Pmc2943306. Epub 2010/06/22. eng.
37. Hotchkiss KA, Matthias LJ, Hogg PJ. Exposure of the cryptic Arg-Gly-Asp sequence in thrombospondin-1 by protein disulfide isomerase. *Biochim Biophys Acta.* 1998 Nov 10;1388(2):478-88. PubMed PMID: 9858782. Epub 1998/12/22. eng.
38. Takaguri A, Kimura K, Hinoki A, Bourne AM, Autieri MV, Eguchi S. A disintegrin and metalloprotease 17 mediates neointimal hyperplasia in vasculature. *Hypertension.* 2011 Apr;57(4):841-5. PubMed PMID: 21357274. Pubmed Central PMCID: Pmc3311130. Epub 2011/03/02. eng.
39. Jasuja R, Furie B, Furie BC. Endothelium-derived but not platelet-derived protein disulfide isomerase is required for thrombus formation in vivo. *Blood.* 2010 Nov 25;116(22):4665-74. PubMed PMID: 20668226. Pubmed Central PMCID: Pmc2996122. Epub 2010/07/30. eng.
40. Kim K, Hahm E, Li J, Holbrook LM, Sasikumar P, Stanley RG, et al. Platelet protein disulfide isomerase is required for thrombus formation but not for hemostasis in mice. *Blood.* 2013 Aug;122(6):1052-61. PubMed PMID: 23788140. Pubmed Central PMCID: PMC3739031. eng.
41. Manickam N, Sun X, Li M, Gazitt Y, Essex DW. Protein disulphide isomerase in platelet function. *Br J Haematol.* 2008 Jan;140(2):223-9. PubMed PMID: 18028487. Epub 2007/11/22. eng.
42. Jasuja R, Passam FH, Kennedy DR, Kim SH, van Hessem L, Lin L, et al. Protein disulfide isomerase inhibitors constitute a new class of antithrombotic agents. *J Clin Invest.*

- 2012 Jun 1;122(6):2104-13. PubMed PMID: 22565308. Pubmed Central PMCID: Pmc3366406. Epub 2012/05/09. eng.
43. Terada K, Manchikalapudi P, Noiva R, Jauregui HO, Stockert RJ, Schilsky ML. Secretion, surface localization, turnover, and steady state expression of protein disulfide isomerase in rat hepatocytes. *J Biol Chem.* 1995 Sep 1;270(35):20410-6. PubMed PMID: 7657616. Epub 1995/09/01. eng.
44. Mezghrani A, Courageot J, Mani JC, Pugniere M, Bastiani P, Miquelis R. Protein-disulfide isomerase (PDI) in FRTL5 cells. pH-dependent thyroglobulin/PDI interactions determine a novel PDI function in the post-endoplasmic reticulum of thyrocytes. *J Biol Chem.* 2000 Jan 21;275(3):1920-9. PubMed PMID: 10636893. Epub 2000/01/15. eng.
45. Ilani T, Alon A, Grossman I, Horowitz B, Kartvelishvily E, Cohen SR, et al. A secreted disulfide catalyst controls extracellular matrix composition and function. *Science.* 2013 Jul 5;341(6141):74-6. PubMed PMID: 23704371. Epub 2013/05/25. eng.
46. Kodali VK, Thorpe C. Oxidative protein folding and the Quiescin-sulfhydryl oxidase family of flavoproteins. *Antioxid Redox Signal.* 2010 Oct;13(8):1217-30. PubMed PMID: 20136510. Pubmed Central PMCID: Pmc2959182. Epub 2010/02/09. eng.
47. Lessey EC, Guilluy C, Burridge K. From mechanical force to RhoA activation. *Biochemistry.* 2012 Sep 25;51(38):7420-32. PubMed PMID: 22931484. Pubmed Central PMCID: Pmc3567302. Epub 2012/08/31. eng.
48. Heo J, Raines KW, Mocanu V, Campbell SL. Redox regulation of RhoA. *Biochemistry.* 2006 Dec;45(48):14481-9. PubMed PMID: 17128987. eng.
49. Sawada N, Itoh H, Ueyama K, Yamashita J, Doi K, Chun TH, et al. Inhibition of rho-associated kinase results in suppression of neointimal formation of balloon-injured arteries. *Circulation.* 2000 May 2;101(17):2030-3. PubMed PMID: 10790342. Epub 2000/05/03. eng.
50. Khan OM, Akula MK, Skalen K, Karlsson C, Stahlman M, Young SG, et al. Targeting GGTase-I activates RHOA, increases macrophage reverse cholesterol transport, and reduces atherosclerosis in mice. *Circulation.* 2013 Feb 19;127(7):782-90. PubMed PMID: 23334894. Epub 2013/01/22. eng.
51. Taylor AJ, Burke AP, Farb A, Yousefi P, Malcom GT, Smialek J, et al. Arterial remodeling in the left coronary system: the role of high-density lipoprotein cholesterol. *J Am Coll Cardiol.* 1999 Sep;34(3):760-7. PubMed PMID: 10483958. Epub 1999/09/14. eng.
52. Janiszewski M, Pasqualucci CA, Souza LC, Pileggi F, da Luz PL, Laurindo FR. Oxidized thiols markedly amplify the vascular response to balloon injury in rabbits through a redox active metal-dependent pathway. *Cardiovasc Res.* 1998 Aug;39(2):327-38. PubMed PMID: 9798518. eng.
53. Wada T, McKee MD, Steitz S, Giachelli CM. Calcification of vascular smooth muscle cell cultures: inhibition by osteopontin. *Circ Res.* 1999 Feb 5;84(2):166-78. PubMed PMID: 9933248. Epub 1999/02/05. eng.
54. Campos LC, Miyakawa AA, Barauna VG, Cardoso L, Borin TF, Dallan LA, et al. Induction of CRP3/MLP expression during vein arterialization is dependent on stretch rather than shear stress. *Cardiovasc Res.* 2009 Jul 1;83(1):140-7. PubMed PMID: 19351738. Epub 2009/04/09. eng.
55. Sadok A, Pierres A, Dahan L, Prevot C, Lehmann M, Kovacic H. NADPH oxidase 1 controls the persistence of directed cell migration by a Rho-dependent switch of alpha2/alpha3 integrins. *Mol Cell Biol.* 2009 Jul;29(14):3915-28. PubMed PMID: 19451223. Pubmed Central PMCID: Pmc2704751. Epub 2009/05/20. eng.
56. Deguchi JO, Huang H, Libby P, Aikawa E, Whittaker P, Sylvan J, et al. Genetically engineered resistance for MMP collagenases promotes abdominal aortic aneurysm formation in mice infused with angiotensin II. *Lab Invest.* 2009 Mar;89(3):315-26. PubMed PMID: 19153555. Pubmed Central PMCID: Pmc2932654. Epub 2009/01/21. eng.

57. Fonck E, Feigl GG, Fasel J, Sage D, Unser M, Rufenacht DA, et al. Effect of aging on elastin functionality in human cerebral arteries. *Stroke*. 2009 Jul;40(7):2552-6. PubMed PMID: 19478233. Epub 2009/05/30. eng.
58. Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukai T, Holland SM, et al. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest*. 2003 Apr;111(8):1201-9. PubMed PMID: 12697739. Pubmed Central PMCID: Pmc152929. Epub 2003/04/17. eng.
59. Liberman M, Bassi E, Martinatti MK, Lario FC, Wosniak J, Jr., Pomerantzeff PM, et al. Oxidant generation predominates around calcifying foci and enhances progression of aortic valve calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008 Mar;28(3):463-70. PubMed PMID: 18162610. Epub 2007/12/29. eng.
60. Bonini MG, Staldler K, Silva SdO, Corbett J, Dores M, Petranka J, et al. Constitutive nitric oxide synthase activation is a significant route for nitroglycerin-mediated vasodilation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008 JUN 24 2008;105(25):8569-74. PubMed PMID: WOS:000257185700017.
61. Maattanen P, Kozlov G, Gehring K, Thomas DY. ERp57 and PDI: multifunctional protein disulfide isomerases with similar domain architectures but differing substrate-partner associations. *Biochem Cell Biol*. 2006 Dec;84(6):881-9. PubMed PMID: 17215875. eng.
62. Weed SA, Karginov AV, Schafer DA, Weaver AM, Kinley AW, Cooper JA, et al. Cortactin localization to sites of actin assembly in lamellipodia requires interactions with F-actin and the Arp2/3 complex. *J Cell Biol*. 2000 Oct 2;151(1):29-40. PubMed PMID: 11018051. Pubmed Central PMCID: Pmc2189811. Epub 2000/10/06. eng.
63. Essex DW, Li M. Protein disulphide isomerase mediates platelet aggregation and secretion. *Br J Haematol*. 1999 Mar;104(3):448-54. PubMed PMID: 10086777. Epub 1999/03/23. eng.
64. Zhang Y, Liu R, Ni M, Gill P, Lee AS. Cell surface relocation of the endoplasmic reticulum chaperone and unfolded protein response regulator GRP78/BiP. *J Biol Chem*. 2010 May 14;285(20):15065-75. PubMed PMID: 20208072. Pubmed Central PMCID: Pmc2865300. Epub 2010/03/09. eng.
65. Lafont A, Durand E, Samuel JL, Besse B, Addad F, Levy BI, et al. Endothelial dysfunction and collagen accumulation: two independent factors for restenosis and constrictive remodeling after experimental angioplasty. *Circulation*. 1999 Sep 7;100(10):1109-15. PubMed PMID: 10477537. Epub 1999/09/08. eng.
66. Kivirikko KI, Myllyla R, Pihlajaniemi T. Protein hydroxylation: prolyl 4-hydroxylase, an enzyme with four cosubstrates and a multifunctional subunit. *Faseb j*. 1989 Mar;3(5):1609-17. PubMed PMID: 2537773. Epub 1989/03/01. eng.
67. Junqueira LC, Cossermelli W, Brentani R. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. *Arch Histol Jpn*. 1978 Jun;41(3):267-74. PubMed PMID: 82432. Epub 1978/06/01. eng.
68. Bauer AL, Jackson TL, Jiang Y. Topography of extracellular matrix mediates vascular morphogenesis and migration speeds in angiogenesis. *PLoS Comput Biol*. 2009 Jul;5(7):e1000445. PubMed PMID: 19629173. Pubmed Central PMCID: Pmc2709079. Epub 2009/07/25. eng.
69. Zai A, Rudd MA, Scribner AW, Loscalzo J. Cell-surface protein disulfide isomerase catalyzes transnitrosation and regulates intracellular transfer of nitric oxide. *J Clin Invest*. 1999 Feb;103(3):393-9. PubMed PMID: 9927500. Pubmed Central PMCID: PMC407899. eng.

70. Haga JH, Li YS, Chien S. Molecular basis of the effects of mechanical stretch on vascular smooth muscle cells. *J Biomech.* 2007;40(5):947-60. PubMed PMID: 16867303. Epub 2006/07/27. eng.
71. Zheng W, Seftor EA, Meininger CJ, Hendrix MJ, Tomanek RJ. Mechanisms of coronary angiogenesis in response to stretch: role of VEGF and TGF-beta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001 Feb;280(2):H909-17. PubMed PMID: 11158993. Epub 2001/02/13. eng.
72. Ochoa CD, Baker H, Hasak S, Matyal R, Salam A, Hales CA, et al. Cyclic stretch affects pulmonary endothelial cell control of pulmonary smooth muscle cell growth. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2008 Jul;39(1):105-12. PubMed PMID: 18314539. Pubmed Central PMCID: Pmc2438445. Epub 2008/03/04. eng.
73. Torsoni AS, Marin TM, Velloso LA, Franchini KG. RhoA/ROCK signaling is critical to FAK activation by cyclic stretch in cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005 Oct;289(4):H1488-96. PubMed PMID: 15923313. Epub 2005/06/01. eng.
74. Kawamura S, Miyamoto S, Brown JH. Initiation and transduction of stretch-induced RhoA and Rac1 activation through caveolae: cytoskeletal regulation of ERK translocation. *J Biol Chem.* 2003 Aug 15;278(33):31111-7. PubMed PMID: 12777392. Epub 2003/06/05. eng.
75. Pasterkamp G, Schoneveld AH, van der Wal AC, Haudenschild CC, Clarijs RJ, Becker AE, et al. Relation of arterial geometry to luminal narrowing and histologic markers for plaque vulnerability: the remodeling paradox. *J Am Coll Cardiol.* 1998 Sep;32(3):655-62. PubMed PMID: 9741507. eng.
76. Lovat PE, Corazzari M, Armstrong JL, Martin S, Pagliarini V, Hill D, et al. Increasing melanoma cell death using inhibitors of protein disulfide isomerases to abrogate survival responses to endoplasmic reticulum stress. *Cancer Res.* 2008 Jul 1;68(13):5363-9. PubMed PMID: 18593938. Pubmed Central PMCID: Pmc2917766. Epub 2008/07/03. eng.
77. Camargo LD, Babelova A, Mieth A, Weigert A, Mooz J, Rajalingam K, et al. Endo-PDI is required for TNFalpha-induced angiogenesis. *Free Radic Biol Med.* 2013 Oct 5;65c:1398-407. PubMed PMID: 24103565. Epub 2013/10/10. Eng.
78. Ryser HJ, Levy EM, Mandel R, DiSciullo GJ. Inhibition of human immunodeficiency virus infection by agents that interfere with thiol-disulfide interchange upon virus-receptor interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 May 10;91(10):4559-63. PubMed PMID: 8183947. Pubmed Central PMCID: Pmc43825. Epub 1994/05/10. eng.
79. Hahm E, Li J, Kim K, Huh S, Rogelj S, Cho J. Extracellular protein disulfide isomerase regulates ligand-binding activity of alphaMbeta2 integrin and neutrophil recruitment during vascular inflammation. *Blood.* 2013 May 9;121(19):3789-800, s1-15. PubMed PMID: 23460613. Pubmed Central PMCID: Pmc3650702. Epub 2013/03/06. eng.
80. Bach RR, Monroe D. What is wrong with the allosteric disulfide bond hypothesis? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009 Dec;29(12):1997-8. PubMed PMID: 19923558. Epub 2009/11/20. eng.
81. Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM. Mechanisms of stenosis after arterial injury. *Lab Invest.* 1983 Aug;49(2):208-15. PubMed PMID: 6876748. Epub 1983/08/01. eng.
82. Heisenberg CP, Bellaiche Y. Forces in tissue morphogenesis and patterning. *Cell.* 2013 May 23;153(5):948-62. PubMed PMID: 23706734. Epub 2013/05/28. eng.
83. Chen TJ, Wu CC, Su FC. Mechanical models of the cellular cytoskeletal network for the analysis of intracellular mechanical properties and force distributions: a review. *Med Eng Phys.* 2012 Dec;34(10):1375-86. PubMed PMID: 23062682. Epub 2012/10/16. eng.
84. Goldyn AM, Rioja BA, Spatz JP, Ballestrem C, Kemkemer R. Force-induced cell polarisation is linked to RhoA-driven microtubule-independent focal-adhesion sliding. *Journal of Cell Science.* 2009 //;122(20):3644-51.

85. Ingber DE. From cellular mechanotransduction to biologically inspired engineering: 2009 Pritzker Award Lecture, BMES Annual Meeting October 10, 2009. *Ann Biomed Eng.* 2010 Mar;38(3):1148-61. PubMed PMID: 20140519. Pubmed Central PMCID: PMC2913424. eng.
86. Ramachandran N, Root P, Jiang XM, Hogg PJ, Mutus B. Mechanism of transfer of NO from extracellular S-nitrosothiols into the cytosol by cell-surface protein disulfide isomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Aug;98(17):9539-44. PubMed PMID: 11493694. Pubmed Central PMCID: PMC55488. eng.
87. Miller MR, Hanspal IS, Hadoke PW, Newby DE, Rossi AG, Webb DJ, et al. A novel S-nitrosothiol causes prolonged and selective inhibition of platelet adhesion at sites of vascular injury. *Cardiovasc Res.* 2003 Mar;57(3):853-60. PubMed PMID: 12618247. Epub 2003/03/06. eng.
88. Rudic RD, Shesely EG, Maeda N, Smithies O, Segal SS, Sessa WC. Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *J Clin Invest.* 1998 Feb;101(4):731-6. PubMed PMID: 9466966. Pubmed Central PMCID: PMC508619. eng.
89. BurrIDGE K, Wittchen ES. Stress fibers get a makeover. *Biophys J.* 2012 Nov;103(10):2045-6. PubMed PMID: 23200036. Pubmed Central PMCID: PMC3512045. eng.
90. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* 2002 Dec 19-26;420(6917):868-74. PubMed PMID: 12490960. Epub 2002/12/20. eng.
91. Schoenhagen P, Tuzcu EM, Apperson-Hansen C, Wang C, Wolski K, Lin S, et al. Determinants of arterial wall remodeling during lipid-lowering therapy: serial intravascular ultrasound observations from the Reversal of Atherosclerosis with Aggressive Lipid Lowering Therapy (REVERSAL) trial. *Circulation.* 2006 Jun 20;113(24):2826-34. PubMed PMID: 16769916. Epub 2006/06/14. eng.
92. Peters LR, Raghavan M. Endoplasmic reticulum calcium depletion impacts chaperone secretion, innate immunity, and phagocytic uptake of cells. *J Immunol.* 2011 Jul 15;187(2):919-31. PubMed PMID: 21670312. Pubmed Central PMCID: Pmc3371385. Epub 2011/06/15. eng.
93. Schrijvers DM, De Meyer GR, Kockx MM, Herman AG, Martinet W. Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages is impaired in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005 Jun;25(6):1256-61. PubMed PMID: 15831805. Epub 2005/04/16. eng.
94. Yang YS, Harel NY, Strittmatter SM. Reticulon-4A (Nogo-A) redistributes protein disulfide isomerase to protect mice from SOD1-dependent amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci.* 2009 Nov 4;29(44):13850-9. PubMed PMID: 19889996. Pubmed Central PMCID: Pmc2797811. Epub 2009/11/06. eng.
95. Rodriguez-Feo JA, Hellings WE, Verhoeven BA, Moll FL, de Kleijn DP, Prendergast J, et al. Low levels of Nogo-B in human carotid atherosclerotic plaques are associated with an atheromatous phenotype, restenosis, and stenosis severity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 Jun;27(6):1354-60. PubMed PMID: 17413036. Epub 2007/04/07. eng.
96. Stanic B, Katsuyama M, Miller FJ, Jr. An oxidized extracellular oxidation-reduction state increases Nox1 expression and proliferation in vascular smooth muscle cells via epidermal growth factor receptor activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010 Nov;30(11):2234-41. PubMed PMID: 20814013. Pubmed Central PMCID: Pmc2959123. Epub 2010/09/04. eng.
97. Takano M, Meneshian A, Sheikh E, Yamakawa Y, Wilkins KB, Hopkins EA, et al. Rapid upregulation of endothelial P-selectin expression via reactive oxygen species generation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002 Nov;283(5):H2054-61. PubMed PMID: 12384485. Epub 2002/10/18. eng.

CURRICULUM VITAE

Leonardo Yuji Tanaka

<http://lattes.cnpq.br/9416512845700354>

I) Formação

(2010 - atual) Doutorado em andamento em Ciências.
Instituto do Coração - Faculdade de Medicina/USP, Brasil.
Título: Dissulfeto isomerase proteica como via integrativa entre estresse oxidativo e resposta a proteínas mal-enoveladas na reparação à lesão vascular,
Orientador: Francisco Rafael Martins Laurindo.
Bolsa: FAPESP

(2007 – 2008) Mestrado em Biodinâmica do Movimento Humano.
Escola de Educação Física e Esporte - USP, Brasil.
Título: Efeito agudo do exercício aeróbio na vasodilatação aórtica: controle da biodisponibilidade de óxido nítrico,
Orientador: Paulo Rizzo Ramires.

(2004 – 2004) Especialização em Fisiologia do Exercício. (Carga Horária: 360h).
Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, Brasil.

(2000 – 2003) Graduação em Licenciatura Plena em Educação Física.
Universidade Estadual Paulista - Bauru, UNESP, Brasil.
Título: Efeito ergogênico da suplementação com carboidrato durante o treinamento resistido.
Orientador: Jair Rodrigues Garcia Júnior.

II) Atuação profissional

(2005 – 2009) Técnico de pesquisa
Unidade Clínica de Aterosclerose – InCor - Faculdade de Medicina/USP, Brasil
Vínculo: Celetista formal, Carga horária semanal: 40

(2002 – 2003) Monitor das disciplinas Anatomia Humana I e II
Vínculo: Colaborador, Carga horária semana: 2

(2002 – 2002) Projeto de Extensão Universitária Futebol: Educando pelo Lazer
Vínculo: bolsista (PROEX), Carga horária semanal: 4

III) Prêmios e títulos

2013 - International Early Career Physiologist Award, The American Physiological Society.

2012 - International Early Career Physiologist Award, The American Physiological Society.

2011- Young Investigator ESPCA, I São Paulo Advanced School on Redox Processes in Biomedicine, Free Radicals 2011.

2011 - Travel Award ESC Congress 2011. 27-31 de agosto de 2011, Paris, França.

IV) Artigos publicados

- 1- da Luz PL, Tanaka L, Brum PC, Dourado PM, Favarato D, Krieger JE, Laurindo FR: Red wine and equivalent oral pharmacological doses of resveratrol delay vascular aging but do not extend life span in rats. **Atherosclerosis** 224:136-142 (2012). Citações SCOPUS: 1
- 2- Mao M, Sudhakar V, Ansenberger-Fricano K, Fernandes DC, Tanaka LY, Fukai T, Laurindo FR, Mason RP, Vasquez-Vivar J, Minshall RD, Stadler K, Bonini MG: Nitroglycerin drives endothelial nitric oxide synthase activation via the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase b pathway. **Free Radic Biol Med** 52:427-435 (2012). Citações Web of Science: 1; SCOPUS: 1
- 3- Ferreira JC, Bacurau AV, Bueno CR, Cunha TC, Tanaka LY, Jardim MA, Ramires PR, Brum PC: Aerobic exercise training improves ca²⁺ handling and redox status of skeletal muscle in mice. **Exp Biol Med** (Maywood) 235:497-505 (2010). Citações Web of Science: 14; SCOPUS: 16
- 4- Santos CX, Tanaka LY, Wosniak J, Laurindo FR: Mechanisms and implications of reactive oxygen species generation during the unfolded protein response: Roles of endoplasmic reticulum oxidoreductases, mitochondrial electron transport, and NADPH oxidase. **Antioxid Redox Signal** 11:2409-2427 (2009). Citações Web of Science: 95
- 5- Bechara LR, Tanaka LY, Santos AM, Jordão CP, Sousa LG, Bartholomeu T, Ramires PR: A single bout of moderate-intensity exercise increases vascular no bioavailability and attenuates adrenergic receptor-dependent and -independent vasoconstrictor response in rat aorta. **J Smooth Muscle Res** 44:101-111 (2008). Citações SCOPUS: 1
- 6- Bartholomeu JB, Vanzelli AS, Rolim NP, Ferreira JC, Bechara LR, Tanaka LY, Rosa KT, Alves MM, Medeiros A, Mattos KC, Coelho MA, Irigoyen MC, Krieger EM, Krieger JE, Negrão CE, Ramires PR, Guatimosim S, Brum PC: Intracellular mechanisms of specific beta-adrenoceptor antagonists involved in improved cardiac function and survival in a genetic model of heart failure. **J Mol Cell Cardiol** 45:240-249 (2008). Citações Web of Science: 21; SCOPUS: 22
- 7- Zanchi NE, Bechara LR, Tanaka LY, Debbas V, Bartholomeu T, Ramires PR: Moderate exercise training decreases aortic superoxide production in myocardial infarcted rats. **Eur J Appl Physiol** 104:1045-1052 (2008). Citações Web of Science: 4; SCOPUS: 5
- 8- Bonini MG, Stadler K, Silva SO, Corbett J, Dore M, Petranka J, Fernandes DC, Tanaka LY, Duma D, Laurindo FR, Mason RP: Constitutive nitric oxide synthase activation is a significant route for nitroglycerin-mediated vasodilation. **Proc Natl Acad Sci U S A** 105:8569-8574 (2008). Citações Web of Science: 9; Citações SCOPUS: 10
- 9- Bechara LRG, Tanaka LY, Bartholomeu T, Ramires PR. Exercício físico e disfunção endotelial. Suplemento da **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v. 17, p. 21-24, 2007.
Citações Citações:1
- 10- Zanchi NE, Bechara LRG, Tanaka LY, Debbas V, Bartholomeu T, Ramires PR. Efeito do treinamento físico aeróbio sobre a bioatividade do óxido nítrico e a vasodilatação aórtica. **Revista Brasileira de Educação Física e Esporte**, v. 20, p. 239-247, 2006.
- 11- Tanaka LY, Garcia Junior JR. Influência da ingestão de bebida com carboidrato no desempenho em treinamento resistido. **Revista da Educação Física**, Maringá, v. 15, p. 63-68, 2004.

V) Capítulo de livro

1- Bechara LRG, Tanaka LY, Ramires PR. Endotélio e exercício físico. In: Antônio Carlos Pereira Barreto; Carlos Eduardo Negrão. (Org.). Cardiologia do exercício. 3ªed.Barueri: Manole, 2010.

VI) Lista de financiamentos à pesquisa

(2010 - atual) Bolsa de Doutorado Regular- Dissulfeto isomerase proteica como via integrativa entre estresse oxidativo e resposta a proteínas mal-enoveladas na reparação a lesão vascular. Orientador: Francisco Rafael Martins Laurindo.

VII) Orientação em andamento

Co-orientação: Haniel Alves Araújo, bolsa Fapesp 2010/06360-0 Bolsa de Iniciação Científica Regular. Estudo de expressão gênica na resposta de reparação vascular à lesão: efeitos da supressão da dissulfeto isomerase proteica.

VII) Indicadores quantitativos.

1) Publicações: 11 / Citações: 154; 2) Capítulos de livros: 01; 3) Teses de Mestrado Defendidas: 01; 4) Orientação de Iniciação Científica: 01; 5) Participação em Bancas: 01; 6) Participação em eventos: 25; 7) Trabalhos em Congressos: 30; 9) Seminários e conferências: 25

VIII) <http://www.researcherid.com/rid/H-9832-2013>

IX) Outras informações

Artigo em processo de resubmissão: Tanaka LY, Bechara LR, Santos AM, Jordão CP, Sousa LG, Bartholomeu T, Ventura LI, Laurindo FRM, Ramires P. Increased NADPH oxidase-dependent superoxide production accompanies higher exercise-induced endothelial vasodilator function in rat aorta.

Artigo Submetido: Tanaka LY, Araújo HA, Hironaka GK, Takimura CK, Casagrande AS, Rodriguez AI, Gutierrez PS, Lemos-Neto PA, Laurindo FRM. Cell-surface protein disulfide isomerase shapes vascular architecture to counteract inward remodeling.