

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

GUILHERME GAMBOGI BRAGA

**Avaliação dos mecanismos de ação do losartan em
cultura de fibroblastos de derme deficientes em
fibrilina-1**

Campinas
2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

GUILHERME GAMBOGI BRAGA

**Avaliação dos mecanismos de ação do losartan em
cultura de fibroblastos de derme deficientes em
fibrilina-1**

Orientador: Dr. Claudio Chrysostomo Werneck

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida pelo aluno Guilherme Gambogi Braga, e orientado pelo Prof. Dr. Claudio Chrysostomo Werneck.



Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Biologia Funcional e Molecular, na área de Bioquímica.

Campinas

2015

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

B73a Braga, Guilherme Gambogi, 1985-
Avaliação dos mecanismos de ação do losartan em cultura de fibroblastos de derme deficientes em fibrilina-1 / Guilherme Gambogi Braga. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Claudio Chrysostomo Werneck.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Marfan, Síndrome de. 2. Fator de crescimento transformador beta. 3. Losartan. 4. Fibroblastos. 5. Fibrilina-1. I. Werneck, Claudio Chrysostomo, 1966-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of losartan action mechanism in dermal fibroblasts derived from fibrillin-1 deficient mice

Palavras-chave em inglês:

Marfan syndrome

Transforming growth factor beta

Losartan

Fibroblasts

Fibrillin-1

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Doutor em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Claudio Chrysostomo Werneck [Orientador]

Alexandre Bruni Cardoso

Sérgio Luis Felisbino

Marcelo Brocchi

Jörg Kobarg

Data de defesa: 06-02-2015

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 06 de fevereiro de 2015

BANCA EXAMINADORA

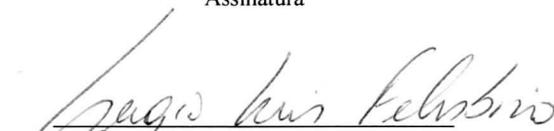
Prof. Dr. Claudio Chrysostomo Werneck (Orientador)


Assinatura

Prof. Dr. Alexandre Bruni Cardoso – USP


Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Luis Felisbino - UNESP


Assinatura

Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel - UNICAMP

Assinatura

Prof. Dr. Jörg Kobarg - UNICAMP


Assinatura

Prof. Dr. Sergio Marangoni - UNICAMP

Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Brocchi - UNICAMP


Assinatura

Prof. Dra. Maria Luiza Vilela Oliva - UNIFESP

Assinatura

Resumo

A fibrilina-1 é um importante componente da rede de microfibrilas presentes nas fibras elásticas. Mutações no gene da fibrilina-1 leva ao surgimento da Síndrome de Marfan. Esta doença afeta a elastogênese de órgãos como pulmões, pele e sistema cardiovascular. Estudos recentes têm demonstrado que o desequilíbrio na atividade de TGF-beta é importante no aparecimento dos sinais e sintomas relacionados a essa síndrome. Estas alterações podem ser revertidas pelo uso de antagonistas de TGF-beta como o princípio ativo losartan. Os mecanismos pelo qual o losartan atua ainda não estão claramente descritos na literatura. Assim, utilizando um modelo de cultura de células primárias (fibroblastos de derme) derivadas de camundongos selvagens e deficientes em fibrilina-1, foi avaliado o perfil elastogênico por ensaios de imunofluorescência, zimografia *in situ*, Real-Time PCR, microscopia eletrônica de transmissão e varredura e *western-blotting* de diferentes proteínas de matriz extracelular e moléculas sinalizadoras importantes na síntese e degradação das fibras elásticas. Os dados apresentados sugerem uma redução conjunta da deposição das proteínas MAGP-1 (83%), Tropoelastina (87,5%) e Fibilina-1 (86%) na matriz extracelular; aumento na atividade e também dos níveis de expressão gênica relativa das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9, ativação da cascata de sinalização canônica (SMAD-2) e não canônica (ERK1/2 e JNK-1) de TGF-beta e aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas culturas de fibroblastos de derme derivados de camundongos deficientes em fibrilina-1. Ao passo que ao utilizar o princípio ativo losartan (100µMol/L) como tratamento para estas células ocorreu um aumento da deposição de MAGP-1 (71,5%) e Tropoelastina (68,5%) na matriz extracelular, redução da atividade e expressão gênica relativa das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9 e inativação da sinalização canônica (SMAD-2) e não canônica (ERK1/2 e JNK-1) de atuação de TGF-beta. De uma maneira geral, nossos dados sugerem um aumento da

degradação das moléculas componentes da fibra elástica em cultura de fibroblastos de derme derivados de camundongos deficientes em fibrilina-1 em função do aumento na expressão das MMPs 2 e 9. Este aumento da degradação da matriz extracelular pode ser resultado do menor nível de fibrilina-1 na matriz produzida por estas células, super ativando a sinalização canônica (SMAD-2) e não-canônica (ERK1/2 e JNK-1) de TGF- β , o que reflete na ativação de EROs e consequentemente a ativação das proteases. O tratamento com o losartan provavelmente faz o caminho inverso reduzindo a super ativação da cascata de sinalização de TGF- β bem como a ativação da metaloproteases, aumento indiretamente a deposição de MAGP-1 e Tropoelastina na matriz extracelular destas células.

Palavras-chave: Síndrome de Marfan, deficiência em fibrilina-1, TGF-beta, fibroblastos de derme, matriz extracelular e princípio ativo losartan.

Abstract

Fibrillin-1 is an important component of the microfibrils network present in elastic fibers. Mutations in fibrillin-1 gene imply in the development of Marfan Syndrome. This disease affects elastogenesis in lungs, skin, cardiovascular system and eyes. Recent studies determined that unbalanced TGF-beta activity is an important factor in the symptoms observed this syndrome. These alterations can be reversed by the use of TGF-beta blockers such as the drug losartan. The mechanisms by which the drug losartan act are not described in the literature. Thus, using a model of primary culture cells (dermal fibroblasts) the elastogenic profile by immunofluorescence, zimograph *in situ*, Real-Time PCR, electronic microscopy and *western-blotting* of matrix proteins and signal molecules of elastic fiber synthesis and degradation was evaluated. The data presented suggest a joint reduction of the deposition of proteins MAGP-1 (83%), Tropoelastina (87.5%) and Fibilina-1 (86%) in the extracellular matrix; an increase in the activity and also the levels of gene expression of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9, activation of the signaling cascade canonical (SMAD-2) and not canonical (ERK1/2 and JNK-1) of TGF-beta and increased levels of reactive oxygen species (ROS) in cultures of fibroblasts in the dermis derived from mice deficient in fibrillin-1. While using the losartan drug (100 μ Mol/L) to treat these cells it was possible to observe an increase in deposition of MAGP-1 (71.5%) and Tropoelastina (68.5%) in the extracellular matrix, reduction of activity and gene expression of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 and inactivation of canonical signaling (SMAD-2) and not canonical (ERK1/2 and JNK-1) activity of TGF-beta. In general, our data suggest an increase in the degradation of molecules components of elastic fibers in culture of fibroblasts in the dermis derived from mice deficient in fibrillin-1 as a function in the increase in the expression of MMPs 2 and 9. This increase in the degradation of the extracellular matrix may be the result of

lower levels of fibrillin-1 in the matrix produced by these cells, super activating the canonical signaling (SMAD-2) and non-canonical (ERK1/2 and JNK-1) of TGF-beta, which reflects the activation of ROS and consequently the activation of proteases. The treatment with losartan probably takes the reverse path reducing the super activation of the signaling cascade of TGF-beta as well as the activation of metalloproteinases, indirectly increase in the deposition of MAGP-1 and Tropoelastina in the extracellular matrix of these cells.

Keywords: Marfan Syndrome, fibrillin-1 deficiency, TGF-beta, dermal fibroblasts, extracellular matrix and drug losartan.

ÍNDICE

| | |
|---|------|
| RESUMO..... | vii |
| ABSTRACT | ix |
| LISTA DE FIGURAS..... | xv |
| LISTA DE ABREVIATURAS | xvii |
| 1. Introdução..... | 01 |
| 2. Relevância e Justificativa..... | 02 |
| 3. Revisão da Literatura..... | 06 |
| 3.1 Fibras elásticas..... | 06 |
| 3.2 Microfibrilas..... | 08 |
| 3.3 Fibrilinas..... | 12 |
| 3.4 Síndrome de Marfan..... | 14 |
| 3.5 losartan | 19 |
| 3.6 Captopril..... | 21 |
| 3.7 TGF-B..... | 23 |
| 3.8 NFK-B..... | 26 |
| 3.9 Espécies reativas de oxigênio (EROs)..... | 26 |
| 3.10 Metaloproteinases (MMP's)..... | 27 |
| 4. Objetivo | 29 |
| 4.1 Objetivo geral..... | 29 |
| 4.2 Objetivos específicos..... | 31 |
| 5. Material e Métodos | 31 |
| 5.1 Animais..... | 31 |
| 5.2 Extração de fibroblastos de derme (cultura primária) | 32 |
| 5.3 Cultura de células..... | 33 |
| 5.4 Tratamentos das culturas com losartan..... | 34 |
| 5.5 Identificação Genotípica por PCR..... | 34 |
| 5.6 Imunofluorescência..... | 35 |
| 5.7 <i>Western-blotting</i> | 36 |
| 5.8 Microscopia eletrônica de varredura..... | 37 |
| 5.9 Microscopia eletrônica de transmissão..... | 38 |
| 5.10 Real time PCR..... | 39 |
| 5.11 Zimografia <i>in situ</i> | 42 |
| 5.12 Análises de vias de sinalização e quantificação TGF-B..... | 43 |
| 5.13 Análises Estatísticas..... | 44 |
| 6. Resultados..... | 45 |
| 7. Discussão..... | 81 |
| 8. Conclusão..... | 92 |
| 9. Referências Bibliográficas..... | 94 |

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente aos meus Pais Célio e Vânia por apoiarem meus estudos e dedicarem parte de suas vidas, abdicando de sonhos, vontades e fazendo grandes sacrifícios para a minha formação educacional.

A minha esposa Nyanne pelo apoio, companheirismo e amor incondicional durante todos esses anos, que esteve presente nos piores e melhores momentos dessa longa caminhada e que de certa forma faz parte desta grande vitória.

Aos meus irmãos Gustavo, Karina e Fernanda por fazerem parte da minha família, tornando minha vida mais serena.

Ao meu orientador e querido amigo Claudio Chrysostomo Werneck, pelo apoio em todos os momentos.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório: Neto, Tallita, Juliana, Giane, Camila, Ana Cláudia, Micheli, Flávio e Daniel por todos ensinamentos, aprendizados, apoio, e um ótimo clima de trabalho e amizade.

Aos Professores José Camillo, Cristina Pontes Vicente, Eduardo Galembeck, Fernanda Gadelha pelos ensinamentos.

As agências financiadoras CAPES e FAPESP pelo auxílio no desenvolvimento da pesquisa.

E a todos de que certa forma contribuíram para a conclusão deste trabalho, muito obrigado!

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Eletromicrografia do tecido rico em fibra elástica..... | 07 |
| Figura 2 – Esquema de inibição do receptor AT1 por losartan..... | 20 |
| Figura 3 – Mutação no gene fibrilina-1, com a deleção dos éxons 19 a 24 e, a inserção do cassete de neomicina, em que resultou nos animais $Fbn1^{mg\Delta/+}$ | 32 |
| Figura 4 – Sequências de primers utilizadas na técnica de Real time -PCR..... | 42 |
| Figura 5 – Identificação genotípica de camundongos por PCR..... | 47 |
| Figura 6 - Visualização dos fibroblastos de derme em cultura e das fibras elásticas na matriz extracelular..... | 48 |
| Figura 7 – Tempo de formação das microfibrilas de Fibrilina-2 por imunofluorescência em cultura primária de fibroblastos de derme derivados de camundongos selvagens..... | 49 |
| Figura 8 – Redução da deposição das microfibrilas de MAGP-1, Tropoelastina e Fibrilina-1 por imunofluorescência em cultura de fibroblastos selvagens e deficientes em fibrilina-1..... | 51 |
| Figura 9 – Visualização das microfibrilas por microscopia eletrônica na matriz extracelular da cultura de fibroblastos selvagens e deficientes em fibrilina-1..... | 53 |
| Figura 10 – Redução da expressão das proteínas MAGP-1, Tropoelastina e Fibrilina-1 em cultura celular de fibroblastos derivados de camundongos selvagens e deficientes em fibrilina-1..... | 55 |
| Figura 11 – Aumento nos níveis de expressão gênica relativa (mRNA) de MMP-2 e MMP-9 quantificados por PCR-Real time na cultura celular de fibroblastos de derme derivados de camundongos selvagens e deficientes em fibrilina-1..... | 57 |
| Figura 12 – Aumento da deposição das microfibrilas de MAGP-1 e Tropoelastina por imunofluorescência após o tratamento com princípio ativo losartan..... | 59 |
| Figura 13 – Aumento da expressão das proteínas MAGP-1 e Tropoelastina em cultura celular de fibroblastos derivados de camundongos selvagens e deficientes em fibrilina-1 após o tratamento com o princípio ativo losartan..... | 63 |
| Figura 14 – Redução dos níveis de expressão gênica relativa(mRNA) de MMP-2 e MMP-9 quantificados por Real-time PCR após tratamento com o princípio ativo losartan..... | 66 |

| | |
|--|----|
| Figura 15 – Não alteração da expressão das proteínas MAGP-1 e Tropoelastina em cultura celular de fibroblastos de derme derivados de camundongos selvagens e deficientes em fibrilina-1 após o tratamento com o princípio ativo captopril, angiotensina I e II..... | 68 |
| Figura 16 – Aumento dos níveis de TGF ativo semi-quantificados por ELISA..... | 70 |
| Figura 17 – Aumento da expressão de SMAD-2 em cultura celular de fibroblastos de derme derivados de camundongos selvagens e deficientes em fibrilina-1..... | 72 |
| Figura 18 – Aumento da expressão de ERK1/2 e JNK-1 em cultura celular de fibroblastos de derme derivados de camundongos selvagens e deficientes em fibrilina-1..... | 75 |
| Figura 19 – Aumentos dos níveis de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em cultura de fibroblastos de derme derivados de camundongos selvagens e deficientes em fibrilina-1..... | 77 |
| Figura 20 –Redução da expressão de NFκ-B em cultura de fibroblastos de derme derivados de camundongos selvagens e deficientes em fibrilina-1..... | 78 |
| Figura 21 – Aumento da atividade de enzimas metaloproteinases de matriz extracelular em cultura de fibroblastos de derme derivados de camundongos selvagens e deficientes em fibrilina-1..... | 80 |
| Figura 22 – Esquema de atuação do losartan no perfil elastogênico de fibroblastos de derme derivados de camundongos deficientes em fibrilina-1..... | 91 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE – Enzima conversora de Angiotensina
AngII – Angiotensina II
AT1 – Receptor 1 de angiotensina II
BMP – *Bone morphogenetic Protein* (proteína morfogênica do osso)
Ct = *threshold cycle* (limiar do ciclo)
DAPI – 4'6-diamidino-2-phenylindole (4'6-diamidino-2-fenilindol)
DEPC – Dietilpirocarbonato
DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (Meio de cultura Dulbecco modificado por Eagle)
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF – *Epidermal factor growth* (fator de crescimento epidermal)
ERK1/2 – *Extracellular-signal-regulated kinase* (sinal extracelular regulado por quinase)
EROs – espécies reativas de oxigênio
FBN1 – Gene fibrilina-1
Fbn1^{+/+} - Animal selvagem
Fbn1^{mgΔ/mgΔ} - Animal homozigoto para mutação no gene da fibrilina-1
Fbn1^{mgΔ/+} - Animal heterozigoto para mutação no gene da fibrilina-1
FGF – *Fibroblast growth factor* (fator de crescimento de fibroblasto)
Fibrilina-1 -/- - Animal homozigoto para mutação no gene da fibrilina-1
Fibrilina-1 -/+ - Animal heterozigoto para mutação no gene da fibrilina-1
Fibrilina-1 +/+ - Animal selvagem
FITC – Isotiocianato de fluoresceína
GAPDH – *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* (gliceraldeído 3- fosfato desidrogenase)
GLUT – Transportador de glicose
JNK-1 – *c-Jun N-terminal kinases* (quinases c-Jun N-terminal)
LAP – *Latency associated peptide* (peptídeo associado a latência)
LOS – Losartan
Losartan – Princípio ativo losartan
LOX-1 – *Lysyl oxidases-1* (enzima lisil-oxidase)
LTBP-1 - *Latente TGF-beta binding protein* (proteína de ligação ao complexo latente TGF-beta)
MAGP – *Microfibril-Associated Glycoprotein* (glicoproteína associada à microfibrila)
MEC – Matriz extracelular
MMP- *Matrix Metalloproteinase* (metaloproteínases de matriz extracelular)
MFS- *Marfan syndrome* (síndrome de marfan)
PBS – *Phosphate Buffered Saline* (tampão salina fosfato)
SMAD-2 - *Small 'mothers against' decapentaplegic* (sinalizador de ativação gênica nuclear)
TGF-β – *Transforming Growth Factor-β* (fator de crescimento transformante beta)

1. Introdução

As fibras elásticas são importantes componentes da matriz extracelular de estruturas ou órgãos que são submetidos à constante estresse mecânico, tais como pulmão, pele e grandes vasos (Ross, 1973). Por meio de uma análise ultraestrutural das fibras, é possível identificar dois componentes bem distintos: uma rede de microfibrilas, com diâmetro de aproximadamente 12 nm, entremeada por uma substância mais elétron-densa e amorfa formada pela elastina. As microfibrilas por sua vez são constituídas por vários componentes dos quais se destacam as fibrilinas, que são os componentes majoritários, e outras moléculas como as MAGPs (“Microfibril-Associated GlycoProtein), fibulinas, dentre outras (Kielty *et al.*, 2002; Kielty *et al.*, 2005).

Há algum tempo, muitos pesquisadores têm demonstrado a importância de moléculas da matriz extracelular não só como parte estrutural, mas também na determinação das funcionalidades das células, regulando a ação de fatores que influenciam os mais diferentes processos celulares, desde a diferenciação até a proliferação (Rosenbloom *et al.*, 1993). Com as moléculas que compõem as microfibrilas não tem sido diferente. Por exemplo, pacientes portadores da síndrome de marfan apresentam mutações no gene da fibrilina-1 (Dietz e Pyeritz, 1995). Esta doença se caracteriza por um grande comprometimento e alteração do desenvolvimento do esqueleto ósseo, dos pulmões e formação dos grandes vasos como a artéria aorta, podendo esta, nos casos de aneurismas (ruptura), conduzir o paciente a óbito. Dados recentes da literatura demonstram que estas anomalias estão relacionadas a uma desregulação da atividade do TGF- β (*transforming growth factor*) devido à diminuição de fibrilina-1 na matriz extracelular (Neptune *et al.*, 2003a; Massam-Wu *et al.*, 2010).

Utilizando camundongos modificados geneticamente, que servem como modelo de estudo para esta síndrome, foi observado que o tratamento com losartan, anti-hipertensivo que atua como um bloqueador do receptor AT1 de angiotensina II, que dentre outras atividades, diminui a expressão e ativação de TGF β , têm levado a reversão dos sinais clínicos característicos de Marfan nestes camundongos (Habashi *et al.*, 2006). Muito embora os sinais clínicos sejam revertidos, o mecanismo pelo qual o losartan atua ainda não está muito claro e diferentes mecanismos de ação tem sido propostos a fim de explicar uma possível ação do fármaco na atenuação dos sinais e sintomas da Síndrome de Marfan (Habashi *et al.*, 2006; Holm *et al.*, 2011; Xiong *et al.*, 2012). Nosso estudo teve como objetivo geral avaliar o perfil de expressão de componentes relacionados com a elastogênese e as possíveis vias sinalização e mecanismos de ação do losartan em cultura de fibroblastos de derme derivados de camundongos deficientes em fibrilina-1.

2. Relevância e Justificativa

As fibras elásticas são importantes estruturas complexas presentes na matriz extracelular e formada por numerosos componentes, dos quais se destacam, quando analisados por microscopia eletrônica, a elastina e as microfibrilas (Cotta-Pereira *et al.*, 1976). As microfibrilas por sua vez são formadas principalmente por fibrilinas, mas também contém outras moléculas associadas como as glicoproteínas associadas às microfibrilas (MAGPs), fibulinas e emilinas (Kielty *et al.*, 2002). As microfibrilas são filamentos que apresentam de 10 a 12 nm de diâmetro e apresentam como principal componente estrutural as fibrilinas (Kielty *et al.*, 2005). As fibrilinas são glicoproteínas de alto peso molecular, aproximadamente 340 kDa e apresentam uma grande

complexidade de domínios (Sakai *et al.*, 1991). Até o momento, foram caracterizadas três fibrilinas 1, 2 e 3. Estas glicoproteínas se caracterizam por apresentar domínios semelhantes aqueles que se ligam ao Fator de Crescimento Epidérmico (*EGF-like*), intercalados por domínios semelhantes aos encontrados nas proteínas que ligam ao complexo latente do TGF-beta (*TGF-like ou TB-like*). A principal diferença estrutural entre a fibrilina 1 e 2, que são as moléculas mais estudadas, é que a primeira apresenta um domínio rico em prolina no exon 10, enquanto que na segunda, este domínio mesmo domínio é rico em glicina (Handford *et al.*, 2000; Charbonneau *et al.*, 2003). Outra diferença importante é que apesar de ambas apresentarem em seu exon 37 um sítio de ligação de integrina, do tipo RGD, na fibrilina 2 há um sítio adicional no exon 24 (Werneck *et al.*, 2004).

Embora diferentes estruturalmente e normalmente apresentando distribuições distintas nos tecidos ao longo da idade, estas isoformas podem, algumas vezes, coincidirem em determinados momentos nos tecidos durante o seu desenvolvimento e na fase adulta, sendo que a isoforma mais encontrada em humanos adultos é a fibrilina 1 (Kielty *et al.*, 2005). Fibrilina 3 é o membro da família que foi menos estudado e pouco se sabe sobre sua função.

Muito embora, até o momento, não haja nenhuma evidência experimental da ligação de complexos latentes de TGF β (*Transforming Growth Factor β*) diretamente aos domínios *TGF-like* apresentados pela fibrilina-1 (Kielty *et al.*, 2005), existem dados na literatura científica demonstrando que o complexo formado pelo TGF β com a proteína LTBP-1 (*Latent-TGF β Binding Protein-1*) é capaz de se ligar a fibrilina-1 (Isogai *et al.*, 2003), sugerindo que a fibrilina-1 possa ser importante para a homeostase deste fator crescimento.

Pessoas que apresentam mutação no gene da fibrilina-1 e conseqüentemente uma menor quantidade desta molécula na matriz extracelular desenvolvem a síndrome de Marfan (Judge e

Dietz, 2005). Esta doença é caracterizada por uma desordem sistêmica do tecido conjuntivo e tem como principais manifestações clínicas aneurismas na aorta ascendente, deslocamento do cristalino e crescimento exacerbado dos ossos. A síndrome de Marfan é uma doença hereditária autossômica dominante, com incidência de 2 a 3 casos a cada 10.000 nascimentos (Judge e Dietz, 2005). Cerca de 90% dos óbitos dentre estes pacientes estão associados com problemas cardiovasculares (dissecção ou aneurisma da aorta, problemas da válvula aórtica e doença cardíaca congestiva). Nos Estados Unidos, o número de óbitos resultantes desta doença foi bastante reduzido com a cirurgia de reconstrução do tronco aórtico, evitando assim a principal causa de morte, o que faz com que os pacientes diagnosticados tenham expectativa de vida de uma pessoa normal (Judge e Dietz, 2008).

Atualmente, acredita-se que a haplo-insuficiência, ou seja, metade da produção da molécula de fibrilina-1 normal é crítica para a expressão clínica da doença. Esta hipótese é baseada em resultados obtidos em estudos com camundongos transgênicos (Judge *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2011).

Estudos realizados utilizando camundongos que expressavam a forma mutante da fibrilina-1 (C1039G), o qual apresentava uma mutação no resíduo número 1039, substituindo uma cisteína por uma glicina, demonstraram que estes animais apresentavam alterações na deposição das microfibrilas, deformidades ósseas e deterioração progressiva da arquitetura da parede aórtica (Habashi *et al.*, 2006).

Aparentemente, a ausência de uma forma correta de comunicação entre as fibras elásticas e as células musculares lisas, papel supostamente desempenhado pela fibrilina-1, leva estas células a expressarem moléculas como as metaloproteinases (MMPs) 2 e 9, promovendo a perda funcional das fibras elásticas, inflamação da parede vascular, hiperplasia da íntima devido à

migração e hiperplasia de células musculares lisas e, finalmente, colapso estrutural da parede do vaso (Pereira *et al.*, 1997; Pereira *et al.*, 1999). Estas características patológicas também foram encontradas em grandes artérias musculares de pacientes com síndrome de Marfan (Bunton *et al.*, 2001).

Dados recentes da literatura dão suporte à hipótese de que mutações no gene da fibrilina-1 levam a ativação exacerbada do complexo latente de TGF β . Esta atividade exacerbada, quando estabelecida em camundongos por mutação no gene da fibrilina-1, leva ao aparecimento de determinados sinais clínicos encontrados na síndrome de Marfan, como os aneurismas aórticos e dissecção (Kielty *et al.*, 1996; Neptune *et al.*, 2003; Judge *et al.*, 2004). O tratamento de camundongos modelos da síndrome de Marfan com antagonistas do TGF β tais como anticorpos anti-TGF β ou com um bloqueador dos receptores AT1 de angiotensina II, losartan, leva a reversão destes sintomas (Habashi *et al.*, 2006). Estes dados reforçam a hipótese de que a fibrilina-1 participa na regulação da atividade do TGF- β .

Porém, os mecanismos de ação e as vias de sinalização pelo qual o losartan atua, ainda não estão claros na literatura científica. Assim, a compreensão dos mesmos é de fundamental importância no desenvolvimento de fármacos específicos para o tratamento de pacientes portadores da Síndrome de Marfan, diminuindo os riscos causados com o uso de medicamentos inespecíficos, bem como, reações adversas e efeitos colaterais.

3. Revisão da Literatura

3.1 Fibras Elásticas

Os tecidos conjuntivos atuam no estabelecimento e manutenção da forma do corpo, o que lhes conferem importante papel biomecânico que só é possível existir graças ao conjunto de macromoléculas, depositadas pelas células do tecido em grande quantidade e organizadas ao redor de si mesmas conhecida como a matriz extracelular (MEC).

Dos componentes formadores do tecido conjuntivo (celulares, fibrilares e substância fundamental da MEC), os fibrilares proporcionam principalmente suporte fino às células, resistência às forças de tração e compressão e elasticidade aos tecidos.

As fibras elásticas são importantes componentes da matriz extracelular de estruturas ou órgãos que são submetidos à constante estresse mecânico, tais como pulmão, pele e grandes vasos. Assim, as fibras elásticas por contribuírem para deformação elástica de órgãos, são componentes abundantes na MEC do tecido conjuntivo que constitui o estroma de órgãos que possuem habilidade de deformar repetidamente e reversivelmente como a bexiga (Koo *et al.*, 1998), o tendão (Caldini *et al.*, 1990; De Carvalho *et al.*, 1994; De Carvalho e Campos Vidal Bde, 1995), a pele (Cotta-Pereira *et al.*, 1976; Kielty *et al.*, 1993), o ligamento periodontal (Takagi *et al.*, 1989) e o pulmão (Fukuda *et al.*, 1984; Leick-Maldonado *et al.*, 1997).

Por meio da análise ultra estrutural, é possível identificar dois componentes bem distintos: uma rede de microfibrilas com diâmetro de aproximadamente 10 a 12 nm entremeada por uma substância mais elétron-densa e amorfa formada pela elastina (Figura 1). No que diz respeito à composição proteica das fibras elásticas, estas constituem um componente altamente insolúvel da MEC. Sua composição compreende a ligação-cruzada da elastina organizada em um arcabouço

de microfibrilas rico em fibrilinas e outras moléculas associadas (Kielty *et al.*, 2002; Kielty, 2006).

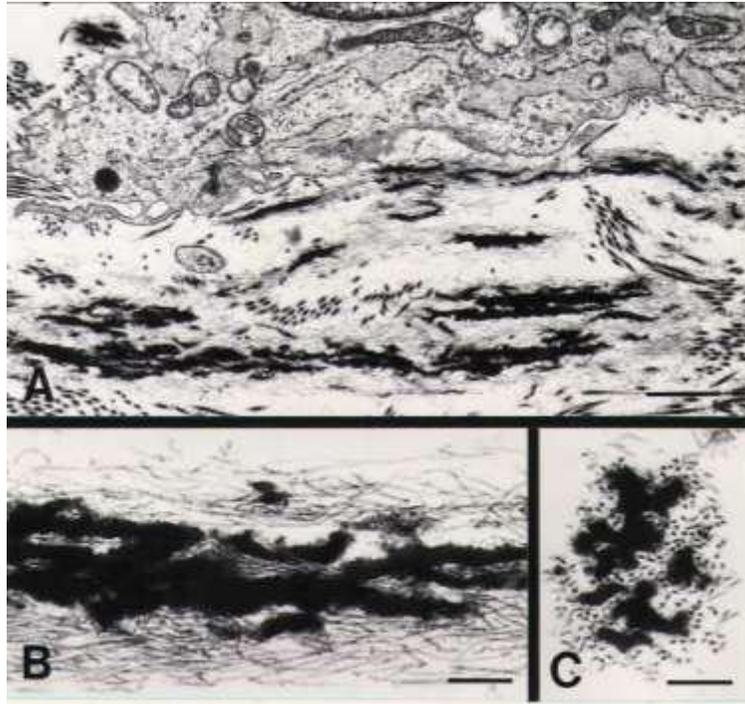


Figura 1 - Eletromicrografia de tecido rico em fibra elástica (aorta) em desenvolvimento. A – Visão geral do tecido rico em fibra elástica. B e C – Presença de uma região mais eletrondensa, a elastina, e a rede de microfibrila. B – Corte longitudinal e C – Corte transversal (Davis, 1994).

Análises ultra estruturais e das proteínas constituintes demonstram que as fibras elásticas são estruturas complexas, que requerem expressão gênica coordenada temporal e espacialmente, a fim de garantir a polimerização do monômero de elastina (tropoelastina) e determinar a arquitetura final da fibra, de acordo com as necessidades funcionais e estresses mecânicos impostos sobre o tecido (Mecham *et al.*, 1981; Rosenbloom *et al.*, 1993). No tecido conjuntivo propriamente dito de mamíferos adultos, as fibras elásticas ditas maduras são compostas predominantemente por polímeros de elastina que se agregam no meio extracelular sob ação enzimática de um conjunto de proteínas que

se ancoram ou mesmo constituem tramas microfibrilares (Rosenbloom *et al.*, 1993; Swee *et al.*, 1995).

3.2 Microfibrilas

Em uma análise ultra estrutural, associadas ou não à elastina, as microfibrilas são caracterizadas como estruturas tubulares, com 10-12nm de diâmetro, aproximadamente (Swee *et al.*, 1995). Essa análise ultra estrutural revela também que as microfibrilas têm aparência semelhante a um “colar de contas”. Se de certa forma as propriedades elásticas das fibras elásticas de mamíferos dependem do seu componente amorfo – a elastina (Ross e Bornstein, 1969), por outro lado, sabe-se que as fibras compostas apenas por microfibrilas, sem material amorfo, não são altamente resistentes quanto à função elástica (Ross *et al.*, 1977) e atuam no sentido de preservar uma possível ação dinâmica (Edwards, 1968).

As microfibrilas parecem ter funções globais de suporte à deposição de tropoelastina e formação das fibras elásticas maduras (Raghunath *et al.*, 1996); extensibilidade dos tecidos elásticos maduros (Lillie *et al.*, 1998); ancoragem de tecidos não elásticos como as zônulas ciliares (Wheatley *et al.*, 1995); suporte e adesão dos endotélios e outras células epiteliais às fibras elásticas via receptores celulares (Sakamoto *et al.*, 1996); adesão de plaquetas (Robinson e Godfrey, 2000); sinalização e funcionalidade celular, por meio da interação com TGF- β e *Bone Morphogenetic Proteins* (BMPs) (Ramirez e Sakai, 2010), entre outros.

As microfibrilas são constituídas por vários componentes dos quais se destacam as fibrilinas, que são os componentes majoritários, e outras moléculas como as *Microfibril-Associated GlycoProtein* (MAGPs), fibulinas e Emilina-1 (Kielty *et al.*, 2005; Wagenseil e Mecham, 2007) (Figura 1.1), as quais tornam a elastogênese, isto é, a produção de fibras elásticas

funcionais, um processo complexo e ainda não muito bem compreendido (Thomassin *et al.*, 2005; Wagenseil e Mecham, 2007).

Uma das principais funções das microfibrilas é participar na formação das fibras elásticas. Durante o desenvolvimento, a rede de microfibrila funciona como um molde para a deposição apropriada de tropoelastina, para a posterior ação das enzimas lisil-oxidases, promovendo as reações de “cross-linking” entre estes monômeros, formando, então, o polímero insolúvel e amorfo de elastina (Figura 1.2).

| Table 1. Structural and associated molecules of microfibrils and elastic fibres | | |
|--|--|-------------|
| Molecule | Elastic-fibre location | Refs |
| Fibrillin-1 | Microfibrils | 36, 37, 38 |
| Fibrillin-2 | Microfibrils | 36 |
| Fibrillin-3 | Unknown – likely in microfibrils | 34 |
| MAGP-1 | Microfibrils | 37, 58 |
| MAGP-2 | Some microfibrils | 39, 40 |
| LTBP-1 | Some microfibrils; also fibronectin | 41, 44, 63 |
| LTBP-2 | Microfibrils, elastic fibres | 42, 44 |
| LTBP-3 | Fibrillar structures | 44 |
| LTBP-4 | Fibrillar structures, fibrillin | 44 |
| Decorin | Microfibrils, microfibril–elastic-fibre interface | 30, 67, 68 |
| Biglycan | Elastic-fibre core | 30, 68 |
| Versican | Some microfibrils | 47 |
| Heparan sulphate | Microfibrils, elastic-fibre core | 60, 61 |
| Perlecan | Microfibrils | 62 |
| MFAP-1 | Some microfibrils | 159 |
| MFAP-3 | Some microfibrils | 160 |
| MFAP-4 (MAGP-36) | Some microfibrils | 161 |
| β IgH3 | Elastic-fibre–collagen interface | 162 |
| Tropoelastin | Elastic-fibre core | 1, 2 |
| LOX | Newly secreted tropoelastin, microfibril–elastin interface | 163 |
| LOXL | Microfibril–fibulin-5–elastin interface | 163 |
| Fibulin-1 | Elastic-fibre core | 164, 165 |
| Fibulin-2 | Elastin–microfibril interface | 64 |
| Fibulin-4 | Unknown – likely in elastic-fibre core | 9 |
| Fibulin-5 | Elastic-fibre–cell interface | 7, 8 |
| Emilin-1 | Elastin–microfibril interface | 46 |
| Emilin-2 | Elastin–microfibril interface | 46 |
| Elastin-binding protein | Newly secreted tropoelastin | 89, 91 |
| Vitronectin | Some microfibrils in dermal tissues | 166 |
| Amyloid | Some microfibrils in dermal tissues | 166 |
| Collagen VIII | Vascular elastic fibres | 48 |
| Collagen XVI | Dermal microfibrils | 167 |
| Endostatin (C-terminus of collagen XVIII) | Vascular elastic fibres | 168 |
| Collagen VI | Some microfibrils | 169 |

Abbreviations: β IGH3, also known as transforming growth factor- β -inducible gene-H3 and as keratopithelin, on chromosome 5q31; LOX, lysyl oxidase; LOXL, lysyl oxidase-like; ITBP, latent-transforming-growth-factor- β -binding protein; MAGP, microfibril-associated glycoprotein; MFAP-1, microfibril-associated protein-1.

Figura 1.1 – Moléculas componentes ou associadas às microfibrilas e às fibras elásticas (Kielty, 2006).

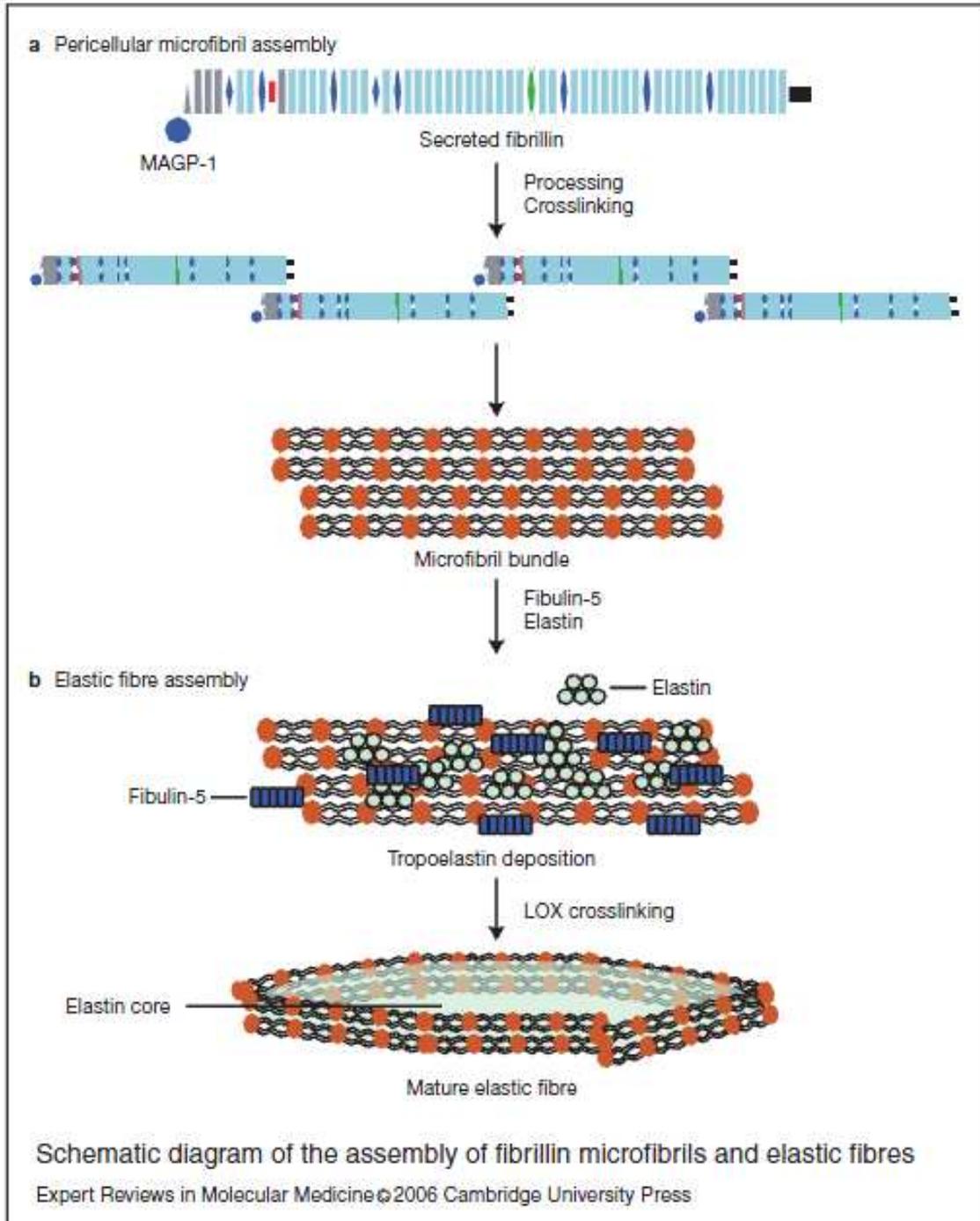


Figura 1.2 – Esquema ilustrativo da formação das fibras elásticas maduras (Kielty, 2006).

3.3 Fibrilinas

As fibrilinas, principais componentes das microfibrilas presentes em vertebrados e invertebrados, são glicoproteínas de alto peso molecular (~350kDa) ricas em cisteína e responsáveis pelas propriedades biomecânicas da maioria dos tecidos e órgãos. Descrita por (Sakai *et al.*, 1986) a fibrilina-1 foi a primeira a ser isolada, já a fibrilina-2 foi descrita posteriormente por Lee *et al* (1991). Um terceiro gene de fibrilina identificado no genoma de todos os metazoários cuja proteína foi denominada de fibrilina-3, está inativo em roedores devido a um rearranjo cromossomal (Corson *et al.*, 2004) e a função dessa fibrilina ainda é desconhecida.

Uma das diferenças reconhecidas entre as fibrilinas diz respeito às sequências de aminoácidos das moléculas, que podem ser ricas em resíduos de prolina (fibrilina-1), de glicina (fibrilina-2) ou de ambos (fibrilina-3) e no número de domínios RGD (Arg-Gly-Asp) ligantes de integrinas (Ramirez e Dietz, 2007a). Essas sequências RGD e domínios ligantes de integrinas interagem com proteoglicanos heparan-sulfato da superfície celular (Ritty *et al.*, 2003). Sendo assim, as fibrilinas atuam como arcabouços de sinalização celular por meio desses receptores (Wagenseil e Mecham, 2007).

Determinadas alterações genéticas que atuam na correta sinalização de formação das fibras elásticas maduras, são responsáveis pelo aparecimento de diversas doenças que podem atuar em diversos órgãos vitais ao organismo humano. Experimentos com camundongos geneticamente modificados, deficientes em fibrilina-1 e 2, permitiram identificar que tais deficiências resultam em uma elastogênese temporal e espacialmente prejudicada, confirmando a importância destes componentes microfibrilares na organização inicial e homeostase das fibras elásticas para maturação e funcionalidade de vasos sanguíneos durante a vida neonatal (Carta *et al.*, 2006). Estudos anteriores

na literatura científica revelaram que a arquitetura tecido-específica das microfibrilas se constitui em uma rede estrutural capaz de especificar a concentração local e o momento adequado para liberação das moléculas sinalizadoras durante a morfogênese e remodelação tecidual (Ramirez *et al.*, 2004; Ramirez e Dietz, 2007).

O *locus genômico* da *FBNI* é dividido em 65 exons que codificam uma pro-fibrillin-1, uma glicoproteína de 350 kD rica em cisteína que é secretada e processada em fibrilina-1. A Fibrilina-1 exibe uma estrutura modular com domínios repetitivos. O domínio mais comum é o EGF-like (fator de crescimento epidérmico) que ocorre 47 vezes. Estes contêm seis resíduos de cisteína conservados, associados a três pontes dissulfeto. Quarenta e três módulos EGF também contêm uma sequência denominada cálcio-ligante (cbEGF). Os domínios cbEGF são intercalados por sete regiões com oito cisteína, que tem homologia ao TGF-like (complexo latente do Fator de Crescimento transformante) (Biery *et al.*, 1999).

Evidências resultantes de conformações moleculares indicaram que as fibrilinas formam arranjos supramoleculares com LTBPs, fibulinas, TGF- β , BMPs, integrinas, proteoglicanos e elastina na MEC (Wagenseil e Mecham, 2007; Ramirez e Rifkin, 2009). Neste sentido, os macro-agregados de fibrilinas são responsáveis por duas funções cruciais na fisiologia animal, pois promovem um arcabouço estrutural que dão suporte às propriedades biomecânicas dos tecidos conjuntivos, mas também agem como “plataformas instrutivas”, capazes de agregar, armazenar e liberar moduladores solúveis do comportamento celular como TGF- β e BMPs (Ramirez e Rifkin, 2009). Estes fatores de crescimento são potentes reguladores da sobrevivência e diferenciação celular, homeostase tecidual e respostas à injúria celular (Massague e Chen, 2000).

3.4 Síndrome de Marfan

Em 1955, McKusick *et al* introduziram uma nova classe de doenças denominada de “Desordens do tecido conjuntivo” (Mckusick, 1995). A síndrome de Marfan foi relatada pela primeira vez em 1896 e é provavelmente o exemplo mais conhecido dessa classe de desordens que compreendem hoje mais de 200 condições distintas. Nos últimos anos, tornou-se evidente que o que era conhecido como síndrome de Marfan, é na verdade um grupo de distúrbios causados por vários genes dos quais o gene da Fibrilina-1 (*FBNI*) pode ser visto como um paradigma. A síndrome de Marfan é uma herança autossômica dominante com completa penetrância, mas com considerável variabilidade de dados-clínicos, variando de leve manifestações musculoesqueléticas ou oculares a uma apresentação neonatal grave, que na maioria das vezes, vêm ocasionar o óbito do paciente (Frydman, 2008). Tendo em vista o amplo espectro clínico da doença, o termo microfibrilopatias tem sido sugerido para descrever todo o espectro de manifestações clínicas.

Em 1896, Antoine-Jean-Bernard Marfan relatou o caso de uma menina de cinco anos de idade com longos membros, contraturas digitais e conjunta, e cifo-escoliose (Gott, 1998). Embora a paciente possa ter apresentado aracnodactilia contratural (síndrome de Beals), o nome Marfan foi usado para designar a combinação de sintomas associados a defeitos no gene *Fbn1*.

O aparecimento de distúrbios da aorta foi reconhecido apenas em 1943, e o papel da dilatação da aorta na redução da expectativa de vida foi esclarecido em 1972 (Murdoch *et al.*, 1972). O papel da fibrilina-1 na patogênese foi demonstrado por (Hollister *et al.*, 1990), e o locus da doença foi posteriormente atribuído ao cromossomo 15q21.1 (Kainulainen *et al.*, 1990). A prova de que mutações no gene fibrilina-1 (*Fbn1*) podem causar síndrome de Marfan foi fornecido por (Dietz *et al.*, 1991).

Mutações *missense* representam cerca de dois terços de todas as mutações identificadas até o momento, e a maioria destas mutações afeta um dos 43 domínios cbEGF de fibrilina-1, geralmente levando a uma substituição de um dos seis resíduos de cisteína, altamente conservados, ou das sequências dos resíduos ligantes de cálcio. As mutações associadas aos códons de terminação ou que afetam uma região de “splicing” resultando no salto de leitura de exons, também são relativamente comuns (Zhao *et al.*, 2009; Aalberts *et al.*, 2010; Hilhorst-Hofstee *et al.*, 2010; Khau Van Kien *et al.*, 2010).

A síndrome de Marfan neonatal representa a mais severa dentro dos espectros clínicos das fibrilinosopatias e está associada com mutações nos exons 24-32. Os indivíduos afetados são geralmente diagnosticados ao nascimento ou pouco depois. Entre as características mais comuns tem-se a rigidez e contraturas articulares, dolicocefalia, aracnodactilia, cianose, pele frouxa, dentre outras. A insuficiência cardíaca congestiva associada à regurgitação mitral e tricúspide é a principal causa de morte, enquanto que a dissecação da aorta é menos comum (Tiecke *et al.*, 2001). A sobrevivência desses pacientes é baixa, chegando a não ultrapassar 24 meses (Tiecke *et al.*, 2001). Dentre os espectros fenotípicos mais leve estão as fibrilinosopatias com ectopia lentis isolada ou as anormalidades esqueléticas, ou várias combinações destas anormalidades, mas sem dilatação da aorta (Robinson *et al.*, 2006).

Embora algumas mutações específicas terem sido associadas com alguns fenótipos, os mecanismos sobre a forma a qual se têm a modificação da apresentação clínica estão ainda a serem descobertos (Robinson *et al.*, 2002).

Os estudos com animais geneticamente modificados e criados como modelo de estudo de diversas doenças são de grande importância no desenvolvimento das pesquisas científicas. Mutações no gene da fibrilina-1 em humanos resultam na síndrome de Marfan, enquanto que as alterações

genéticas no gene da fibrilina-2 resultam na aracnodactilia contratural congênita (Lee *et al.*, 1991) (Park *et al.*, 1998) (Chaudhry *et al.*, 2001). Essas mutações são denominadas em conjunto de fibrilinopatias e resultam em severas alterações no sistema esquelético e articular, bem como problemas de natureza cardiovascular (Robinson *et al.*, 2002) (Dietz *et al.*, 2005). Em virtude de algumas diferenças de expressão e patologia dessas doenças, têm-se sugerido que as fibrilinas possuem funções relacionadas, porém distintas, que ainda não foram totalmente esclarecidas (Ramirez e Pereira, 1999).

No que diz respeito ao TGF- β , sabe-se que ele interage com *Latency Associated Peptide* (LAP), permanecendo ligado à célula até que outra proteína, a LTBP ligue-se por pontes dissulfeto, formando um complexo capaz de ser secretado à MEC (Figura 1.3) e se ligar à região N-terminal da fibrilina-1 (Munger *et al.*, 1997; Hyytiainen *et al.*, 2004; Rifkin, 2005). Este complexo é capaz de interagir com outras moléculas extracelulares, como proteoglicanos, fibulina-4, MAGP-1, EMILINA-1 e lisil oxidases (Ramirez e Sakai, 2010). A atividade do TGF- β é modulada na MEC pela ligação e sequestro dos grandes complexos latentes dos ativadores presentes na superfície celular, tais como plasmina e integrinas (Munger *et al.*, 1998; Munger *et al.*, 1999)). Assim, mutações no gene da fibrilina-1 podem resultar no sequestro incorreto dos complexos LTBP da MEC e aumentar a atividade do TGF- β (Kartinen e Warburton, 2003). Além disto, mutações nos genes de receptores do TGF- β (TGFBR1 e TGFBR2) têm destaque em muitas doenças com variados graus de similaridade à síndrome de Marfan clássica, incluindo a síndrome Loeys-Dietz e aneurismas torácicos aórticos (Mizuguchi *et al.*, 2004).

Ainda no que diz respeito aos fatores tróficos que atuam nos tecidos conjuntivos, sabe-se que BMPs são armazenados de modo diferente que o TGF- β nas microfibrilas. Os BMPs podem interagir diretamente com as microfibrilas por meio de interações não covalentes entre seus pró-domínios e a

região N-terminal da fibrilina-1 e 2 e, podem ser ativados por proteólise de seus antagonistas (Ramirez e Sakai, 2010). Sugawara *et al* (2009) e Cini *et al* (2009) sugeriram a possibilidade de que as fibras oxitalânicas podem servir como reguladores da sinalização mediada por BMPs no ligamento periodontal durante a homeostase ou mesmo durante a regeneração tecidual.

Consequentemente, a biogênese defeituosa e/ou respostas celulares a uma matriz anormal podem contribuir para perda de regulação destas vias de sinalização, como observado na síndrome de Marfan (Neptune *et al.*, 2003; Ramirez e Rifkin, 2009).

Embora a sinalização inadequada do TGF- β na patogênese da síndrome de Marfan e a eficiência terapêutica do losartan, antagonista do TGF- β , demonstrada em camundongos deficientes em fibrilina-1 por (Habashi *et al.*, 2006) em que se observou evidências histológicas de redução do aneurisma aórtico e melhora na septação alveolar e hipoplasia muscular, os mecanismos precisos da ação deste fármaco ainda permanecem desconhecidos.

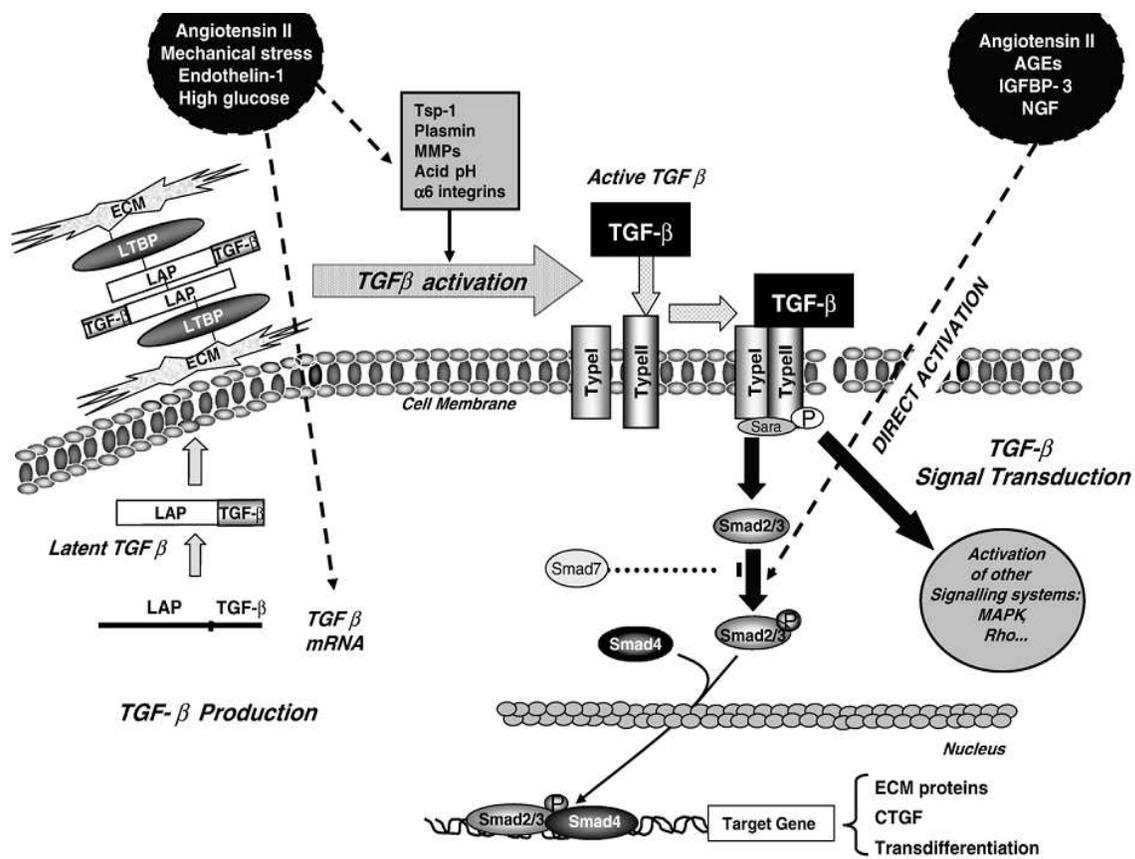


Figura 1.3 – Síntese, exportação e ativação do complexo latente de TGF-beta na MEC (Ruiz-Ortega *et al.*, 2007).

3.5 Losartan

O losartan, princípio ativo comumente utilizado como um agente anti-hipertensivo é um inibidor do receptor AT1 de angiotensina II (Figura 2). É atualmente comercializado por várias empresas, tendo sido inicialmente desenvolvido pela *Merck Sharp & Dohme*, e em 1995 aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) e comercializado sob o nome *Cozaar*. O losartan foi o primeiro antagonista dos receptores de angiotensina a ser disponibilizado no mercado. Seu efeito está relacionado com a vasodilatação e diminuição na produção de aldosterona pelas glândulas supra-renais, levando a não retenção de sódio e água. Em relação aos seus efeitos, estudos com portadores da síndrome de Marfan, os quais apresentam desordem no tecido conjuntivo e frequentes anomalias nas estruturas esquelética, pulmonar, cardíaca, ocular, vasos sanguíneos entre outras, são tratados com o losartan, o qual melhora significativamente a redução no desenvolvimento do aneurisma, devido a um bloqueio, acredita-se, no receptor do tipo 1 de angiotensina II (AT1) diminuindo os níveis de TGF- β (Robinson *et al.*, 2006). Adicionalmente, o trabalho de (Habashi *et al.*, 2006) demonstrou uma melhora na arquitetura das fibras elásticas, quando trataram camundongos transgênicos que apresentavam sinais clínicos de síndrome de Marfan, com anticorpo anti-TGF- β e, conforme se aumentava às doses de anticorpo, a melhora era mais significativa. Nesse mesmo trabalho, os animais também foram tratados com os fármacos propranolol e losartan, em que pôde ser verificada uma melhora significativa nas estruturas das fibras elásticas quando este último foi utilizado.

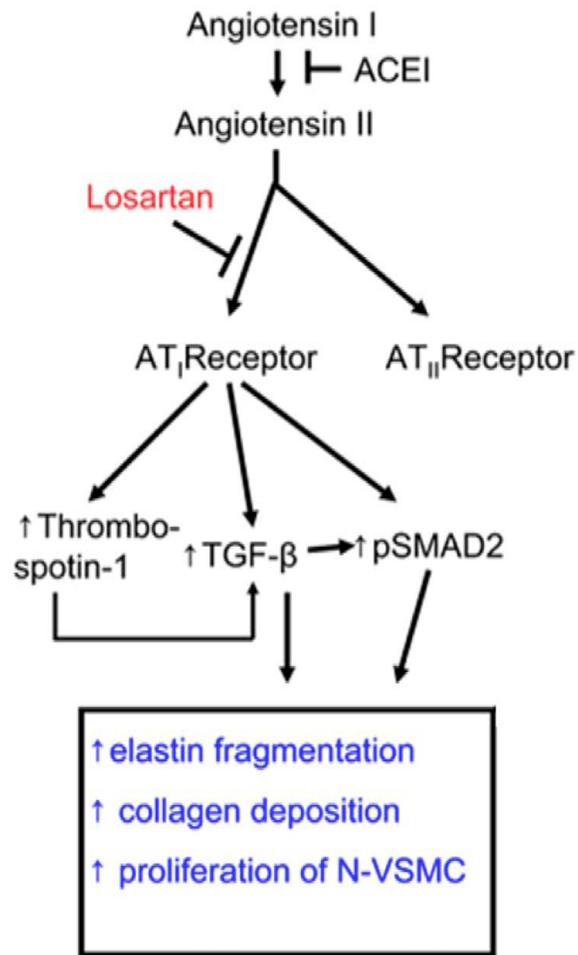


Figura 2 - Esquema da inibição do receptor AT1 por losartan (Brooke *et al.*, 2008).

3.6 Captopril

Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina (ACE) são comumente utilizados como redutores da pressão arterial em pacientes hipertensos, diminuindo a resistência periférica com pouco efeito sobre o débito cardíaco ou frequência cardíaca. O aumento da complacência arterial devido à inibição da ACE influencia na hemodinâmica regional, com a redistribuição do fluxo sanguíneo em favor de órgãos vitais . Os efeitos benéficos hemodinâmicos dos inibidores da ACE no tratamento da hipertensão são mediados principalmente pela inibição da enzima conversora de angiotensina e consequente retirada da ação vasoconstritora endógena de angiotensina II (McInnes, 1994; Brown e Vaughan, 1998).

Produzidos localmente, angiotensina II pode exercer um efeito significativo sobre o tônus vascular diretamente pela contração de músculo liso e, indiretamente, por liberar catecolaminas em torno de terminações nervosas. A angiotensina II vascular pode ser um importante fator patológico no desenvolvimento de aterosclerose, mediando a proliferação arterial de células musculares lisas por muitos mecanismos, incluindo um efeito direto sobre produção do fator de crescimento. Essas ações são devido ao bloqueio da angiotensina II uma vez que o mesmo efeito foi observado com um antagonista do receptor AT1 (Camargo *et al.*, 2012).

A síndrome de Marfan (MFS) surge de um defeito no gene que codifica a proteína da matriz extracelular fundamental, fibrilina-1 (Judge e Dietz, 2005). Há muito tempo pensava-se que o aneurisma da raiz da aorta na MFS era causada por deficiência de fibrilina-1, resultando na fragmentação da elastina e uma aorta enfraquecida, que estaria propensa a ruptura. Recentes compreensões das funções regulatórias das microfibrilas na matriz extracelular sugerem uma patogênese alternativa de síndrome de Marfan. Em camundongos deficientes em fibrilina-1, (Dietz *et al.*, 2005), demonstraram que muitos das características clínicas da síndrome de Marfan

são devido a anormais níveis de ativação do fator de crescimento transformante (TGF-beta). O TGF- beta é um potente estimulador da inflamação, ativação de fibrose e de certas metaloproteinases de matriz (MMP).

Esta combinação de anomalias na matriz estrutural das microfibrilas, desregulação da homeostase por excesso de TGF-beta, e uma anormal interação células-matriz resulta nas características fenotípicas da MFS (Keane e Pyeritz, 2008). A destruição das lamelas elásticas e de colágeno conduzem a degeneração medial a uma rigidez aórtica aumentada, distensibilidade diminuída e dilatação da aorta progressiva com posterior ruptura. A Rigidez aórtica está elevada em pacientes com MFS contribuindo para dilatação da aorta e sua ruptura, a principal causa de morte prematura nesta população (Jeremy *et al.*, 1994).

Estudos recentes sobre inibidores da enzima conversora de angiotensina (ACE), relataram uma redução na rigidez arterial em 60% e de 3-7 mm nos diâmetros das aortas em pacientes com MFS tratados (Ahimastos *et al.*, 2007). Geralmente, drogas anti-hipertensivas reduzem a rigidez arterial passivamente através da redução da pressão arterial, no entanto, os inibidores da ACE podem ter efeitos adicionais sobre a estrutura da parede arterial contribuindo para a redução na rigidez arterial e do diâmetro (Wojakowski *et al.*, 2001). Existe a hipótese de que tais resultados estariam correlacionados à redução no plasma dos níveis de TGF-beta e de MMP's (Ahimastos *et al.*, 2007).

3.7 TGF- β

Constituído por uma grande família de proteínas, o TGF- β , está presente sob três isoformas — TGF β -1, TGF β -2 e TGF β -3 (Ten Dijke e Arthur, 2007). Ele atua promovendo diferentes respostas biológicas através da ligação a um par de receptores de membranas dos tipos I e II que, juntos, ativam uma sinalização intracelular mediada pelas proteínas SMADs, as quais, uma vez fosforiladas, são levadas ao núcleo, onde ativam ou reprimem a transcrição de diferentes genes alvos (sinalização conhecida como via canônica) (Massague e Gomis, 2006; Feng e Derynck, 2005). Em determinadas situações, a sinalização de TGF- β pode afetar também outras vias independentes de SMAD-2, atualmente conhecidas por via de sinalização não-canônica de TGF- β , e incluem vários ramos da via MAPK dentre elas ERK-1/2 e JNK-1 (Zhang, 2009). A ativação de TGF- β , além de envolver-se em diferentes respostas biológicas, como no controle da proliferação e da diferenciação celular, desempenha papel importante durante a hematopoese e a organogênese do coração, rim, osso, fígado, trato vascular e gastrointestinal. Promove também a inibição da proliferação de células do tecido conjuntivo, diminuição da degradação do colágeno e mantém a homeostasia no adulto, com funções autócrina, parácrina e, em alguns casos, endócrina. O desbalanceamento do TGF- β está relacionado a muitas patologias, dentre elas câncer, fibrose, doenças auto-imunes e vasculares (Zeisberg *et al.*, 2003; Ten Dijke e Arthur, 2007).

A superfamília TGF- β é composta por várias citocinas multifuncionais, incluindo TGF- β , BMPs, ativinas, inibinas e micostatina. Eles participam de uma gama de processos que incluem, dentre outras, diferenciação tecidual durante o desenvolvimento através da regulação da função de células imunes e mesenquimais (Bobik, 2006).

Estudos demonstram que na síndrome de Marfan o desbalanço devido à super-ativação de TGF- β têm sido responsável na sua grande maioria pelo aparecimento dos sintomas dessa doença. Acredita-se que os sintomas desta síndrome estão diretamente relacionados com uma maior ativação do fator TGF- β , devido a uma redução, provavelmente, na quantidade de fibrilina-1 na matriz extracelular (Neptune *et al.*, 2003). O TGF- β , uma citocina sintetizada e secretada por quase todas as células, está ligado ao peptídeo associado à latência (LAP), o qual está ligado à proteína ligante do complexo latente do TGF- β (LTBP) (Figura 1.3), que por sua vez, se liga na parte N-terminal da fibrilina-1 (Figura 1.4), presente na matriz extracelular caracterizando, assim, a forma inativa. Essa maior ativação do TGF- β aparentemente, é decorrente de uma redução na quantidade de fibrilina-1, o que torna o complexo latente mais exposto e susceptível à ativação, uma vez que não permanece ligado à fibrilina (Neptune *et al.*, 2003).

A fibrilina-1, sendo o componente majoritário da microfibrilas e que na síndrome de Marfan apresenta mutação genética, possui uma região de ligação à proteína LTBP-1, a qual atua na latência ou armazenamento de TGF- β na sua forma inativa (Figura 1.4). A ausência da expressão gênica dessa molécula ou mutações que possam ocasionar incorretas ligações da proteína LTBP-1 à sua região específica da Fibrilina-1 leva a liberação do TGF- β latente que se torna ativo por ação de enzimas da matriz extracelular. Estudos demonstram que a utilização do losartan que atua como antagonista de TGF- β , pelo bloqueio no receptor AT1 de AngII, que tem como efeito a diminuição dos níveis de TGF- β levam a uma melhora dos sinais clínicos em modelos de Síndrome de Marfan (Habashi *et al.*, 2006).

Fibrillin-1 molecular interactions

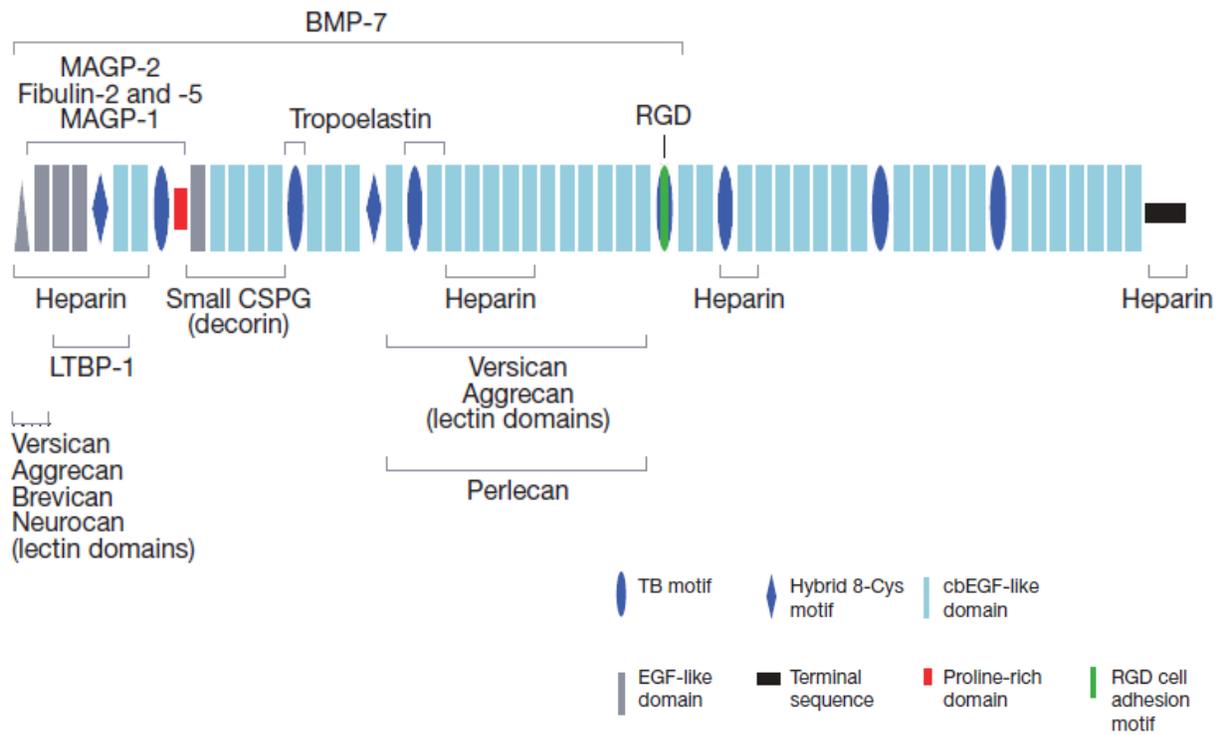


Figura 1.4 – Interações moleculares com a fibrilina-1 (Kielty, 2006).

3.8 NF- κ B

Rel ou proteínas NF-kappaB (NF- κ B) compreendem uma família de fatores de transcrição de células eucariotas estruturalmente relacionadas (p50, p52, RelA, RelB, c-Rel). O NF- κ B é um heterodímero constituído de duas subunidades: p65 (RelA) e p50. São utilizadas no controle de um grande número de processos celulares e do organismo, tais como, respostas imunitárias e inflamatórias, processos de desenvolvimento, crescimento celular e a apoptose. O NF- κ B pode estar ligado indiretamente ao aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs). Além disso, estes fatores de transcrição são continuamente ativados em diversos tipos de doenças e situação inflamatórias, dentre elas, o cancro, a artrite, a inflamação crônica, a asma, as doenças neurodegenerativas e doenças cardíacas (Baeuerle e Baltimore, 1996). Quando não estimulado, o fator NF- κ B encontra-se no citoplasma ligado a uma proteína inibitória: o I κ B. Esse complexo impede a translocação do NF- κ B para o núcleo e conseqüentemente sua ativação (O'Neill e Kaltschmidt, 1997).

3.9 Espécies reativas de oxigênio (EROs)

As espécies reativas de oxigênio são moléculas químicas derivadas naturalmente dos processos celulares pela redução parcial do oxigênio e estão presentes na maioria dos sistemas biológicos. Originam-se da redução incompleta do oxigênio, gerando espécies que apresentam alta reatividade com outras biomoléculas, principalmente lipídios, as proteínas das membranas celulares, bem como, o DNA (Narendhirakannan e Hannah, 2013).

Entre essas EROs estão: o radical superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil ($OH\cdot$) (Halliwell e Gutteridge, 1990).

Estudos recentes demonstram que EROs podem ser gerados por oxidases de membrana plasmática especializados na sinalização fisiológica de xenobióticos, fatores de crescimento, citocinas e estarem ligadas ao aumento da expressão e atividade de metaloproteases de matriz extracelular (MMPs), responsáveis pelo remodelamento e degradação de seus componentes constituintes (Ray *et al.*, 2012).

Os danos provocados por estresse oxidativo apresentam efeitos cumulativos e estão relacionadas a uma série de doenças, como o câncer, a aterosclerose, diabetes, neuro-degeneração e o envelhecimento (Ray *et al.*, 2012).

3.10 Metaloproteinasas

As metaloproteinasas da matriz (MMPs) constituem-se de um grupo de enzimas (endopeptidases) responsáveis pela degradação dos componentes da MEC e das membranas basais.

A descoberta das MMPs provavelmente ocorreu no ano de 1962 quando (Gross e Lapiere, 1962) encontraram uma enzima ativa na cultura de fragmentos da pele de ratos, que degradou a tripla hélice do colágeno tipo I maduro. As MMPs degradam as macromoléculas da matriz, incluindo o colágeno intersticial, a fibronectina, a laminina e os proteoglicanos, entre outras (Birkedal-Hansen, 1993). Assim, degradam vários componentes da MEC que participam no remodelamento de tecidos durante o desenvolvimento, cicatrização de feridas, crescimento de tumores, na metástase e na inflamação (Kanesaka *et al.*, 2006). Elas diferem entre si estruturalmente e em sua habilidade em degradar um grupo particular de proteínas da matriz

extracelular. Coletivamente, as MMPs são capazes de degradar todas as proteínas componentes da matriz extracelular e das membranas basais (Birkedal-Hansen, 1993).

As MMPs utilizam o zinco para as suas atividades proteolíticas. Elas são essenciais em diversos processos biológicos normais tais como o desenvolvimento embrionário, morfogênese, reabsorção do tecido reprodutivo e remodelamento. As principais células que produzem MMPs são os leucócitos polimorfonucleares, os queratinócitos, os monócitos, os macrófagos, os fibroblastos e as células mesenquimais. Estudos recentes demonstram que MMP-7 e MMP-9 estão expressas em células inflamatórias na esclerose múltipla, doença que ataca o sistema nervoso central. E que o aumento dos níveis de MMP-9 estão associados a danos no sistema hematoencefálico. O que demonstra a grande importância dessas metaloproteínas na homeostase tecidual (Cuzner *et al.*, 1996; Cossins *et al.*, 1997). Mates *et al* (2004), relataram um aumento na expressão de MMP-2 e MMP-9 durante o desenvolvimento do aneurisma torácico aórtico em camundongos modelos da síndrome de Marfan. Em um trabalho recente, Suda e colaboradores (Suda *et al.*, 2009), utilizando doxíciclina como inibidor não específico das metaloproteinasas 2 e 9, normalizou a função aórtica vasomotor e suprimiu o crescimento do aneurisma em camundongos modelos de Marfan.

(Chung *et al.*, 2007), utilizando um modelo animal clássico da síndrome de Marfan (*Fbn1*^{C1039G/+}), relataram que o aumento na regulação das MMP-2 e MMP-9, ocasionou a degradação e perda das fibras elásticas e da integridade estrutural das paredes das aortas torácicas.

A participação da MMP-9 em processos patológicos incluindo uma variedade de doenças auto-imunes como o Lúpus eritematoso, síndrome de Sjogrens's, Esclerose sistêmica, artrites reumatoide, polimiosite e ateroscleroses também tem sido descrita (Ram *et al.*, 2006).

4. Objetivos

4.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste projeto foi avaliar o perfil de expressão de componentes relacionados com a elastogênese e as possíveis vias de sinalização e mecanismos de ação do losartan em cultura de fibroblastos de derme derivados de camundongos deficientes em fibrilina-1.

4.2 Objetivos Específicos

4.2.1. Analisar a formação de fibras elásticas em células obtidas de camundongos selvagens e deficientes em fibrilina-1.

4.2.2. Verificar a influência do tratamento com losartan neste processo.

4.2.3. Analisar a ultra estrutura das fibras elásticas formadas.

4.2.4. Avaliação do perfil de expressão gênica relativas de componentes da matriz das fibras elásticas.

4.2.5. Analisar a atividade de TGF-beta na cultura celular.

4.2.6. Verificar as possíveis vias de sinalização associadas ao tratamento com losartan.

4.2.4. Testar o perfil de atividade das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9

4.2.5. Avaliar o nível de espécies reativas de oxigênio (EROs) dos fibroblastos de derme em cultura.

5. Material e Métodos

5.1 Animais

Para a realização dos estudos foram utilizados camundongos C57BL/6, heterozigotos para a mutação no gene *Fbn1* (*Fbn1*^{mgΔ/+}), gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Lygia da Veiga Pereira – Laboratório de Genética Molecular/USP (Figura 3). Estes animais foram colocados em cruzamento e permaneceram no biotério do Departamento de Bioquímica da UNICAMP para desenvolvimento da pesquisa. Para realização dos estudos com células de derme foram utilizados camundongos recém-nascidos de 2-3 dias de idade oriundos do cruzamento entre pais heterozigotos para a mutação no gene da *Fbn1* (*Fbn1*^{mgΔ/+}). Os camundongos foram mantidos em temperatura de 22 ± 1°C em ciclo de claro e escuro de 12h, com livre acesso a água e ração. Para os roedores, foi utilizada dieta padrão (Nuvilab CR1®). Os protocolos experimentais utilizados com os animais foram previamente submetidos ao Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEE/IB/UNICAMP) protocolo número 3169-1 (Anexo I).

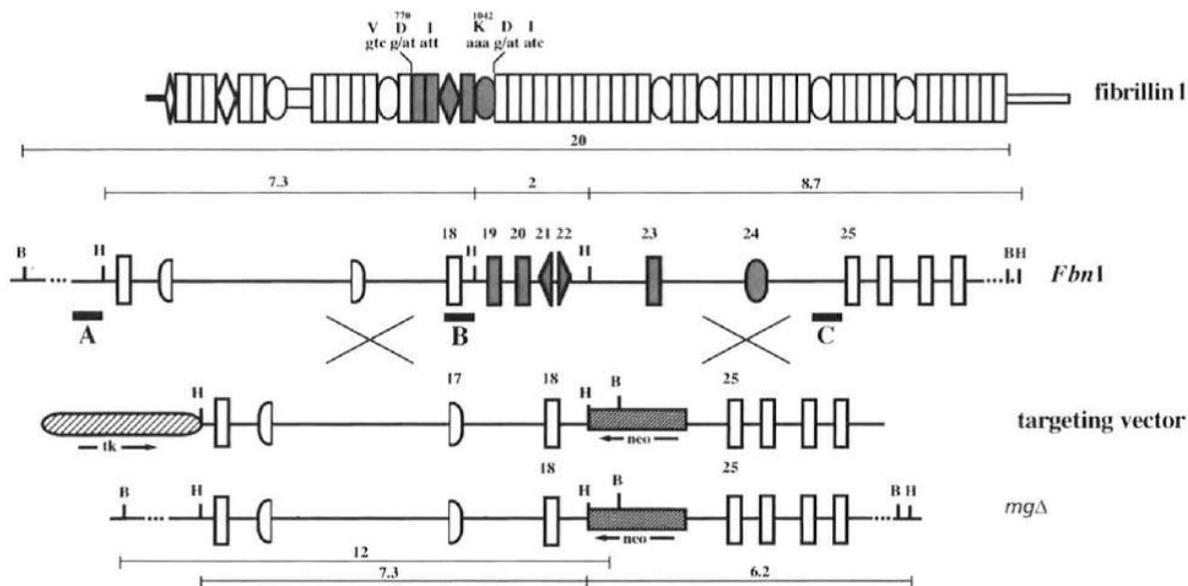


Figura 3. Mutação no gene fibrilina-1, com a deleção dos éxons 19 a 24 e, a inserção do cassete de neomicina, em que resultou nos animais $Fbn1^{mg\Delta/+}$ (heterozigotos) (Pereira *et al.*, 1997b).

5.2 Extrações de Fibroblastos de derme (Cultura Primária)

Para o isolamento dos fibroblastos de derme foram utilizados camundongos recém-nascidos com 2-3 dias de idade, obtidos a partir de um cruzamento entre dois camundongos adultos heterozigotos para a mutação no gene da fibrilina-1 ($Fbn1^{mg\Delta/+}$) (Figura 3). Esse cruzamento possibilitou a obtenção de três genótipos celulares, selvagens: $Fbn1^{+/+}$, heterozigotos: $Fbn1^{mg\Delta/+}$ e homozigotos: $Fbn1^{mg\Delta/mg\Delta}$ que foram estudados nesse trabalho. Tais animais foram eutanasiados por hipotermia e em seguida submetidos ao procedimento da retirada da pele, segundo o protocolo de (Rittie e Fisher, 2005). Foi realizado um corte longitudinal (cabeça-cauda) e a pele separada com a ajuda de duas pinças tracionadas em sentidos opostos. Após a retirada da pele, a mesma foi colocada em solução de tripsina (2,5g/L) à 4°C por 16h. Esse

procedimento possibilitou a separação da derme (rica em fibroblastos) e epiderme. Após a coleta da derme, foi realizada sua digestão por ação enzimática (colagenase IV – 1mg/mL) e mecânica (pipetagem) por 30 minutos. A suspensão celular formada foi então plaqueada em meio DMEM + 10% Soro Fetal bovino + 1% penicilina 10.000 U.I/ mL e estreptomicina 10 mg/mL e incubada em estufa 37° C com atmosfera de 5% de CO₂.

5.3 Cultura de células

Para a realização dos ensaios os fibroblastos de derme inicialmente eram descongelados, a células contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas com densidade de 1×10^5 células/mL em placas de 90 mm. Em seguida era acrescentado o meio de cultura DMEM adicionado de 10% Soro Fetal bovino e 1% penicilina 10.000 U.I/ mL e estreptomicina 10 mg/mL e colocadas em estufa 37° C a 5% de CO₂ para crescimento até atingirem a confluência celular. Caso necessário, as trocas de meios eram realizadas a cada dois dias. Após as células atingirem a confluência celular, contavam-se mais quatro dias e em seguida as células estavam preparadas para a realização dos experimentos.

Para o desenvolvimento da técnica de cultura celular foram utilizados placas, garrafas de cultura, tubos de centrifugação de 15mL e 50 mL estéreis para cultura celular. O meio de cultura utilizado para crescimento celular foi DMEM acrescido 10% Soro Fetal bovino e 1% penicilina 10.000 U.I/ mL e estreptomicina 10 mg/mL, ambos adquiridos da Nutricell®. Para a armazenagem e manutenção das culturas foi utilizada uma estufa 37° C a 5% de CO₂ da Forma Scientific Modelo 3154. A cultura foi manipulada em fluxo laminar vertical da Veco VLFS-12 e

as centrifugações realizadas na centrífuga de bancada do modelo Universal 320 (Hettich Zentrifugen – Alemanha).

5.4. Tratamentos das culturas celulares com losartan

Os fibroblastos de derme foram tratados com o losartan acrescido ao meio de cultura individualmente, nas concentrações de estudo. O princípio ativo losartan foi cedido pelo Professor José Eduardo Krieger (USP-INCOR).

Para o tratamento em cultura celular foram feitas soluções estoques de losartan 0,3 mg/mL previamente esterilizadas por filtro 0,22 µm Syringe-driven filters da JET BIOFIL. As concentrações testes utilizadas para o losartan foram de 0, 1, 10 e 100 µMol/L (Sauter *et al.*, 2007). As células após atingirem a confluência celular foram cultivadas por mais quatro dias na presença de DMEM acrescido de 10% Soro Fetal bovino, 1% penicilina 10.000 U.I./mL/estreptomicina 10 mg/mL mais as concentrações testes do princípio ativo losartan e então disponibilizadas para os ensaios.

5.5 Identificação Genotípica por PCR

As caudas dos animais recém-nascidos dos cruzamentos das matrizes reprodutivas no biotério da Bioquímica foram coletadas, identificadas e estocadas a -20°C em tubos de microcentrífuga do tipo eppendorfs autoclavados. Em seguida, para a lise, as amostras foram incubadas com TNES (Tris 10mM, NaCl 125mM, EDTA 10nM, SDS 0,5% em pH 8) e proteinase K (20mg/mL) por 16h “*overnight*”. No dia seguinte, as amostras foram tratadas com

RNAse A (4mg/mL) por 30min. Em seguida, realizou-se o ensaio para precipitação de proteínas com NaCl (5M) em centrifugação (15000xG). Posteriormente, houve a precipitação do DNA com o uso de isopropanol e centrifugação (15000xG), e após, houve lavagem com etanol 70% seguida por centrifugação (15000xG). Apenas o precipitado seco (contendo apenas DNA) resultante foi utilizado, hidratado com TE (Tris 10mM e EDTA 1mM) e armazenado a -4°C.

Para o PCR, foram utilizados os seguintes oligonucleotídeos (primers) para 1 REAÇÃO: NeoF (5' – GAGGCTATTCGGCTATGACT – 3') e NeoR (5' – CTCTTCGTCCAGATCATCCT – 3') e os primers para a 2 REAÇÃO: 20F (5'- AAA CCA TCA AGG GCA CTT GC – 3') e CC-R (5'CAC ATT CGC TGC CTT TAA TTC – 3'), nas concentrações finais de 10,0 pmol/uL em tampão TE com 2uL do DNA template e MasterMix (GE Healthcare UK). O programa dos ciclos para a PCR foi: etapa 1 (1 ciclo: 94°C – 2min30s), etapa 2 (29 ciclos: 94°C – 30s, 60°C – 1min, 72°C – 1min) e etapa 3 (1 ciclo: 72°C – 7min, 4°C∞). O produto da reação foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,75% acrescido de brometo de etídio 5% com marcador de peso molecular (1.000bp ou 10.000bp DNA ladder plus) utilizando como tampão de corrida TBE 1x (160mA/50 min) e posteriormente visualizado por revelador GE Healthcare UV 302nm .

5.6 Imunofluorescência

Os anticorpos primários utilizados nesta técnica foram gentilmente cedidos pelo laboratório do Prof. Dr. Robert Mechan, EUA, Washington University, St. Louis, para as glicoproteínas Tropoelastina, MAGP-1, Fibrilina-1 e Fibrilina-2. Como anticorpo secundário foi

utilizado Anti-Rabbit IgG FITC da Sigma. As imunofluorescências foram captadas e fotografadas pelo microscópio Carls Zeiss Observer Z.1® e analisadas pelo software Axion vision 4.8.

Como procedimento, as células foram cultivadas por quatro dias pós-confluência celular, em lamínulas de vidro estéreis de 13 mm em densidade de 1×10^5 células/mL. Em seguida, as células foram fixadas em Metanol -80°C por 30 min. Após a fixação, as células foram bloqueadas em tampão (TB) contendo gelatina FISH 1% e 0,01% de TWEEN-20 por 1h a temperatura ambiente. Logo após o bloqueio as células foram incubadas com o anticorpo primário por 1h e 30 min na diluição de 1: 500, seguida de 3x lavagens de 5 min cada com TB. Em seguida as células foram incubadas com o anticorpo secundário Anti-Rabbit IgG FITC na diluição de 1 : 500 em ausência de luz por mais 1h. Por último, as células foram submetidas a coloração nuclear com DAPI (4',6 - Diamidino - 2 phenylindole dihydrochloride) - SIGMA® e em seguida feita a montagem das lâminas de microscopia com meio de montagem (VECTASHIELD® Mounting Medium) e levadas ao microscópio de fluorescência Carls Zeiss Observer Z.1®, Alemanha.

5.7 Western-blotting

As células em estudo foram cultivadas individualmente por quatro dias pós-confluência celular com ou sem tratamento com o princípio ativo losartan e então foram submetidas ao processo de extração proteica. Foi utilizado o tampão Buffer B (100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris-HCl e 8 M Uréia) acrescido de Cocktail Inibitor Protease e Cocktail Inibitor Phosfatase da SIGMA® para a lise celular e colocadas em um sonicador (VirSonic 60, Virtis, Gardiner, NY, EUA) e em banho de gelo. O extrato obtido foi centrifugado a 4°C a $3000\times\text{G}$ durante 5 minutos,

o sobrenadante foi separado, uma alíquota de cada material foi retirada para dosagem proteica pelo método de Bradford (1976) e o restante foi armazenado a -80°C .

Após a quantificação de proteínas pelo método de Bradford, as amostras foram submetidas ao protocolo padrão de *western-blotting* utilizando 30 μg de proteínas em corrida de gel de poliacrilamida de 10%. A corrida ocorreu a 25mA. Em sequência, foi realizada a transferência das proteínas para membrana de PVDF (Immobilon-P-Transfer Membranes, Millipore Corporation, U.S.A), a 220 mA durante 50 min, em tampão de transferência CAPS 10 mmol/L, metanol 10% pH 11. Em seguida, a membrana foi bloqueada com em Leite em Pó desnatado 5% (Blotto) em TBS-T e recebeu as incubações com os anticorpos primários na diluição de 1:1.000 e secundário conjugado com HRP de interesse na diluição de 1:5.000. A revelação ocorreu pelo método de quimiluminescência em filme fotográfico especial.

5.8 Microscopia eletrônica de varredura

Os fibroblastos de animais selvagens: *Fbn1*^{+/+}, heterozigotos: *Fbn1*^{mg Δ /+} e homozigotos: *Fbn1*^{mg Δ /mg Δ} foram cultivados até a pré-confluência e posteriormente submetidos a fixação durante três horas com glutaraldeído 2,5% (Electron Microscopy Science, Hatfield, PA, USA), ácido tânico 0,5% (Electron Microscopy Science) em tampão cacodilato 0,1M (pH 7,4). Em seguida, foram lavadas em tampão cacodilato de mesma molaridade e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% (Electron Microscopy Science) a 4 $^{\circ}\text{C}$ durante 1h. Posteriormente procedeu-se a desidratação por Etanol em concentrações crescentes. Após a desidratação, o material foi levado ao aparelho Critical Point Dryer CPD030 BALZERS para realização do ponto crítico. Em seguida foi realizado o sputter

das lamínulas no aparelho Sputter coater SCD050 da BAL-TEC e analisadas em microscópio eletrônico de varredura JSM 5800LV- JEOL (U.S.A).

5.9 Microscopia eletrônica de transmissão

Os fibroblastos em estudo foram cultivados por quatro dias pós-confluência celular em lamínulas de vidro de 13 mm estéreis e posteriormente fixada durante três horas com glutaraldeído 2,5% (Electron Microscopy Science, Hatfield, PA, USA), ácido tânico 0,5% (Electron Microscopy Science) em tampão cacodilato 0,1M (pH 7,4). Em seguida, foram lavadas em tampão cacodilato de mesma molaridade e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% (Electron Microscopy Science) a 4°C durante 1h. Posteriormente procedeu-se a desidratação por Etanol em concentrações crescentes. As lamínulas foram pré-embebidas em mistura de etanol e resina Epon (Electron Microscopy Science) na proporção de 1:1 e 1:3 durante 2h cada e em seguida embebidos em resina Epon pura *overnight*. As amostras foram então incluídas em resina pura, mantidas em estufa a 60°C, durante 72 horas. Desse material, para estudo morfológico e análise da área de interesse, foram obtidos cortes de monocamada, corados a quente em solução de 0,5% de Azul de Toluidina (Kiernan, 1999). Ainda desse material, foram obtidos cortes ultrafinos de 70nm coletados em grades de cobre e contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo. Os cortes ultrafinos foram estudados e micrografados em microscópio eletrônico de transmissão LEO 906-Carls Zeiss (Alemanha) do Laboratório de Microscopia Eletrônica (LME) do Instituto de Biologia – Unicamp.

5.10 Real Time – PCR

As sequências específicas de oligonucleotídeos para LOX-1, MMP-2, MMP-9, fibulina-5, tropoelastina e GAPDH (gene normalizador) foram obtidas no *GenBank Database* do *National Center for Biotechnology Information (NCBI) of the National Institutes of Health*. Então os *primers* foram desenhados com o auxílio do “Primer Express 3.0 Software for *Real-Time*” (Applied Biosystems), verificados pelo BLAST e, assim, a confecção desses *primers* (Figura 4) foi solicitada à Invitrogen Brasil Ltda.

As sequências específicas para Fibrilina-1, Fibrilina-2, MAGP-1 e MAGP-2 foram cedidas pelo Prof. Dr. Robert Mecham da Washington University, e então sintetizados pela IDT®.

As expressões dos genes de Fibrilina-1, Fibrilina-2, MAGP-1, MAGP-2, elastina, fibulina-5, LOXL1, MMP-2, MMP-9 e o GAPDH gene normalizador foram analisadas pelo método quantitativo de *Real-Time* PCR. Os fibroblastos de derme derivados de animais selvagens: *Fbn1*^{+/+}, heterozigotos: *Fbn1*^{mgΔ/+} e homozigotos: *Fbn1*^{mgΔ/mgΔ} foram cultivados por 4 dias após o plaqueamento. Posteriormente, o RNA total foi extraído e isolado utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen) seguindo o protocolo do fabricante. Foram retirados os meios de cultura e em seguida foram adicionado 3 mL de Trizol por cada placa. Após a lise celular e o homogenato foi transferido para tubos tipo *ependorfs* e incubados por 5min à temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 200 µL de clorofórmio RNase *free* a cada amostra, agitado por 15 s e incubado por 3 min à temperatura ambiente. Na sequência, o material foi centrifugado a 12000 xG por 15 min a 2-8° C. Após a centrifugação, a fase aquosa foi removida cuidadosamente para evitar contaminação por proteínas ou DNA genômico. Em seguida, adicionou-se 500 µL de isopropanol, incubou-se por 10min à temperatura ambiente e, novamente, o material foi centrifugado a 12000 xG por 10 min a 2-8° C e houve formação de um precipitado na parede do tubo. Após essa etapa, o sobrenadante foi

removido, adicionou-se álcool etílico 70% a 4° C e o material foi centrifugado a 7000 xG por 5 min a 2-8° C. Finalmente, o sobrenadante foi retirado e o *pellet* permaneceu durante 15min exposto para secar. Em seguida, o material foi reidratado com 30 µL de água DEPC (Dietilpirocarbonato).

A avaliação da integridade das amostras RNA total obtidas foi feita por meio da eletroforese em gel de agarose a 1% na cuba horizontal, com corrente contínua a 100 V durante 20 min.

Após a verificação da extração por meio do gel de agarose, o RNA total foi quantificado com auxílio do NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer) no Hemocentro – Faculdade de Ciências Médicas/Unicamp. Em seguida, o material foi aliquoteado e armazenado à -80° C

Para síntese de cDNA, foi utilizado o *RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* (Fermentas, Maryland, EUA) conforme as instruções do fabricante. Brevemente, 1 µg de RNA total foi adicionado à 1 µL de oligo(dT), *primer* (50,0 µM) e a reação foi completada até 12 µL de água DEPC, e posteriormente foi incubado a 65° C por 5 min no termociclador. Em seguida, para cada reação, foram adicionados 8 µL do *mix* contendo 4 µL de 5x *reaction buffer*, 1 µL de *Ribolock Ribonuclease inhibitor* (20u/µL), 2 µL de 10mM dNTP mix e 1 µL de *RevertAid H Minus M-MuLV RT* (200 u/µL), completando o volume final da reação para 20 µL. Em seguida, as amostras foram incubadas no termociclador (90 min a 42° C e 5 min a 70° C). As amostras foram quantificadas com auxílio do NanoDrop, aliquoteadas e armazenadas a -80° C.

Após a síntese de cDNA, foram efetuados testes dos oligonucleotídeos utilizando os moldes de cDNA recém-confeccionados por meio do RT-PCR (Taq DNA polymerase, Fermentas). Cada reação foi composta por 4,5 µL de Mix PCR (1x tampão Taq DNA polimerase, dNTP 0,2 mM, MgCl₂ 1,5 mM), 1,25 µL de DMSO, 2 µL de cDNA, 2 µL de primers F+R (10mM), 0,12 µL de Taq, 15,12 µL de água DEPC. Em seguida, as amostras foram incubadas no termociclador de acordo com o seguinte programa: 95 °C – 1 min, 5x (95° C – 1 min, 65° C – 30 s, 72° C – 1 min), 30 x (95° C – 30 s, 60° C –

30 s, 72° C – 1 min), 72° C – 10 min. A avaliação da reação da PCR foi feita por meio da eletroforese em gel de agarose a 2% na cuba horizontal, com corrente contínua a 100 V durante 30 min com ladder de 50 pb.

Para cada reação foram utilizados 39 µL de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), 12 µL de cDNA (50 ng/uL), 12uL de *primer* F (312,5 nM) e 12 uL de *primer* R (312,5 nM) no seguinte programa: 50° C – 2 min, 95° C – 10 min, 45x (95° C – 15s, 60° C – 1 min). Cada ensaio foi feita em triplicata (3x 25µL) utilizando placa apropriada para o termociclador Applied Biosystems 7300, presente no Laboratório de Matriz Extracelular, do prof. Dr. Hernandes Faustino Carvalho no Departamento de Biologia Estrutural e Funcional do Instituto de Biologia da Unicamp. O gene normalizador utilizado foi o GAPDH. Os resultados foram normalizados usando os valores de Ct (*threshold cycle*) do controle endógeno da mesma placa. Para quantificar a expressão gênica relativa, foi utilizado o modelo matemático $2^{-\Delta\Delta Ct}$, considerando o grupo “Selvagem” como calibrador. Para validar os ensaios de *Real-Time PCR*, as curvas de eficiência e de dissociação foram confeccionadas previamente e ajustes de concentração de cDNA e *primers* foram efetuados. A curva de eficiência foi calculada por meio da equação $E = 10^{(-1/slope)}$, com valores resultantes acima de 0,90 para todos os genes.

| | |
|----------------------|--|
| MMP2 primers | Forward, 5-TTCCACTCCACTGCATTTCT-3 Reverse, 5-GGCGGGCTGAGATGCAT-3 |
| MMP9 primers | Forward, 5-GGCGTGTCTGGAGATTCGA-3 Reverse, 5-CTCCTTATCCACGCGAATGAC-3 |
| Fibulin-5 primers | Forward, 5-GCAAGCAACAACCCGATAACC-3 Reverse, 5-CCTGTTTGCCGCATATAGAACTC-3 |
| LOX-1 primers | Forward, 5-CCGCAGCAGTTCCCCTATC -3 Reverse, 5-CGCGGGATCGTAGTTCTCA -3 |
| Tropoelastin primers | Forward, 5-AAGACCTGGCTTTGGACTTTCT-3 Reverse, 5- CGGCCACAGGATTTCCCA-3 |
| Fibrillin-1 primers | Forward, 5-CATTCTGTGGGGATGGATTC-3 Reverse, 5-TACGTGCAAGCACACCGATTT-3 |
| Fibrillin-2 primers | Forward, 5-CACCGTGGGAAGCTATTTTTG-3 Reverse, 5-GTTCCAGCCCTCTGATCAATG-3 |
| MAGP-1 primers | Forward, 5-GCTGGCTCAGGGCCAATATG-3 Reverse, 5-GAGGACTCACTTCTTGGTAGTCA-3 |
| MAGP-2 primers | Forward, 5-GTCTTGGCAATCAGCATCCC-3 Reverse, 5-CCAGATTAGGGTCGTCTGTGAAT-3 |
| GAPDH primers | Forward, 5-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3 Reverse, 5-CCTGCTTCACCACCTTCTTGAT-3 |

Figura 4 – Sequências de primers utilizadas na técnica de Real time –PCR.

5.11 Zimografia in situ

As células em estudos foram cultivadas por quatro dias pós-confluência celular com ou sem o tratamento com o losartan em lamínulas de vidro de 13 mm estéreis e posteriormente fixada em Metanol -80 °C. Em seguida, foi preparado 1mg/mL de DQ-gelatina com solução tampão de reação de gelatinase (NaCl 150mM, CaCl₂ 5mM, NaN₃ 0,2mM, Tris-HCl 50mM, pH 7,6). A concentração final da solução de DQ-gelatina foi ajustada para 20µg/mL e, 500µl DQ-gelatina foi adicionado as lâminas e incubadas à 37°C em câmara escura úmida por 3 horas.

Posteriormente, as lamínulas foram lavadas 3 vezes com PBS e, em seguida, analisadas em microscópio de fluorescência com Filtro FITC. Para quantificação da atividade gelatinolítica foi mensurado mediante a média da intensidade de pixel pelo Software ImageJ.

5.12 Análises de Vias de sinalização e quantificação de TGF- β .

As células em estudos foram cultivadas por quatro dias pós-confluência celular com ou sem o tratamento com o losartan. Em seguida, as células foram submetidas à extração, quantificação proteica e armazenado em Biofreezer -80 °C conforme descrito em *western-blotting* na seção material e métodos. Utilizando técnicas de *western-blotting* e kits comerciais de quantificação (ELISA), foram investigadas proteínas das vias de sinalização de TGF-beta (SMAD e MAPK2, ERK-1, JNK-1) e TGF-beta Total/ativo.

5.13 Determinação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs)

As células em estudos foram cultivadas em placas especiais para cultura de 35 mm por quatro dias após confluência celular. Em seguida o meio de cultura foi retirado, as células lavadas com solução PBS estéril e então adicionado um novo meio de cultura com baixo teor de soro fetal bovino (2%) acrescido da sonda carboxi-2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (carboxi-H₂DCFDA) da Invitrogen® seguindo o protocolo disponibilizado pelo próprio fabricante. Neste ensaio, inicialmente a sonda foi reconstituída com DMSO estéril (solução estoque) preparada imediatamente antes do uso. A solução estoque foi então diluída à solução trabalho na concentração de 1 – 10 μ M. Após a retirada do meio de cultura e lavagem das células com PBS, a

sonda foi então adicionada juntamente com o meio de cultura (DMEM acrescido 2% soro fetal bovino) e as células incubadas por 30 min em câmara escura (estufa 37°C, 5% CO₂). Na sequência, as células foram novamente lavadas com solução estéril de PBS e então a fluorescência acessada, captada e fotografada pelo microscópio Carls Zeiss Observer Z.1® utilizando o filtro FITC e analisadas pelo software Axion vision 4.8.

5.14 Análises Estatísticas

Os dados foram apresentados como média ± erro-padrão. As diferenças entre médias foram analisadas por ANOVA por meio do programa Prisma 5.0, como critério de significância $p \leq 0.05$ pelo teste de Tukey. Em PCR-Real Time a expressão relativa dos genes foram comparados entre os grupos utilizando o teste Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Mann-Whitney. A significância estatística foi definida como $p < 0,05$.

6. Resultados

Iniciamos nossa investigação sobre o comportamento dos fibroblastos de derme selvagens e deficientes em fibrilina-1 em cultura celular realizando o processo de extração destas células de modelos de camundongos para síndrome de marfan mantidos em nosso laboratório.

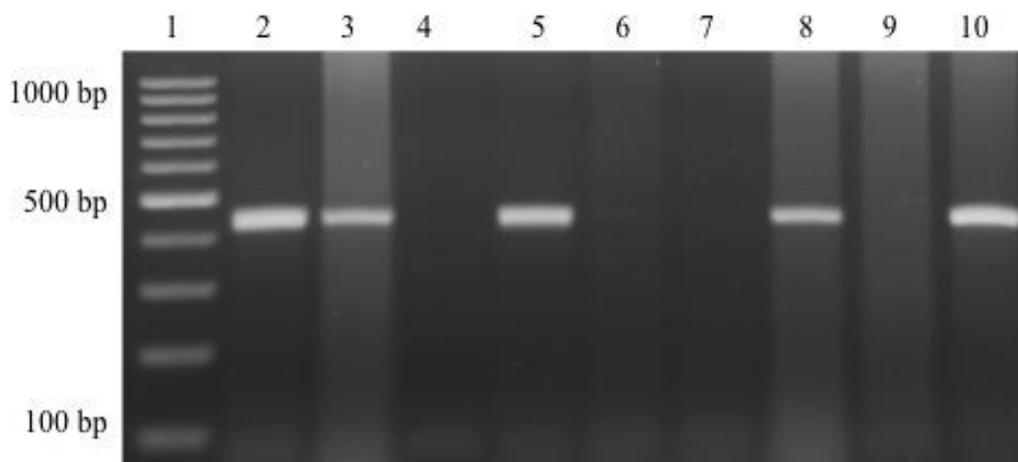
Como descrito em material e métodos, foi realizada a extração dos fibroblastos de derme de camundongos recém-nascidos (2 a 3 dias de idade) da linhagem C57BL/6 com mutação nos éxons 19-24 do gene da Fibrilina-1 (Figura 3), obtidos a partir do cruzamento de dois camundongos heterozigotos para a mutação do gene de fibrilina-1 (*Fbn1*^{mgΔ/+} - HT).

Os fibroblastos foram então identificados por PCR, quanto ao nível de expressão gênica, classificando-os em três genótipos: selvagens *Fbn1*^{+/+} (WT) (não portador da mutação), heterozigotos *Fbn1*^{mgΔ/+} (HT) e homozigotos *Fbn1*^{mgΔ/mgΔ} (HO) para a mutação no gene da fibrilina-1.

A identificação genotípica por PCR se deu em duas etapas de reações, cada qual com um par de oligonucleotídios (primers) específicos. Os animais que apresentaram banda com aproximadamente 440pb na primeira reação foram identificados como portadores da mutação no gene da fibrilina-1 (mgΔ/+). Os animais que apresentaram banda com aproximadamente 600bp na segunda reação foram identificados como portadores do alelo selvagem. Sendo assim, os animais selvagens, apresentaram banda apenas o par 20F/CC-R (segunda reação), os animais deficientes heterozigotos apresentaram bandas em ambos os pares NeoF/NeoR (primeira reação) e 20F/CC-R (segunda reação) e os animais deficientes homozigotos apresentaram bandas apenas para os pares NeoF/NeoR (primeira reação). A Figura 5A ilustra um exemplo de um dos géis obtidos após a primeira etapa de reação de PCR e eletroforese em gel de agarose 0,75%, onde as

bandas em evidência representam os animais heterozigotos ou homozigotos, já que o par de primers NeoF/NeoR amplifica uma região do cassete de neomicina no gene da Fibrilina-1 mutado. Em B, é possível observar um dos géis após a segunda etapa de reações de PCR, onde a banda em evidência identifica os animais que apresentam a amplificação para o alelo selvagem, cujo primer utilizado foi 20F/CC-R. Os animais selvagens apresentaram apenas amplificados para a segunda reação, os animais heterozigotos apresentam amplificados para a primeira e segunda reação e os animais homozigotos apresentam amplificados somente para a primeira reação.

A



B

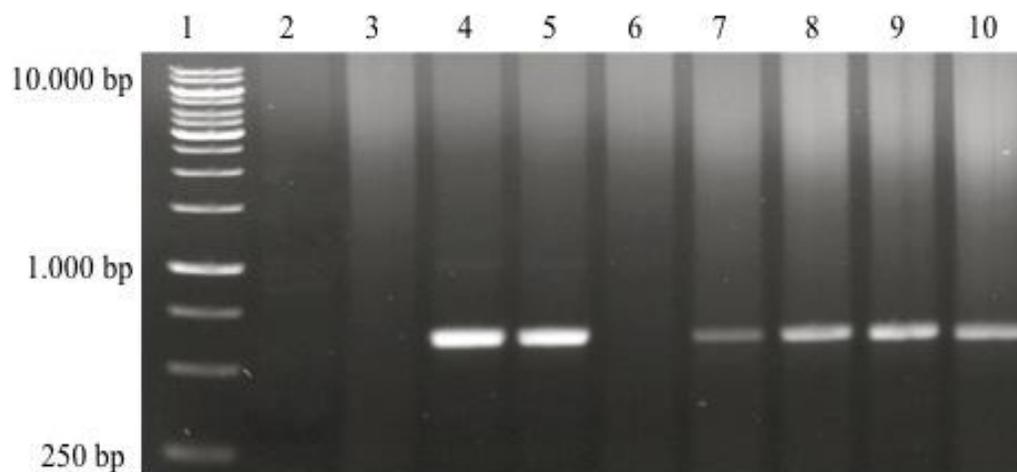


Figura 5 – Identificação genotípica de camundongos por PCR. Em A (primeira reação), as bandas indicam animais heterozigotos (HT) ou homozigotos (HO) para a mutação no gene *Fbn1*, corresponde às bandas **2, 3, 5 e 8**; **1**- padrão de peso molecular de 1.000 pares de bases; **9** - controle negativo (WT) e **10** - controle positivo (HT). Em B (segunda reação), as bandas indicam animais portadores do alelo selvagem (WT), que corresponde às bandas **4, 5, 7 e 8**; **1**- padrão de peso molecular com 10.000 pares de bases; **9** - controle negativo (WT) e **10** - controle positivo (HT).

A partir da criação de um estoque de células, iniciamos os experimentos para caracterização do perfil de expressão de componentes da matriz extracelular dos fibroblastos deficientes em fibrilina-1.

Inicialmente nosso foco se deu sobre os principais componentes da matriz extracelular que compõem as redes de microfibrilas, importantes no processo de formação das fibras elásticas maduras. Assim, realizamos um ensaio inicial para verificar a capacidade de formação *in vitro* das fibras elásticas presentes na matriz extracelular na cultura de fibroblastos de derme. A princípio utilizamos a técnica de imunofluorescência em cultura de fibroblastos selvagens (WT) para um dos componentes e também constituintes das microfibrilas, a fibrilina-2. Podemos observar em destaque verde as redes de microfibrilas formadas, como ilustrado na Figura 6.

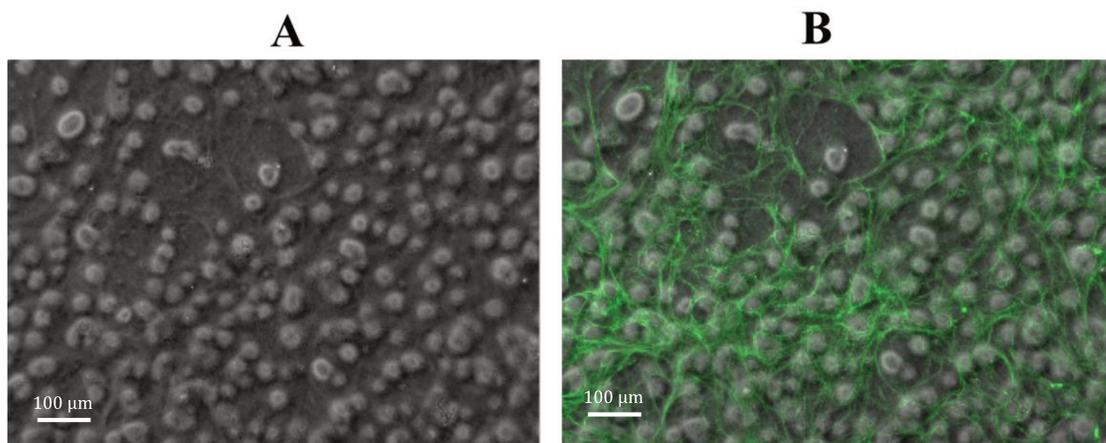


Figura 6 – Visualização dos fibroblastos de derme em cultura e das fibras elásticas na matriz extracelular. Em **A**: Células em contraste de fase **B**: Rede de microfibrilas visualizadas por imunofluorescência para fibrilina-2 (Verde). Anticorpo secundário conjugado com FITC. Barra = 100 µm.

Em seguida a fim de obter o melhor tempo de formação das redes de microfibrilas e assim otimizar a visualização das mesmas, realizamos outro ensaio de imunofluorescência para

fibrilina-2, utilizando fibroblastos selvagens (WT) em cultura celular com 0, 1, 2 3 e 4 dias após atingirem a confluência celular. Podemos observar o quarto dia como sendo o que apresentou melhor visualização e maior quantidade de microfibrilas formadas em relação à quantidade de células, marcadas com coloração nuclear DAPI (destaque em azul) como mostrado na Figura 7.

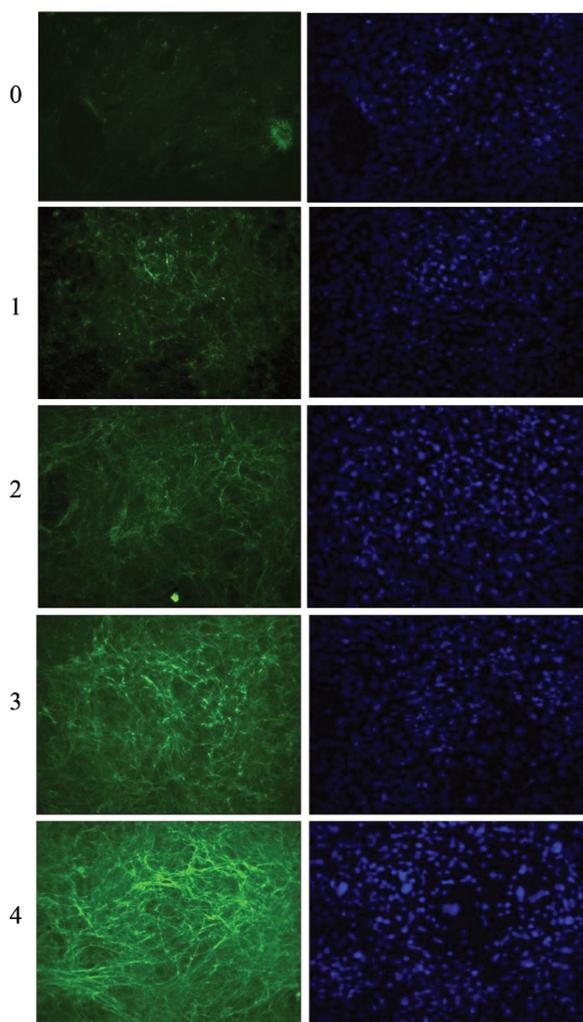


Figura 7 – Tempo de formação das microfibrilas de Fibrilina-2 por imunofluorescência em cultura primária de fibroblastos de derme derivados de camundongos selvagens (WT). Em 0, 1, 2, 3 e 4 dias de cultivo após atingir à confluência celular. Plaqueamento com densidade celular de 1×10^5 células/mL e marcação nuclear com DAPI (AZUL). Anticorpo primário Fibrilina-2. Anticorpo secundário conjugado com FITC. Aumento 20x.

Após a padronização e a escolha do quarto dia de cultura após as células atingirem a confluência celular como sendo o método de partida para o estudo, iniciamos a investigação sobre a deposição de moléculas componentes das microfibrilas na matriz extracelular utilizando um ensaio de imunofluorescência em cultura de fibroblastos de derme derivados de camundongos selvagens ($Fbn1^{+/+}$ - WT) e deficientes em fibrilina-1 (heterozigotos: $Fbn1^{mg\Delta/+}$ - HT e homozigotos: $Fbn1^{mg\Delta/mg\Delta}$ - HO) como descrito em material e métodos.

As células foram inicialmente plaqueadas em lamínula de vidro de 13 mm, em densidade de 1×10^5 células/mL e cultivadas por quatro dias após atingirem a confluência celular.

A Figura 8 ilustra o resultado das imunofluorescências para as glicoproteína MAGP-1, Tropoelastina e Fibrilina-1, onde observamos uma diminuição conjunta da deposição destas proteínas na rede de microfibrilas dos fibroblastos derivados de camundongos deficientes em fibrilina-1: MAGP-1 (HT - 22% e HO - 83%), Tropoelastina (HT - 25% e HO - 87,5%) e Fibrilina-1 (HT - 26% e HO - 86%) se comparadas as dos fibroblastos controles derivados de camundongos selvagens (WT).

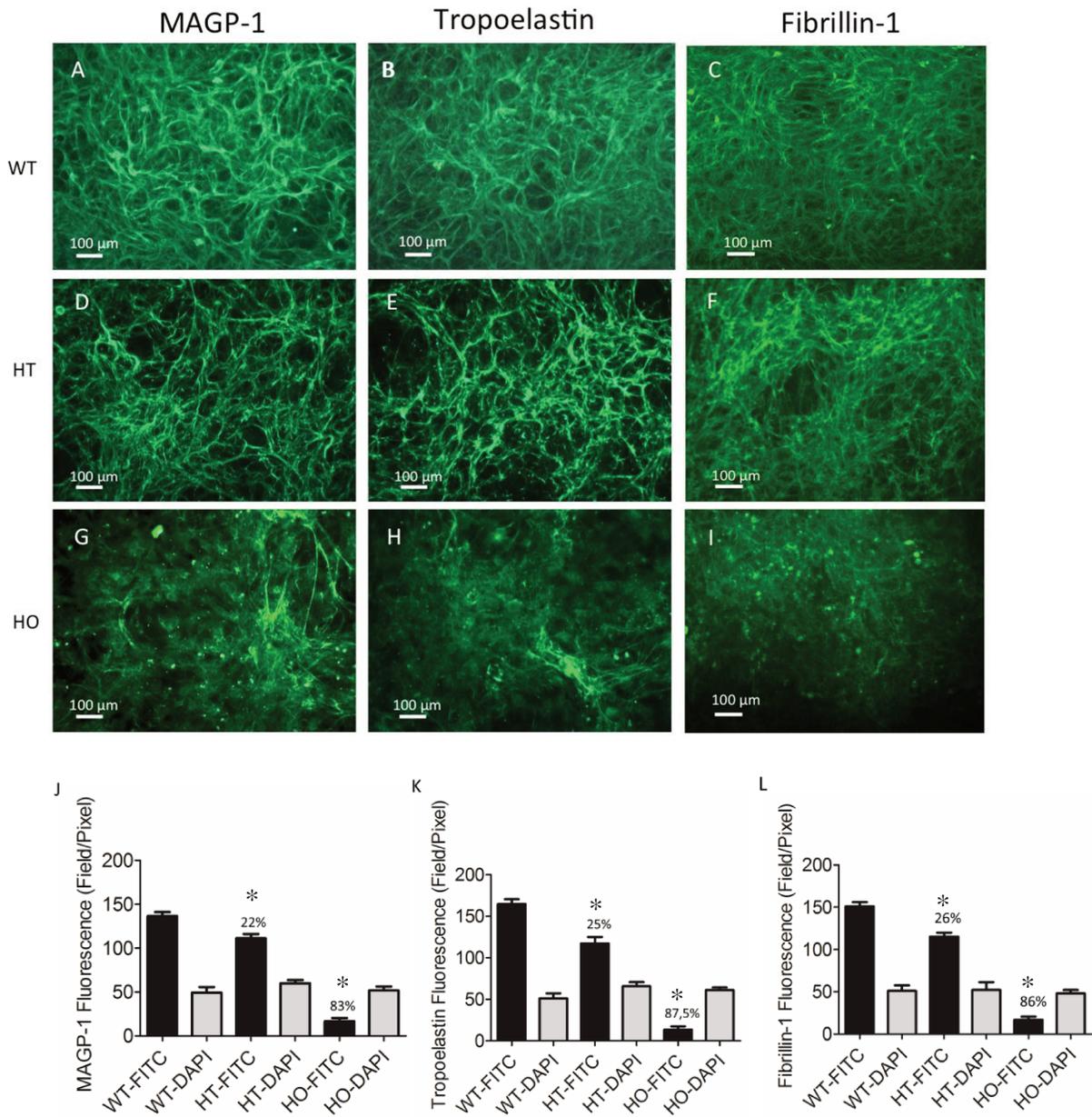


Figura 8 – Redução da deposição das microfibrilas de MAGP-1, Tropoelastina e Fibrilina-1 por imunofluorescência em cultura de fibroblastos selvagens e deficientes em fibrilina-1. Em (A, D e G) cultura de fibroblastos de derme derivados de camundongos selvagens (WT) e deficientes em fibrilina-1 (HT e HO) para **MAGP-1**. Em (B, E e H) cultura de fibroblastos de derme derivados de camundongos selvagens (WT) e deficientes em fibrilina-1 (HT e HO) para **Tropoelastina**. Em (C, F e H) cultura de fibroblastos de derme derivados de camundongos selvagens (WT) e deficientes em fibrilina-1 (HT e HO) para **Fibrilina-1**. Cultura de quatro dias pós-confluência celular (1×10^5 células/mL). Anticorpo secundário conjugado com FITC. Gráficos: Análise gráfica das fluorescências pixel/área * $p < 0,05$. Aumento 20x – Barra = 100 μ m.

A partir dos dados adquiridos na imunofluorescência, realizamos um ensaio ultra estrutural das fibras elásticas formadas, utilizando microscopia eletrônica de transmissão e varredura. Os dados demonstram que a rede de microfibrilas na matriz extracelular dos fibroblastos derivados de camundongos deficientes em fibrilina-1 (HT e HO) se apresenta mais delgada e fragmentada se comparada a dos fibroblastos derivados de camundongos selvagens (WT). A Figura 9 ilustra a visualização das microfibrilas das fibras elásticas formadas na matriz extracelular na cultura de fibroblastos de derme derivados de camundongos selvagens e deficientes em fibrilina-1.

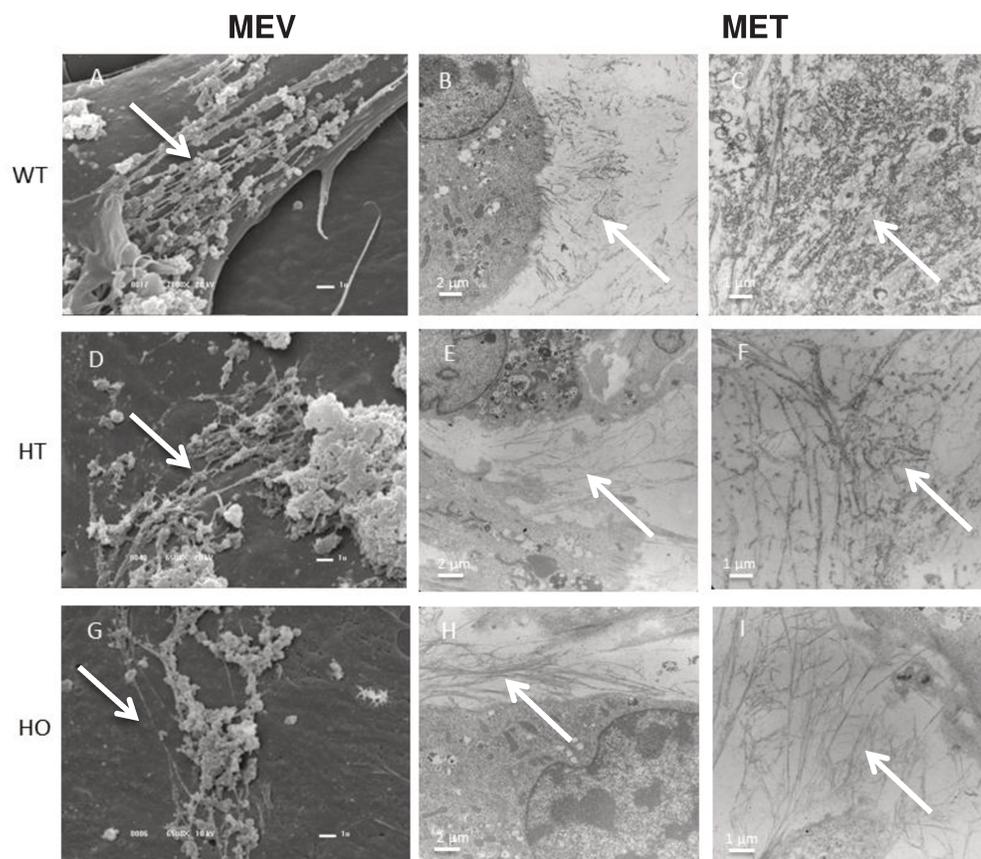


Figura 9 – Visualização das microfibrilas por microscopia eletrônica na matriz extracelular da cultura de fibroblastos selvagens e deficientes em fibrilina-1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) para fibroblastos selvagens (WT) em **A** e deficientes em fibrilina-1, heterozigotos (HT) em **D** e homozigotos (HO) em **G**. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) para fibroblastos selvagens (WT) em **B e C**; deficientes em fibrilina-1, heterozigotos (HT) em **E e F**; homozigotos (HO) em **H e I**. Cultura de fibroblastos de derme derivados de camundongos selvagens: *Fbn1*^{+/+} (WT), heterozigotos: *Fbn1*^{mgΔ/+} (HT) e homozigotos: *Fbn1*^{mgΔ/mgΔ} (HO) por 4 dias após atingir a confluência celular. Visualização das microfibrilas indicadas pelas setas. Barra = 2 μm e Barra = 1 μm.

Com o propósito de semi-quantificar a deposição das glicoproteínas MAGP-1, Tropoelastina e Fibrilina-1 na matriz extracelular de cultura de fibroblastos derivados de camundongos selvagens e deficientes em fibrilina-1, foi realizado o ensaio de *western-blotting*.

As células foram cultivadas por quatro dias após atingirem a confluência celular para obtenção do extrato proteico e os dados normalizados por beta-actina (42KDa). Neste ensaio, observamos a redução conjunta da expressão das proteínas MAGP-1 (HT – 32% e HO – 86%), Tropoelastina (HT – 33% e HO – 83%) e Fibrilina-1 (HT – 37% e HO – 87,5%) nas culturas celulares dos fibroblastos derivados de camundongos deficientes em fibrilina-1 (HT e HO) se comparado aos fibroblastos derivados de camundongos selvagens (WT). As Figuras 10A, 10B e 10C ilustram os resultados obtidos pela técnica de *western-blotting* para as proteínas MAGP-1 (31 KDa) e Tropoelastina (70 KDa) e Fibrilina-1 (350KDa), respectivamente.

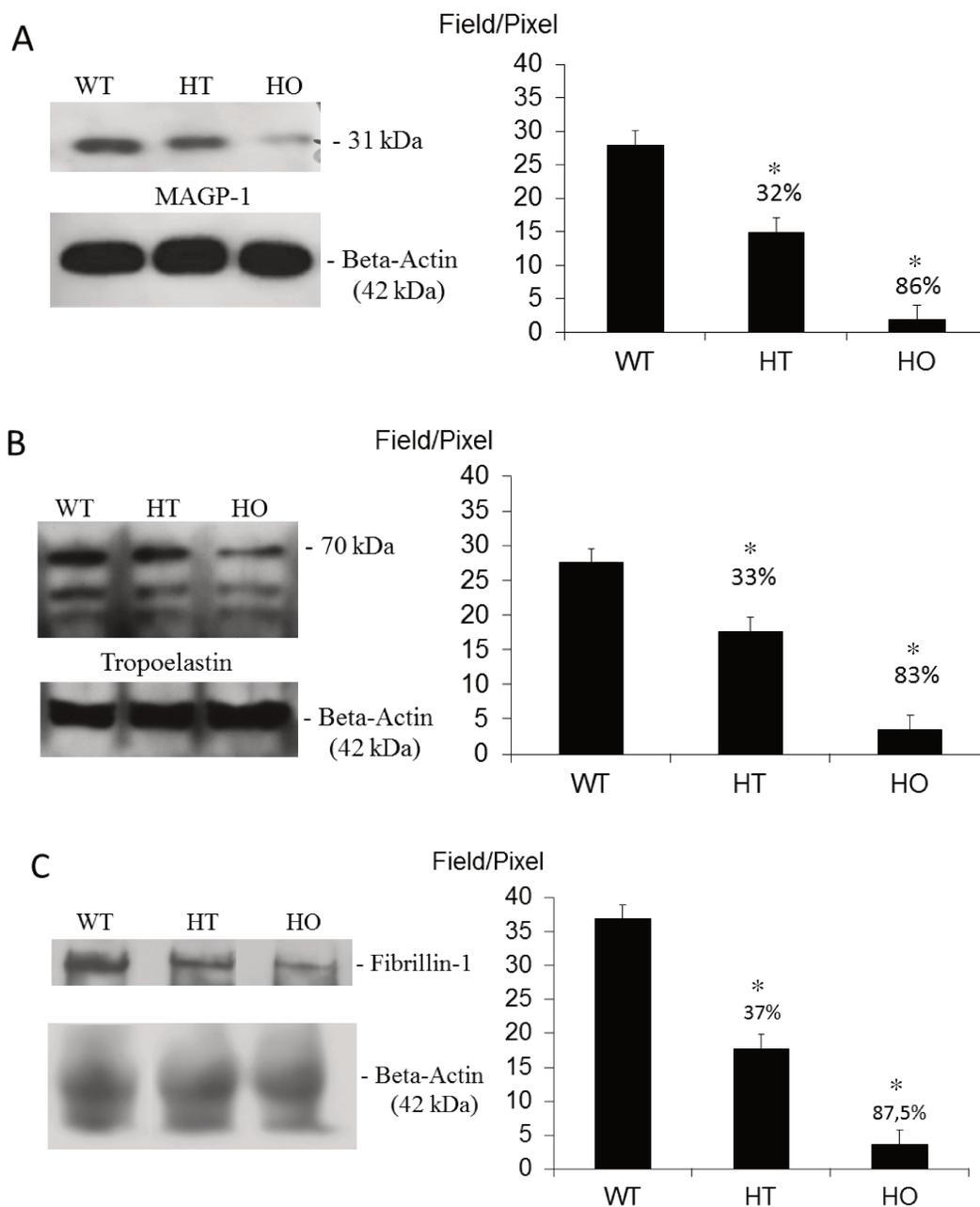


Figura 10 – Redução da expressão das proteínas MAGP-1, Tropoelastina e Fibrilina-1 em cultura celular de fibroblastos derivados de camundongos selvagens e deficientes em fibrilina-1. Western-blotting das glicoproteína MAGP-1 em A, Tropoelastina em B e Fibrilina-1 em C para os genótipos: selvagens $Fbn1^{+/+}$ (WT), heterozigotos $Fbn1^{mg\Delta/+}$ (HT) e homozigotos $Fbn1^{mg\Delta/mg\Delta}$ (HO). Extrato proteico celular de fibroblastos de derme obtido em cultura de quatro dias pós-confluência celular. Gráficos: Análise gráfica das bandas pixel/área * $p < 0,05$.

A fim de averiguar e investigar o nível de expressão gênica relativa das glicoproteínas em estudo após o ensaio de deposição na matriz extracelular realizamos um ensaio de Real-Time PCR, onde as células foram cultivadas por quatro dias pós-confluência celular e em seguida foram realizados os protocolos para extração de mRNA e síntese do cDNA requerido.

Neste ensaio, podemos observar que não houve diferenças significativas na expressão gênica relativa de MAGP-1, Tropoelastina, Fibrilina-2, MAGP-2, Fibulina-5 e LOX-1 dos fibroblastos derivados de camundongos deficientes em fibrilina-1 (HT e HO) se comparado aos fibroblastos controles derivados de camundongos selvagens (WT). Porém, ocorreu um aumento significativo na expressão gênica relativa das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9 dos fibroblastos derivados de camundongos deficientes em fibrilina-1 (HT e HO) se comparado ao seu controle selvagem (WT). A Figura 11 ilustra os dados obtidos pela técnica de Real-time PCR na cultura de fibroblastos de derme derivados de camundongos selvagens e deficientes em fibrilina-1.

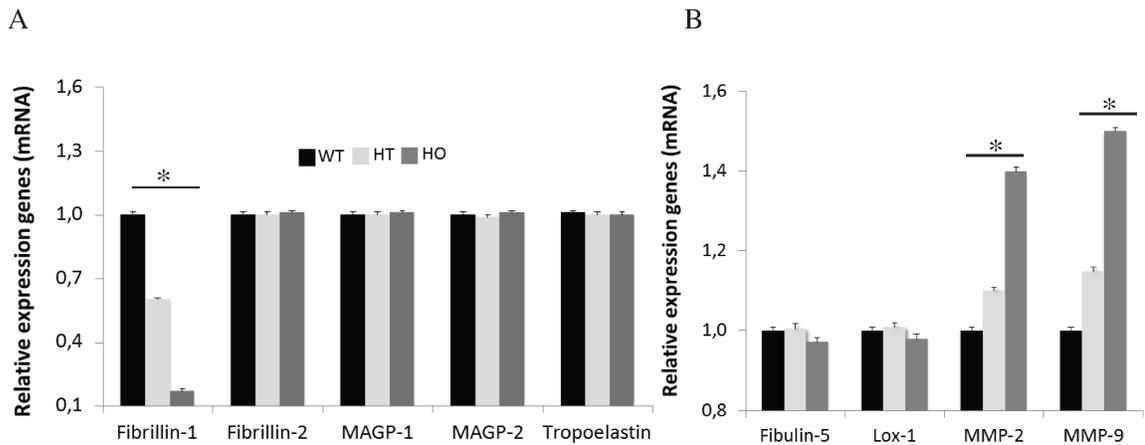


Figura 11 – Aumento dos níveis de expressão gênica relativa (mRNA) de MMP-2 e MMP-9 quantificados por PCR-Real time na cultura celular de fibroblastos de derme derivados de camundongos selvagens e deficientes em fibrilina-1. Em **A** as proteínas Fibrilina-1, Fibrilina-2, MAGP-1, MAGP-2 e Tropoelastina. Em **B**, as proteínas Fibulina-5, Lox-1, MMP-2 e MMP-9. Cultura de fibroblastos de derme derivados de camundongos selvagens e deficientes em fibrilina-1 quatro dias pós-confluência celular. Genótipos: selvagens $Fbn1^{+/+}$ (WT), heterozigotos $Fbn1^{mg\Delta/+}$ (HT) e homozigotos $Fbn1^{mg\Delta/mg\Delta}$ (HO). * $p < 0,05$.

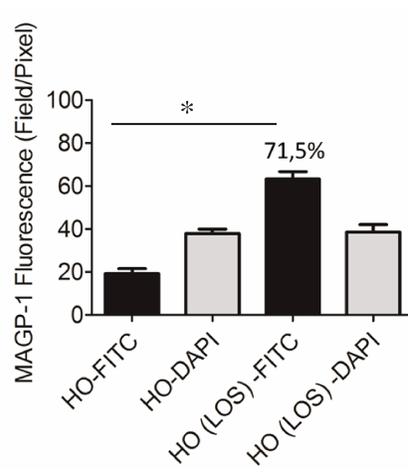
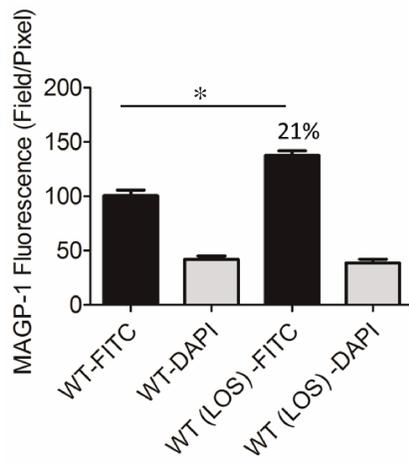
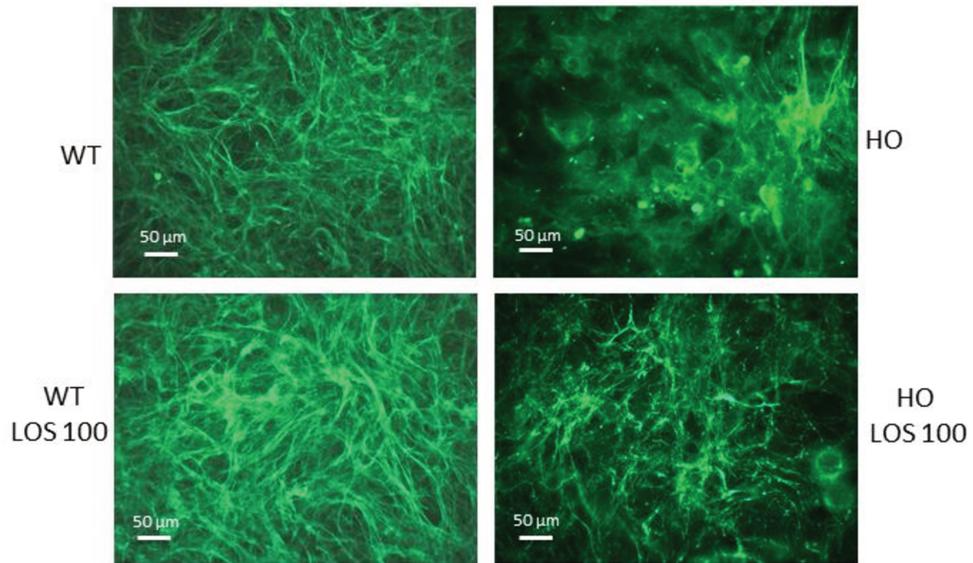
Após a avaliação primária do perfil elastogênico dos fibroblastos de derme derivados de camundongos selvagens e deficientes em fibrilina-1, iniciamos o estudo do comportamento celular dos fibroblastos frente ao tratamento com o princípio ativo losartan, comumente descrito na literatura científica e seguindo os protocolos já mencionados em material e métodos.

Para este ensaio, os fibroblastos de derme foram cultivados por quatro dias após atingirem a confluência celular na ausência ou presença de 100 $\mu\text{Mol/L}$ de losartan potássico (princípio ativo). Os dados sugerem um aumento significativo na deposição das microfibrilas de MAGP-1 (WT LOS – 21% e HO LOS - 71,5%) e Tropoelastina (WT LOS – 18% e HO LOS – 68,5%) na cultura celular de fibroblastos de derme derivados de camundongos selvagens (WT) e deficientes

em fibrilina-1 (HO) após o tratamento com 100 $\mu\text{Mol/L}$ do princípio ativo losartan se comparado ao seu controle sem a utilização do tratamento. Não se observou mudanças significativas na deposição das microfibrilas de Fibrilina-1 dos fibroblastos selvagens (WT) e deficientes em fibrilina-1 (HO) após o mesmo tratamento. A Figura 12 ilustra o resultado das imunofluorescências para MAGP-1, Tropoelastina e Fibrilina-1 após o tratamento com o princípio ativo losartan (100 $\mu\text{Mol/L}$) na cultura de fibroblastos de derme derivados de camundongos selvagens e deficientes em fibrilina-1.

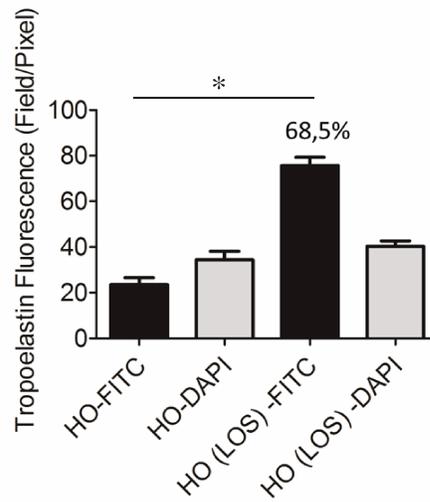
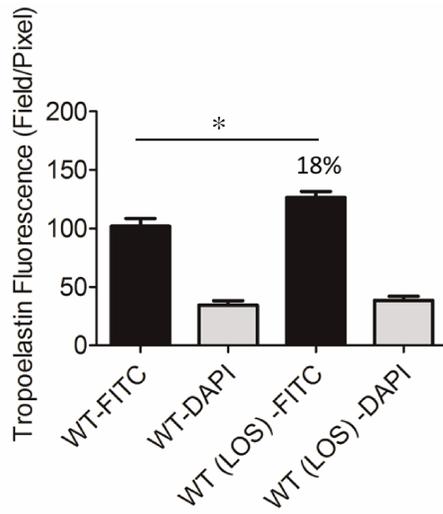
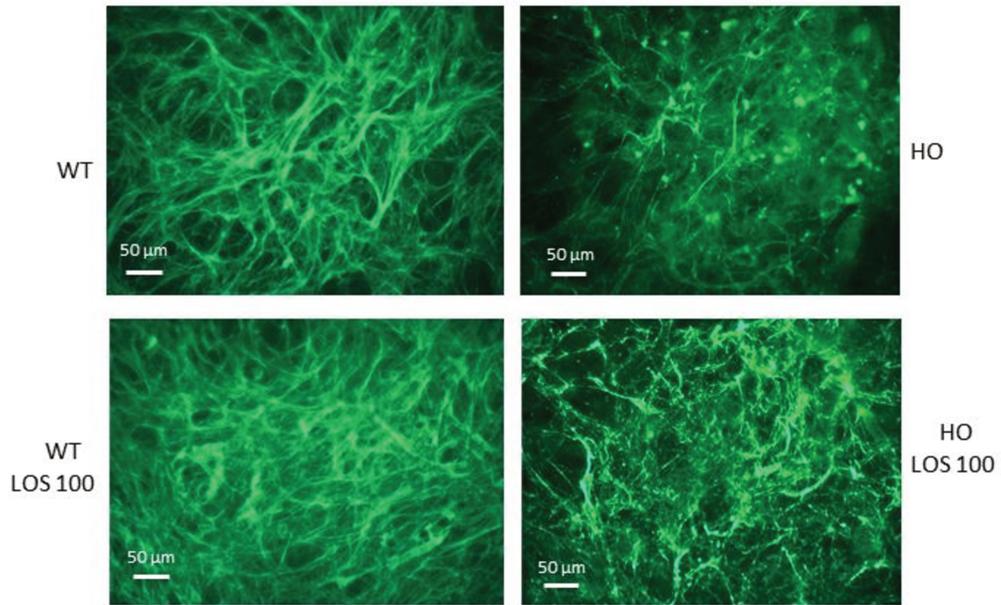
A)

MAGP-1



B)

Tropoelastin



C)

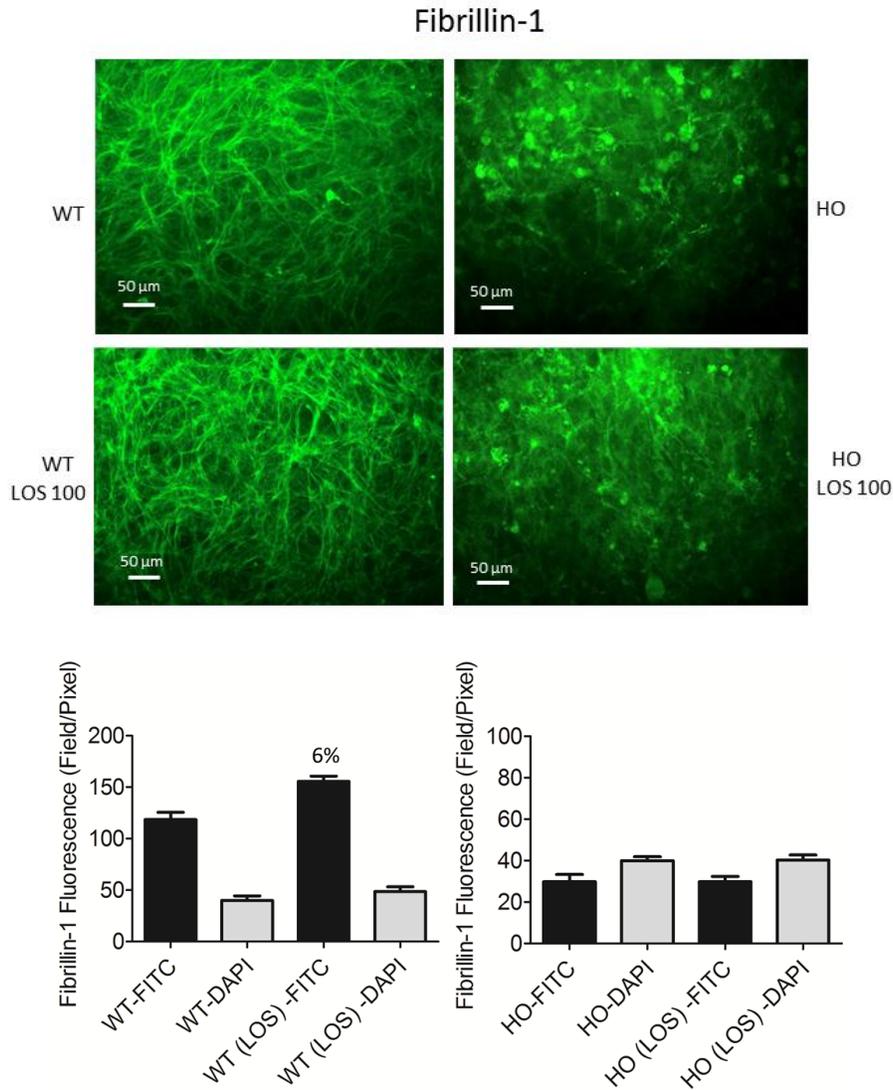
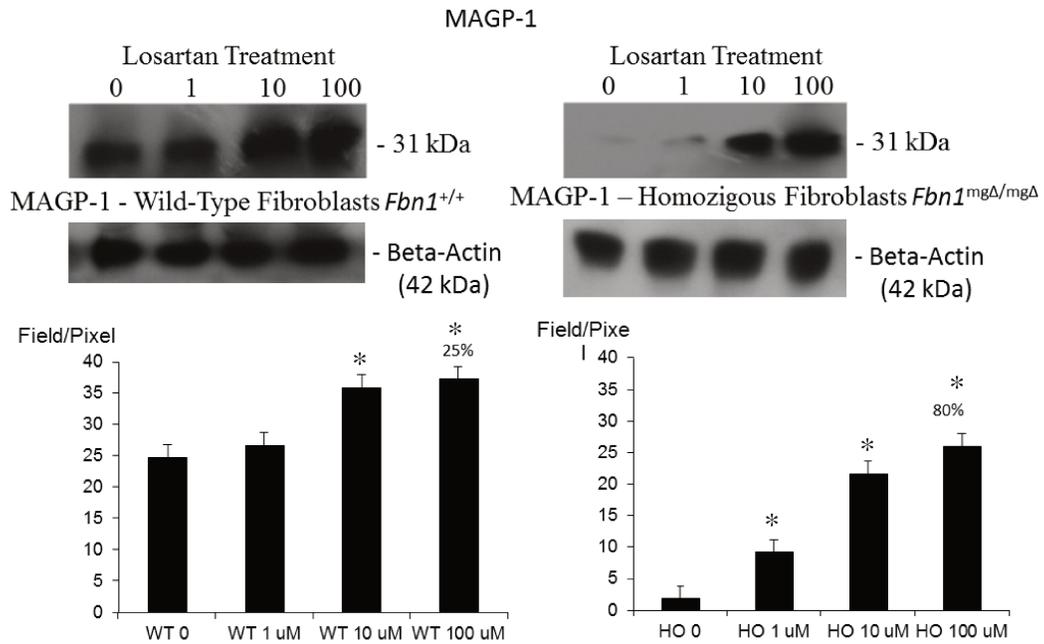


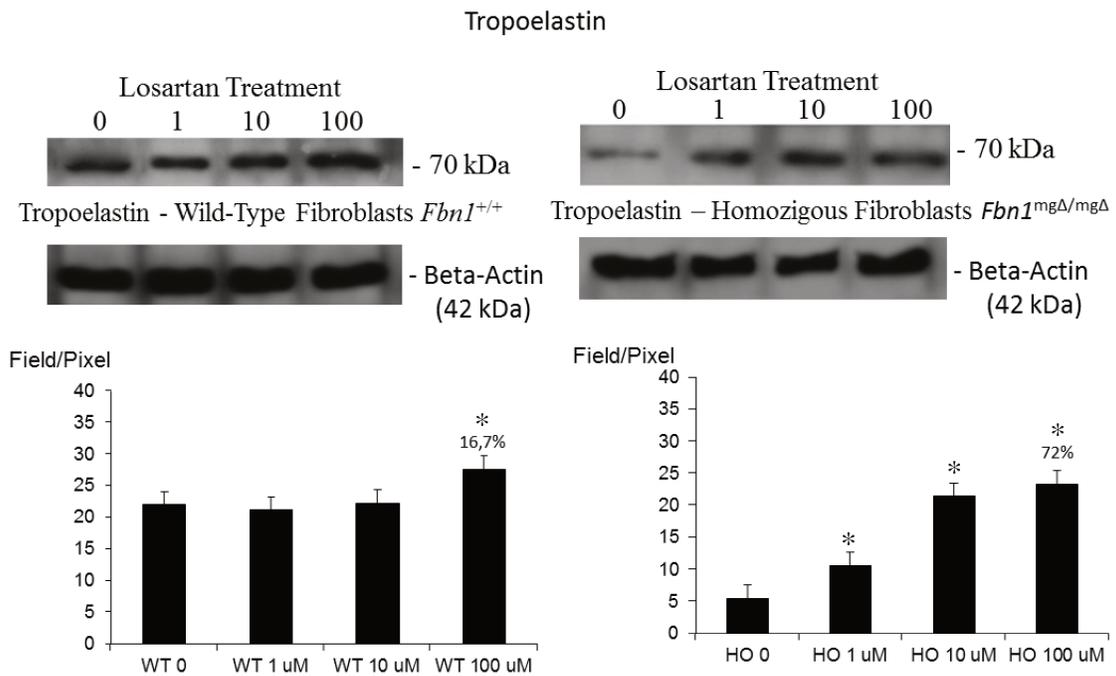
Figura 12 – Aumento da deposição das microfibrilas de MAGP-1 e Tropoelastina por imunofluorescência após o tratamento com princípio ativo losartan. Imunofluorescência para MAGP-1 em **A**, Tropoelastina em **B** e Fibrilina-1 em **C**. Cultura primária de fibroblastos de derme derivados de camundongos selvagens (WT) e deficientes em fibrilina-1 (HO), quatro dias pós-confluência celular (1×10^5 células/mL) na ausência ou presença do princípio ativo losartan potássico 100 $\mu\text{Mol/L}$. Anticorpo secundário conjugado com FITC. Gráficos: Análise gráfica das fluorescências pixel/área * $p < 0,05$. Aumento 40x – Barra = 50 μm .

A propósito de corroborar os dados encontrados na imunofluorescência após o tratamento com o princípio ativo losartan, foi realizado o ensaio de *western-blotting* para as glicoproteínas MAGP-1, Tropoelastina e Fibrilina-1 utilizando o mesmo procedimento. Para este ensaio, os fibroblastos de derme derivados de camundongos selvagens e deficientes em fibrilina-1 foram cultivados por quatro dias pós-confluência celular na ausência ou presença do princípio ativo losartan (0,1,10 e 100 μ Mol/L) para obtenção do extrato proteico. Os dados obtidos corroboram com os encontrados na imunofluorescência, sugerindo um aumento na expressão das proteínas MAGP-1 (WT LOS 100 - 25% e HO LOS 100 – 80%) e Tropoelastina (WT LOS 100 – 16,7% e HO LOS 100 – 72%) na cultura celular de fibroblastos derivados de camundongos selvagens (WT) e deficientes em fibrilina-1 (HO) após o tratamento com 100 μ Mol/L do princípio ativo losartan se comparado ao seu controle sem o tratamento. Não se observou mudanças significativas na deposição das microfibrilas de Fibrilina-1 dos fibroblastos selvagens (WT) e deficientes em fibrilina-1 (HO) após o mesmo tratamento. A Figura 13 ilustra o resultado dos imunoblots para MAGP-1, Tropoelastina e Fibrilina-1 na ausência e presença do tratamento com losartan.

A)



B)



C)

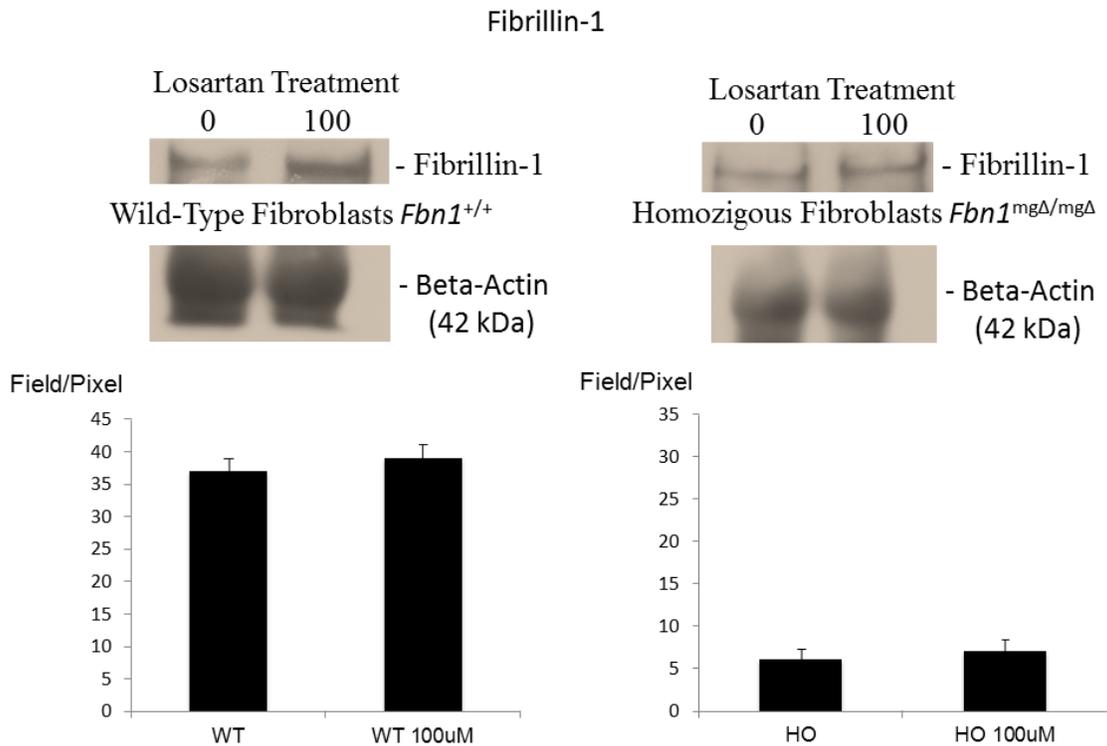


Figura 13 – Aumento da expressão das proteínas MAGP-1 e Tropoelastina em cultura celular de fibroblastos derivados de camundongos selvagens e deficientes em fibrilina-1 após o tratamento com o princípio ativo losartan. *Western-blotting* das glicoproteína MAGP-1 em A (WT e HO), Tropoelastina em B (WT e HO) e Fibrilina-1 em C (WT e HO) para os genótipos: selvagens *Fbn1*^{+/+} (WT) e homozigotos *Fbn1*^{mgΔ/mgΔ} (HO). Extrato proteico celular de fibroblastos de derme obtido em cultura de quatro dias pós-confluência celular na ausência ou presença do princípio ativo losartan (0,1,10 ou 100 μMol/L). Gráficos: Análise gráfica das bandas pixel/área *p<0,05.

Dando seguimento a linha de pesquisa, realizamos um ensaio para averiguar a expressão gênica relativa de mRNA por Real-Time PCR das principais glicoproteínas em estudo, após o tratamento dos fibroblastos com o princípio ativo losartan. Para este ensaio, as células foram

cultivadas por quatro dias pós-confluência celular na presença de 100µMol/L do princípio ativo losartan e em seguida realizados os protocolos para extração de mRNA e execução do experimento. Os dados sugerem uma redução substancial na expressão gênica relativa das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9 na cultura dos fibroblastos de derme derivados de camundongos deficientes em fibrilina-1 (HT e HO) após o tratamento com 100µMol/L do princípio ativo losartan. Não se observou variações significativas na expressão gênica relativa das proteínas Fibrilina-1, Fibrilina-2, MAGP-1 e Tropoelastina após o mesmo tratamento. A Figura 14 ilustra os resultados do ensaio de Real Time – PCR após o tratamento com o princípio ativo losartan na cultura de fibroblastos de derme derivados de camundongos selvagens e deficientes em fibrilina-1.

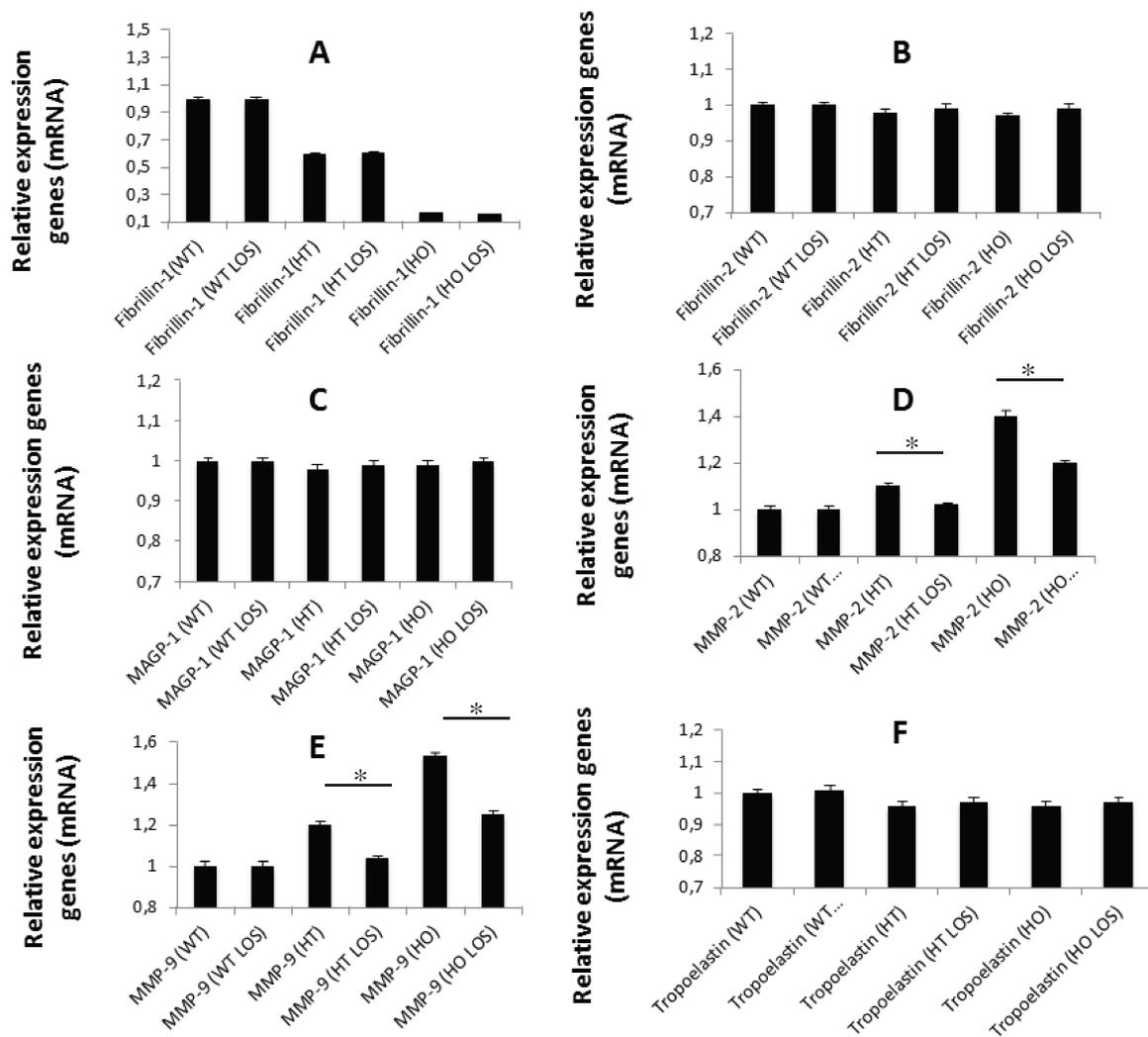
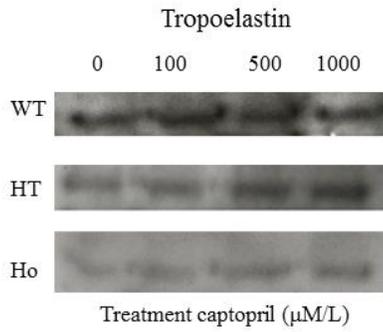


Figura 14 – Redução do níveis de expressão relativa(mRNA) de MMP-2 e MMP-9 quantificados por Real-time PCR após tratamento com o princípio ativo losartan. Em A Fibrilina-1, em B Fibrilina-2, em C MAGP-1, em D MMP-2, em E MMP-9 e em F Tropoelastina. Cultura de fibroblastos de derme derivados de camundongos selvagens e deficientes em fibrilina-1 quatro dias pós-confluência celular em ausência ou presença de 100µMol/L do losartan. Genótipos selvagens: Fbn1^{+/+} (WT), heterozigotos: Fbn1^{mgΔ/+} (HT) e homozigotos: Fbn1^{mgΔ/mgΔ} (HO). *p<0,05.

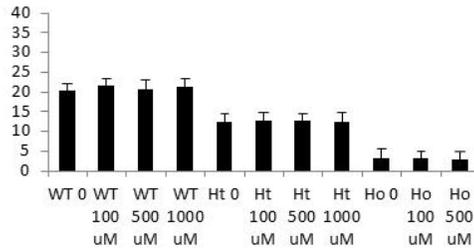
Utilizando o conceito do princípio ativo losartan como um inibidor de receptor AT1 e consequente geração de acúmulo de angiotensina II, foi realizado testes para averiguar a deposição das proteínas MAGP-1 e Tropoelastina na matriz extracelular de cultura de fibroblastos de derme derivados de camundongos selvagens e deficientes em fibrilina-1 frente à utilização do princípio ativo captopril e os peptídeos de angiotensina I e angiotensina II, como tratamento. Para realização dos testes foi desenvolvida a técnica de *Western-blotting*. Para o princípio ativo captopril foram utilizadas as concentrações-testes: 0, 100, 500 e 1000 $\mu\text{Mol/L}$; para a Angiotensina I e II foram utilizadas as concentrações: 0 nMol/L ; 1 nMol/L ; 10 nMol/L e 1 $\mu\text{Mol/L}$.

Os dados sugerem que o tanto o princípio ativo captopril como os peptídeos de angiotensina I e II não alteraram de forma significativa a expressão das proteínas MAGP-1 e Tropoelastina na cultura celular dos fibroblastos de derme derivados de camundongos selvagens (WT) e deficientes em fibrilina-1 (HT e HO) após o tratamento. A Figura 15 ilustra os resultados dos *immunoblottings* das culturas de fibroblastos de derme derivados de camundongos selvagens e deficientes em fibrilina-1 para o tratamento com o princípio ativo captopril, angiotensina I e angiotensina II.

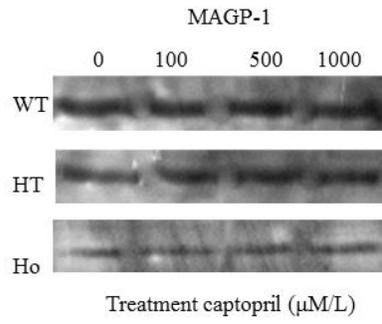
A)



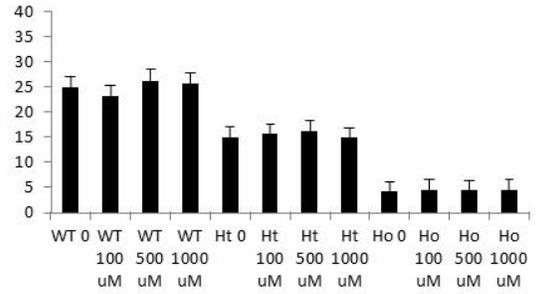
Pixel/Field



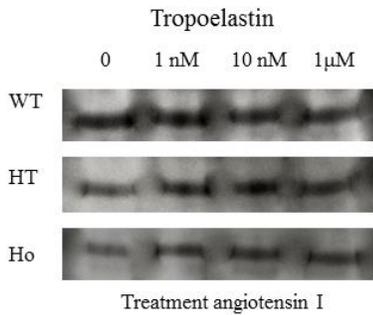
B)



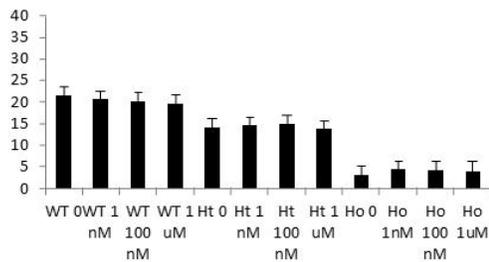
Pixel/Field



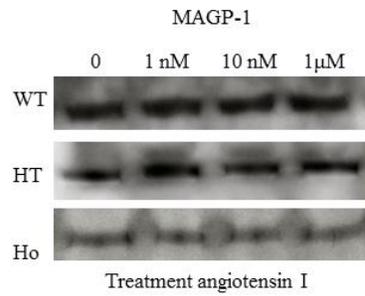
C)



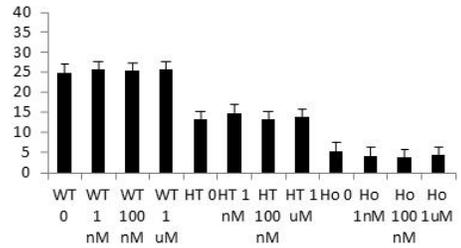
Pixel/Field



D)



Pixel/Field



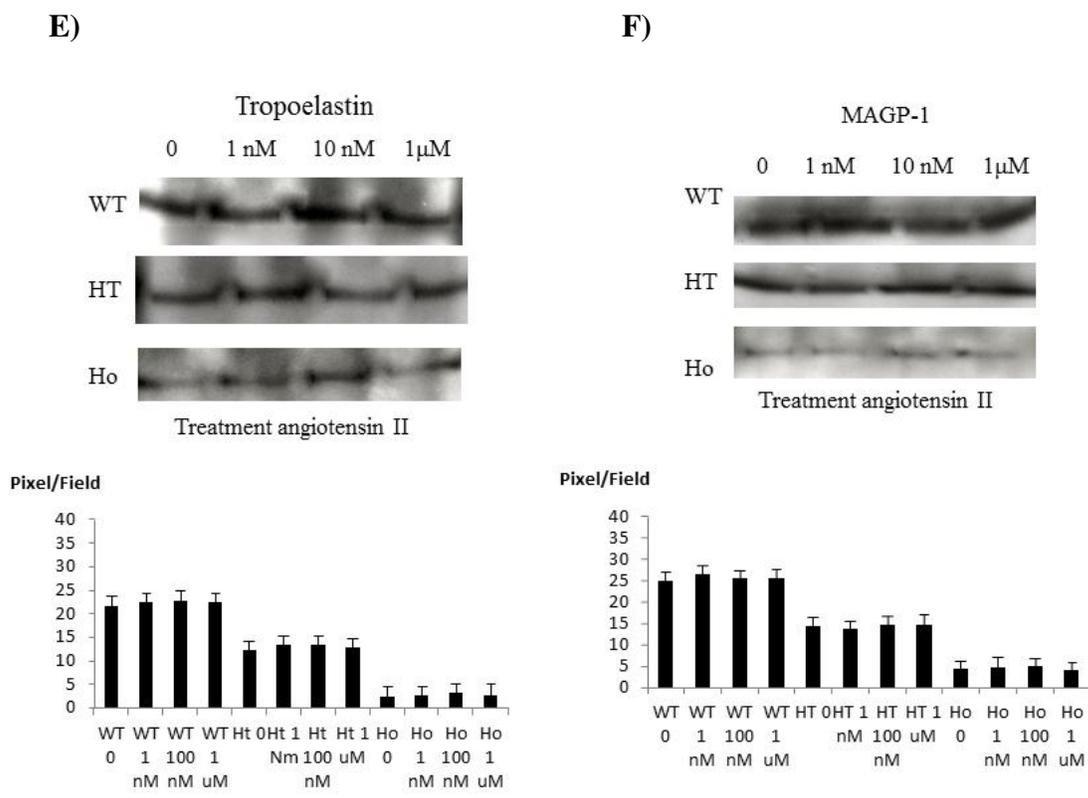


Figura 15 – Não alteração da expressão das proteínas MAGP-1 e Tropoelastina em cultura celular de fibroblastos de derme derivados de camundongos selvagens e deficientes em fibrilina-1 após o tratamento com o princípio ativo captopril, angiotensina I e II. Western-blotting das Proteínas MAGP-1 em B, D e F; Tropoelastina em A, C e E. Para os tratamentos: Captopril (0, 100, 500 e 1000 μMol/L) ; Angiotensina I e II (0, 1 e 10 nMol/L e 1 μMol/L). Extrato proteico celular de fibroblastos de derme, com quatro dias de tratamento após confluência celular. Genótipos: selvagem *Fbn1*^{+/+} (WT), heterozigoto *Fbn1*^{mgΔ/+} (HT) e homozigotos *Fbn1*^{mgΔ/mgΔ} (Ho). Gráficos: Análise gráfica das bandas pixel/área p<0,05.

Ao constatarmos a influência indireta do princípio ativo losartan no perfil elastogênico dos fibroblastos de derme derivados de camundongos selvagens e deficientes em fibrilina-1, iniciamos um estudo sobre as possíveis vias de sinalização atuante do fármaco. Sendo assim,

realizamos em um primeiro momento o ensaio de semi-quantificação de TGF-beta na cultura celular. Para este estudo utilizamos o ensaio de ELISA conforme descritos em material e métodos. Através dos dados obtidos, observamos um aumento significativo na atividade da citocina ativa de TGF-beta na cultura celular dos fibroblastos de derme derivados de camundongos deficientes em fibrilina-1 (HO) se comprado ao seu controle selvagem (WT). Verificamos também a redução na atividade desta citocina após o tratamento com 100µMol/L do princípio ativo losartan. A Figura 16 ilustra o resultado da semi-quantificação de TGF-beta total e ativo por ELISA na ausência ou presença do princípio ativo losartan (100µMol/L).

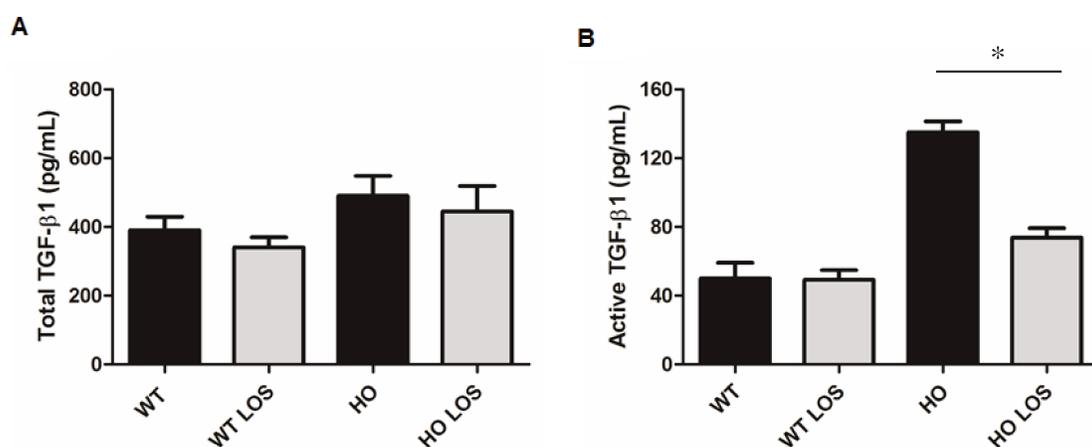
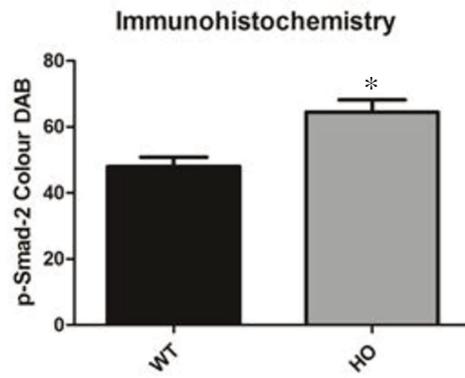
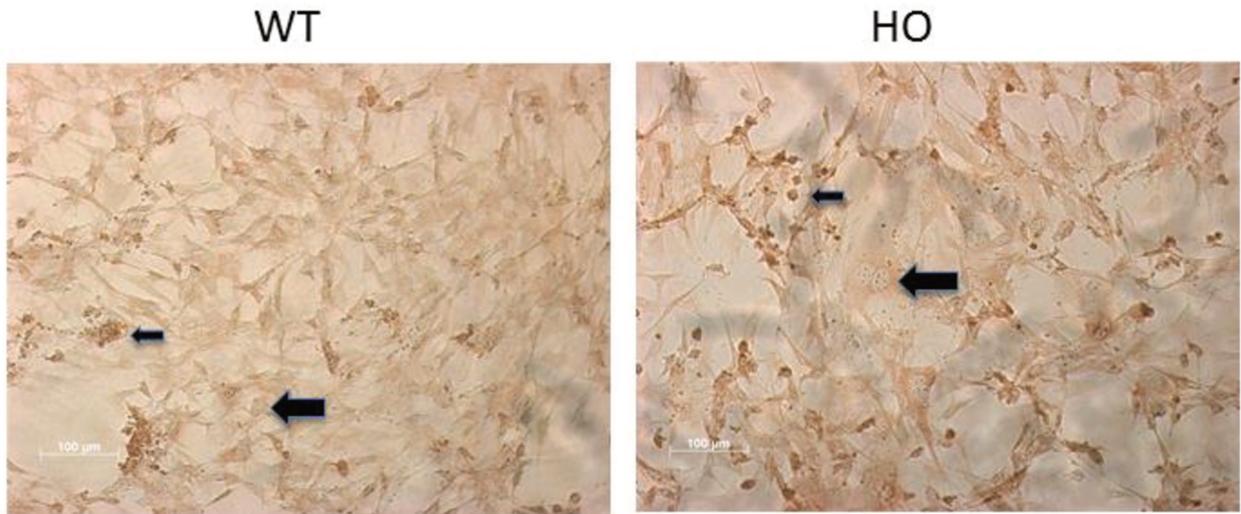


Figura 16 – Aumento dos níveis de TGF ativo semi-quantificado por ELISA. Em (A) TGF-beta total e em (B) TGF-beta ativo em cultura de fibroblastos de derme derivados de camundongos selvagens - $Fbn1^{+/+}$ (WT) e deficientes em Fibrilina-1 - $Fbn1^{mg\Delta/mg\Delta}$ (HO), quatro dias pós-confluência celular na ausência ou presença de 100µMol/L do losartan.* $p < 0,05$.

Após a análise da semi-quantificação de TGF-beta por ELISA e segundo a linha de estudo, investigamos a atividade da via de sinalização canônica de atuação de TGF-beta segundo a literatura científica.

Para tal, realizamos ensaios de imunohistoquímica e *western-blotting* para SMAD-2 (via canônica de atuação de TGF-beta). Neste ensaio, os fibroblastos de derme derivados de camundongos selvagens e deficientes em fibrilina-1 foram cultivados por quatro dias pós-confluência celular na ausência ou presença do princípio ativo losartan (100µMol/L). Os dados obtidos nestes ensaios mostraram um aumento da expressão de SMAD-2 em fibroblastos de derme derivados de camundongos deficientes em fibrilina-1 (HO) se comparado ao seu controle selvagem (WT). Após o tratamento destas células com o princípio ativo losartan, observou-se uma redução da expressão de SMAD-2. A Figura 17 ilustra o resultado dos ensaios de imunohistoquímica e *western-blotting* para SMAD-2 na ausência ou presença do princípio ativo losartan na cultura de fibroblastos de derme derivados de camundongos selvagens e deficientes em fibrilina-1.

A)



B)

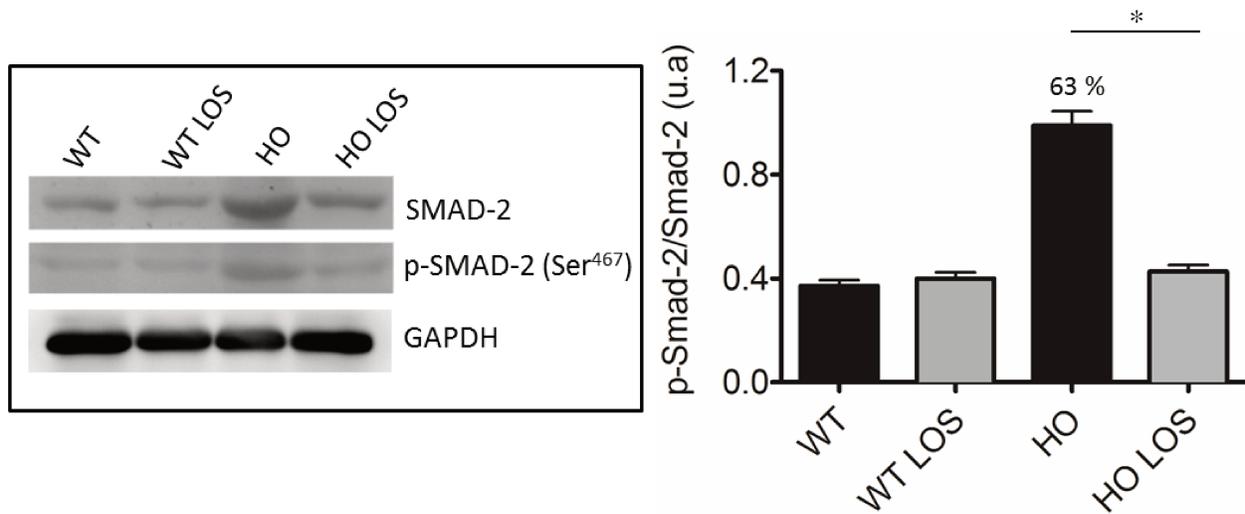
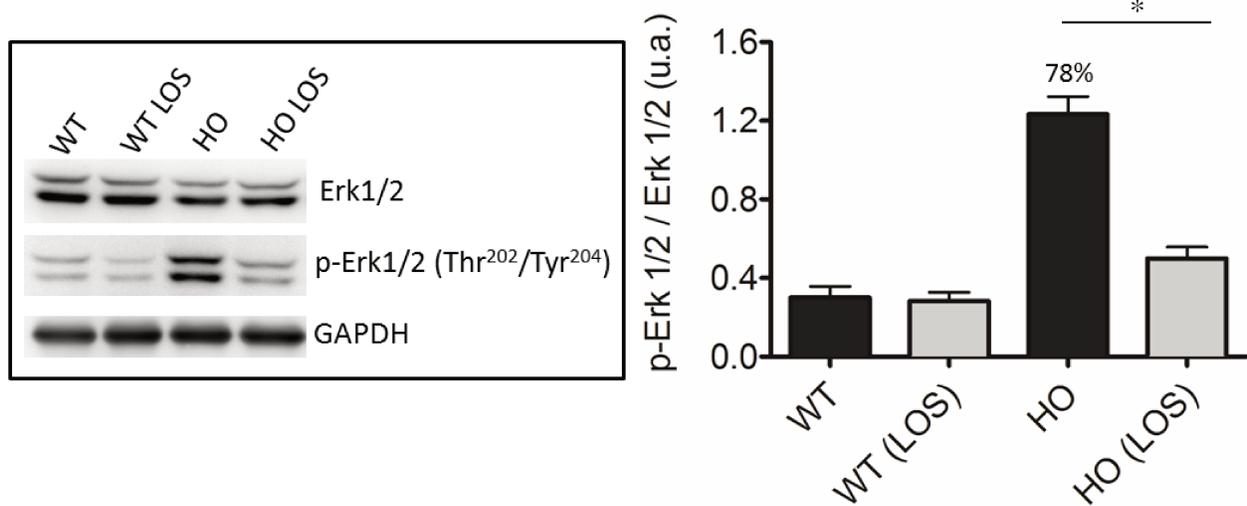


Figura 17 – Aumento da expressão de SMAD-2 em cultura celular de fibroblastos de derme derivados de camundongos selvagens e deficientes em fibrilina-1. Imunohistoquímica (A) e *Western-blotting* (B) de SMAD-2 para os genótipos: selvagens $Fbn1^{+/+}$ (WT) e homocigotos $Fbn1^{mg\Delta/mg\Delta}$ (HO). Cultura celular de fibroblastos de derme quatro dias pós-confluência celular na presença ou ausência do princípio ativo losartan ($100\mu\text{Mol/L}$). Gráficos: Análise gráfica das bandas pixel/área e coloração por DAB.* $p < 0,05$.

Em seguida, realizamos ensaios para investigar a atividade da via de sinalização não canônica de atuação de TGF-beta. Assim, realizamos ensaios de *western-blotting* para ERK1/2 e JNK-1. Os fibroblastos de derme derivados de camundongos selvagens e deficientes em fibrilina-1 foram cultivados por quatro dias pós-confluência celular na presença ou ausência do losartan ($100\mu\text{Mol/L}$). Neste ensaio, os dados mostraram um aumento da expressão de ERK1/2 e JNK-1 na cultura de fibroblastos de derme derivados de camundongos deficientes em fibrilina-1 (HO) se comparado ao seu controle selvagem (WT). Após o tratamento com o princípio ativo losartan observou-se nestas mesmas células uma redução da expressão de ERK1/2 e JNK-1. A Figura 18 ilustra os resultados do ensaio de *western-blotting* para ERK1/2 e JNK-1 na ausência ou presença

de 100 μ Mol/L do princípio ativo losartan na cultura de fibroblastos de derme derivados de camundongos selvagens e deficientes em fibrilina-1.

A)



B)

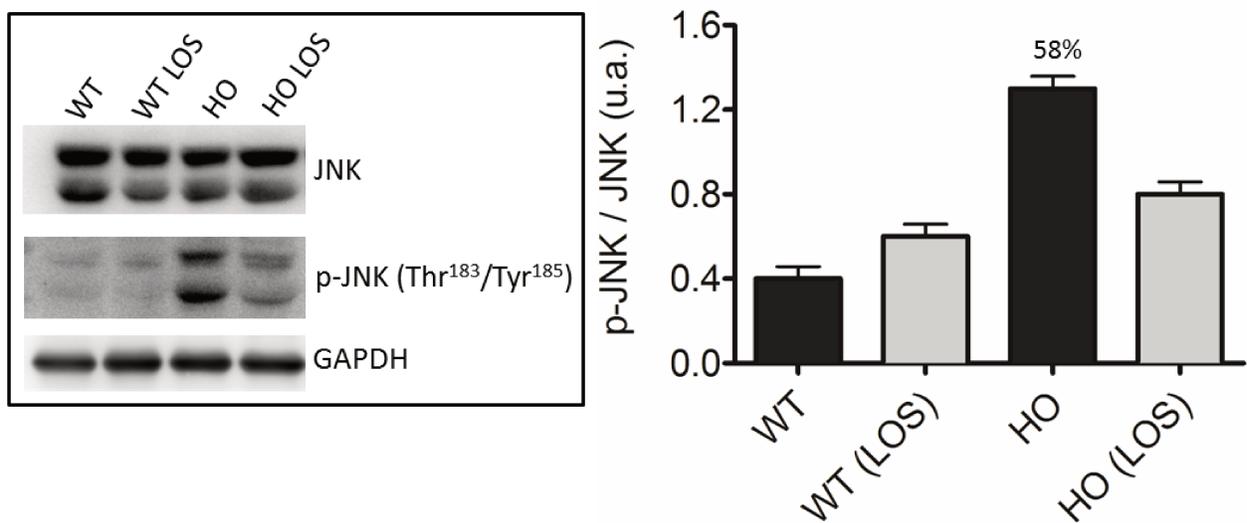


Figura 18 – Aumento da expressão de ERK1/2 e JNK-1 em cultura celular de fibroblastos de derme derivados de camundongos selvagens e deficientes em fibrilina-1. Western-blotting de ERK1/2 (A) e JNK-1 (B) para os genótipos: selvagens $Fbn1^{+/+}$ (WT) e homocigotos $Fbn1^{mg\Delta/mg\Delta}$ (HO). Cultura celular de fibroblastos de derme quatro dias pós-confluência celular na presença ou ausência do losartan (100 μ Mol/L). Gráficos: Análise gráfica das bandas pixel/área. * $p < 0,05$.

A fim de verificar uma possível alteração no processo metabólico dos fibroblastos de derme deficientes em fibrilina-1, investigamos também os níveis de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), utilizando uma sonda 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H₂DCFDA) *in vivo* através do ensaio de imunofluorescência em cultura de fibroblastos de derme derivados de camundongos selvagens e deficientes em fibrilina-1. Os dados sugerem um aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio na cultura de fibroblastos de derme derivados de camundongos deficientes em fibrilina-1 (HO) se comparado ao seu controle selvagem (WT). A Figura 19 ilustra o resultado do ensaio de imunofluorescência para espécies reativas de oxigênio (EROs) na cultura de fibroblastos de derme derivados de camundongos selvagens e deficientes em fibrilina-1.

Reactive Oxygen Species (ROS)

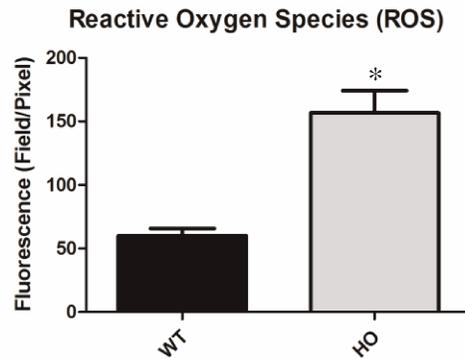
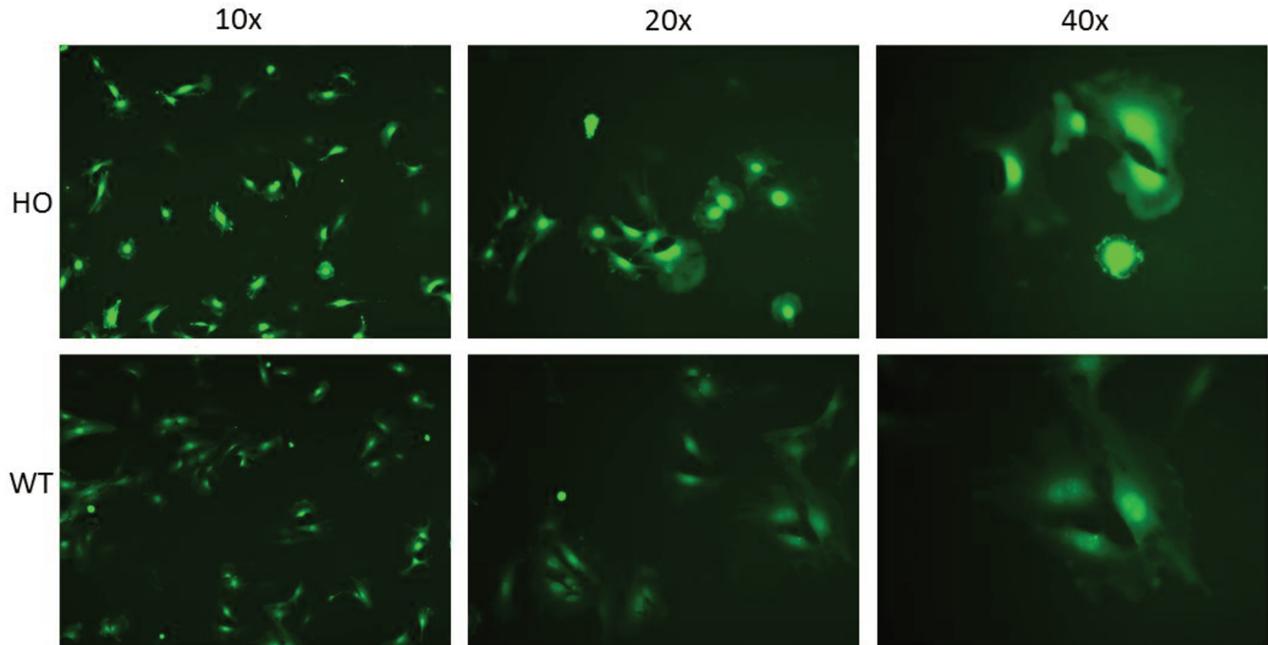


Figura 19 – Aumento nos níveis de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em cultura de fibroblastos de derme derivados de camundongos selvagens e deficientes em fibrilina-1. Fluorescência para espécies reativas de oxigênio (EROs) utilizando uma sonda H₂DCFDA. Cultura primária de fibroblastos de derme derivados de camundongos selvagens (WT) e deficientes em fibrilina-1 (HO). Gráficos: Análise gráfica das fluorescência pixel/área. *p<0,05. Filtro FITC.

Após análise dos resultados dos ensaios de EROs, verificamos a atividade da via de sinalização NFk-B, responsável indiretamente pelo aumento de EROs, através de uma ensaio de *western-blotting*. Os dados deste ensaio sugerem uma diminuição na expressão de NFk-B na cultura dos fibroblastos de derme deficientes em fibrilina-1 (HO) se comparado ao seu controle selvagem (WT). Após o tratamento destas células com o princípio ativo losartan (100µMol/L) observou aumento na sua respectiva expressão. A Figura 20 ilustra o resultado do ensaio de *western-blotting* em cultura de fibroblastos de derme derivados de camundongos selvagens e deficientes em fibrilina-1 na ausência ou presença do princípio ativo losartan (100µMol/L).

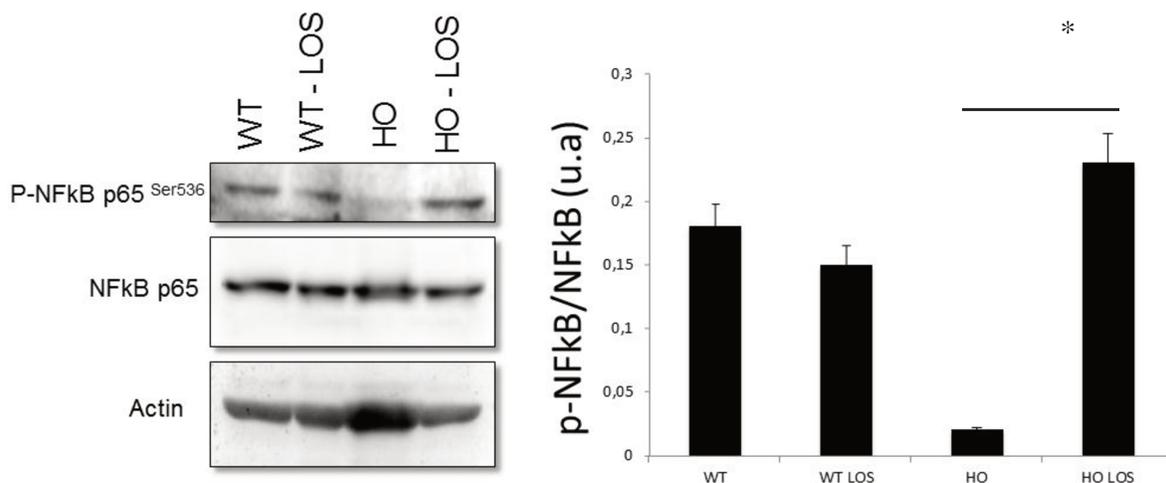


Figura 20 – Redução da expressão de NFk-B em cultura de fibroblastos de derme derivados de camundongos selvagens e deficientes em fibrilina-1. *Western-blotting* de NFk-B para os genótipos: selvagens $Fbn1^{+/+}$ (WT) e homocigotos $Fbn1^{mg\Delta/mg\Delta}$ (HO). Cultura celular de fibroblastos de derme quatro dias pós-confluência celular na ausência ou presença do princípio ativo losartan (100µMol/L). Gráficos: Análise gráfica das bandas pixel/área. * $p < 0,05$.

Por fim, verificamos também a atividade das enzimas metaloproteinasas da matriz extracelular na cultura de fibroblastos de derme derivados de camundongos selvagens e deficientes em fibrilina-1, envolvidas no processo de remodelamento e degradação das fibras

elásticas. Para este ensaio, utilizamos a técnica de zimografia *in situ*, descrita em material e métodos. Os resultados foram obtidos por fluorescência.

Os dados demonstram um aumento na atividade das metaloproteinases de matriz extracelular na cultura de fibroblastos de derme derivados de camundongos deficientes em fibrilina-1 (HO) se comparado ao seu controle selvagem (WT). Podemos observar também uma redução da atividade das metaloproteinases após o tratamento destas células com o princípio ativo losartan (100 μ Mol/L). A Figura 21 ilustra o resultado do ensaio de zimografia *in situ* para fibroblastos de derme derivados de camundongos selvagens e deficientes em fibrilina-1, cultivados por quatro dias pós-confluência celular na ausência ou presença do princípio ativo losartan (100 μ Mol/L).

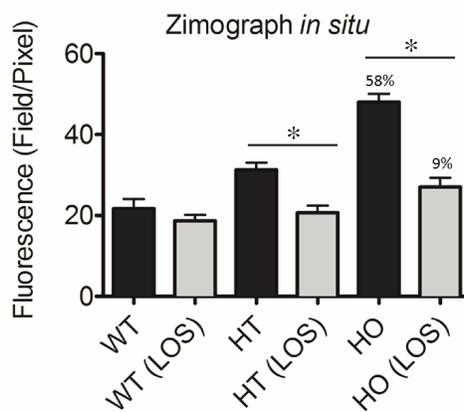
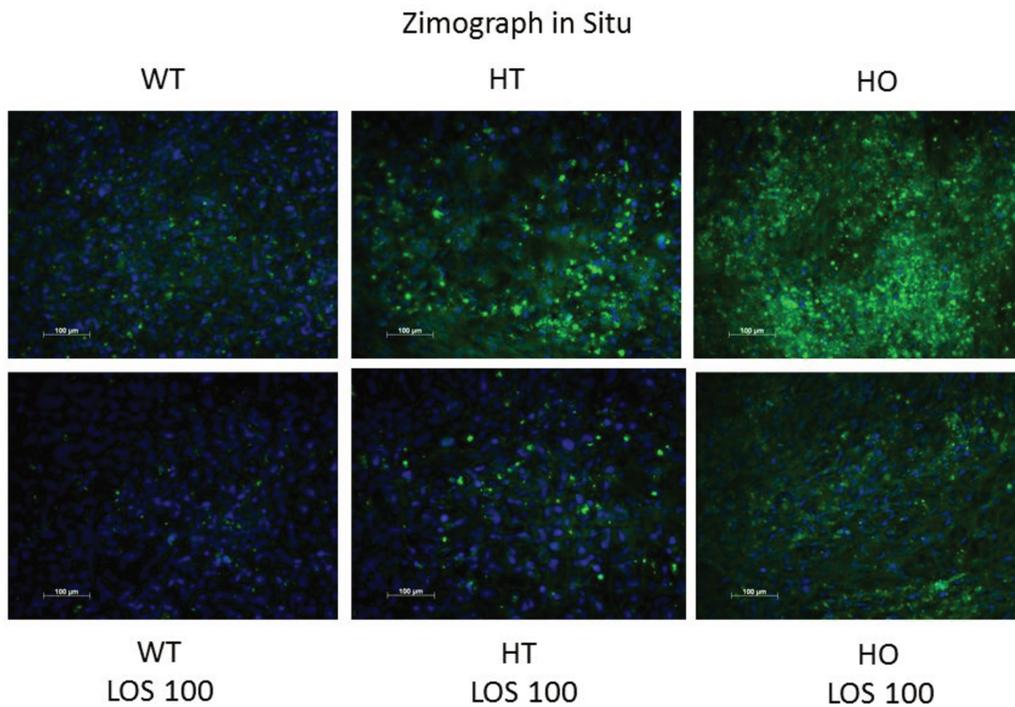


Figura 21 – Aumento da atividade de enzimas metaloproteinases de matriz extracelular em cultura de fibroblastos de derme derivados de camundongos selvagens e deficientes em fibrilina-1. Fluorescência para metaloproteinases de matriz extracelular em cultura primária de fibroblastos de derme derivados de camundongos selvagens (WT) e deficientes em fibrilina-1 (HO), quatro dias pós-confluência celular (1×10^5 células/mL) na ausência ou presença do princípio ativo losartan 100 μ Mol/L. Gráficos: Análise gráfica das fluorescência pixel/área * $p < 0,05$. Aumento 20x – Barra = 100 μ m.

7. Discussão

Um dos principais desafios no estudo das fibras elásticas é encontrar um modelo ideal para desenvolvimento da pesquisa. Dentre os modelos usuais, o de cultura de células tem sido bastante útil no sentido de ajudar a conhecer e compreender os possíveis reguladores e os seus mecanismos de regulação, muito embora, em cultura, uma das principais razões para o aparecimento das fibras elásticas na escala evolutiva não esteja presente: o estresse mecânico. O estabelecimento das culturas primárias de fibroblastos de derme foi o nosso primeiro desafio. As células foram estabelecidas, cultivadas e capazes de manter a expressão dos componentes das fibras elásticas, objetos do nosso estudo. A determinação dos genótipos de cada cultura celular foi realizada por PCR assim como estabelecido em nosso laboratório para a identificação genotípica dos camundongos. Através deste método foram caracterizados os genótipos dos camundongos recém-nascidos bem como os das células extraídas a partir de cada animal, onde foram obtidas células de animais que apresentavam a mutação no gene da fibrilina-1 [heterozigotos ($Fbn1^{mg\Delta/+}$) e homozigotos ($Fbn1^{mg\Delta/mg\Delta}$)] e de animais selvagens ($Fbn1^{+/+}$) que expressavam a fibrilina-1 normalmente (Figura 5). Estudos posteriores permitiram estabelecer o quarto dia de pós-confluência da cultura celular como o período de crescimento adequado para avaliar a capacidade das células em depositar matriz extracelular e ainda verificar o efeito do tratamento do losartan na síntese e deposição de MAGP-1, tropoelastina e fibrilina-1 (Figura 7).

O conjunto dos resultados obtidos com emprego de microscópios de luz e eletrônicos de transmissão e de varredura na caracterização do fenótipo de células isoladas a partir da derme de animais de genótipos selvagem ($Fbn1^{+/+}$) e deficientes em fibrilina-1 [heterozigotos ($Fbn1^{mg\Delta/+}$) e homozigotos ($Fbn1^{mg\Delta/mg\Delta}$)] mantiveram, *in vitro*, características de células semelhantes a fibroblastos

mantendo a capacidade de sintetizar componentes da matriz extracelular e também depositá-los em forma de rede microfibrilar na matriz extracelular (MEC) (Figura 9). A partir disto, foi possível verificar que o tratamento com losartan interfere na capacidade das células depositarem a trama microfibrilar na MEC, ao longo dos experimentos.

A manutenção de características fenotípicas é aspecto relevante, notado na formação dinâmica de fibras elásticas *in vitro* por células semelhantes a fibroblastos, que expressam proteínas e que compõem estas fibras, particularmente aquelas que fazem parte da trama microfibrilar, que contem fibrilina à qual se agregam a tropoelastina, que progressivamente coalesce em agregados maiores para eventualmente formar fibras elásticas funcionais (Czirok *et al.*, 2006; Kozel *et al.*, 2006).

As fibras elásticas são uma importante classe de fibras da matriz extracelular e estruturas presentes em diversos órgãos, desempenhando papel fundamental na manutenção estrutural dos tecidos (Kielty, 2006). A pele, ligamento, pulmão e vasos estão intimamente ligados às funcionalidades das fibras elásticas e são estruturas que exercem papéis dinâmicos (Ramirez e Sakai, 2009). Alterações nas estruturas componentes das fibras elásticas, principalmente das microfibrilas, ocasionam diversos problemas, sendo o mais comum, e de nosso interesse a síndrome de Marfan (Frydman, 2008).

Ao iniciarmos nossos estudos, nos deparamos que os resultados semi-quantitativos obtidos no estudo imunoquímico evidenciaram uma diminuição conjunta da deposição das proteínas MAGP-1 e tropoelastina e esta diminuição é maior para as células obtidas dos animais homocigotos para a mutação (Figura 8 e 10). A manutenção da capacidade de síntese de componentes das fibras elásticas pelos fibroblastos, particularmente de MAGP-1 e fibrilina-2 propiciam base para deposição de tropoelastina, a exemplo do que foi observado em fibroblastos,

mantidos em cultura, extraídos de tecidos conjuntivos de bovinos, humanos e de ratos (Mecham, *et al* 1981, Tsuruga, Yajima *et al.* 2005 Sugawara, Sawada *et al.* 2010).

A diminuição conjunta da deposição de proteínas na matriz extracelular de cultura de fibroblastos deficientes em fibrilina-1 é uma característica ainda não muito bem descrita e poucos trabalhos existem sobre esse tema, porém, muitos ressaltam a importância da fibrilina-1 na correta formação do sistema microfibrilar.

Em 1990, estudos realizados com pacientes portadores da síndrome de Marfan demonstraram a existência de uma aparente deficiência de um elemento do tecido conjuntivo pertencente ao sistema microfibrilar, através de imunohistologia (Hollister *et al.*, 1990). Durante a formação das fibras elásticas maduras, Kielty *et al* (2005) relataram a importância da Fibrilina-1 em conduzir a correta deposição de tropoelastina na formação da fibra elástica. Em outro estudo, foi sugerido que ambas, fibrilina-1 e fibrilina-2 são essenciais para a formação das tramas microfibrilares na zonas ciliares e que suas supressões acarretam uma diminuição das espessuras das mesmas (McLaughlin *et al.*, 2006; Yamanouchi *et al.*, 2011). Estudos realizados por vários grupos tem demonstrado a essencialidade de outras moléculas para a formação da fibra elástica *in vivo*, tais como fibulina-5 e fibulina-4 enquanto outras moléculas aparentemente não são tão importantes durante o desenvolvimento da fibra, mas sim na manutenção desta, como a MAGP-1 e fibulina-2 (Nakamura *et al.*, 2002; Yanagisawa *et al.*, 2002; Orringer *et al.*, 2004; McLaughlin *et al.*, 2006; Sicot *et al.*, 2008; Weinbaum *et al.*, 2008; Werneck *et al.*, 2008).

Os resultados obtidos na caracterização morfológica e imunoquímica de fibroblastos de camundongos selvagens (Fbn1^{+/+}) e deficientes em fibrilina-1 [heterozigotos (Fbn1^{mgΔ/+}) e homozigotos (Fbn1^{mgΔ/mgΔ})] corroboram com os resultados descritos na literatura e sugerem que a perda do conteúdo proteico de alguns componentes das fibras elásticas, resulta em desarranjo da

trama microfibrilar que não se agrega de modo adequado na MEC, podendo levar ao aumento da degradação destes componentes pela maior exposição a proteases devido a não formação das estruturas corretas. Wipff *et al* (2010) demonstraram que fibroblastos obtidos de portadores de esclerose sistêmica (SSc) não apresentaram alterações nem nas expressões gênicas de fibrilina-1, avaliada por imunquímica e PCR, nem na produção, secreção e organização das microfibrilas, *in vitro*. De acordo com estes autores, o comportamento dos fibroblastos na SSc difere do modelo de síndrome de Marfan onde se observa que a deficiência nas expressões gênicas de fibrilina-1, interfere drasticamente na produção, secreção e organização das microfibrilas *in vitro* assim como nós demonstramos em nossos estudos.

A fibrilina-1 tem um essencial papel na formação das fibras elásticas, bem como na homeostase do tecido elástico. A deficiência de fibrilina-1 parece estar intrinsicamente ligada às alterações na síntese/degradação/deposição dos componentes da fibra elástica (Wang *et al.*, 2009). Nossos dados demonstram que há uma diminuição dos componentes analisados nas culturas com deficiência em fibrilina-1, podendo esta diminuição ser resultado de alteração na expressão gênica destes componentes ou na sua deposição ou ainda, no aumento da sua degradação. Para verificar alterações nos níveis de expressão gênica, realizamos PCR quantitativo das principais proteínas constituintes das microfibrilas ou que participam da regulação e formação das fibras elásticas (Figura 11).

Os resultados obtidos no ensaio de Real Time-PCR demonstram que não houve variações significativas nos níveis de expressão dos genes das proteínas LOX-1, Fibrilina-2, Fibulina-5, MAGP-1, MAGP-2 e tropoelastina entre os genótipos selvagens e deficientes em fibrilina-1. No entanto ficou evidente o aumento nos níveis de expressão das metaloproteinases MMP-2 e MMP-

9 nas células dos animais deficientes em fibrilina-1. O aumento da atividade destas enzimas também foi confirmado pelos resultados da zimografia *in situ* (Figura 21).

Este aumento da expressão de MMP-2 e MMP-9 nos animais deficientes em fibrilina-1, muito embora seja pequeno, pode ser um indício de que estas metaloproteinases possam estar atuando na degradação das microfibrilas e fibras elásticas *in vitro*. As metaloproteinases são enzimas capazes de clivar e degradar componentes da matriz extracelular e com isso alterar o perfil de deposição das proteínas. O aumento nos níveis das MMPs pode estar contribuindo para diminuição das proteínas MAGP-1 e tropoelastina como nossos dados sugerem, seja pela degradação das moléculas já depositadas, seja pela degradação antes da deposição.

Pratt, B. *et al* (2010) relataram em seus estudos, que o aumento na regulação da MMPs em particular a MMP-9, está diretamente ligado aos danos ocorridos na matriz extracelular na síndrome de marfan (Kang *et al.*, 2003). Em outro estudo foi verificado que o aumento da metaloproteinase MMP-2 está diretamente ligado ao processo de degradação da fibrilina na matriz extracelular de cultura fibroblastos de ligamento periodontal (Tsuruga *et al.*, 2007). Em estudos envolvendo aneurismas da aorta na síndrome de marfan, vários autores descreveram a importância da superatividade das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9 na perda da integridade das fibras elásticas (Chung *et al.*, 2007; Ikonomidis *et al.*, 2006; Yasmin *et al.*, 2005).

Assim, o aumento nos níveis de expressão e atividade das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9 em fibroblastos derivados de animais deficientes em fibrilina-1 (modelos para Síndrome de Marfan) e as características morfológicas dos agregados fibrilares na MEC são sugestivos de que possa haver atuação enzimática dessas metaloproteinases sobre as fibras elásticas ou componentes microfibrilares depositados principalmente pelos fibroblastos derivados de animais homocigotos. Nossos resultados dos ensaios realizados para medir a atividade destas enzimas

reforçam sua grande importância no papel regulador da deposição de fibras elásticas na matriz extracelular bem como torna mais clara a possível função destas enzimas neste processo.

A síndrome de marfan, caracterizada por uma desordem no sistema de tecidos conjuntivos têm como principais manifestações clínicas aneurismas na aorta proximal, deslocamento do cristalino e crescimento exacerbado dos ossos. Os diversos sinais e sintomas apresentados pelos pacientes portadores dessa síndrome são atribuídos a desregulação e super-ativação de TGF-beta (Neptune *et al.*, 2003; Baldwin *et al.*, 2013).

Vehvilainen *et al* (2009) relataram a importância da fibrilina-1 na interação com as proteínas LTBP's (proteínas de ligação ao fator latente de TGF-beta) (Vehvilainen *et al.*, 2009). Em 2009, Ono R. N. *et al*, demonstraram a importância da fibrilina-1 na apropriada interação com as LTBP's. Os estudos mostraram que, diferentemente de outras proteínas também presentes na matriz extracelular, a fibrilina-1 é a única requerida (Ono *et al.*, 2009).

A utilização do losartan, um anti-hipertensivo bloqueador do receptor AT1 de angiotensina II e inibidor da expressão e ativação de TGF-beta, tem sido a estratégia utilizada nos tratamentos dos portadores de síndrome de marfan (Habashi *et al.*, 2006; Jimenez e Rosenbloom, 2008). Muito embora este possa ser o mecanismo pelo qual o losartan possa estar atuando, outras vias não podem ser descartadas já que o uso de captopril, inibidor da enzima conversora de angiotensina (ACE), não teve o mesmo efeito em nosso estudo (Figura 15).

Utilizando o modelo de cultura de células, foi possível visualizar o aumento significativo do conteúdo proteico de Tropoelastina e MAGP-1 após o tratamento com o losartan nos ensaios de *immunoblotting* e imunofluorescência. Esses dados corroboram com Radonic *et al* (2010); Yang *et al* (2009); Jimenez *et al* (2008); Kalluri *et al* (2008); Habashi *et al* (2006); (Jimenez e Rosenbloom, 2008); (Habashi *et al.*, 2006); (Mates *et al.*, 2004); (Radonic *et al.*, 2010), em

estudos com o losartan na síndrome de Marfan. O tratamento com losartan também aumentou a quantidade de fibras formadas pelos fibroblastos como evidenciado pelos estudos imunocitoquímicos (Figuras 12 e 13).

Os dados obtidos sugerem que o tratamento com o losartan tem a capacidade de resgatar de forma parcial o conteúdo proteico normal de MAGP-1 e tropoelastina nas microfibrilas da matriz extracelular de cultura de fibroblastos de derme deficientes em fibrilina-1. Considerando que o losartan, como um agente anti-hipertensivo, atua inibindo o receptor AT1 de angiotensina II, bloqueando a sinalização por angiotensina II como descrito acima, foram realizados ensaios de immunoblotting para as proteínas MAGP-1 e tropoelastina, utilizando culturas de fibroblastos de derme tratados com o fármaco captopril, um agente anti-hipertensivo inibidor de ACE (enzima conversora de angiotensina I) e os peptídeos de angiotensina I e II, buscando averiguar e mimetizar uma possível similaridade com a via de atuação do losartan no tratamento da síndrome de Marfan (Figura 15).

De acordo com os dados apresentados, não ocorreram alterações significativas no conteúdo proteico de MAGP-1 e tropoelastina utilizando tais tratamentos, sugerindo que o losartan atua de maneira única e que o funcionamento do sistema renina-angiotensina, pelo menos *in vitro*, não parece ser importante neste processo.

O papel do losartan como uma espécie antagonista da ativação de TGF- β na MEC nos induziu a realizar experimentos que comprovassem a sua super-ativação na cultura de fibroblastos de derme deficientes em fibrilina-1 (Ono *et al.*, 2009). Foram realizados ensaios de ELISA que comprovaram o aumento da atividade desta citocina na matriz extracelular da cultura dos fibroblastos (Figura 16).

Sendo assim, iniciamos então, uma busca pela possível via de atuação do losartan como agente de tratamento das células deficientes em fibrilina-1. A atividade de TGF- β para regular as inúmeras funções celulares pode se dar em uma multiplicidade de vias de sinalização intracelulares diferentes da via convencional de SMADs ou também conhecida como via de sinalização canônica de TGF- β . Estas vias de sinalizações alternativas, ditas não-Smads, são também conhecida como via de sinalização não-canônica de TGF- β (Vivar *et al.*, 2013) Zhang 2009).

As vias não-canônicas de TGF- β são acionadas diretamente por seus receptores ativos para reforçar, atenuar ou modular de diferentes formas as respostas celulares ao estímulo. Estas vias não-Smads incluem vários ramos das vias MAP quinase, Rho-GTPase e as vias de fosfatidilinositol-3-quinase/AKT (Zhang, 2009).

Holm *et al.*, (2011) utilizando modelos para síndrome de marfan analisou a progressão do aneurisma aórtico nestes animais em função das atividade da via não canônica de TGF- β sinalizada por ERK 1/2 e JNK-1, onde ambas se mostraram ativas no desenvolvimento do aneurisma e quando tratados com agentes específicos de inibição de TGF- β contribuíram amenizando o seu crescimento.

Assim, realizamos ensaios de imunoblots e imunohistoquímica buscando todas as possíveis formas de sinalização de TGF- β , canônica e não canônica (Figuras 17 e 18). Os resultados mostraram que ambas as vias canônicas e não-canônicas estavam ativas sugerindo que o aumento na super atividade de TGF- β poderia estar sendo “compensada” por diferentes ramos da sinalização intracelular de TGF- β simultaneamente. Em seguida em outro ensaio, ocorreu uma redução da atividade canônica (SMAD-2) e não-canônica (ERK1/2 e JNK-1) após o tratamentos dos fibroblastos de derme derivados de camundongos deficientes em Fibrilina-1 com o losartan,

mimetizando os dados encontrados no estudo utilizando inibidores específicos de TGF- β (Holm *et al.*, 2011).

Estudos demonstram que o aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio das células pode estar relacionado ao aumento da atividade de ERK1/2 e JNK-1 (Zhang *et al.*, 2013) (Nakano *et al.*, 2006). Baseando-se neste contexto, realizamos ensaios para averiguar os níveis de espécies reativas de oxigênio dos fibroblastos de derme derivados de camundongos deficientes em fibrilina-1, utilizando microscopia de imunofluorescência (Figura 19). Nossos resultados, demonstraram um aumento significativo na pesquisa de espécies reativas de oxigênio (EROs) corroborando com os dados encontrados na literatura científica.

Em contrapartida, o aumento de EROs via NFK-B por estar ligado diretamente ao aumento da expressão das enzimas metaloproteínases MMP-2 e MMP-9 importantes na regulação da síntese e degradação das fibras elásticas (Zhang *et al.*, 2013). Assim, realizamos ensaios para verificar a atividade da via de sinalização de NFK-B (Figura 20). Nossos dados demonstraram a inibição desta via em fibroblastos de derme derivados de camundongos deficientes em fibrilina-1. Ao realizar o tratamento dos fibroblastos com o losartan, observamos o aumento da atividade da via de sinalização NFK-B. Nakano *et al.*, (2006) conseguiu estabelecer uma relação entre atividade da via de sinalização NFK-B, as espécies reativas de oxigênio (EROs) e a via de sinalização não canônica de TGF- β . Em seu estudo Nakano relata que o aumento da atividade de JNK-1 (via não canônica de TGF- β) pode estar relacionado à inibição da via de sinalização NFK-B e dessa mesma forma ao aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs) como encontrado em nosso estudo (Papa *et al.*, 2006; Ray *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013).

Portanto, de uma maneira geral, nossos dados sugerem um aumento da degradação de moléculas componentes da fibra elástica madura em cultura de fibroblastos de derme derivados de camundongos deficientes em fibrilina-1 em função do aumento na expressão e atividade das enzimas metaloproteinases MMP 2 e 9. Este aumento da degradação da matriz extracelular pode ser resultado da menor presença de fibrilina-1 na matriz produzida por estas células, superativando a sinalização canônica (SMAD-2) e não-canônica (ERK1/2 e JNK-1) de TGF- β , o que reflete na ativação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e conseqüentemente a ativação das proteases. O tratamento com o princípio ativo losartan nas culturas dos fibroblastos de derme deficientes em fibrilina-1 provavelmente faz o caminho inverso, reduzindo a super-ativação da cascata de sinalização de TGF- β bem como a ativação das metaloproteinases, aumentando de forma indireta a deposição de MAGP-1 e tropoelastina na matriz extracelular destas células.

Para melhor compreender os resultados obtidos em nosso estudo, bem como, propor uma possível elucidação da via de atuação do losartan no perfil elastogênico de fibroblastos de derme derivados de camundongos deficientes em fibrilina-1, apresentamos na sequência um esquema ilustrativo do comportamento celular antes e após seu tratamento com o princípio ativo losartan (Figura 22) (Kim *et al.*, 2004; Habashi *et al.*, 2006; Nakano *et al.*, 2006; Papa *et al.*, 2006; Holm *et al.*, 2011; Xiong *et al.*, 2012; Baldwin *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013).

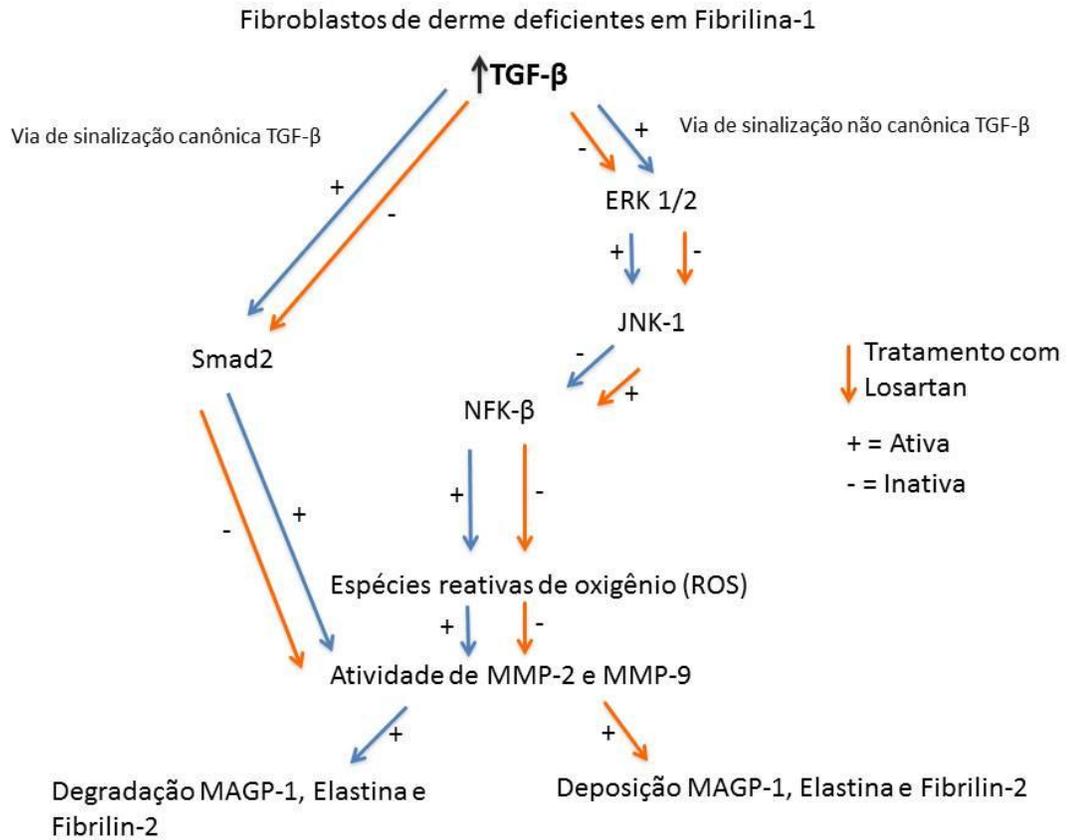


Figura 22 - Esquema de atuação do losartan no perfil elastogênico de fibroblastos de derme derivados de camundongos deficientes em fibrilina-1.

8. Conclusão

Sobre os dados apresentados nessa dissertação, podemos concluir que:

- A deficiência em fibrilina-1 ocasionou uma redução conjunta da deposição MAGP-1 e tropoelastina na matriz extracelular em cultura de fibroblastos.
- Fibroblastos de derme deficientes em fibrilina-1 têm níveis de expressão e atividade das enzimas metaloproteinases MMP-2 e MMP-9 aumentados.
- Fibroblastos de derme deficientes em fibrilina-1 têm níveis de TGF- β ativo aumentado.
- Fibroblastos de derme deficientes em fibrilina-1, ativam a via de sinalização canônica (SMAD-2) e não-canônica (ERK1/2 e JNK-1) de TGF- β .
- Fibroblastos de derme deficientes em fibrilina-1 têm níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) aumentados.
- O fármaco Captopril não influencia na deposição das proteínas MAGP-1 e tropoelastina na matriz extracelular de cultura de fibroblastos de derme.
- Os peptídeos de Angiotensina I e II não influenciam sobre a deposição de MAGP-1 e tropoelastina na matriz extracelular de cultura de fibroblastos de derme
- O tratamento dos fibroblastos de derme deficientes em fibrilina-1 com o princípio ativo losartan aumenta a deposição na matriz extracelular de MAGP-1 e tropoelastina.

- O tratamento dos fibroblastos de derme deficientes em fibrilina-1 com o princípio ativo losartan inibe a via de sinalização canônica e não canônica de TGF- β .
- O tratamento dos fibroblastos de derme deficientes em fibrilina-1 com o princípio ativo losartan reduz a atividade das enzimas metaloproteinases na matriz extracelular.

9. Bibliografia

AALBERTS, J. J. et al. Recurrent and founder mutations in the Netherlands: Extensive clinical variability in Marfan syndrome patients with a single novel recurrent fibrillin-1 missense mutation. **Netherlands heart journal : monthly journal of the Netherlands Society of Cardiology and the Netherlands Heart Foundation**, v. 18, n. 2, p. 85-9, Feb 2010. ISSN 1876-6250 (Electronic) 1568-5888 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20200614> >.

AHIMASTOS, A. A. et al. Effect of perindopril on large artery stiffness and aortic root diameter in patients with Marfan syndrome: a randomized controlled trial. **JAMA : the journal of the American Medical Association**, v. 298, n. 13, p. 1539-47, Oct 3 2007. ISSN 1538-3598 (Electronic) 0098-7484 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17911499> >.

BAEUERLE, P. A.; BALTIMORE, D. NF-kappa B: ten years after. **Cell**, v. 87, n. 1, p. 13-20, Oct 4 1996. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8858144> >.

BALDWIN, A. K. et al. Elastic fibres in health and disease. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 15, p. e8, 2013. ISSN 1462-3994 (Electronic) 1462-3994 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23962539> >.

BIERY, N. J. et al. Revised genomic organization of FBN1 and significance for regulated gene expression. **Genomics**, v. 56, n. 1, p. 70-7, Feb 15 1999. ISSN 0888-7543 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10036187 >.

BIRKEDAL-HANSEN, H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. **Journal of periodontology**, v. 64, n. 5 Suppl, p. 474-84, May 1993. ISSN 0022-3492 (Print) 0022-3492 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8315570> >.

BOBIK, A. Transforming growth factor-betas and vascular disorders. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 26, n. 8, p. 1712-20, Aug 2006. ISSN 1524-4636 (Electronic) 1079-5642 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16675726> >.

BROOKE, B. S. et al. Angiotensin II blockade and aortic-root dilation in Marfan's syndrome. **The New England journal of medicine**, v. 358, n. 26, p. 2787-95, Jun 26 2008. ISSN 1533-4406 (Electronic) 0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18579813> >.

BROWN, N. J.; VAUGHAN, D. E. Angiotensin-converting enzyme inhibitors. **Circulation**, v. 97, n. 14, p. 1411-20, Apr 14 1998. ISSN 0009-7322 (Print) 0009-7322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9577953> >.

BUNTON, T. E. et al. Phenotypic alteration of vascular smooth muscle cells precedes elastolysis in a mouse model of Marfan syndrome. **Circ Res**, v. 88, n. 1, p. 37-43, Jan 19 2001. ISSN 1524-4571 (Electronic). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11139471 >.

CALDINI, E. G. et al. Distribution of elastic system fibres in the rat tail tendon and its associated sheaths. **Acta anatomica**, v. 139, n. 4, p. 341-8, 1990. ISSN 0001-5180 (Print) 0001-5180 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1706129> >.

CAMARGO, A. C. et al. Bradykinin-potentiating peptides: beyond captopril. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 59, n. 4, p. 516-23, Mar 15 2012. ISSN 1879-3150 (Electronic) 0041-0101 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21835190> >.

CARTA, L. et al. Fibrillins 1 and 2 perform partially overlapping functions during aortic development. **J Biol Chem**, v. 281, n. 12, p. 8016-23, Mar 24 2006. ISSN 0021-9258 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16407178 >.

CHARBONNEAU, N. L. et al. Fibrillins can co-assemble in fibrils, but fibrillin fibril composition displays cell-specific differences. **J Biol Chem**, v. 278, n. 4, p. 2740-9, Jan 24 2003. ISSN 0021-9258 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12429739 >.

CHAUDHRY, S. S. et al. Mutation of the gene encoding fibrillin-2 results in syndactyly in mice. **Human molecular genetics**, v. 10, n. 8, p. 835-43, Apr 1 2001. ISSN 0964-6906 (Print) 0964-6906 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11285249> >.

CHUNG, A. W. et al. Loss of elastic fiber integrity and reduction of vascular smooth muscle contraction resulting from the upregulated activities of matrix metalloproteinase-2 and -9 in the thoracic aortic aneurysm in Marfan syndrome. **Circulation research**, v. 101, n. 5, p. 512-22, Aug 31 2007. ISSN 1524-4571 (Electronic) 0009-7330 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17641224> >.

CINI, G. et al. Thyroid hormones and the cardiovascular system: pathophysiology and interventions. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie**, v. 63, n. 10, p. 742-53, Dec 2009. ISSN 1950-6007 (Electronic) 0753-3322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19917524> >.

CORSON, G. M. et al. Differential expression of fibrillin-3 adds to microfibril variety in human and avian, but not rodent, connective tissues. **Genomics**, v. 83, n. 3, p. 461-72, Mar 2004. ISSN 0888-7543 (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14962672 >.

COSSINS, J. A. et al. Enhanced expression of MMP-7 and MMP-9 in demyelinating multiple sclerosis lesions. **Acta neuropathologica**, v. 94, n. 6, p. 590-8, Dec 1997. ISSN 0001-6322 (Print) 0001-6322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9444361> >.

COTTA-PEREIRA, G.; GUERRA RODRIGO, F.; BITTENCOURT-SAMPAIO, S. Oxytalan, elaunin, and elastic fibers in the human skin. **The Journal of investigative dermatology**, v. 66, n. 3, p. 143-8, Mar 1976. ISSN 0022-202X (Print) 0022-202X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1249442> >.

CUZNER, M. L. et al. The expression of tissue-type plasminogen activator, matrix metalloproteases and endogenous inhibitors in the central nervous system in multiple sclerosis: comparison of stages in lesion evolution. **Journal of neuropathology and experimental neurology**, v. 55, n. 12, p. 1194-204, Dec 1996. ISSN 0022-3069 (Print) 0022-3069 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8957442> >.

CZIROK, A. et al. Extracellular matrix macroassembly dynamics in early vertebrate embryos. **Curr Top Dev Biol**, v. 73, p. 237-58, 2006. ISSN 0070-2153 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16782461 >.

DAVIS, E. C. Immunolocalization of microfibril and microfibril-associated proteins in the subendothelial matrix of the developing mouse aorta. **Journal of cell science**, v. 107 (Pt 3), p. 727-36, Mar 1994. ISSN 0021-9533 (Print) 0021-9533 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8006086> >.

DE CARVALHO, H. F.; CAMPOS VIDAL BDE, C. The elastic system of a pressure-bearing tendon of the bullfrog *Rana catesbeiana*. **Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft**, v. 177, n. 5, p. 397-404, Jul 1995. ISSN 0940-9602 (Print) 0940-9602 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7645734> >.

DE CARVALHO, H. F.; LINO NETO, J.; TABOGA, S. R. Microfibrils: neglected components of pressure-bearing tendons. **Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft**, v. 176, n. 2, p. 155-9, Apr 1994. ISSN 0940-9602 (Print) 0940-9602 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8210051> >.

DIETZ, H. C. et al. Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene. **Nature**, v. 352, n. 6333, p. 337-9, Jul 25 1991. ISSN 0028-0836 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1852208 >.

DIETZ, H. C. et al. Recent progress towards a molecular understanding of Marfan syndrome. **American journal of medical genetics. Part C, Seminars in medical genetics**, v. 139C, n. 1, p. 4-9, Nov 15 2005. ISSN 1552-4868 (Print) 1552-4868 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16273535> >.

DIETZ, H. C.; PYERITZ, R. E. Mutations in the human gene for fibrillin-1 (FBN1) in the Marfan syndrome and related disorders. **Hum Mol Genet**, v. 4 Spec No, p. 1799-809, 1995. ISSN 0964-6906 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8541880 >.

EDWARDS, J. G. A study of the periodontium during orthodontic rotation of teeth. **American journal of orthodontics**, v. 54, n. 6, p. 441-61, Jun 1968. ISSN 0002-9416 (Print) 0002-9416 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5239302> >.

FENG, X. H.; DERYNCK, R. Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 21, p. 659-93, 2005. ISSN 1081-0706 (Print) 1081-0706 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16212511> >.

FRYDMAN, M. The Marfan syndrome. **The Israel Medical Association journal : IMAJ**, v. 10, n. 3, p. 175-8, Mar 2008. ISSN 1565-1088 (Print). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18494226> >.

FUKUDA, Y.; FERRANS, V. J.; CRYSTAL, R. G. Development of elastic fibers of nuchal ligament, aorta, and lung of fetal and postnatal sheep: an ultrastructural and electron microscopic immunohistochemical study. **The American journal of anatomy**, v. 170, n. 4, p. 597-629, Aug 1984. ISSN 0002-9106 (Print) 0002-9106 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6475819> >.

GOTT, V. L. Antoine Marfan and his syndrome: one hundred years later. **Maryland medical journal**, v. 47, n. 5, p. 247-52, Nov 1998. ISSN 0886-0572 (Print) 0886-0572 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9798380> >.

GROSS, J.; LAPIERE, C. M. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 48, p. 1014-22, Jun 15 1962. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13902219> >.

HABASHI, J. P. et al. Losartan, an AT1 antagonist, prevents aortic aneurysm in a mouse model of Marfan syndrome. **Science**, v. 312, n. 5770, p. 117-21, Apr 7 2006. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16601194> >.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods in enzymology**, v. 186, p. 1-85, 1990. ISSN 0076-6879 (Print)

0076-6879 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2172697> >.

HANDFORD, P. A. et al. Fibrillin: from domain structure to supramolecular assembly. **Matrix Biol**, v. 19, n. 6, p. 457-70, Nov 2000. ISSN 0945-053X (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11068200 >.

HILHORST-HOFSTEE, Y. et al. The clinical spectrum of missense mutations of the first aspartic acid of cbEGF-like domains in fibrillin-1 including a recessive family. **Human mutation**, v. 31, n. 12, p. E1915-27, Dec 2010. ISSN 1098-1004 (Electronic) 1059-7794 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20886638> >.

HOLLISTER, D. W. et al. Immunohistologic abnormalities of the microfibrillar-fiber system in the Marfan syndrome. **The New England journal of medicine**, v. 323, n. 3, p. 152-9, Jul 19 1990. ISSN 0028-4793 (Print) 0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2194127> >.

HOLM, T. M. et al. Noncanonical TGFbeta signaling contributes to aortic aneurysm progression in Marfan syndrome mice. **Science**, v. 332, n. 6027, p. 358-61, Apr 15 2011. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21493862> >.

HYTTIÄINEN, M.; PENTTINEN, C.; KESKI-OJA, J. Latent TGF-beta binding proteins: extracellular matrix association and roles in TGF-beta activation. **Critical reviews in clinical laboratory sciences**, v. 41, n. 3, p. 233-64, 2004. ISSN 1040-8363 (Print) 1040-8363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15307633> >.

IKONOMIDIS, J. S. et al. Expression of matrix metalloproteinases and endogenous inhibitors within ascending aortic aneurysms of patients with Marfan syndrome. **Circulation**, v. 114, n. 1 Suppl, p. I365-70, Jul 4 2006. ISSN 1524-4539 (Electronic). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16820601 >.

ISOGAI, Z. et al. Latent transforming growth factor beta-binding protein 1 interacts with fibrillin and is a microfibril-associated protein. **J Biol Chem**, v. 278, n. 4, p. 2750-7, Jan 24 2003. ISSN 0021-9258 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12429738 >.

JEREMY, R. W. et al. Relation between age, arterial distensibility, and aortic dilatation in the Marfan syndrome. **The American journal of cardiology**, v. 74, n. 4, p. 369-73, Aug 15 1994. ISSN 0002-9149 (Print) 0002-9149 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8059700> >.

JIMENEZ, S. A.; ROSENBLOOM, J. Angiotensin II blockade in Marfan's syndrome. **The New England journal of medicine**, v. 359, n. 16, p. 1732-3; author reply 1733-4, Oct 16 2008a. ISSN 1533-4406 (Electronic) 0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18927953> >.

JUDGE, D. P. et al. Evidence for a critical contribution of haploinsufficiency in the complex pathogenesis of Marfan syndrome. **J Clin Invest**, v. 114, n. 2, p. 172-81, Jul 2004a. ISSN 0021-9738 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15254584 >.

JUDGE, D. P.; DIETZ, H. C. Marfan's syndrome. **Lancet**, v. 366, n. 9501, p. 1965-76, Dec 3 2005. ISSN 1474-547X (Electronic). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16325700 >.

KAARTINEN, V.; WARBURTON, D. Fibrillin controls TGF-beta activation. **Nature genetics**, v. 33, n. 3, p. 331-2, Mar 2003. ISSN 1061-4036 (Print) 1061-4036 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12610545> >.

KAINULAINEN, K. et al. Location on chromosome 15 of the gene defect causing Marfan syndrome. **The New England journal of medicine**, v. 323, n. 14, p. 935-9, Oct 4 1990. ISSN 0028-4793 (Print) 0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2402262> >.

KANESAKA, T. et al. Serum matrix metalloproteinase-3 levels correlate with disease activity in relapsing-remitting multiple sclerosis. **Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry**, v. 77, n. 2, p. 185-8, Feb 2006. ISSN 0022-3050 (Print) 0022-3050 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16421119> >.

KANG, H. G. et al. Target genes for OBP3, a Dof transcription factor, include novel basic helix-loop-helix domain proteins inducible by salicylic acid. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 35, n. 3, p. 362-72, Aug 2003. ISSN 0960-7412 (Print) 0960-7412 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12887587> >.

KEANE, M. G.; PYERITZ, R. E. Medical management of Marfan syndrome. **Circulation**, v. 117, n. 21, p. 2802-13, May 27 2008. ISSN 1524-4539 (Electronic). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18506019 >.

KHAU VAN KIEN, P. et al. Missense mutations of conserved glycine residues in fibrillin-1 highlight a potential subtype of cb-EGF-like domains. **Human mutation**, v. 31, n. 1, p. E1021-42, Jan 2010. ISSN 1098-1004 (Electronic) 1059-7794 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19802897> >.

KIELTY, C. M. Elastic fibres in health and disease. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 8, n. 19, p. 1-23, 2006. ISSN 1462-3994 (Electronic) 1462-3994 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16893474> >.

KIELTY, C. M. et al. Microfibrillar assemblies of foetal bovine skin. Developmental expression and relative abundance of type VI collagen and fibrillin. **Matrix**, v. 13, n. 2, p. 103-12, Mar 1993. ISSN 0934-8832 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8492740 >.

KIELTY, C. M. et al. Fibrillin microfibrils. **Adv Protein Chem**, v. 70, p. 405-36, 2005. ISSN 0065-3233 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15837522 >.

KIELTY, C. M.; SHERRATT, M. J.; SHUTTLEWORTH, C. A. Elastic fibres. **J Cell Sci**, v. 115, n. Pt 14, p. 2817-28, Jul 15 2002a. ISSN 0021-9533 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12082143 >.

KIELTY, C. M.; WHITTAKER, S. P.; SHUTTLEWORTH, C. A. Fibrillin: evidence that chondroitin sulphate proteoglycans are components of microfibrils and associate with newly synthesised monomers. **FEBS letters**, v. 386, n. 2-3, p. 169-73, May 20 1996. ISSN 0014-5793 (Print) 0014-5793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8647274> >.

KIM, E. S.; KIM, M. S.; MOON, A. TGF-beta-induced upregulation of MMP-2 and MMP-9 depends on p38 MAPK, but not ERK signaling in MCF10A human breast epithelial cells. **International journal of oncology**, v. 25, n. 5, p. 1375-82, Nov 2004. ISSN 1019-6439 (Print) 1019-6439 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15492828> >.

KOO, H. P. et al. Temporal expression of elastic fiber components in bladder development. **Connective tissue research**, v. 37, n. 1-2, p. 1-11, 1998. ISSN 0300-8207 (Print) 0300-8207 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9643643> >.

KOZEL, B. A. et al. Elastic fiber formation: a dynamic view of extracellular matrix assembly using timer reporters. **J Cell Physiol**, v. 207, n. 1, p. 87-96, Apr 2006. ISSN 0021-9541 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16261592 >.

LEE, B. et al. Linkage of Marfan syndrome and a phenotypically related disorder to two different fibrillin genes. **Nature**, v. 352, n. 6333, p. 330-4, Jul 25 1991. ISSN 0028-0836 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1852206 >.

LEICK-MALDONADO, E. A. et al. Differential distribution of elastic system fibers in control and bronchoconstricted intraparenchymatous airways in the guinea-pig lung. **Journal of submicroscopic cytology and pathology**, v. 29, n. 4, p. 427-34, Oct 1997. ISSN 1122-9497 (Print)

1122-9497 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9397581> >.

LILLIE, M. A.; DAVID, G. J.; GOSLINE, J. M. Mechanical role of elastin-associated microfibrils in pig aortic elastic tissue. **Connective tissue research**, v. 37, n. 1-2, p. 121-41, 1998. ISSN 0300-8207 (Print)

0300-8207 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9643652> >.

MASSAGUE, J.; CHEN, Y. G. Controlling TGF-beta signaling. **Genes & development**, v. 14, n. 6, p. 627-44, Mar 15 2000. ISSN 0890-9369 (Print)

0890-9369 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10733523> >.

MASSAGUE, J.; GOMIS, R. R. The logic of TGFbeta signaling. **FEBS letters**, v. 580, n. 12, p. 2811-20, May 22 2006. ISSN 0014-5793 (Print)

0014-5793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16678165> >.

MASSAM-WU, T. et al. Assembly of fibrillin microfibrils governs extracellular deposition of latent TGF beta. **Journal of cell science**, v. 123, n. Pt 17, p. 3006-18, Sep 1 2010. ISSN 1477-9137 (Electronic)

0021-9533 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20699357>
<http://jcs.biologists.org/content/123/17/3006.full.pdf> >.

MATES, L. et al. Mice lacking the extracellular matrix adaptor protein matrilin-2 develop without obvious abnormalities. **Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology**, v. 23, n. 3, p. 195-204, Jun 2004. ISSN 0945-053X (Print)

0945-053X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15296947> >.

MCINNES, G. T. Role of ACE inhibitors in hypertension complicated by vascular disease. **British heart journal**, v. 72, n. 3 Suppl, p. S33-7, Sep 1994. ISSN 0007-0769 (Print)

0007-0769 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7946801> >.

MCKUSICK, V. A. Reviews in molecular medicine. **Medicine**, v. 74, n. 6, p. 301-4, Nov 1995. ISSN 0025-7974 (Print)

0025-7974 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7500894> >.

MCLAUGHLIN, P. J. et al. Targeted disruption of fibulin-4 abolishes elastogenesis and causes perinatal lethality in mice. **Mol Cell Biol**, v. 26, n. 5, p. 1700-9, Mar 2006. ISSN 0270-7306 (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16478991 >.

MECHAM, R. P. et al. Elastin synthesis by ligamentum nuchae fibroblasts: effects of culture conditions and extracellular matrix on elastin production. **J Cell Biol**, v. 90, n. 2, p. 332-8, Aug 1981. ISSN 0021-9525 (Print). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&listuids=6169729> >.

MIZUGUCHI, T. et al. Heterozygous TGFBR2 mutations in Marfan syndrome. **Nature genetics**, v. 36, n. 8, p. 855-60, Aug 2004. ISSN 1061-4036 (Print) 1061-4036 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15235604> >.

MUNGER, J. S. et al. Interactions between growth factors and integrins: latent forms of transforming growth factor-beta are ligands for the integrin alpha v beta 1. **Molecular biology of the cell**, v. 9, n. 9, p. 2627-38, Sep 1998. ISSN 1059-1524 (Print) 1059-1524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9725916> >.

MUNGER, J. S. et al. Latent transforming growth factor-beta: structural features and mechanisms of activation. **Kidney international**, v. 51, n. 5, p. 1376-82, May 1997. ISSN 0085-2538 (Print) 0085-2538 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9150447> >.

MUNGER, J. S. et al. The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. **Cell**, v. 96, n. 3, p. 319-28, Feb 5 1999. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10025398> >.

MURDOCH, J. L. et al. Life expectancy and causes of death in the Marfan syndrome. **The New England journal of medicine**, v. 286, n. 15, p. 804-8, Apr 13 1972. ISSN 0028-4793 (Print) 0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5011789> >.

NAKAMURA, T. et al. Fibulin-5/DANCE is essential for elastogenesis in vivo. **Nature**, v. 415, n. 6868, p. 171-5, Jan 10 2002. ISSN 0028-0836 (Print). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&listuids=11805835> >.

NAKANO, H. et al. Reactive oxygen species mediate crosstalk between NF-kappaB and JNK. **Cell death and differentiation**, v. 13, n. 5, p. 730-7, May 2006. ISSN 1350-9047 (Print) 1350-9047 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16341124> >.

NARENDHIRAKANNAN, R. T.; HANNAH, M. A. Oxidative stress and skin cancer: an overview. **Indian journal of clinical biochemistry : IJCB**, v. 28, n. 2, p. 110-5, Apr 2013. ISSN 0970-1915 (Print) 0970-1915 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24426195> >.

NEPTUNE, E. R. et al. Dysregulation of TGF-beta activation contributes to pathogenesis in Marfan syndrome. **Nat Genet**, v. 33, n. 3, p. 407-11, Mar 2003a. ISSN 1061-4036 (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12598898 >.

O'NEILL, L. A.; KALTSCHMIDT, C. NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. **Trends in neurosciences**, v. 20, n. 6, p. 252-8, Jun 1997. ISSN 0166-2236 (Print)
0166-2236 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9185306> >.

ONO, R. N. et al. Latent transforming growth factor beta-binding proteins and fibulins compete for fibrillin-1 and exhibit exquisite specificities in binding sites. **The Journal of biological chemistry**, v. 284, n. 25, p. 16872-81, Jun 19 2009. ISSN 1083-351X (Electronic)
0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19349279> >.

ORRINGER, J. S. et al. Connective tissue remodeling induced by carbon dioxide laser resurfacing of photodamaged human skin. **Archives of dermatology**, v. 140, n. 11, p. 1326-32, Nov 2004. ISSN 0003-987X (Print)
0003-987X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15545540> >.

PAPA, S. et al. The NF-kappaB-mediated control of the JNK cascade in the antagonism of programmed cell death in health and disease. **Cell death and differentiation**, v. 13, n. 5, p. 712-29, May 2006. ISSN 1350-9047 (Print)
1350-9047 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16456579> >.

PARK, E. S. et al. Clustering of FBN2 mutations in patients with congenital contractural arachnodactyly indicates an important role of the domains encoded by exons 24 through 34 during human development. **American journal of medical genetics**, v. 78, n. 4, p. 350-5, Jul 24 1998. ISSN 0148-7299 (Print)
0148-7299 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9714438> >.

PEREIRA, L. et al. Targetting of the gene encoding fibrillin-1 recapitulates the vascular aspect of Marfan syndrome. **Nature genetics**, v. 17, p. 218-222, 1997a.

PEREIRA, L. et al. Targetting of the gene encoding fibrillin-1 recapitulates the vascular aspect of Marfan syndrome. **Nat Genet**, v. 17, n. 2, p. 218-22, Oct 1997b. ISSN 1061-4036 (Print).
Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9326947 >.

PEREIRA, L. et al. Pathogenetic sequence for aneurysm revealed in mice underexpressing fibrillin-1. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, p. 3819-3823, 1999.

PIETTE, J. et al. Multiple redox regulation in NF-kappaB transcription factor activation. **Biological chemistry**, v. 378, n. 11, p. 1237-45, Nov 1997. ISSN 1431-6730 (Print)
1431-6730 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9426183> >.

RADONIC, T. et al. Losartan therapy in adults with Marfan syndrome: study protocol of the multi-center randomized controlled COMPARE trial. **Trials**, v. 11, p. 3, 2010. ISSN 1745-6215 (Electronic)
1745-6215 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20067609> >.

RAGHUNATH, M. et al. Fibrillin and elastin expression in skin regenerating from cultured keratinocyte autografts: morphogenesis of microfibrils begins at the dermo-epidermal junction and precedes elastic fiber formation. **The Journal of investigative dermatology**, v. 106, n. 5, p. 1090-5, May 1996. ISSN 0022-202X (Print)
0022-202X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8618045> >.

RAM, M.; SHERER, Y.; SHOENFELD, Y. Matrix metalloproteinase-9 and autoimmune diseases. **Journal of clinical immunology**, v. 26, n. 4, p. 299-307, Jul 2006. ISSN 0271-9142 (Print)
0271-9142 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16652230> >.

RAMIREZ, F.; DIETZ, H. C. Fibrillin-rich microfibrils: Structural determinants of morphogenetic and homeostatic events. **Journal of cellular physiology**, v. 213, n. 2, p. 326-30, Nov 2007a. ISSN 0021-9541 (Print)
0021-9541 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17708531> >.

RAMIREZ, F.; PEREIRA, L. The fibrillins. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 31, n. 2, p. 255-9, Feb 1999. ISSN 1357-2725 (Print)
1357-2725 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10216958> >.

RAMIREZ, F.; RIFKIN, D. B. Extracellular microfibrils: contextual platforms for TGFbeta and BMP signaling. **Current opinion in cell biology**, v. 21, n. 5, p. 616-22, Oct 2009. ISSN 1879-0410 (Electronic)
0955-0674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19525102> >.

RAMIREZ, F.; SAKAI, L. Y. Biogenesis and function of fibrillin assemblies. **Cell Tissue Res**, Jun 10 2009. ISSN 1432-0878 (Electronic). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19513754 >.

RAMIREZ, F. et al. Fibrillin microfibrils: multipurpose extracellular networks in organismal physiology. **Physiol Genomics**, v. 19, n. 2, p. 151-4, Oct 4 2004. ISSN 1531-2267 (Electronic). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15466717 >.

RAY, P. D.; HUANG, B. W.; TSUJI, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. **Cellular signalling**, v. 24, n. 5, p. 981-90, May 2012. ISSN 1873-3913 (Electronic)
0898-6568 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22286106> >.

RIFKIN, D. B. Latent transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding proteins: orchestrators of TGF-beta availability. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 9, p. 7409-12, Mar 4 2005. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15611103> >.

RITTIE, L.; FISHER, G. J. Isolation and culture of skin fibroblasts. **Methods in molecular medicine**, v. 117, p. 83-98, 2005. ISSN 1543-1894 (Print) 1543-1894 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16118447> >.

RITTY, T. M. et al. Fibrillin-1 and -2 contain heparin-binding sites important for matrix deposition and that support cell attachment. **The Biochemical journal**, v. 375, n. Pt 2, p. 425-32, Oct 15 2003. ISSN 1470-8728 (Electronic) 0264-6021 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12837131> >.

ROBINSON, P. N. et al. The molecular genetics of Marfan syndrome and related disorders. **Journal of medical genetics**, v. 43, n. 10, p. 769-87, Oct 2006. ISSN 1468-6244 (Electronic) 0022-2593 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16571647> >.

ROBINSON, P. N. et al. Mutations of FBN1 and genotype-phenotype correlations in Marfan syndrome and related fibrillinopathies. **Human mutation**, v. 20, n. 3, p. 153-61, Sep 2002. ISSN 1098-1004 (Electronic) 1059-7794 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12203987> >.

ROBINSON, P. N.; GODFREY, M. The molecular genetics of Marfan syndrome and related microfibrilopathies. **Journal of medical genetics**, v. 37, n. 1, p. 9-25, Jan 2000. ISSN 0022-2593 (Print) 0022-2593 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10633129> >.

ROSENBLOOM, J.; ABRAMS, W. R.; MECHAM, R. Extracellular matrix 4: the elastic fiber. **FASEB J**, v. 7, n. 13, p. 1208-18, Oct 1993a. ISSN 0892-6638 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8405806 >.

ROSS, R. The elastic fiber. **J Histochem Cytochem**, v. 21, n. 3, p. 199-208, Mar 1973. ISSN 0022-1554 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4121415 >.

ROSS, R.; BORNSTEIN, P. The elastic fiber. I. The separation and partial characterization of its macromolecular components. **The Journal of cell biology**, v. 40, n. 2, p. 366-81, Feb 1969. ISSN 0021-9525 (Print) 0021-9525 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5812469> >.

ROSS, R.; FIALKOW, R. J.; ALTMAN, L. K. The morphogenesis of elastic fibers. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 79, p. 7-17, 1977. ISSN 0065-2598 (Print) 0065-2598 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/868667> >.

RUIZ-ORTEGA, M. et al. TGF-beta signaling in vascular fibrosis. **Cardiovascular research**, v. 74, n. 2, p. 196-206, May 1 2007. ISSN 0008-6363 (Print) 0008-6363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17376414> >.

SAKAI, L. Y.; KEENE, D. R.; ENGVALL, E. Fibrillin, a new 350-kD glycoprotein, is a component of extracellular microfibrils. **The Journal of cell biology**, v. 103, n. 6 Pt 1, p. 2499-509, Dec 1986. ISSN 0021-9525 (Print) 0021-9525 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3536967> >.

SAKAI, L. Y. et al. Purification and partial characterization of fibrillin, a cysteine-rich structural component of connective tissue microfibrils. **J Biol Chem**, v. 266, n. 22, p. 14763-70, Aug 5 1991. ISSN 0021-9258 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1860873 >.

SAKAMOTO, H. et al. Cell-type specific recognition of RGD- and non-RGD-containing cell binding domains in fibrillin-1. **The Journal of biological chemistry**, v. 271, n. 9, p. 4916-22, Mar 1 1996. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8617764> >.

SAUTER, M. et al. ACE inhibitor and AT1-receptor blocker attenuate the production of VEGF in mesothelial cells. **Peritoneal dialysis international : journal of the International Society for Peritoneal Dialysis**, v. 27, n. 2, p. 167-72, Mar-Apr 2007. ISSN 0896-8608 (Print) 0896-8608 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17299153> >.

SICOT, F. X. et al. Fibulin-2 is dispensable for mouse development and elastic fiber formation. **Mol Cell Biol**, v. 28, n. 3, p. 1061-7, Feb 2008. ISSN 1098-5549 (Electronic). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18070922 >.

SMITH, L. B. et al. Haploinsufficiency of the murine Col3a1 locus causes aortic dissection: a novel model of the vascular type of Ehlers-Danlos syndrome. **Cardiovascular research**, v. 90, n. 1, p. 182-90, Apr 1 2011. ISSN 1755-3245 (Electronic) 0008-6363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21071432> >.

SUDA, N. et al. Marfan syndrome and its disorder in periodontal tissues. **Journal of experimental zoology. Part B, Molecular and developmental evolution**, v. 312B, n. 5, p. 503-9, Jul 15 2009. ISSN 1552-5015 (Electronic) 1552-5007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19199346> >.

SWEE, M. H.; PARKS, W. C.; PIERCE, R. A. Developmental regulation of elastin production. Expression of tropoelastin pre-mRNA persists after down-regulation of steady-state mRNA levels. **The Journal of biological chemistry**, v. 270, n. 25, p. 14899-906, Jun 23 1995. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7797468> >.

TAKAGI, M. et al. Differential distribution and ultrastructural staining of oxytalan and elastic fibers in the periodontal ligament of Alligator mississippiensis. **The Anatomical record**, v. 225, n. 4, p. 279-87, Dec 1989. ISSN 0003-276X (Print)
0003-276X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2480070> >.

TEN DIJKE, P.; ARTHUR, H. M. Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 8, n. 11, p. 857-69, Nov 2007. ISSN 1471-0080 (Electronic)
1471-0072 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17895899> >.

THOMASSIN, L. et al. The Pro-regions of lysyl oxidase and lysyl oxidase-like 1 are required for deposition onto elastic fibers. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 52, p. 42848-55, Dec 30 2005. ISSN 0021-9258 (Print)
0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16251195> >.

TIECKE, F. et al. Classic, atypically severe and neonatal Marfan syndrome: twelve mutations and genotype-phenotype correlations in FBN1 exons 24-40. **European journal of human genetics : EJHG**, v. 9, n. 1, p. 13-21, Jan 2001. ISSN 1018-4813 (Print)
1018-4813 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11175294> >.

TSURUGA, E.; IRIE, K.; YAJIMA, T. Fibrillin-2 degradation by matrix metalloproteinase-2 in periodontium. **Journal of dental research**, v. 86, n. 4, p. 352-6, Apr 2007. ISSN 0022-0345 (Print)
0022-0345 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17384031> >.

VEHVILAINEN, P.; HYYTIAINEN, M.; KESKI-OJA, J. Matrix association of latent TGF-beta binding protein-2 (LTBP-2) is dependent on fibrillin-1. **Journal of cellular physiology**, v. 221, n. 3, p. 586-93, Dec 2009. ISSN 1097-4652 (Electronic)
0021-9541 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19681046> >.

VIVAR, R. et al. TGF-beta1 prevents simulated ischemia/reperfusion-induced cardiac fibroblast apoptosis by activation of both canonical and non-canonical signaling pathways. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1832, n. 6, p. 754-62, Jun 2013. ISSN 0006-3002 (Print)
0006-3002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23416528> >.

WAGENSEIL, J. E.; MECHAM, R. P. New insights into elastic fiber assembly. **Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews**, v. 81, n. 4, p. 229-40, Dec 2007a. ISSN 1542-9768 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18228265> >.

WANG, M. C.; LU, Y.; BALDOCK, C. Fibrillin microfibrils: a key role for the interbead region in elasticity. **Journal of molecular biology**, v. 388, n. 1, p. 168-79, Apr 24 2009. ISSN 1089-8638 (Electronic)
0022-2836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19268673> >.

WEINBAUM, J. S. et al. Deficiency in microfibril-associated glycoprotein-1 leads to complex phenotypes in multiple organ systems. **J Biol Chem**, v. 283, n. 37, p. 25533-43, Sep 12 2008. ISSN 0021-9258 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18625713 >.

WERNECK, C. C. et al. Identification of a major microfibril-associated glycoprotein-1-binding domain in fibrillin-2. **J Biol Chem**, v. 279, n. 22, p. 23045-51, May 28 2004. ISSN 0021-9258 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15044481 >.

WERNECK, C. C. et al. Mice lacking the extracellular matrix protein MAGP1 display delayed thrombotic occlusion following vessel injury. **Blood**, v. 111, n. 8, p. 4137-44, Apr 15 2008. ISSN 0006-4971 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18281502 >.

WHEATLEY, H. M. et al. Immunohistochemical localization of fibrillin in human ocular tissues. Relevance to the Marfan syndrome. **Archives of ophthalmology**, v. 113, n. 1, p. 103-9, Jan 1995. ISSN 0003-9950 (Print) 0003-9950 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7826283> >.

WOJAKOWSKI, W. et al. The influence of angiotensin-converting enzyme inhibitors on the aorta elastin metabolism in diet-induced hypercholesterolaemia in rabbits. **Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS**, v. 2, n. 1, p. 37-42, Mar 2001. ISSN 1470-3203 (Print) 1470-3203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11881065> >.

XIONG, W. et al. MMP-2 regulates Erk1/2 phosphorylation and aortic dilatation in Marfan syndrome. **Circulation research**, v. 110, n. 12, p. e92-e101, Jun 8 2012. ISSN 1524-4571 (Electronic) 0009-7330 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22550139> >.

YAMANOUCHI, K. et al. Fibrillin-1 and Fibrillin-2 Are Essential for Formation of Thick Oxytalan Fibers in Human Nonpigmented Ciliary Epithelial Cells In Vitro. **Connective tissue research**, Aug 18 2011. ISSN 1607-8438 (Electronic) 0300-8207 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21851253> >.

YANAGISAWA, H. et al. Fibulin-5 is an elastin-binding protein essential for elastic fibre development in vivo. **Nature**, v. 415, n. 6868, p. 168-71, Jan 10 2002. ISSN 0028-0836 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11805834 >.

YASMIN et al. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), MMP-2, and serum elastase activity are associated with systolic hypertension and arterial stiffness. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 25, n. 2, p. 372, Feb 2005. ISSN 1524-4636 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&listuids=15556929> >.

ZEISBERG, M. et al. BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. **Nature medicine**, v. 9, n. 7, p. 964-8, Jul 2003. ISSN 1078-8956 (Print) 1078-8956 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12808448> >.

ZHANG, H. et al. Transforming growth factor-beta1 induces matrix metalloproteinase-9 expression in rat vascular smooth muscle cells via ROS-dependent ERK-NF-kappaB pathways. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 375, n. 1-2, p. 11-21, Mar 2013. ISSN 1573-4919 (Electronic) 0300-8177 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23275087> >.

ZHANG, Y. E. Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. **Cell research**, v. 19, n. 1, p. 128-39, Jan 2009. ISSN 1748-7838 (Electronic) 1001-0602 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19114990> >.

ZHAO, L. et al. Two novel FBN1 mutations associated with ectopia lentis and marfanoid habitus in two Chinese families. **Molecular vision**, v. 15, p. 826-32, 2009. ISSN 1090-0535 (Electronic) 1090-0535 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19390640> >.

Anexo I



UNICAMP



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Avaliação dos mecanismos de ação do losartan em cultura de fibroblastos de derme deficientes em fibrilina-1" (protocolo nº 3169-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Cláudio Chrysostomo Werneck / Guilherme Gambogi Braga, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 07 de outubro de 2013.

Campinas, 07 de outubro de 2013.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Ateriso
Secretária Executiva

Anexo II

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de mestrado intitulada **Avaliação dos mecanismos de ação do losartan em cultura de fibroblastos de derme deficientes em fibrilina-1.**

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

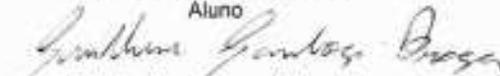
() CIBio – Comissão Interna de Biossegurança , projeto No. _____, Instituição:

(X) CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto No. 3169-1, Instituição: UNICAMP

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. _____, Instituição:

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*

Guilherme Gambogi Braga
Aluno



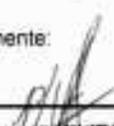
Cláudio Chrysostomo Werneck
Orientador



Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura



Prof. Dr. ALEXANDRE LESTE RODRIGUES DE OLIVEIRA
Presidente da Comissão de Ética no Uso de
Animais CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura