



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

Guilherme Gambogi Braga

Avaliação da elastogênese em cultura de células obtidas de camundongos deficientes em Fibrilina-1. Estudo do efeito do Losartan.

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Guilherme Gambogi Braga
Claudio R. Werneck
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Biologia Funcional e
Molecular, na área de bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Claudio Chrysostomo Werneck

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

B73a	Braga, Guilherme Gambogi, 1985- Avaliação da elastogênese em cultura de células obtidas de camundongos deficientes em Fibrilina-1: estudo do efeito do Losartan / Guilherme Gambogi Braga. – Campinas, SP: [s.n.], 2012. Orientador: Claudio Chrysostomo Werneck. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. 1. Fibras elásticas. 2. Fibrilina-1. 3. Síndrome de Marfan. 4. Losartan. I. Werneck, Cláudio Chrysostomo, 1966-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.
------	---

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Evaluation on elastic fiber synthesis in cell culture obtained from Fibrilin-1 defficient mice: Losartan's effect studies

Palavras-chave em Inglês:

Elastic fibers

Fibrillin-1

Marfan Syndrome

Losartan

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Claudio Chrysostomo Werneck [Orientador]

Paulo Pinto Joazeiro

Luiz Eurico Nasciutti

Data da defesa: 16-02-2012

Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular

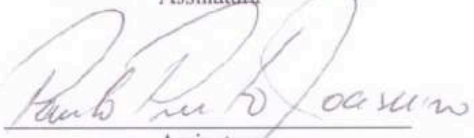
Campinas, 16 de fevereiro de 2012

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Claudio Chrysostomo Werneck (Orientador)


Assinatura

Prof. Dr. Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro


Assinatura

Prof. Dr. Prof. Dr. Luiz Eurico Nasciutti


Assinatura

Prof. Dr. Prof. Dr. Marcelo Brocchi

Assinatura

Prof. Dr. Prof. Dr. Rodrigo Ramos Catharino

Assinatura

***"Há homens que lutam um dia e são bons.
Há outros que lutam um ano e são melhores.
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.
Porém, há os que lutam por toda a vida.
Esses são os imprescindíveis."***

Bertolt Brecht.

DEDICATÓRIA

Aos meus Pais, Célio e Vânia,
pelos esforços nunca medidos,
por acreditar e apostar em meus sonhos
e fazer de suas vidas, à minha.

AGRADECIMENTOS

Aos meus Pais, por lutaram bravamente para que eu pudesse estar aqui hoje. Por sempre estarem ao meu lado nos momentos mais difíceis e que agora, possam também estar presentes nos momentos de felicidades.

A minha companheira Nyanne, por estar ao meu lado todos esses anos, caminhando juntos com muita força de vontade, garra e amor incondicional.

Aos meus irmão Gustavo, Karina e Fernanda, por fazerem parte da minha vida, tornando minha caminhada muito mais feliz.

Aos meus familiares, pela colhida e companheirismo em todos os momentos da minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Claudio Chrysostomo Werneck, por acreditar e confiar à mim, um simples aluno até então desconhecido, seu trabalho. Agradeço pelo companheirismo, pelo apoio, pelos conselhos e experiência oferecidas e muito bem aproveitadas.

Aos meu colegas de laboratório Neto, Talitinha, Ana Cláudia, Tallita, Catherine, Fabiana e Daniele pelo companheirismo e aprendizado e por tornar o trabalho no laboratório mais sereno.

Em especial ao Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro, pelo apoio, ensinamento, ajuda e principalmente paciência pelas horas de trabalho realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica após o expediente, muito obrigado.

A Profa. Dr. Cristina Pontes Vicente, pelo apoio, ensinamento e confiar à mim a responsabilidade de repassar a seus alunos um pouco sobre meus conhecimentos.

Ao Prof. Dr. Hernandes Faustino Carvalho, por permitir a realização dos ensaios de Real-Time PCR no Laboratório de Matriz Extracelular. E à bióloga Fabiana Kühne, pela clareza, paciência e comprometimento em me ajudar nesses ensaios moleculares.

Aos demais Profissionais que de certa forma tornaram possível a realização deste trabalho, muito obrigado.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1. Introdução.....	1
2. Justificativa e relevância.....	3
3. Revisão da Literatura.....	10
3.1 Fibras elásticas.....	10
3.2 Microfibrilas.....	13
3.3 Fibrilinas.....	14
3.4 TGF-beta.....	16
3.5 Metaloproteinase (MMP's)	18
3.6 Síndrome de Marfan.....	20
3.7 Fármaco Losartan.....	24
3.8 Fármaco Captopril	26
4. Objetivo	29
4.1 Objetivo geral.....	30
4.2 Objetivo específicos.....	30
5. Materiais e Métodos	32
5.1 Animais.....	33
5.2 Extração de fibroblastos de derme (cultura primária)	33
5.3 Cultura celular.....	34
5.4 Identificação Genotípica por PCR.....	35
5.5 Imunofluorescência.....	36
5.6 Western-Blotting.....	37
5.7 Microscopia eletrônica de varredura.....	39
5.8 Microscopia eletrônica de transmissão.....	39
5.9 Real Time – PCR.....	40
5.10 Tratamento da células com Losartan, Captopril, Angiotensina I e II.....	43
5.11 Análises estatísticas.....	44
6. Resultados.....	45
7. Discussão.....	84
8. Conclusão.....	93
Referências Bibliográficas.....	96

LISTA DE ABREVIATURAS

ECA/ACE – Enzima conversora de Angiotensina
 AngII – Angiotensina II
 Ang I – Angiotensina I
 AT1 – Receptor 1 de angiotensina II
 BMP – Proteína morfogênica do osso (Bone morphogenetic Protein)
 bp – Pares de base
 °C – Graus Celsius
 DAPI – 4'6-diamidino-2-fenilindol (4'6-diamidino-2-phenylindole)
 FITC – Isotiocianato de fluoresceína (fluorescein isothiocyanate)
 DNA – Ácido desoxirribonucléico
 EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
 EGF – Fator de crescimento epidermal (Epidermal factor growth)
 LTBP-1 - Latente TGF-beta binding protein (latent TGF- β -binding protein-1)
 LAP – Peptídeo associado a latência (Latency associated peptide)
 MEC – Matriz extracelular
 FGF – Fator de crescimento de fibroblasto (Fibroblast growth factor)
 MMP- metaloproteinase
FBN1 – gene fibrilin-1
 h – Horas
 HCl – Ácido clorídrico
 kDa – Quilo Dalton
 LOS – Losartan
 Fibrilina-1 +/+ - Animal selvagem
 Fibrilina-1 +/- - Animal heterozigoto para mutação no gene da fibrilina-1
 Fibrilina-1 -/- - Animal homozigoto para mutação no gene da fibrilina-1
Fbn1 +/+ - Animal selvagem
Fbn1^{mg Δ /+} - Animal heterozigoto para mutação no gene da fibrilina-1
Fbn1^{mg Δ /mg Δ} - Animal homozigoto para mutação no gene da fibrilina-1
 MAGP – Glicoproteína associada à microfibrila (Microfibril-Associated GlycoProtein)
 μ l – microlitro
 ng – nano grama
 uM – micro molar
 nM – nano molar
 Ct = threshold cycle
 NaOH – Hidróxido de Sódio
 nm – Nanômetro
 N-terminal – Amino terminal
 C-terminal – Carboxi terminal
 PBS – Tampão salina fosfato (Phosphate Buffered Saline)
 pH – Potencial Hidrogeniônico
 RNA – Ácido Ribonucléico
 TGF- β – Fator de crescimento transformante beta (Transforming Growth Factor- β)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Região do gene da fibrilina-1 mutada.....	10
Figura 2 – Eletromicrografia do tecido rico em fibra elástica.....	12
Figura 3 – Esquema de inibição do receptor AT1 por Losartan.....	25
Figura 4 – Gel de agarose para identificação genotípica.....	47
Figura 5 – Fotografia dos fibroblastos de derme em cultura.....	48
Figura 6 – Imunofluorescência de Fibrilina-2 em fibroblastos de derme derivados de animais selvagens, em diferentes dias de confluência celular.....	49
Figura 7 – Imunofluorescência de Fibrilina-2 em fibroblastos de derme derivados animais selvagens: <i>Fbn1</i> ^{+/+}	50
Figura 8 – Imunofluorescência de Fibrilina-2 em fibroblastos de derme derivados animais heterozigotos: <i>Fbn1</i> ^{mgΔ/+}	51
Figura 9 – Imunofluorescência de Fibrilina-2 em fibroblastos de derme derivados animais homozigotos: <i>Fbn1</i> ^{mgΔ/mgΔ}	52
Figura 10 – Imunofluorescência de MAGP-1 em fibroblastos de derme derivados animais selvagens: <i>Fbn1</i> ^{+/+}	53
Figura 11 – Imunofluorescência de MAGP-1 em fibroblastos de derme derivados animais heterozigotos: <i>Fbn1</i> ^{mgΔ/+}	54
Figura 12 – Imunofluorescência de MAGP-1 em fibroblastos de derme derivados animais homozigotos: <i>Fbn1</i> ^{mgΔ/mgΔ}	55
Figura 13 – Imunofluorescência de tropoelastina em fibroblastos de derme derivados animais selvagens: <i>Fbn1</i> ^{+/+}	56

Figura 14 – Imunofluorescência de tropoelastina em fibroblastos de derme derivados animais heterozigotos: <i>Fbn1</i> ^{mgΔ/+}	57
Figura 15 – Imunofluorescência de tropoelastina em fibroblastos de derme derivados animais homozigotos: <i>Fbn1</i> ^{mgΔ/mgΔ}	58
Figura 16 – Immunoblotting controle beta-actina.....	59
Figura 17 – Immunoblotting de MAGP-1.....	59
Figura 18 – Immunoblotting de Tropoelastina.....	60
Figura 19 – Microscopia Eletrônica de Varredura de cultura <i>in vitro</i> de fibroblastos de derme.....	62
Figura 20 – Microscopia Eletrônica de Transmissão de cultura <i>in vitro</i> de fibroblastos de derme.....	62
Figura 21 – Immunoblotting de tropoelastina em fibroblastos de derme derivados animais selvagens: <i>Fbn1</i> ^{+/+} tratados com losartan.....	66
Figura 22 – Immunoblotting de tropoelastina em fibroblastos de derme derivados animais heterozigotos: <i>Fbn1</i> ^{mgΔ/+} tratados com losartan.....	67
Figura 23 – Immunoblotting de tropoelastina em fibroblastos de derme derivados animais homozigotos: <i>Fbn1</i> ^{mgΔ/mgΔ} tratados com losartan	68
Figura 24 – Immunoblotting de MAGP-1 em fibroblastos de derme derivados animais selvagens: <i>Fbn1</i> ^{+/+} tratados com losartan.....	69
Figura 25 – Immunoblotting de MAGP-1 em fibroblastos de derme derivados animais heterozigotos: <i>Fbn1</i> ^{mgΔ/+} tratados com losartan.....	70
Figura 26 – Immunoblotting de MAGP-1 em fibroblastos de derme derivados animais homozigotos: <i>Fbn1</i> ^{mgΔ/mgΔ} tratados com losartan.....	71

Figura 27 – Imunofluorescência de Fibrilina-2 em fibroblastos de derme derivados animais selvagens: <i>FbnI</i> ^{+/+} tratados com losartan.....	72
Figura 28 – Imunofluorescência de Fibrilina-2 em fibroblastos de derme derivados animais heterozigotos: <i>FbnI</i> ^{mgΔ/+} tratados com losartan.....	73
Figura 29 – Imunofluorescência de Fibrilina-2 em fibroblastos de derme derivados animais homozigotos: <i>FbnI</i> ^{mgΔ/mgΔ} tratados com losartan.....	74
Figura 30 – Imunofluorescência de MAGP-1 em fibroblastos de derme derivados animais selvagens: <i>FbnI</i> ^{+/+} tratados com losartan.....	75
Figura 31 – Imunofluorescência de MAGP-1 em fibroblastos de derme derivados animais heterozigotos: <i>FbnI</i> ^{mgΔ/+} tratados com losartan.....	76
Figura 32 – Imunofluorescência de MAGP-1 em fibroblastos de derme derivados animais homozigotos: <i>FbnI</i> ^{mgΔ/mgΔ} tratados com losartan.....	77
Figura 33 – Imunofluorescência de tropoelastina em fibroblastos de derme derivados animais selvagens: <i>FbnI</i> ^{+/+} tratados com losartan.....	78
Figura 34 – Imunofluorescência de tropoelastina em fibroblastos de derme derivados animais heterozigotos: <i>FbnI</i> ^{mgΔ/+} tratados com losartan.....	79
Figura 35 – Imunofluorescência de tropoelastina em fibroblastos de derme derivados animais homozigotos: <i>FbnI</i> ^{mgΔ/mgΔ} tratados com losartan.....	80
Figura 36 – Immunoblotting de MAGP-1 e tropoelastina para os tratamentos com Captopril, Angiotensina I e II.....	81
Gráfico 1 - Níveis de mRNA avaliados por Real Time – PCR.....	64

Avaliação da elastogênese em cultura de células obtidas de camundongos deficientes em Fibrilina-1. Estudo do efeito do Losartan.

Resumo

Fibrilina-1 é um importante componente da rede de microfibrilas da matriz extracelular. As microfibrilas estão presentes nas fibras elásticas que são responsáveis pela elasticidade e resistência de tecidos dos pulmões, pele e grandes vasos. Mutações no gene da Fibrilina-1 estão associadas com a síndrome de Marfan. Pacientes com esta síndrome apresentam muitas manifestações clínicas nos pulmões, sistema cardiovascular e olhos. Modelos de síndrome de Marfan tem sido criados no sentido de obter informações sobre o desenvolvimento desta doença. Estudos recentes em modelos de camundongos tem sugerido a importância da atividade exacerbada do TGF β promovendo a quase totalidade das alterações fenotípicas encontradas nestes camundongos, o que pode ser revertido pelo tratamento com o Losartan. O principal objetivo deste projeto foi avaliar a formação de fibras elásticas em cultura de células obtidas de animais deficientes em fibrilina-1, bem como o possível efeito do tratamento destas células com losartan. Os fibroblastos derivados de animais deficientes em fibrilina-1 foram estudados usando imunofluorescência, western blotting, microscopia eletrônica de varredura e transmissão e real-time PCR. Assim, a deficiência em fibrilina-1 ocasionou uma redução conjunta da deposição de fibrilina-2, MAGP-1 e tropoelastina na matriz extracelular em cultura de fibroblastos de derme. Foi possível verificar aumento no níveis de expressão das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9. O tratamento dos fibroblastos derivados de animais deficientes em fibrilina-1 com o fármaco losartan levou a recuperação parcial da deposição das proteínas Fibrilina-2, MAGP-1 e tropoelastina na matriz extracelular de cultura *in vitro*. Porém, o tratamento dos fibroblastos derivados de animais deficientes em fibrilina-1 com fármaco Captopril e os peptídeos de Angiotensina I e II não influenciaram na deposição das mesmas na matriz extracelular de cultura *in vitro*.

Palavras-chave: Fibras elásticas; Fibrilina-1; Síndrome de Marfan; Losartan

Evaluation on elastic fiber synthesis in cell culture obtained from Fibrillin-1 deficient mice. Losartan's effect studies.

Abstract

Fibrillin-1 is an important microfibril network component. Microfibrils are present in elastic fiber responsible for resilience and elastic properties from structures like lungs, skin and large vessels. Mutations in Fibrillin-1 gene are associated with Marfan's Syndrome. Marfan's Syndrome patients shown many different clinical manifestations in lungs, cardiovascular system and eyes tissues. Marfan's models have been created to get better insights about this disease development. Recent studies from mice models have suggested an important role to unbalanced TGF β activity promoting almost whole alterations found in those mice which might be rescued by losartan treatment. Our main goal were evaluate elastic fiber formation in cell culture obtained from fibrillin-1 deficient mice as well as losartan's treatment effect on those cells. The fibroblasts derived from deficient animals in fibrillin-1 were studied using immunofluorescence, western blotting, scanning electron microscopy and transmission and real-time PCR. Thus, the deficiency in fibrillin-1 led to a joint reduction of the deposition of fibrillin-2, MAGP-1 and tropoelastin in the extracellular matrix in culture of fibroblasts in the dermis. It was possible to observe an increase in levels of expression of metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 were found. The treatment of the fibroblasts derived from deficient animals in fibrillin-1 with the drug losartan has led to the partial recovery of the deposition of protein fibrillin-2, MAGP-1 and tropoelastin in the extracellular matrix of culture *in vitro*. However, the treatment of fibroblasts derived from deficient animals in fibrillin-1 with drug Captopril and the peptides of Angiotensin I and II not influenced in the deposition of the same in the extracellular matrix of culture *in vitro*.

Keywords: Elastic Fiber; Fibrillin-1; Marfan Syndrome; Losartan

Introdução

1. Introdução

As fibras elásticas são importantes componentes da matriz extracelular de estruturas ou órgãos que são submetidos a constante estresse mecânico, tais como pulmão, pele e grandes vasos.

Através de análise ultra estrutural, 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 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, entre outras (Kielty, Sherratt et al. 2002; Kielty, Sherratt et al. 2005).

Há algum tempo, muitos pesquisadores tem demonstrado a importância de moléculas da matriz extracelular não só como parte estrutural, mas também na determinação das funcionalidades das células através da regulação da ação de fatores que influenciam os mais diferentes processos celulares, desde a diferenciação até a proliferação. Dessa forma, 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. Esta doença se caracteriza por um grande comprometimento do desenvolvimento do esqueleto ósseo, dos pulmões e na formação dos grandes vasos como a artéria aorta. Dados recentes da literatura demonstram que estas anomalias estão relacionadas a uma desregulação da atividade do TGF β devido à diminuição de Fibrilina-1 na matriz extracelular.

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, Judge et al. 2006). Muito embora os sinais clínicos sejam revertidos, o mecanismo pelo qual o Losartan atua não está bem claro.

No atual projeto, foi proposto estudar a elastogênese em células de camundongos deficientes em fibrilina-1, utilizando fibroblastos de derme e avaliar a capacidade destes em formar fibras elásticas, além de verificar o efeito do tratamento de Losartan, na formação das mesmas.

2. Relevância e Justificativa

As fibras elásticas são importantes estruturas presentes em tecidos conjuntivos que estão sob constante estresse mecânico como aqueles da pele, do pulmão e das grandes artérias. Elas são grandes complexos da matriz extracelular formados por numerosos componentes, dos quais se destacam, quando analisados por microscopia eletrônica, a elastina e as microfibrilas.

A fibra elástica madura é formada a partir da deposição de tropoelastina, molécula de aproximadamente 70 kDa, que apresenta como principal característica a presença de domínios hidrofóbicos alternados por domínios de reações cruzadas (*cross-link*) ricos em lisina. Na matriz extracelular, a tropoelastina se auto-agrega num processo denominado coacervação, no qual, domínios hidrofóbicos de diferentes moléculas se alinham,

formando o agregado, que por ação de enzimas do tipo lisil oxidases sobre os resíduos de lisina dos domínios de reações cruzadas, são covalentemente ligadas formando a elastina (Thomassin, Werneck et al. 2005; Wagenseil and Mecham 2007).

Kozel *et al* (2004) investigaram os passos iniciais de montagem da fibra elástica utilizando um modelo *in vitro* no qual tropoelastina recombinante foi adicionada às culturas de células. Neste estudo, a capacidade da tropoelastina se associar ou com as fibras elásticas pré-existentes ou com as microfibrilas na matriz extracelular foi acessada por imunofluorescência. Os resultados mostram que a tropoelastina recombinante pode se associar aos componentes da matriz e não depende de células vivas para isto acontecer. Além disto, foi observado que heparan sulfato parece ser importante na deposição da tropoelastina recombinante (Kozel, Ciliberto et al. 2004).

As microfibrilas são formadas principalmente por fibrilinas, mas também contém outras moléculas associadas como as glicoproteínas associadas às microfibrilas (MAGPs), fibulinas e emilinas (Kielty, Sherratt et al. 2002). As microfibrilas são filamentos que apresentam de 10 a 12 nm de diâmetro e apresentam como principal componente estrutural as fibrilinas. Em análises por microscopia eletrônica de extratos obtidos de tecidos ricos em microfibrilas, é possível identificar estrutura semelhante a um colar de “contas”, com periodicidade de ~54 nm, enquanto que o comprimento do monômero de fibrilina é de ~ 160 nm (Lin, Tiedemann et al. 2002). As fibrilinas são glicoproteínas de alto peso molecular, aproximadamente 340 kDa e apresentam uma grande complexidade de domínios (Sakai, Keene 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 Fator de Crescimento Transformante (*TGF-like* ou *TB-like*). A principal diferença estrutural entre 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 é rico em glicina (Handford, Downing et al. 2000; Charbonneau, Dzamba et al. 2003). Além disto, apesar de ambas apresentarem em seu exon 37 um sítio de ligação de integrina, RGD, na fibrilina 2 há um sítio adicional no exon 24 (Werneck, Trask et al. 2004). Embora diferentes, e normalmente apresentando distribuições distintas nos tecidos ao longo da idade, estas isoformas podem, algumas vezes, coincidirem em determinados momentos nos tecidos durante o desenvolvimento e na fase adulta, sendo que a isoforma mais encontrada em humanos adultos é a fibrilina 1 (Kielty, Sherratt et al. 2005). Fibrilina 3 é o membro da família que foi menos estudado e pouco se sabe sobre sua função. A fibrilina 1 apresenta como principal característica estrutural 47 domínios *EGF-like*, sendo que destes, 43 são do tipo que ligam cálcio, que é importante por manter o correto enovelamento destes domínios e apresentam também 7 domínios *TGF-like* (Kielty, Sherratt et al. 2005).

Muito embora, até o momento, não haja nenhuma evidência experimental da ligação destes complexos latentes de TGF β diretamente a estes domínios da fibrilina-1, existem dados na literatura 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, Ono 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 consequentemente uma menor quantidade desta molécula na matriz extracelular, apresentam a síndrome de Marfan (Judge and 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 10000 nascimentos (Judge and Dietz 2005). Cerca de 90% dos óbitos dentre estes pacientes estão associados com problemas cardiovasculares (dissecção 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 and Dietz 2008).

Atualmente, acredita-se que a haplo-insuficiência, ou seja, metade da produção da molécula normal, é crítica para a expressão clínica da doença. Esta hipótese é baseada em resultados obtidos em estudos com camundongos transgênicos (Judge, Biery et al. 2004; Smith, Hadoke 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. Utilizando um “background” (Bunton, Biery et al. 2001; Carta, Pereira et al. 2006) genético de um camundongo expressando quantidades normais de fibrilina-1, a expressão da molécula mutante não foi

suficiente para produzir o problema vascular presente no camundongos heterozigotos para a mutação C1039G. Ainda nestes estudos, os autores observaram que os camundongos heterozigotos para esta mutação apresentam os mesmos sinais clínicos visto em camundongos nulos para a expressão de fibrilina-1 (Carta, Pereira et al. 2005). Finalmente, quando um animal transgênico super-expressando fibrilina-1 de maneira normal em um background heterozigoto para a mutação (C1039G/+) foi criado, este animal apresentava-se normal, sem nenhuma das alterações vasculares antes observadas (Judge, Biery et al. 2004).

Em trabalhos realizados com outros modelos murinos de síndrome de Marfan, foi observado que microfibrilas formadas por fibrilina-1 não são essenciais para a formação da fibra elástica e sim, importantes para a manutenção destas durante a vida pós-natal. 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 fibra elástica, inflamação da parede vascular, hiperplasia da íntima devido a migração e hiperplasia de células musculares lisas e, finalmente, colapso estrutural da parede do vaso (Pereira, Andrikopoulos et al. 1997; Pereira, Lee et al. 1999). Estas características patológicas também foram encontradas em grandes artérias musculares de pacientes com síndrome de Marfan (Bunton, Biery et al. 2001).

A função estrutural das microfibrilas ricas em fibrilina-1 é bastante óbvia, mas ultimamente tem aumentado as evidências de que estas microfibrilas tem papel crítico na regulação de citocinas, que são moléculas que afetam o desenvolvimento de tecidos, bem

como a homeostase, regulando a atividade celular, como proliferação, migração, capacidade de síntese e morte (Ramirez and Rifkin 2003). A molécula de fibrilina-1 apresenta um alto grau de homologia com as proteínas que pertencem a mesma família e que ligam ao TGF (LTBP- Latent TGF- β Binding Protein) (Pereira, D'Alessio et al. 1993). Citocinas da família do TGF- β são sintetizadas e secretadas para a matriz extracelular como um grande complexo latente, formado por duas moléculas de TGF- β ligadas ao peptídeo que confere latência a citocina (LAP- Latency associated peptide) e a uma das isoformas de LTBP (LTBP 1, 3 e 4) (Sinha, Nevett et al. 1998; Dallas, Keene et al. 2000). 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 dissecação (rompimento) (Kielty, Whittaker et al. 1996; Judge, Biery et al. 2004).

O tratamento de camundongos modelos de 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, Judge et al. 2006). Estes dados reforçam a hipótese de que a fibrilina-1 participa na regulação da atividade do TGF β .

Nosso laboratório tem se dedicado ao estudo da possível participação destas moléculas que compõem as fibras elásticas, mais especificamente a rede de microfibrilas, estruturas estas presentes na parede de grandes vasos, durante processo de formação de trombos.

Neste contexto, a correta formação das fibras elásticas, e consequentemente, das lâminas elásticas, são de grande importância para o modelo. Utilizando um modelo fotoquímico de produção de trombos, verificamos a importância da participação da MAGP-1 (GlicoProteína Associada a Microfibrila -1) bem como da fibrilina-1, na formação de trombos, onde a deficiência destas moléculas leva a necessidade de um tempo maior para que este processo ocorra. No caso dos camundongos deficientes em MAGP-1, o tratamento com Losartan resgata o tempo normal de formação de trombos (Werneck, Vicente et al. 2008) (dados não publicados).

O presente projeto, tem como objetivo geral, estudar a elastogênese (formação de fibras elásticas) em células de camundongos deficientes em fibrilina-1, utilizando um modelo de cultura de fibroblastos de derme e verificar o efeito do tratamento com Losartan sobre uma possível influência na mesma.

Para isto, foram isolados fibroblastos de derme de camundongos recém nascidos deficientes em fibrilina-1 e posteriormente a formação das fibras elásticas foi analisada por imuno-fluorescência. As células foram obtidas a partir de camundongos modificados geneticamente e que expressam uma fibrilina-1 sem a região central correspondente aos exons 19 a 24 (figura 1). Estes camundongos quando em homozigose ($FbnI^{mg\Delta/mg\Delta}$) são aparentemente normais, porém todos morrem com complicações cardiovasculares antes de completarem 3 semanas de vida.

No entanto, quando em heterozigose ($FbnI^{mg\Delta/+}$), apresentam expectativa de vida normal, sem apresentar problemas relacionados a síndrome de Marfan, muito embora expressem aproximadamente 50% da quantidade normal de fibrilina 1 (Pereira, Andrikopoulos et al. 1997).

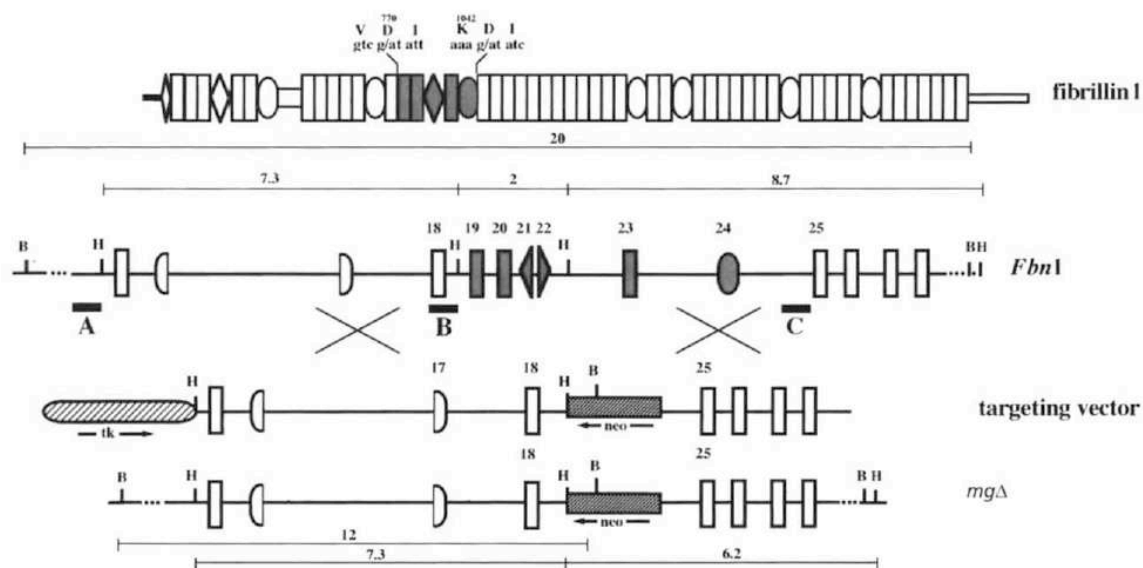


Figura 1: Região do gene da fibrilina-1 (*Fbn1*) onde ocorreu a mutação, deleção dos exons 19 a 24 e inserção do cassete de Neomicina (*mgΔ*) (Pereira, Andrikopoulos et al. 1997).

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, Macarak et al. 1998), o tendão (Caldini, Caldini et al. 1990) (de Carvalho, Lino Neto et al. 1994) (de Carvalho and Campos Vidal Bde 1995) , a pele (Cotta-Pereira, Guerra Rodrigo et al. 1976) (Kielty, Berry et al. 1993), o ligamento periodontal (Takagi, Kazama et al. 1989) e o pulmão (Fukuda, Ferrans et al. 1984) (Leick-Maldonado, Lemos 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 2). No que diz respeito à composição protéica 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, Sherratt et al. 2002) (Kielty 2006).

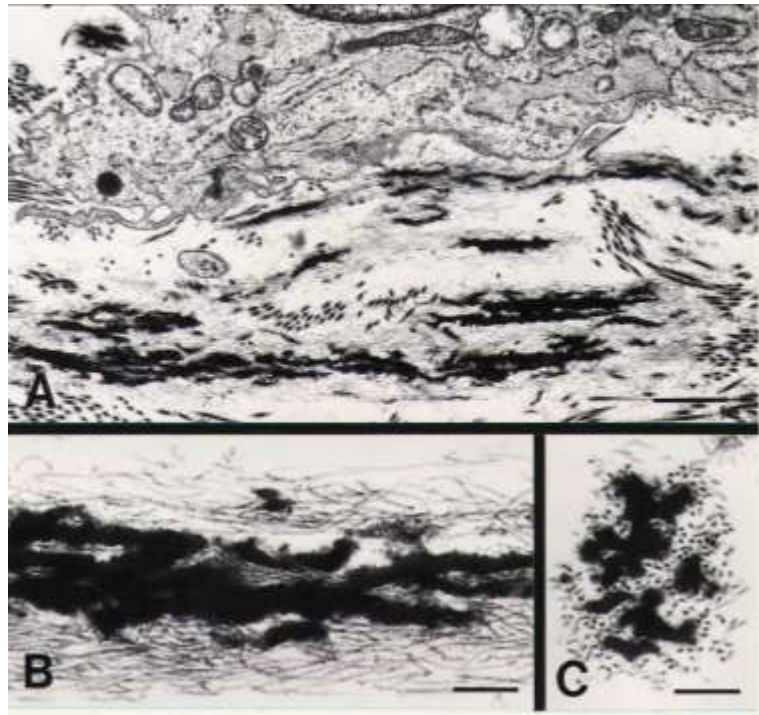


Figura 2 - Eletromicrografia de tecido rico em fibra elástica (aorta) em desenvolvimento. **A** – Visão geral do tecido rico em fibra elástica. **B** e **C** – Presença de uma região mais eletrondensa, a elastina, e a rede de microfibrila. **B** – Corte longitudinal e **C** – Corte transversal (Davis 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, Lange et al. 1981) (Rosenbloom, Abrams 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, Abrams et al. 1993) (Swee, Parks 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, Parks 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 and Bornstein 1969), por outro lado, sabe-se que as fibras compostas apenas por microfibrilas, sem material amorfo, não são altamente resistentes quanto a função elástica (Ross, Fialkow 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, Bachi et al. 1996); extensibilidade dos tecidos elásticos maduros (Lillie, David et al. 1998); ancoragem de tecidos não elásticos como as zônulas ciliares (Wheatley, Traboulsi et al. 1995); suporte e adesão dos endotélios e outras células epiteliais às fibras elásticas via receptores celulares (Sakamoto, Broekelmann et al. 1996); adesão de plaquetas (Robinson and Godfrey 2000); sinalização e funcionalidade celular, por meio da interação com TGF- β (*Transforming Growth Factor* β) e BMPs (*Bone Morphogenetic Proteins*) (Ramirez and 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 MAGPs (“Microfibril-Associated GlycoProtein”), fibulinas, entre outras (Kielty, Sherratt et al. 2005) (Kielty, Sherratt et al. 2002).

Essas tramas microfibrilares contêm moléculas de fibrilinas, Glicoproteínas Associadas às Microfibrilas (MAGPs), fibulinas e EMILINA-1 (Ritty, Broekelmann et al. 2003) (Werneck, Trask et al. 2004) (Wagenseil and Mecham 2007), as quais tornam a elastogênese, isto é, a produção de fibras elásticas funcionais, um processo complexo e ainda não muito bem compreendido (Thomassin, Werneck et al. 2005) (Wagenseil and 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.

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) (Sakai, Keene et al. 1986), a fibrilina-1 foi a primeira a ser isolada, já a fibrilina-2 foi descrita posteriormente por Lee *et al.* (1991a) (Lee, Godfrey 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, Charbonneau 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 and Dietz 2007). Essas sequências RGD e domínios ligantes de integrinas interagem com proteoglicanos heparan-sulfato da superfície celular (Ritty, Broekelmann et al. 2003). Sendo assim, as fibrilinas atuam como arcabouços de sinalização celular por meio desses receptores (Wagenseil and 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.

Entre elas, 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, Pereira 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, Sakai et al. 2004; Ramirez and 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, Eldadah et al. 1999).

Evidências resultantes de conformações moleculares indicaram que as fibrilinas formam arranjos supramoleculares com LTBP (Latent TGF- β -Binding Protein), fibulinas, TGF- β , BMPs, integrinas, proteoglicanos e elastina na MEC (Wagenseil and Mecham 2007) (Ramirez and 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 and Rifkin 2009). Estes fatores de crescimento são potentes reguladores da sobrevivência e diferenciação celular, homeostase tecidual e respostas à injúria celular (Massague and Chen 2000).

3.4 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 and 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 (Massague and Gomis 2006) (Feng and Derynck 2005). Esse fator, além de envolver-se em diferentes respostas biológicas, como no controle da proliferação e da diferenciação celular, desempenha papel importante durante a hematopoiese 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, doença auto-imune e vascular (Zeisberg, Hanai et al. 2003) (ten Dijke and 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, Frischmeyer 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), que, por sua vez, se liga na parte N-terminal da fibrilina-1, 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, Frischmeyer 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. 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, levam a liberação do TGF- β latente que se torna ativo por ação de enzimas da matriz extracelular.

Estudos demonstram que a utilização do fármaco 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, Judge et al. 2006).

3.5 Metaloproteinases (MMP's)

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

A descoberta das MMPs provavelmente ocorreu no ano de 1962, quando Gross & Lapière (Gross and 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 matriz (MEC) que participam no remodelamento de tecidos durante o desenvolvimento, cicatrização de feridas, crescimento de tumores, na metástase e na inflamação (Kanesaka, Mori 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 vários processos biológicos normais, 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, Gveric et al. 1996) (Cossins, Clements et al. 1997).

Yang *et al* (Mates, Nicolae 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, Yang e colaboradores (Suda, Shiga et al. 2009), utilizando doxíciclina como inibidor não específico das metaloproteinases 2 e 9, normalizou a função aórtica vasomotor e suprimiu o crescimento do aneurisma em camundongos modelos de Marfan.

Chung *et al* (Chung, Au Yeung 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 da parede das aorta torácicas.

A participação da MMP-9 em processos patológicos incluindo uma variedade de doenças auto-imunes como o Lupus eritematoso, syndrome de Sjögren's, Sclerose sistêmica, artrites reumatoide, polimiosite e aterosclerose também tem sido descrita (Ram, Sherer et al. 2006).

3.6 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 musculo-esqueléticas ou oculares à 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 5 anos de idade com longos membros, contraturas digitais e conjunta, e cifose-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 esclarecida em 1972 (Murdoch, Walker et al. 1972). O papel da fibrilina-1 na patogênese foi demonstrado por Hollister *et al*, em 1990 (Hollister, Godfrey et al. 1990), e o locus da doença foi posteriormente atribuído ao cromossomo 15q21.1 (Kainulainen, Pulkkinen et al. 1990). A prova de que mutações no gene fibrilina-1 (*Fbn1*) podem causar síndrome de Marfan foi fornecido por Dietz *et al* em 1991 (Dietz, Cutting 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, Liang et al. 2009; Aalberts, Schuurman et al. 2010; Hilhorst-Hofstee, Rijlaarsdam et al. 2010; Khau Van Kien, Baux 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 a regurgitação mitral e tricúspide é a principal causa de morte, enquanto que a

dissecção da aorta é menos comum (Tiecke, Katzke et al. 2001). A sobrevivência desses pacientes é baixa, chegando a não ultrapassar 24 meses (Tiecke, Katzke et al. 2001). Dentre os espectros fenotípicos mais leve estão as fibrilinopatias com ectopia lentis isolada ou as anormalidades esqueléticas, ou várias combinações destas anormalidades, mas sem dilatação da aorta (Robinson, Arteaga-Solis 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, Booms 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 contractural congênita (Lee, Godfrey et al. 1991) (Park, Putnam et al. 1998) (Chaudhry, Gazzard 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, Booms et al. 2002) (Dietz, Loeys 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 and Pereira 1999).

No que diz respeito ao TGF- β , sabe-se que ele interage com LAP (*Latency Associated Peptide*), permanecendo ligado à célula até que outra proteína, a LTBP ligue-se por pontes dissulfeto, formando um complexo capaz de ser secretado à MEC e se ligar à região N-terminal da fibrilina-1 (Munger, Harpel et al. 1997) (Hyytiainen, Penttinen 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 and 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, Harpel et al. 1998) (Munger, Huang et al. 1999) (Munger, Harpel et al. 1997). Assim, mutações no gene da fibrilina-1 podem resultar no sequestro incorreto dos complexos LTBP da MEC e aumentar a atividade do TGF- β (Kaartinen and Warburton 2003). Além disto, mutações nos genes de receptores do TGF- β (TGFB1 e TGFB2) 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, Collod-Beroud et al. 2004).

Ainda no que diz respeito aos fatores tróficos que atuam nos tecidos conjuntivos, sabe-se que BMPs (*Bone morphogenetic proteins*) 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 and Sakai 2010). Sugawara *et al.* (2009) (Cini, Carpi 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, Frischmeyer et al. 2003) (Ramirez and Rifkin 2009). Deste modo, tendo como pontos de partida a sinalização inadequada do TGF- β na

patogênese da síndrome de Marfan e a eficiência terapêutica do fármaco Losartan, antagonista do TGF- β , demonstrada em camundongos deficientes em fibrilina-1, Habashi *et al.* (2006) (Habashi, Judge et al. 2006) demonstraram evidências histológicas de redução do aneurisma aórtico e melhora na septação alveolar e hipoplasia muscular, entretanto, os mecanismos precisos da ação deste fármaco permanecem desconhecidos.

Apesar de estudos indicarem que microfibrilas ricas em fibrilinas possam ser degradadas por proteases séricas e elastases de neutrófilos e macrófagos (Ramirez and Pereira 1999), de modo semelhante ao que foi observado para a elastina, há pouco ou nenhum *turnover* das microfibrilas em tecidos adultos normais, embora a degradação de tecidos elásticos faça parte de processos normais durante o envelhecimento e seja marcante em várias doenças humanas.

3.7 Fármaco Losartan

O Losartan, fármaco comumente utilizado como um agente anti-hipertensivo, é um inibidor do receptor AT1 de angiotensina II (ver figura 3). 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 fármaco 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) e diminui os níveis de TGF- β (Robinson, Arteaga-Solis et al. 2006). Adicionalmente, o trabalho de Habashi *et al.*

(Habashi, Judge 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 aumentaram as doses de anticorpo, a melhora foi mais significativa. Nesse mesmo trabalho, foram também tratados animais com os fármacos propranolol e Losartan, em que pôde ser verificado uma melhora significativa nas estruturas das fibras elásticas quando este último foi utilizado.

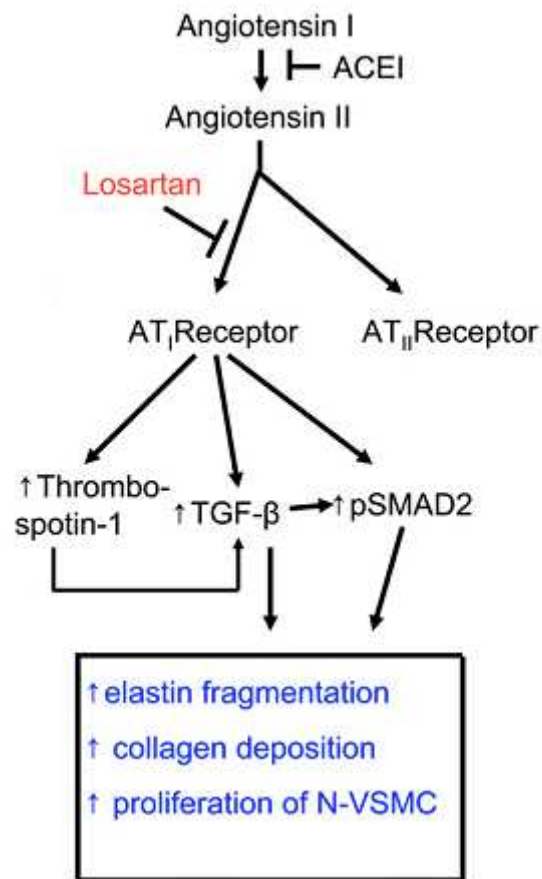


Figura 3 - Esquema da inibição do receptor AT₁ por Losartan (Brooke, Habashi et al. 2008).

3.8 Fármaco Captopril

Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina- ECA 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 ECA pode influenciar a hemodinâmica regional, com a redistribuição do fluxo sanguíneo em favor de órgãos vitais (McInnes 1994).

Os efeitos benéficos hemodinâmicos dos inibidores da ECA 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).

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 provavelmente devido ao bloqueio da angiotensina II uma vez que o mesmo efeito foi observado com um antagonista do receptor AT1 (McInnes 1994) .

A síndrome de Marfan (MFS), surge de um defeito no gene que codifica a proteína da matriz extracelular fundamental, fibrilina-1 (Judge and 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. (Dietz, Loeys 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 and Pyeritz 2008). A destruição das lamelas elásticas e de colágeno conduzem a degeneração medial à 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, Huang et al. 1994).

Estudos recentes sobre inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA), relataram uma redução na rigidez arterial em 60% e de 3-7 mm no diâmetros da aorta em pacientes com MFS tratados (Ahimastos, Aggarwal et al. 2007)cé. Geralmente, drogas anti-hipertensivas reduzem a rigidez arterial passivamente através da redução da pressão arterial, no entanto, os inibidores da ECA pode ter efeitos adicionais sobre a estrutura da parede arterial contribuindo para a redução na rigidez arterial e do diâmetro

(Wojakowski, Gminski et al. 2001). Existe a hipótese de que a tais resultados estariam correlacionados a redução no plasma dos níveis de TGF-beta e de MMP's (Ahimastos, Aggarwal et al. 2007) .

OBJETIVOS

4. Objetivos

4.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste projeto foi estudar a elastogênese em células de camundongos deficientes em fibrilina-1, utilizando cultura primária de fibroblastos de derme, bem como a influência do tratamento com o fármaco Losartan nesse processo.

4.2 Objetivos Específicos

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

As células obtidas a partir de camundongos deficientes em fibrilina-1 foram analisadas em um sistema de aquisição de imagens (Axio Observer, Carl Zeiss, Alemanha) que nos permitiu avaliar a deposição de moléculas componentes das microfibrilas e também de elastina, em células que expressam diferentes níveis de fibrilina-1 ($FbnI^{+/+}$, $FbnI^{mg\Delta/+}$ e $FbnI^{mg\Delta/mg\Delta}$).

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

Através da utilização do mesmo sistema de aquisição de imagens foi possível avaliar a influência do tratamento com Losartan nestas células e em suas capacidades de sintetizar e depositar tropoelastina na matriz extracelular.

4.2.3. Analisar a ultra estrutura das fibras elásticas formadas.

Análise ultra estrutural das fibras elásticas formadas foi realizada por microscopia eletrônica de transmissão e varredura.

MATERIAIS E MÉTODOS

5. Materiais e Métodos

5.1 Animais

Para a realização dos estudos foram utilizados camundongos C57BL/6, heterozigotos para o gene *Fbn1* (*Fbn1*^{mgΔ/+}), gentilmente doados pela Profa. Dra. Lygia da Veiga Pereira – Laboratório de Genética Molecular/USP. Estes animais foram colocadas em cruzamento e permaneceram no biotério do Departamento de Bioquímica da UNICAMP para desenvolvimento da pesquisa. Para realização dos estudos foram utilizados recém-nascido de 2-3 dias de idade oriundos do cruzamento entre pais heterozigotos para a mutação no gene da *Fbn1* (*Fbn1*^{mgΔ/+}). Sendo assim, foram obtidos três genótipos diferentes para o estudo em questão. 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. Os protocolos experimentais utilizados com os animais foram previamente submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA/IB/UNICAMP) protocolo número 2187-1 (ANEXO 1). Além disso, para os roedores, foi utilizada dieta padrão (Nuvilab CR1®).

5.2 Extração de Fibroblastos de derme (Cultura Primária)

Para o isolamento dos fibroblastos da 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*^{mgΔ/+}). Esse cruzamento possibilitou a obtenção de três genótipos celulares, selvagens: *Fbn1*^{+/+}, heterozigotos: *Fbn1*^{mgΔ/+} e homozigotos: *Fbn1*^{mgΔ/mgΔ}, a serem estudados nesse trabalho.

Tais animais foram eutanasiados por hipotermia e em seguida submetidos ao procedimento da retirada da pele, seguindo o protocolo de Rittie e Fisher (Rittie and Fisher 2005). Inicialmente foi feito um corte transversal (cabeça-cauda) em que a pele pode ser 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 10 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.

Após a extração celular dos fibroblastos, foram realizados 3 repiques (P3) e então as células foram submetidas ao congelamento para a criação de um estoque de células. Como meio de congelamento foi utilizado o meio de cultura acrescido de 10% de DMSO (di-metil sulfóxido, SIGMA Chemical Co.)

5.3 Cultura celular

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 utilizado 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) .

Durante as manipulações celulares, foram utilizados trocas de meios a cada 2 dias e realizado o repique quando as células atingiam o estado de sub-confluência.

5.4 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 microcentrifuga 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 10,0pmol/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 1% acrescido de brometo de etídio 5% com marcador de peso molecular (100bp DNA ladder plus) utilizando como tampão de corrida TBE 1x (160mA/50 min) e posteriormente visualizado por revelador GE Healthcare UV 302nm .

Os animais que apresentaram banda com aproximadamente 440pb foram identificados como portadores da mutação no gene da fibrilina-1 (+/mgΔ) na primeira reação. Os animais que apresentaram banda com aproximadamente 600bp foram identificados como portadores do alelo selvagem na segunda reação. Sendo assim, os animais selvagens, apresentaram banda apenas o par 20F/CC-R, os animais deficientes heterozigotos apresentaram bandas em ambos os pares NeoF/NeoR e 20F/CC-R e os animais deficientes homozigotos apresentaram apenas a banda NeoF/NeoR.

5.5 Imunofluorescência

Os anticorpos primários utilizados nesta técnica foram gentilmente cedido pelo laboratório do Prof. Dr. Robert Mechan, EUA, Washington University, St. Louis, para as glicoproteínas Elastina, MAGP-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 4 dias após atingirem a confluência celular (dia seguinte ao plaqueamento), 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 com 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 primários por 1h e 30 min na diluição de 1: 500, seguida de 3x lavagens de 5 min cada. 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.

5.6 Western blotting

As células em estudo foram cultivadas individualmente por 4 dias após o plaqueamento com ou sem tratamento Losartan, Captopril, Angiotensina I e II e então foram submetidas ao processo de extração protéica. Foi utilizado o tampão Buffer B (100 mM NaH₂PO₄, 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 3000xG 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, 30µg de proteínas foram aplicados em géis de poliacrilamida de 10%, preparados segundo Laemmli (1970), em placas verticais do sistema Mini Protein III (Bio-Rad Laboratories). A corrida

ocorreu com o uso do tampão de corrida (Tris base 12,5mM; Glicina 100mM e SDS 0,02%) e a mesma foi acompanhada com o uso do padrão de peso molecular Dual color prestained Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad Laboratories) empregando uma fonte de corrente contínua ajustada com amperagem constante de 25mA. Em sequência, foi realizada a transferência das proteínas para membrana de PVDF (Immobilon-P-Transfer Membranes, Millipore Corporation, U.S.A), conforme descrito abaixo.

A transferência para a membrana de PVDF dos géis SDS-PAGE foi realizada em cuba de transferência (Bio-Rad) com a corrente ajustada para 220mA durante 50 minutos, em tampão de transferência CAPS 10 mmol/L, metanol 10% pH 11. As membranas foram coradas pela solução de Ponceau (100mg de Ponceau e 0,5mL de ácido acético para 50mL) a fim de se verificar o padrão de separação eletroforética e a transferência efetiva para a membrana PVDF.

Para realização dos ensaios de imunoblotting as membranas foram preparadas conforme as etapas:

- 1) Bloqueio em Leite em Pó desnatado 5% (Blotto) em TBS-T durante 1 hora à temperatura ambiente ou overnight a 4° C;
- 2) Incubadas com o anticorpo primário para Elastin, MAGP-1, AT1 ou AT2, diluído a 1:1000 em TBS-T durante 1 hora ou overnight a 4°C;
- 3) Em seguida foram realizadas lavagens de 5 min com Blotto e incubação com o anticorpo secundário ECL Anti-Rabbit IgG Horseradish peroxidase linked (GE Healthcare UK Limited), na diluição de 1:2000 em TBS-T durante 1h a temperatura ambiente.

- 4) Após três lavagens de 5 min em Blotto, procedeu-se à revelação utilizando a solução de Luminol 0,45 mM e Ácido cumárico 0,625 mM e a solução de H₂O₂ 2,65 mM na proporção de 1:1 e posterior exposição e revelação com filme de raio X. (Kodak film Medical X-ray – General Purpose Green).

5.7 Microscopia eletrônica de varredura

Os fibroblastos derivados de animais selvagens: *Fbn1*^{+/+}, heterozigotos: *Fbn1*^{mgΔ/+} e homozigotos: *Fbn1*^{mgΔ/mgΔ} foram cultivados até sub-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 Microscope Science) a 4°C durante 1h. Posteriormente procedeu-se à 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).

5.8 Microscopia eletrônica de transmissão

Os três genótipos celulares em estudo foram cultivados por quatro dias pós confluência em lamínulas de vidro de 13 mm estéreis e posteriormente fixadas 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 Microscope Science) a 4°C durante 1h. Posteriormente procedeu-se à desidratação por Etanol em concentrações crescentes. As lamínulas foram pré-embebidas em mistura de Etanol e resina Epon (Electron Microscope Science) na proporção de 1:1, 1:3 durante 2h cada e 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 70 nm 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.

5.9 REAL TIME - PCR

As sequências específicas de oligonucleotídeos para LOXL1, MMP-2, MMP-9, fibulina-5, tropoelastina e GAPDH (gene normalizador) foram obtidas do *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* (Tabela 1) 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 (IDT®).

As expressões dos genes de Fibrilina-1, Fibrillin-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 *eppendorfs* 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 (*Diethyl pyrocarbonate*).

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 por 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)₁₈ *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/µL), 12 µL de *primer* F (312,5 nM) e 12 µL 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 reação de cada animal 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 Anatomia, Biologia Celular, Fisiologia e Biofísica 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 $E = 10^{(-1/\text{slope})}$, com valores resultantes acima de 0,90 para todos os genes.

5.10 Tratamentos das culturas celulares com Losartan, Captopril, Angiotensina I e Angiotensina II

Os fibroblastos foram tratados com os fármacos Losartan, captopril e os peptídeos de Angiotensina I e Angiotensina II acrescido ao meio de cultura individualmente nas concentrações de estudo. O Losartan foi cedido pelo Professor José Eduardo Krieger

(USP-INCOR), já o Captopril e os peptídeos de Angiotensina I e II foram adquiridos da SIGMA ALDRICH.

Para o tratamento em cultura foram feitas soluções estoques de Losartan 0,3 mg/mL, Captopril 0,5 mg/mL, Angiotensina I 1 mg/mL e Angiotensina II 5 mg/mL ambas esterilizadas por filtro 0,22 μ m Syringe-driven filters da JET BIOFIL. As concentrações utilizadas para o fármaco Losartan foram de 0, 1, 10 e 100 μ M/L (Sauter, Cohen et al. 2007). Para o fármaco Captopril de 0, 100, 500, 1000 μ M/L. Para os peptídeos angiotensina I e II de 0 nM/L ; 1 nM/L ; 100 nM/L e 1 μ M/L. As células foram cultivadas em meio de cultura DMEM acrescido 10% Soro Fetal bovino, 1% penicilina 10.000 U.I/ mL e estreptomicina 10 mg/mL e os tratamentos por 4 dias após o plaqueamento, com duas trocas de meios de cultura e tratamento durante esse período.

5.11 Análises Estatísticas

Os dados dos imunoblots foram apresentados como média $\pm$ 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 $P < 0,05$.

RESULTADOS

6. Resultados

Como descrito em materiais e métodos, primeiramente foi realizada a extração dos fibroblastos de derme de camundongos recém-nascidos (2 a 3 dias de idade) da linhagem C57BL/6 com mutação no exon 19-24 do gene da Fibrilina-1 (síndrome de Marfan), obtidos do cruzamento de dois camundongos heterozigotos ($FbnI^{mg\Delta/+}$).

Posteriormente estes fibroblastos foram identificados quanto a nível de expressão por PCR afim de se obterem os genótipos selvagens: $FbnI^{+/+}$, heterozigotos: $FbnI^{mg\Delta/+}$ e homozigotos: $FbnI^{mg\Delta/mg\Delta}$. A identificação genotípica se deu por PCR, em duas reações. A primeira reação identificou os animais que apresentavam a mutação para o gene da Fibrilina-1. A segunda reação identificou os animais que apresentavam o alelo selvagem. Na figura 4, em **A** é possível observar um exemplo de um dos géis obtidos após o ciclo de reações de PCR e eletroforese em gel de agarose 0,75%, onde a banda em evidência aparece nos animais heterozigotos e homozigotos, já que o par de oligonucleotídios amplifica uma região do cassete de neomicina no gene da Fibrilina-1 mutado. Em **B**, é possível observar o gel da segunda reação após o ciclo de reações de PCR, onde a banda em evidência identifica os animais que apresentam a amplificação para o alelo selvagem. Sendo assim, os animais selvagens apresentam apenas amplificados para a segunda reação, os animais heterozigotos apresentam amplificados para a primeira e segunda reações e os animais homozigotos apresentam amplificados para somente a primeira reação.

Por fim, foi criado um estoque de células contendo fibroblastos de derme derivados de animais selvagens: $FbnI^{+/+}$, heterozigotos: $FbnI^{mg\Delta/+}$ e homozigotos: $FbnI^{mg\Delta/mg\Delta}$.

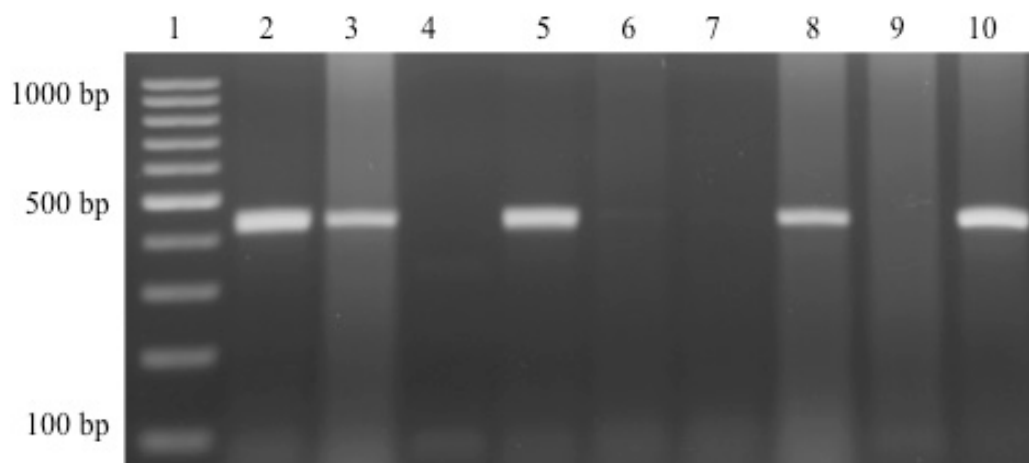
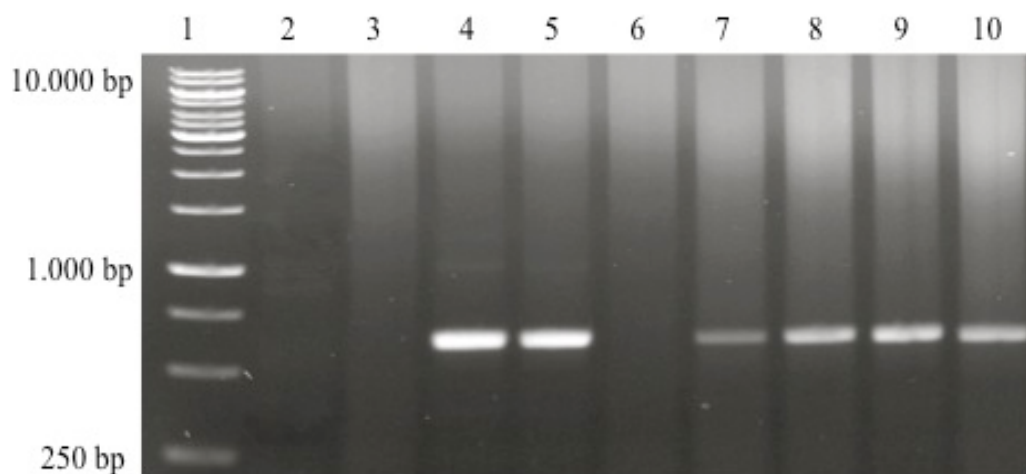
A**B**

Figura 4 – Identificação genotípica de camundongos. Em **A (primeira reação)**, as bandas indicam animais heterozigotos e homozigotos positivos para o gene $Fbn1^{mg\Delta/+}$, que corresponde as bandas 2,3,5 e 8 e 10; 1 padrão de peso molecular com 100 pares de bases; 10- controle positivo e 9 - controle negativo. Em **B (segunda reação)**, as bandas indicam animais positivos para o alelo selvagem, que corresponde as bandas 4,5,7, 8, 9 e 10; 1 padrão de peso molecular com 1.000 pares de bases; 6-controle negativo e 7- controle positivo.

A partir da criação do estoque de células, iniciamos os experimentos para caracterização do perfil de expressão de componentes da matriz extracelular pelos três genótipos celulares. Nosso foco foi sobre os principais componentes da matriz extracelular que compõem as redes de microfibrilas, importantes no processo de formação das Fibras Elásticas maduras. Sendo assim realizamos um ensaio sobre a formação das fibras elásticas na matriz extracelular em cultura de células. Para isso, utilizamos a técnica de imunofluorescência para averiguar os componentes e moléculas constituintes das microfibrilas na formação das fibras elásticas. Inicialmente, realizamos um teste com as células selvagens a fim de obter qual seria o melhor tempo de formação das microfibrilas e assim otimizar a visualização das mesmas. A figura 5 mostra os fibroblastos de derme em cultura e a presença das fibras elásticas na matriz extracelular. A figura 6, indica os resultados obtidos na imunofluorescência com 0, 1, 2, 3 e 4 dias após o plaqueamento.

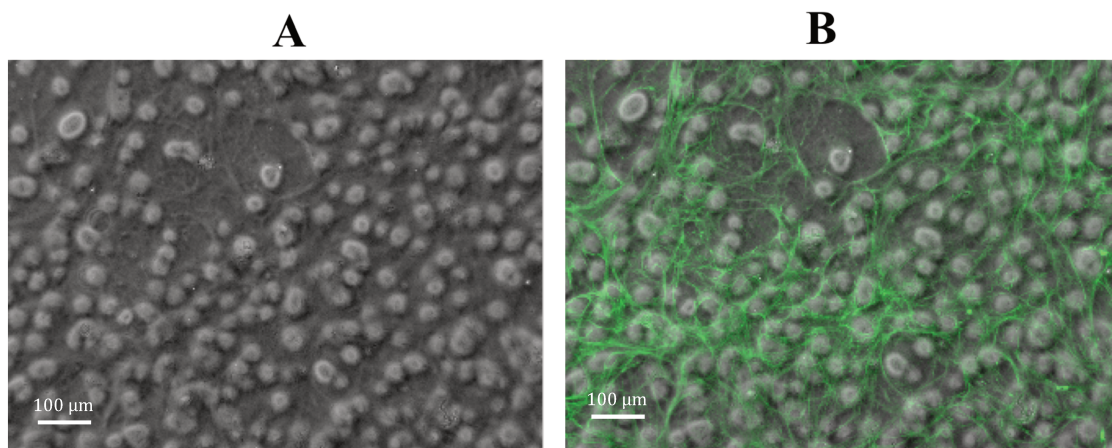


Figura 5 – Visualização dos fibroblastos de derme em cultura e das fibras elásticas. Em **A**: contraste de fase **B**: fibras elásticas visualizadas por imunofluorescência para fibrilina-2. Anticorpo secundário conjugado com FITC. Barra = 100 µm.

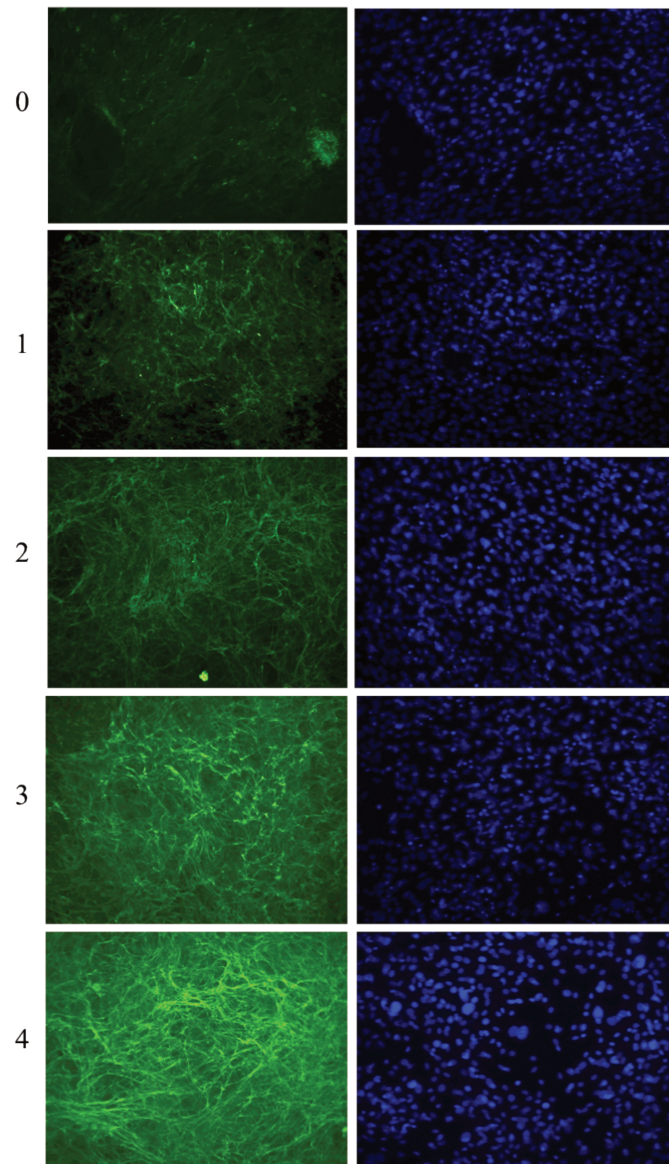


Figura 6 – Imunofluorescência para fibrilina-2 em cultura primária de fibroblastos de derme de camundongos selvagens, após 0, 1, 2, 3 e 4 após o plaqueamento (1×10^5 células/mL) e marcação nuclear com DAPI. Anticorpo secundário conjugado com FITC. Aumento 20x.

Após a padronização dos métodos, foram verificados a deposição de moléculas componentes das microfibrilas na matriz extracelular por ensaio de imunofluorescência em cultura de fibroblastos derivados de camundongos selvagens e deficientes em Fibrilina-1

com os genótipos selvagens: *Fbn1*^{+/+}, heterozigotos: *Fbn1*^{mgΔ/+} e homozigotos: *Fbn1*^{mgΔ/mgΔ}, 4 dias após o plaqueamento. Para este ensaio, as células foram plaqueadas em lamínula de vidro de 13 mm, em densidade de 1×10^5 células/mL. Anticorpos primários Anti-Fibrilina-2, Anti-MAGP-1 e Anti-Tropoelastina, foram utilizados e então, anticorpos secundários anti-anticorpos de coelhos conjugados com FITC foram empregados. As Figuras 7, 8 e 9 mostram os resultados das imunofluorescências em cultura de fibroblastos de derme para glicoproteína Fibrilina-2 para os genótipos selvagens: *Fbn1*^{+/+}, heterozigotos: *Fbn1*^{mgΔ/+} e homozigotos: *Fbn1*^{mgΔ/mgΔ}, respectivamente.

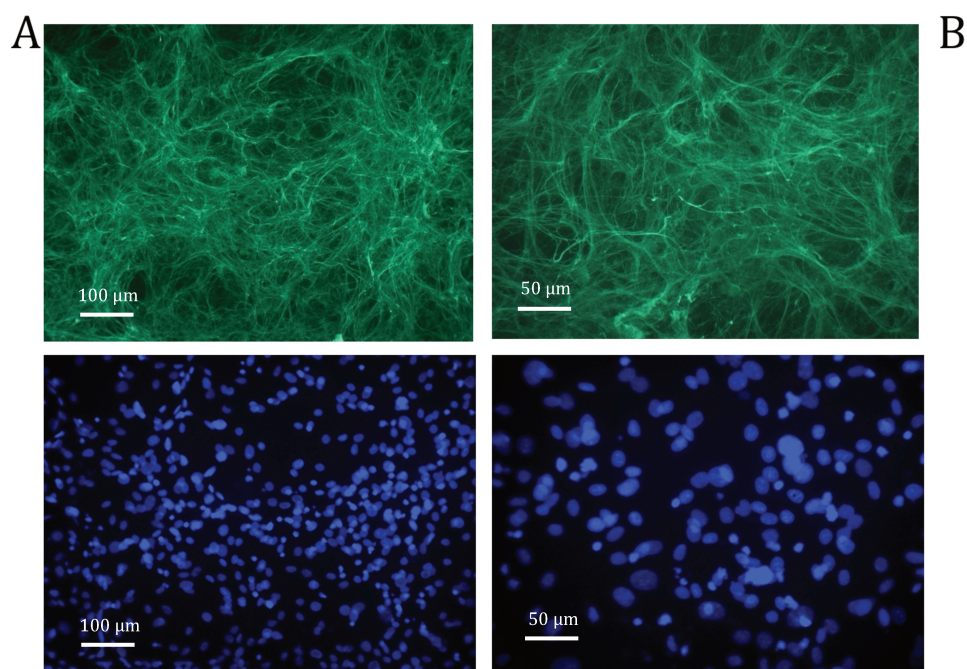


Figura 7 - Imunofluorescência para Fibrilina-2 em cultura primária de fibroblastos de derme de camundongos selvagens, 4 dias após plaqueamento (1×10^5 células/mL). **A** – Fibras elásticas e marcação nuclear com DAPI – Barra = 100 μm ; **B** – Fibras elásticas e marcação nuclear com DAPI - Barra = 50 μm. Anticorpo secundário conjugado a FITC.

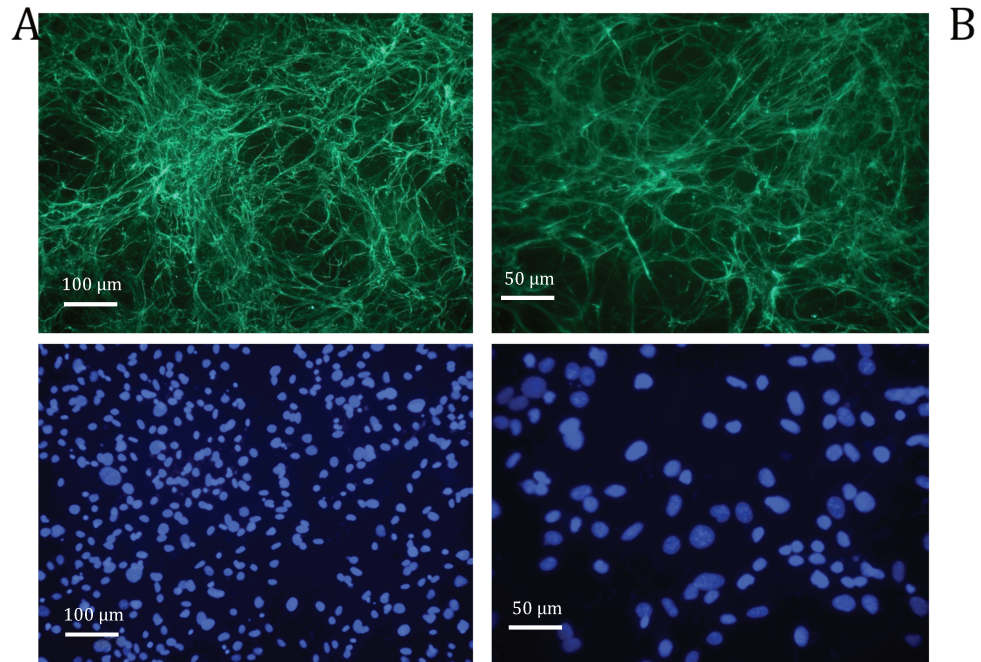


Figura 8 - Imunofluorescência para Fibrilina-2 em cultura primária de fibroblastos de derme de camundongos heterozigotos: *Fbn1*^{mgΔ/+}, 4 dias após plaqueamento (1×10^5 células/mL). **A** – Fibras elásticas e marcação nuclear com DAPI - Barra = 100 μ ; **B** – Fibras elásticas e marcação nuclear com DAPI - Barra = 50 μm. Anticorpo secundário conjugado a FITC.

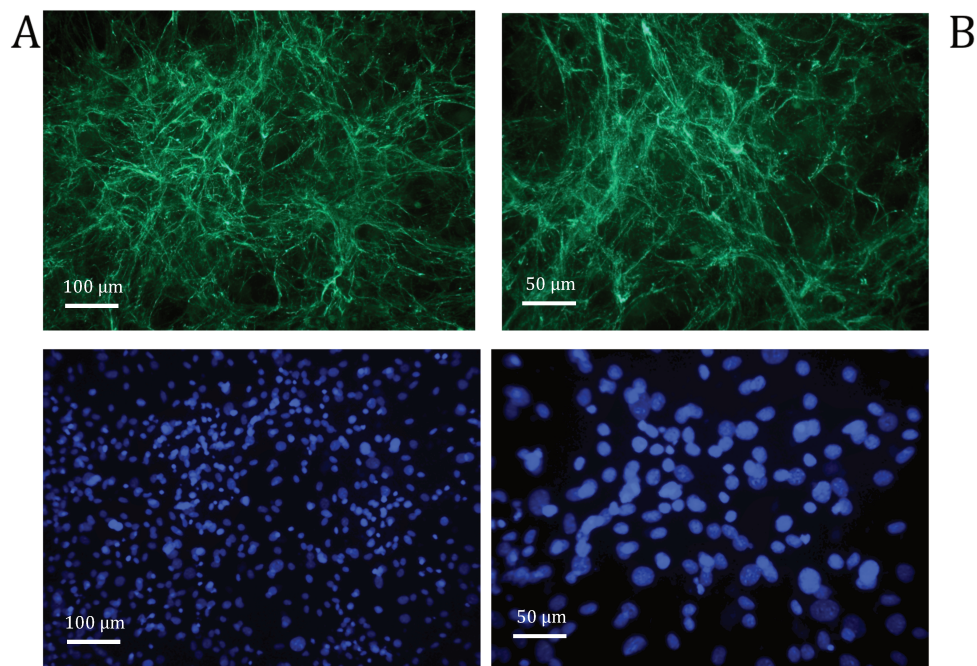


Figura 9 - Imunofluorescência para Fibrilina-2 em cultura primária de fibroblastos de derme de camundongos homozigotos: *Fbn1*^{mgΔ/ mgΔ}, 4 dias após plaqueamento (1×10^5 células/mL). **A** – Fibras elásticas e marcação nuclear com DAPI - Barra = 100 μ ; **B** – Fibras elásticas e marcação nuclear com DAPI - Barra = 50 μm. Anticorpo secundário conjugado a FITC.

Utilizando a mesma técnica, averiguamos agora a deposição de MAGP-1. As figuras 10, 11 e 12 mostram os resultados da deposição de MAGP-1 em cultura de fibroblastos de derme de camundongos selvagens e deficiente em Fibrilina-1, em 4 dias de cultura após o plaqueamento das células.

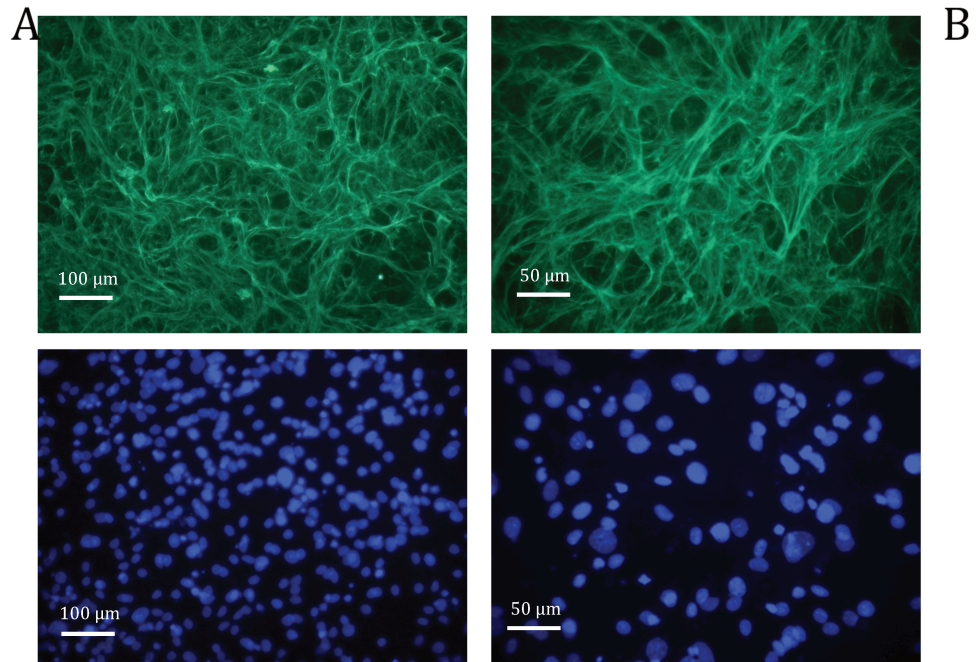


Figura 10 - Imunofluorescência para MAGP-1 em cultura primária de fibroblastos de derme de camundongos selvagens, 4 dias após plaqueamento (1×10^5 células/mL). **A** – Fibras elásticas e marcação nuclear com DAPI - Barra = 100 μ ; **B** – Fibras elásticas e marcação nuclear com DAPI - Barra = 50 μ m. Anticorpo secundário conjugado a FITC.

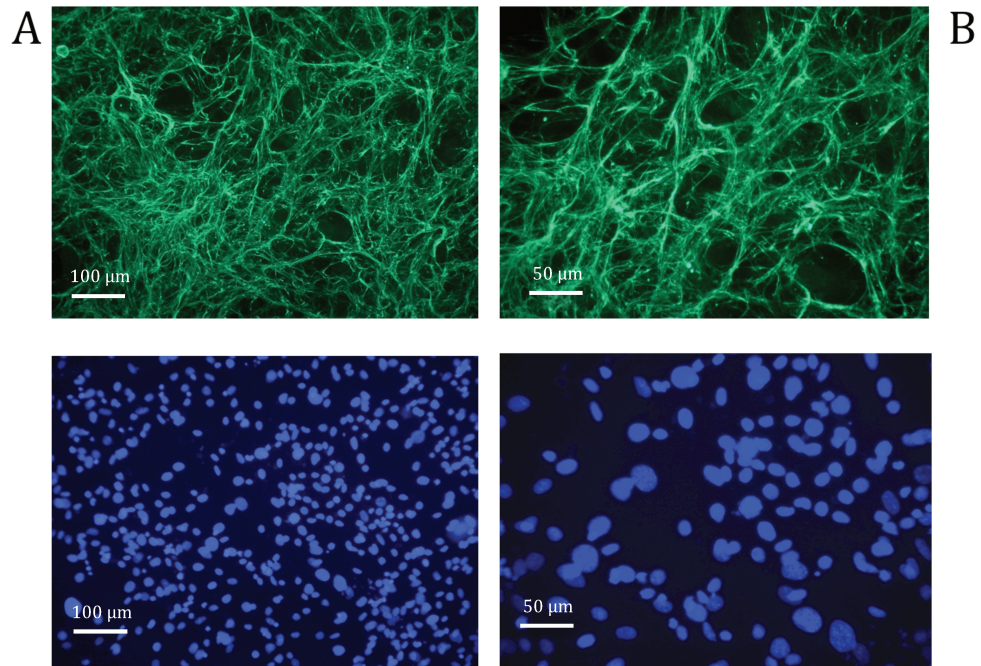


Figura 11 - Imunofluorescência para MAGP-1 em cultura primária de fibroblastos de derme de camundongos heterozigotos: *Fbn1*^{mgΔ/+}, 4 dias após plaqueamento (1×10^5 células/mL). **A** – Fibras elásticas e marcação nuclear com DAPI - Barra = 100 μ ; **B** – Fibras elásticas e marcação nuclear com DAPI - Barra = 50 μ m. Anticorpo secundário conjugado a FITC.

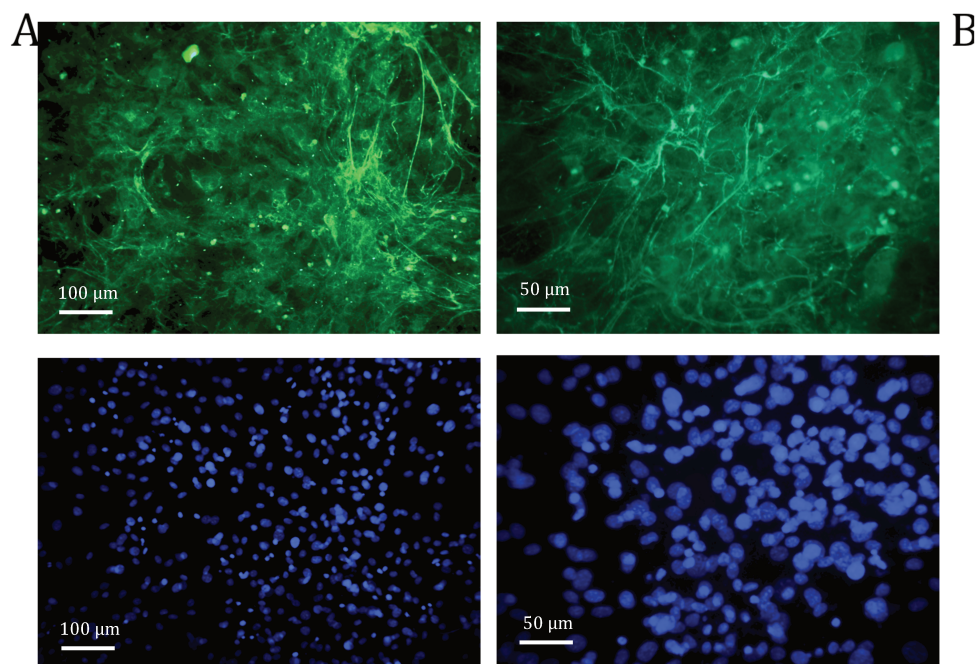


Figura 12 - Imunofluorescência para MAGP-1 em cultura primária de fibroblastos de derme de camundongos homozigotos: *Fbn1*^{mgΔ/ mgΔ}, 4 dias após plaqueamento (1×10^5 células/mL). **A** – Fibras elásticas e marcação nuclear com DAPI - Barra = 100 μ ; **B** – Fibras elásticas e marcação nuclear com DAPI - Barra = 50 μ m. Anticorpo secundário conjugado a FITC.

Utilizando o mesmo princípio, nós averiguamos também a deposição de tropoelastina, um precursor solúvel de elastina comumente depositada após a formação dos feixes de microfibrilas. As figuras 13, 14 e 15 mostram a deposição de tropoelastina em cultura de fibroblastos de derme obtidos de camundongos selvagens e deficiente em Fibrilina-1, 4 dias após o plaqueamento das células.

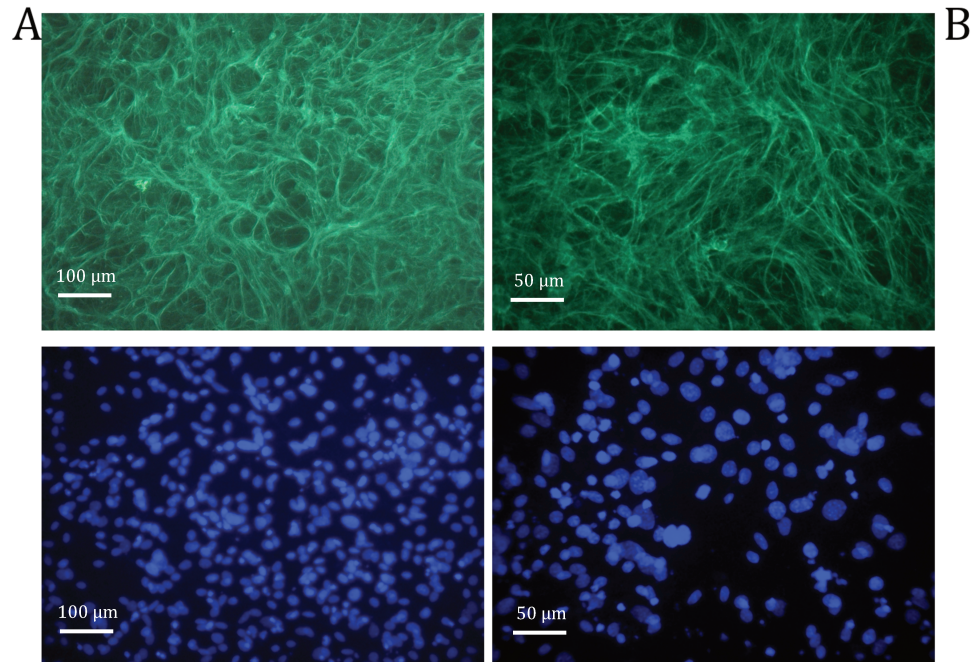


Figura 13 - Imunofluorescência para Tropoelastina em cultura primária de fibroblastos de derme de camundongos selvagens, 4 dias após plaqueamento (1×10^5 células/mL). **A** – Fibras elásticas e marcação nuclear com DAPI - Barra = 100 μ ; **B** – Fibras elásticas e marcação nuclear com DAPI - Barra = 50 μ m. Anticorpo secundário conjugado a FITC.

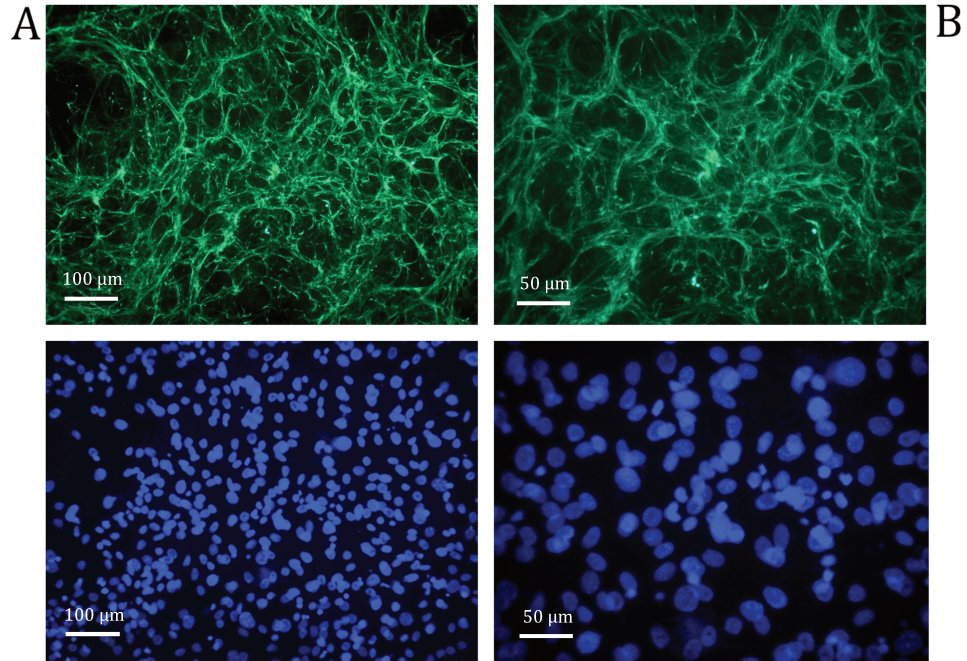


Figura 14 - Imunofluorescência para Tropoelastina em cultura primária de fibroblastos de derme de camundongos heterozigotos: *Fbn1*^{mgΔ/+}, 4 dias após plaqueamento (1×10^5 células/mL). **A** – Fibras elásticas e marcação nuclear com DAPI - Barra = 100 μ ; **B** – Fibras elásticas e marcação nuclear com DAPI - Barra = 50 μm. Anticorpo secundário conjugado a FITC.

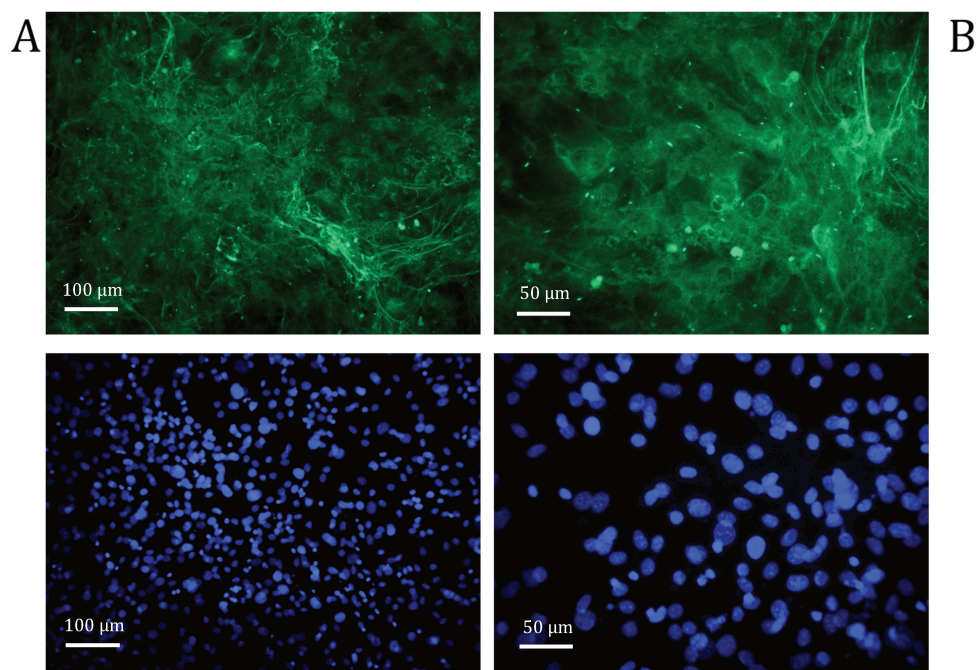


Figura 15 - Imunofluorescência para Tropoelastina em cultura primária de fibroblastos de derme de camundongos homozigotos: *Fbn1*^{mgΔ/ mgΔ}, 4 dias após plaqueamento (1×10^5 células/mL). **A** – Fibras elásticas e marcação nuclear com DAPI - Barra = 100 μ ; **B** – Fibras elásticas e marcação nuclear com DAPI - Barra = 50 μm. Anticorpo secundário conjugado a FITC.

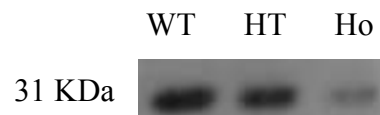
A partir dos dados adquiridos na imunofluorescência, adicionalmente foi realizado uma análise por western-blotting das proteínas MAGP-1 e Tropoelastina. Não foi possível realizar o blot da glicoproteína Fibrilina-2 por ela possuir um alto peso molecular com cerca de 340 KDa, o que dificulta a transferência para a membrana de PVDF. Os dados do imunoblotting foram normalizados por beta-actina (figura 16). As figuras 17A e 18A, mostram os resultados obtidos pela técnica de western-blotting para as proteínas MAGP-1 (31 KDa) e Tropoelastina (70 KDa).



Figura 16 - Western-Blotting para controle interno beta-actina, para os genótipos selvagens: *Fbn1*^{+/+}, heterozigotos: *Fbn1*^{mgΔ/+} e homozigotos: *Fbn1*^{mgΔ/mgΔ}. Extrato celular dos fibroblastos de derme obtido 4 dias após plaqueamento.

Os resultados obtidos pela técnica de Western-blotting foram analisados pelo software ImageJ em função da razão Pixel/Área das bandas e normalizados pelo controle Beta-Actina e apresentados sob forma de gráficos (figura 17B e 18B).

A) MAGP-1



B)

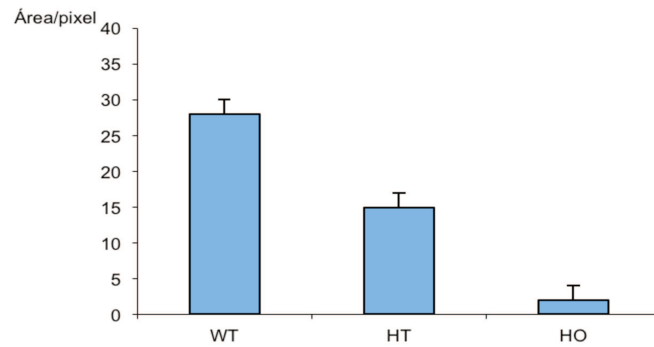
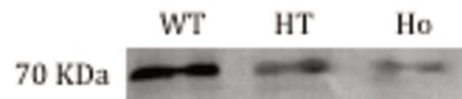


Figura 17 - A) Western-Blotting para glicoproteína MAGP-1, para os genótipos selvagens: *Fbn1*^{+/+}, heterozigotos: *Fbn1*^{mgΔ/+} e homozigotos: *Fbn1*^{mgΔ/mgΔ}. Extrato celular de fibroblastos de derme obtido 4 dias após plaqueamento. B) Análise gráfica das bandas pixel/área.

A) TROPOELASTINA



B)

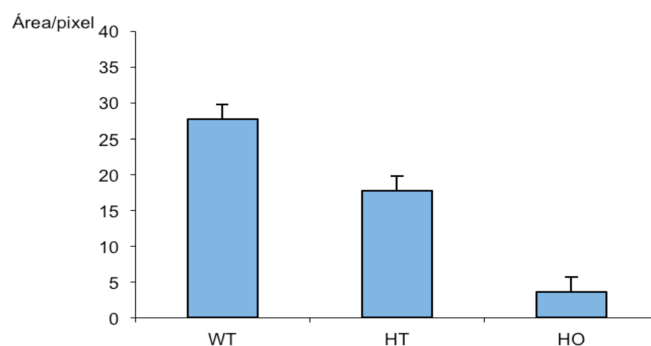


Figura 18 - A) Western-Blotting para tropoelastina, para os genótipos selvagens: *Fbn1*^{+/+}, heterozigotos: *Fbn1*^{mgΔ/+} e homozigotos: *Fbn1*^{mgΔ/mgΔ}. Extrato celular de fibroblastos de derme obtido 4 dias após plaqueamento. B) Análise gráfica das bandas pixel/área. B) Análise gráfica das bandas pixel/área.

Utilizando a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e transmissão (MET) foi possível verificar a ultra-estrutura das microfibrilas dos animais selvagens, heterozigotos e homozigotos para a mutação no gene de Fibrilina-1. A figura 19, mostra as eletromicrografias das microfibrilas por MEV. E as figuras 20A, 20B e 20C mostram os resultados obtidos pela análise por MET, em cultura de fibroblastos de derme, 4 dias após o plaqueamento das células.

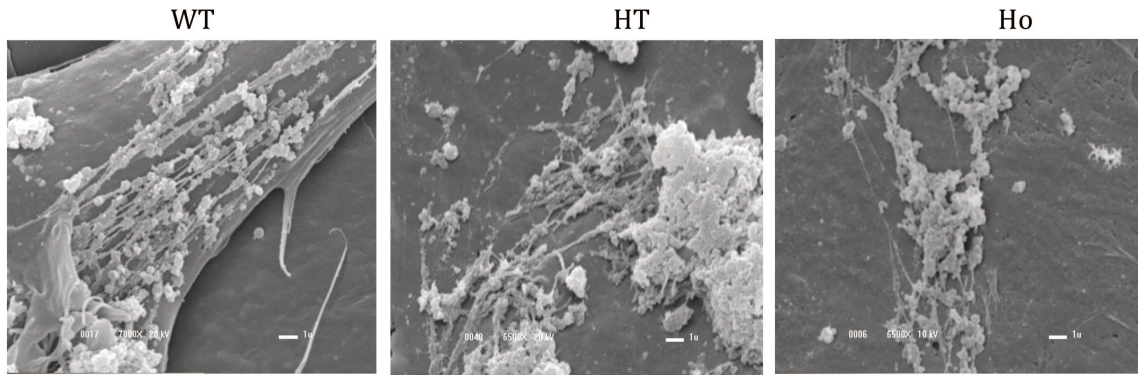
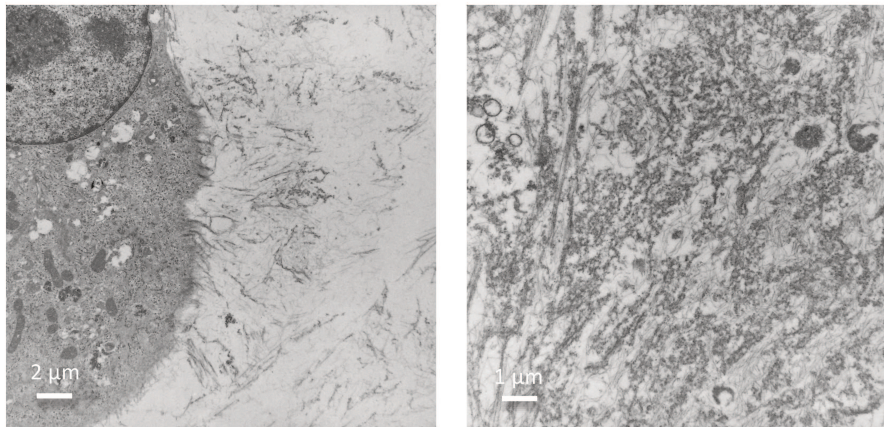
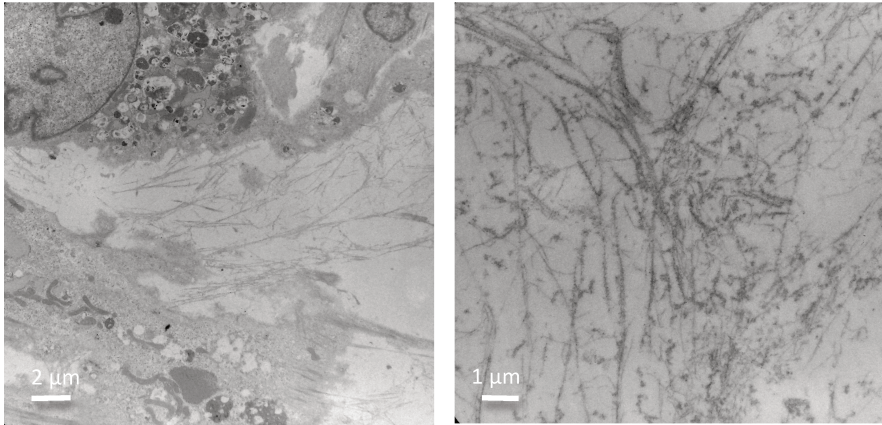


Figura 19 - Microscopia eletrônica de varredura. Cultura de fibroblastos de derme selvagens: *Fbn1*^{+/+}, heterozigotos: *Fbn1*^{mgΔ/+} e homozigotos: *Fbn1*^{mgΔ/mgΔ}. Visualização das microfibrilas, Barra = 1µm.

A) MET – Fibroblastos de derme derivados de animais selvagens *Fbn1*^{+/+}



B) MET – Fibroblastos de derme derivados de animais heterozigotos $Fbn1^{mg\Delta/+}$



C) MET – Fibroblastos de derme derivados de animais homozigotos $Fbn1^{mg\Delta/mg\Delta}$

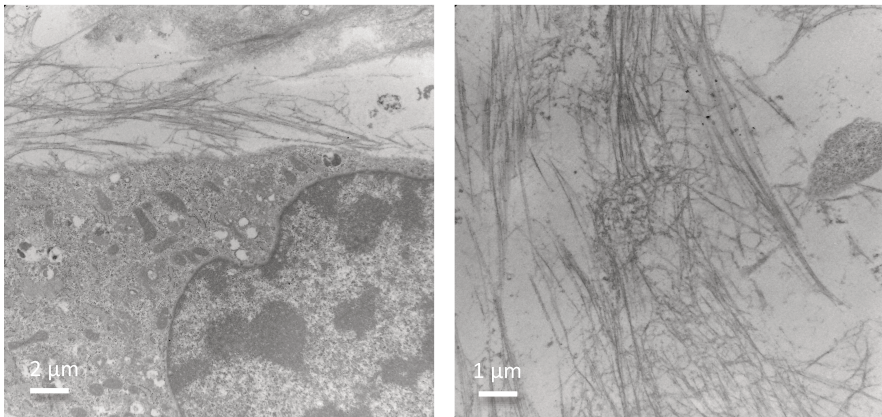
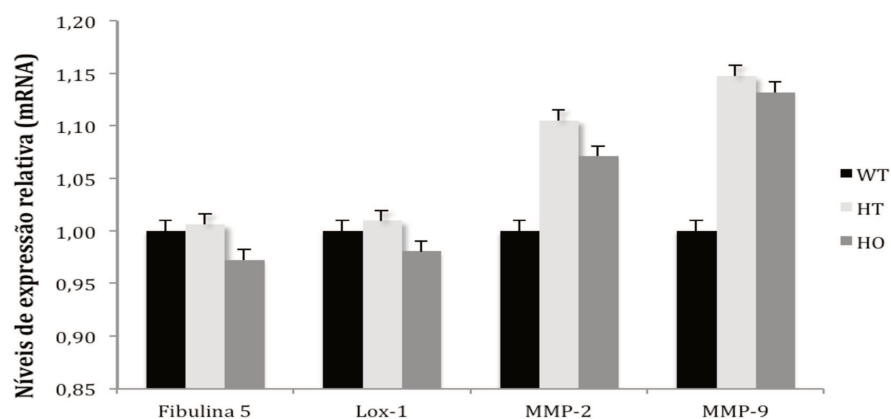


Figura 20 - Microscopia eletrônica de transmissão (MET). Em A, cultura de fibroblastos de derme derivados de camundongos selvagens: $Fbn1^{+/+}$ (WT), em B: Heterozigotos: $Fbn1^{mg\Delta/+}$ (HT) e em C: Homozigotos: $Fbn1^{mg\Delta/mg\Delta}$ (Ho). Visualização das microfibrilas e células. Barra = 2μm e Barra = 1 μm.

Utilizando a técnica de PCR-real time, foi também investigado o perfil de expressão gênica das principais proteínas envolvidas na síntese, regulação e estruturação das fibras elásticas maduras. Para essa análise, foram verificados a expressão gênica de LOX-1, Fibrilina-1, Fibrilina-2, MAGP-1, MAGP-2, Tropoelastina, Fibulina-5, MMP-2 e MMP-9. Os gráficos 1A e 1B, mostram os resultados encontrados nessa análise. Todos os dados foram normalizados, utilizando como controle endógeno GAPDH.

A



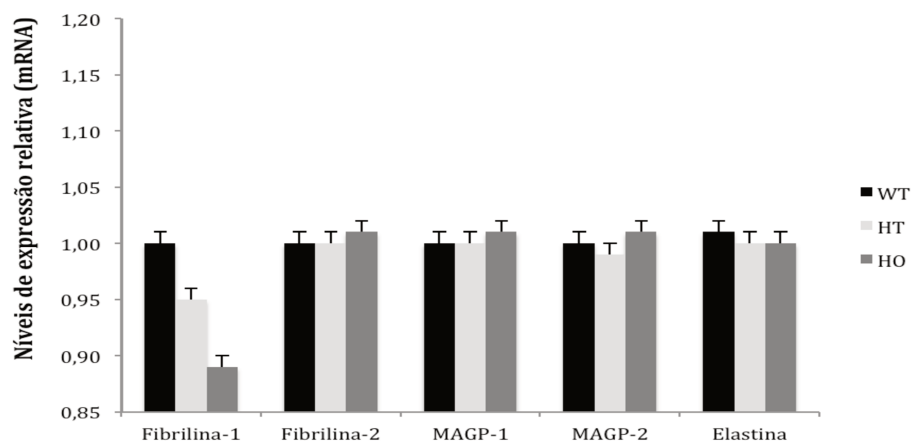
B

Gráfico 1 – Níveis de mRNA quantificados por PCR-Real time, em **A** as proteínas Fibulina-5, Lox-1, MMP-2, MMP-9, e em **B**, Fibrilina-1, Fibrilina-2, MAGP-1, MAGP-2 e Elastina.

Após isto, verificou-se a influência do tratamento com o fármaco Losartan em cultura de fibroblastos de derme. Sendo assim, foi realizado o ensaio de Western-Blotting para as proteínas Elastina e MAGP-1, na presença e ausência do tratamento com o fármaco Losartan e os dados foram normalizados pelo controle beta-actina. Para a realização do tratamento foram realizadas culturas de 4 dias de tratamento após o plaqueamento na presença das concentrações de 0, 1, 10 e 100 $\mu\text{M/L}$. As figuras 21, 22 e 23, mostram os resultados dos ensaios de Western-Blotting de extratos de cultura de fibroblastos de derme para Tropoelastina ao final do tratamento com o fármaco Losartan para os genótipos selvagens: *Fbn1*^{+/+} (WT), heterozigotos: *Fbn1*^{mg Δ /+} (HT) e homozigotos: *Fbn1*^{mg Δ /mg Δ} , respectivamente.

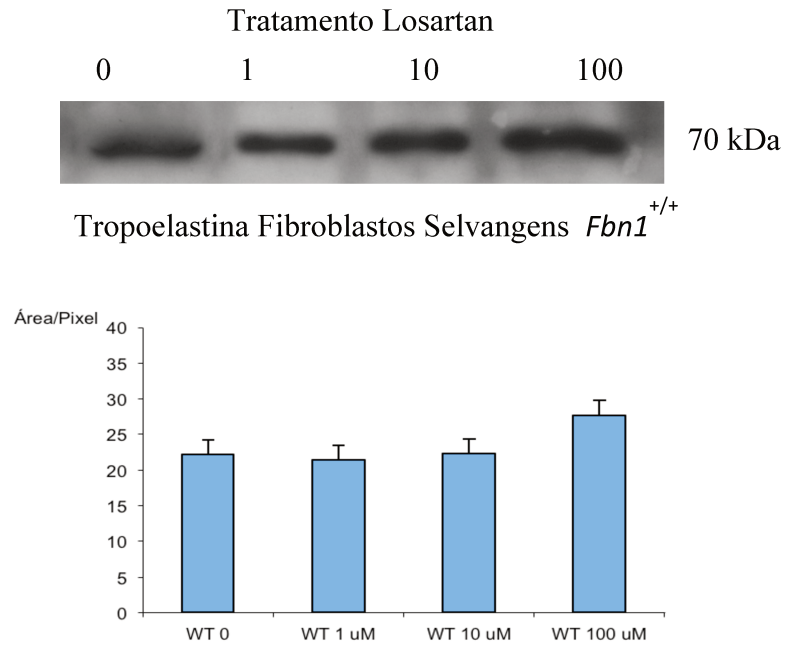


Figura 21 - A) Western-Blotting da tropoelastina para o genótipo selvagens: *Fbn1*^{+/+} (WT), tratamento com o fármaco Losartan nas concentrações de 0, 1, 10 e 100 μM/L por 4 dias após plaqueamento. B) Análise gráfica das bandas pixel/área.

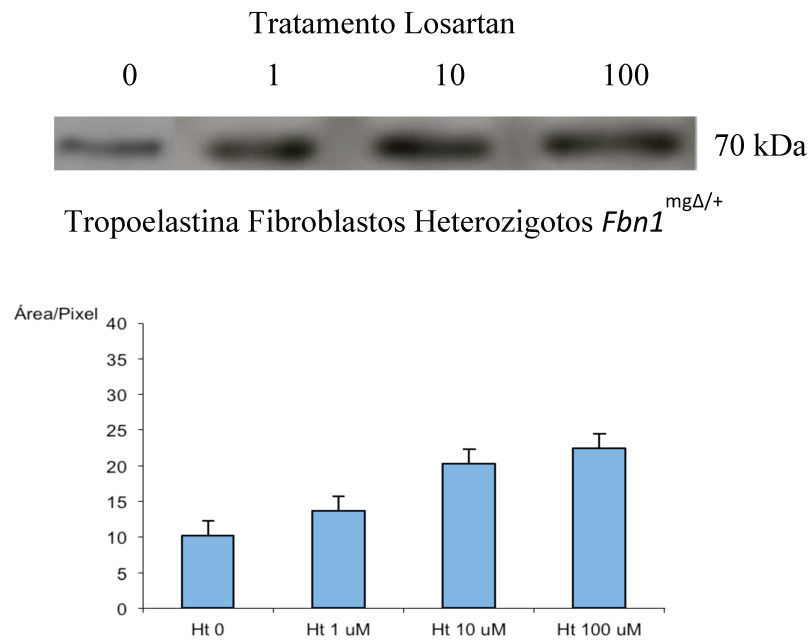


Figura 22 - A) Western-Blotting da tropoelastina para o genótipo heterozigotos: *Fbn1*^{mgΔ/+} (Ht), tratamento com o fármaco Losartan nas concentrações de 0, 1, 10 e 100 μM/L por 4 dias após plaqueamento. B) Análise gráfica das bandas pixel/área.

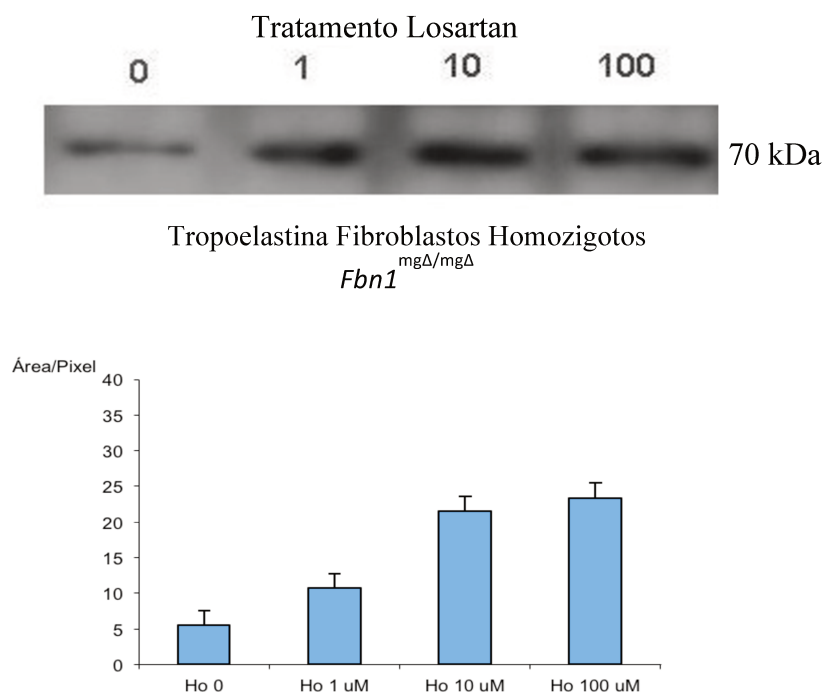


Figura 23 - A) Western-Blotting da tropoelastina para o genótipo homozigotos *Fbn1*^{mgΔ/mgΔ} (Ho), tratamento com o fármaco Losartan nas concentrações de 0, 1, 10 e 100 μM/L por 4 dias após plaqueamento. B) Análise gráfica das bandas pixel/área.

Em adição, nas figuras 24, 25 e 26 mostramos os resultados dos ensaios de Western-Blotting de extratos de cultura de fibroblastos de derme para MAGP-1 ao final do tratamento com o fármaco Losartan para os genótipos selvagens: *Fbn1*^{+/+}, heterozigotos: *Fbn1*^{mgΔ/+} e homozigotos: *Fbn1*^{mgΔ/mgΔ}, respectivamente.

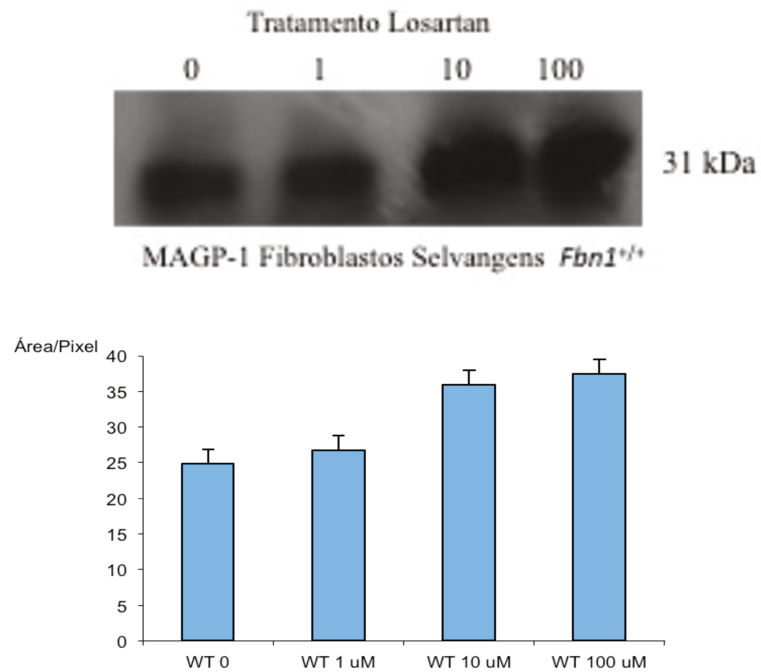


Figura 24 - A) Western-Blotting da glicoproteína MAGP-1 para o genótipo selvagens: *Fbn1*^{+/+} (WT), tratamento com o fármaco Losartan nas concentrações de 0, 1, 10 e 100 $\mu\text{M/L}$ por 4 dias após plaqueamento. B) Análise gráfica das bandas pixel/área.

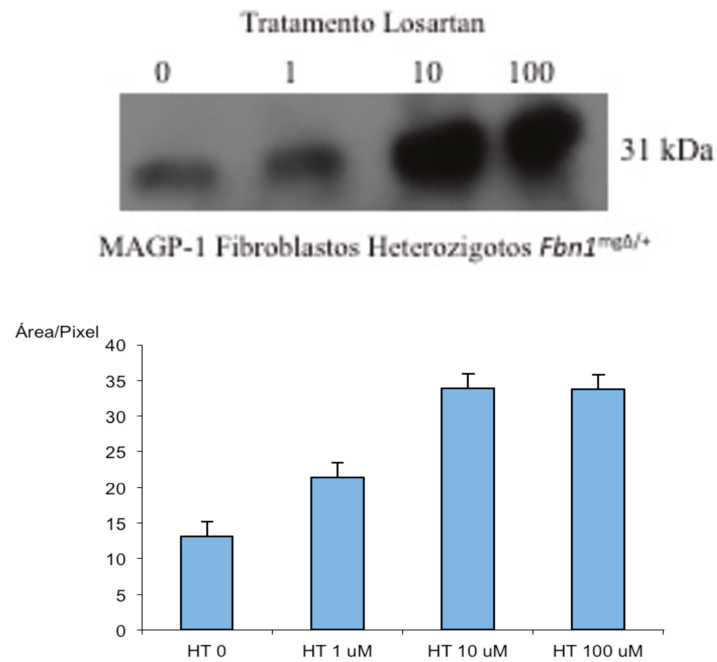


Figura 25 - A) Western-Blotting da glicoproteína MAGP-1 para o genótipo heterozigotos: *Fbn1*^{mgΔ/+} (Ht), tratamento com o fármaco Losartan nas concentrações de 0, 1, 10 e 100 μ M/L por 4 dias após plaqueamento. B) Análise gráfica das bandas pixel/área.

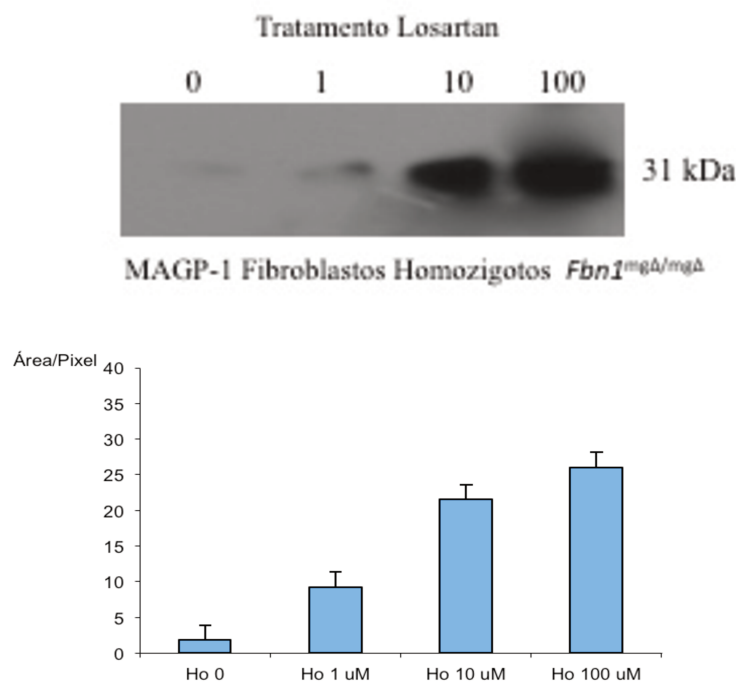


Figura 26 - A) Western-Blotting da glicoproteína MAGP-1 para o genótipo homozigotos *Fbn1*^{mgΔ/mgΔ} (Ho), tratamento com o fármaco Losartan nas concentrações de 0, 1, 10 e 100 μM/L por 4 dias após plaqueamento. B) Análise gráfica das bandas pixel/área.

Ainda verificando a influência do tratamento de Losartan nas culturas de fibroblastos de derme, foi realizado também o ensaio de imunofluorescência, utilizando como concentração dose-fármaco 100 μM/L, dose em que se mostrou melhor resposta à técnica de Western-Blotting. Sendo assim, as figuras 27, 28 e 29, mostram os resultados das imunofluorescências em cultura de fibroblastos de derme para a glicoproteína Fibrilina-2 na presença (Los 100) e ausência (Los 0) do tratamento com o fármaco Losartan 100 μM/L para os genótipo selvagem: *Fbn1*^{+/+} (WT); heterozigotos: *Fbn1*^{mgΔ/+} (HT) e homozigotos: *Fbn1*^{mgΔ/mgΔ} (Ho).

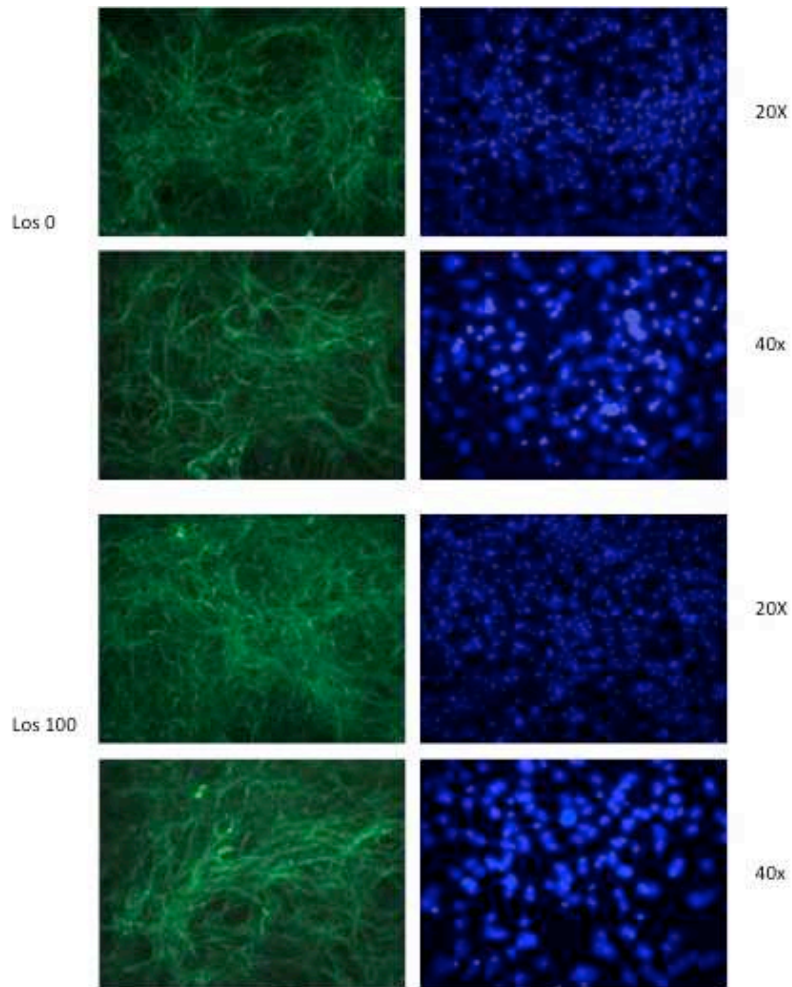


Figura 27 - Imunofluorescência para Fibrilina-2 em cultura primária de fibroblastos de derme de camundongos selvagem: *Fbn1*^{+/+}, 4 dias após o plaqueamento (1×10^5 células/mL), na presença (Los 100) e ausência (Los 0) do tratamento com o fármaco Losartan 100 μ M/L. Aumentos de **20x** e **40x** e marcação nuclear com DAPI. Anticorpo secundário conjugado a FITC.

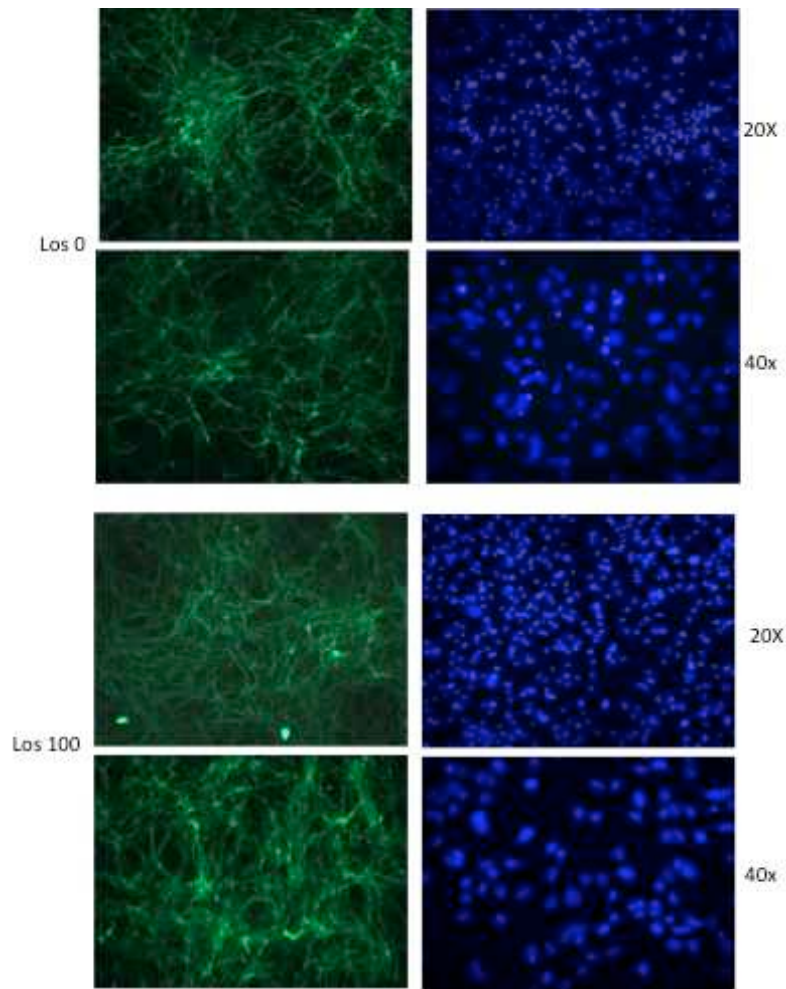


Figura 28 - Imunofluorescência para Fibrilina-2 em cultura primária de fibroblastos de derme de camundongos heterozigotos: *Fbn1*^{mgΔ/+}, 4 dias após o plaqueamento (1×10^5 células/mL), na presença (Los 100) e ausência (Los 0) do tratamento com o fármaco Losartan 100 μ M/L. Aumentos de 20x e 40x e marcação nuclear com DAPI. Anticorpo secundário conjugado a FITC.

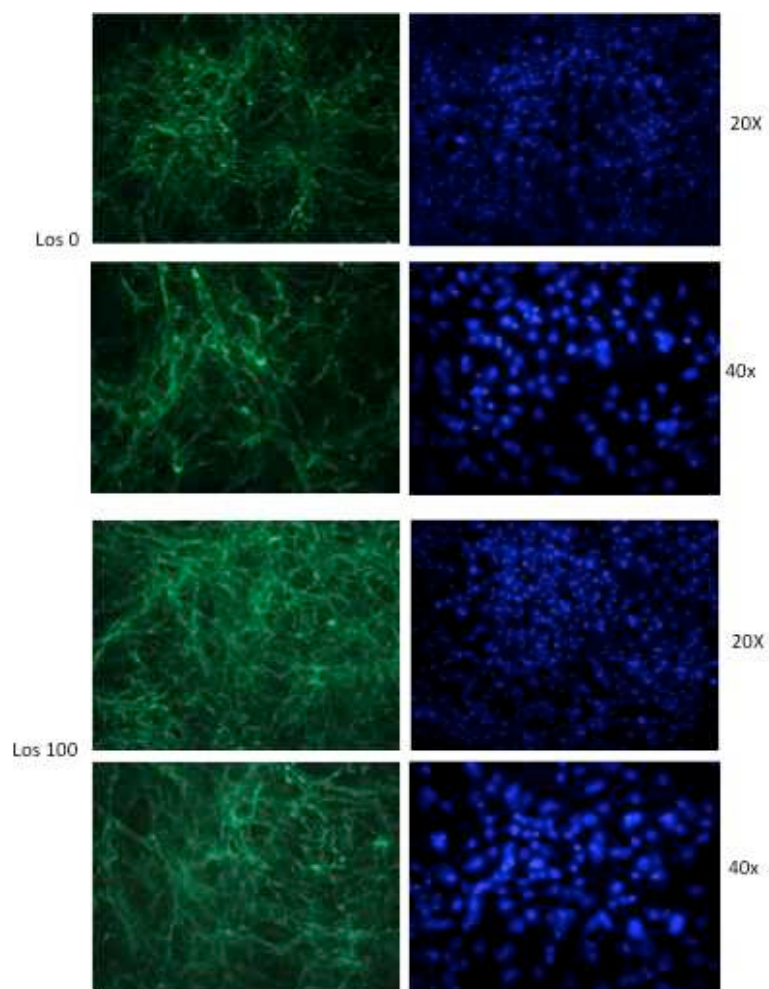


Figura 29 - Imunofluorescência para Fibrilina-2 em cultura primária de fibroblastos de derme de camundongos homozigotos: *Fbn1*^{mgΔ/mgΔ}, 4 dias após o plaqueamento (1×10^5 células/mL), na presença (Los 100) e ausência (Los 0) do tratamento com o fármaco Losartan 100 μ M/L. Aumentos de 20x e 40x e marcação nuclear com DAPI. Anticorpo secundário conjugado a FITC.

Utilizando os mesmos conceitos, as figuras 30, 31 e 32, mostram os resultados das imunofluorescência em cultura de fibroblastos de derme para a glicoproteína MAGP-1 na presença (Los 100) e ausência (Los 0) do tratamento com o fármaco Losartan 100 μ M/L

para os genótipo selvagem: $FbnI^{+/+}$ (WT); heterozigotos: $FbnI^{mg\Delta/+}$ (HT) e homozigotos: $FbnI^{mg\Delta/mg\Delta}$ (Ho).

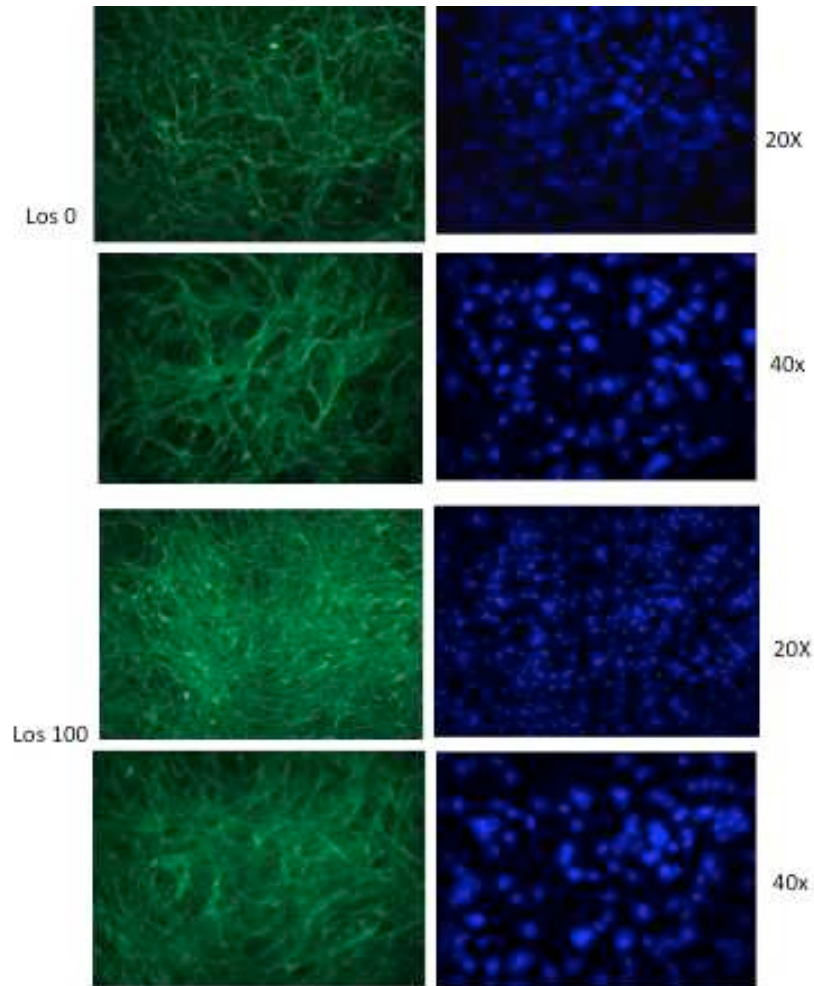


Figura 30 - Imunofluorescência para MAGP-1 em cultura primária de fibroblastos de derme de camundongos selvagem: $FbnI^{+/+}$, 4 dias após o plaqueamento (1×10^5 células/mL), na presença (Los 100) e ausência (Los 0) do tratamento com o fármaco Losartan 100 μ M/L. Aumentos de 20x e 40x e marcação nuclear com DAPI. Anticorpo secundário conjugado a FITC.

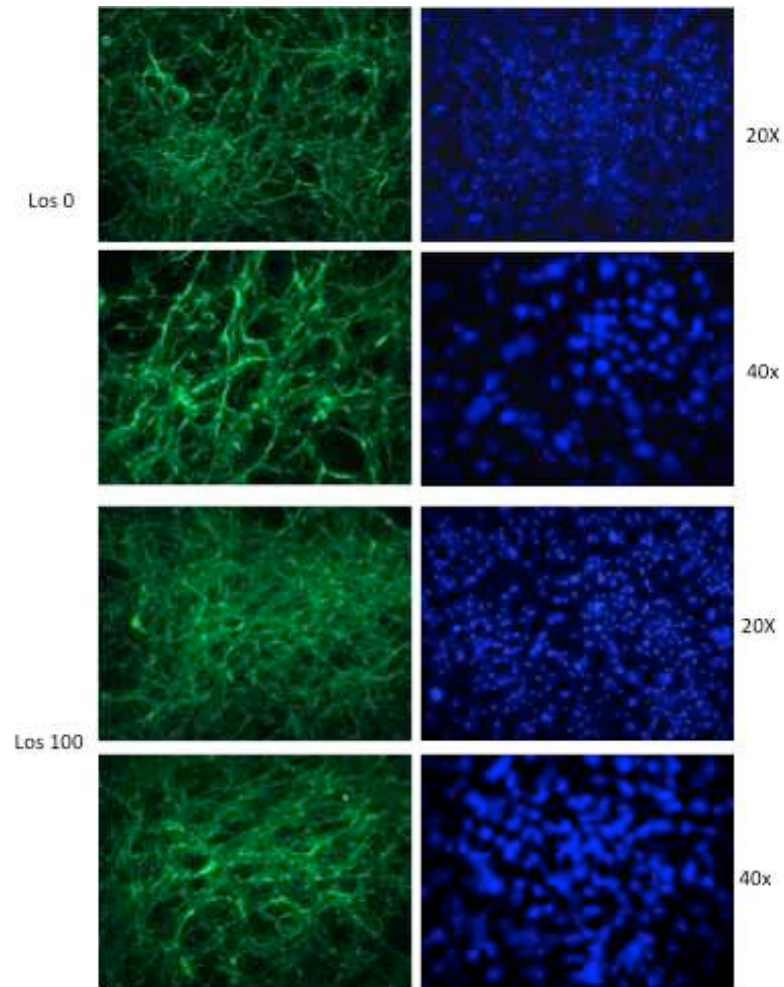


Figura 31 - Imunofluorescência para MAGP-1 em cultura primária de fibroblastos de derme de camundongos heterozigotos: *Fbn1*^{mgΔ/+}, 4 dias após o plaqueamento (1×10^5 células/mL), na presença (Los 100) e ausência (Los 0) do tratamento com o fármaco Losartan 100 μ M/L. Aumentos de 20x e 40x e marcação nuclear com DAPI. Anticorpo secundário conjugado a FITC.

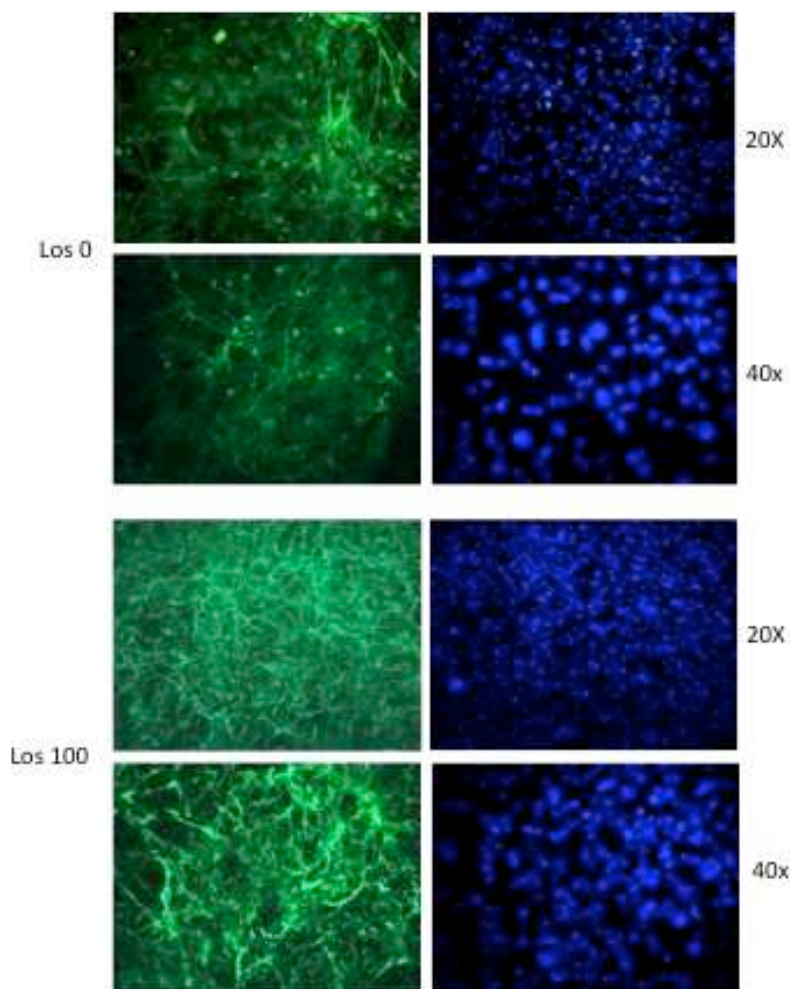


Figura 32 - Imunofluorescência para MAGP-1 em cultura primária de fibroblastos de derme de camundongos homozigotos: *Fbn1*^{mgΔ/mgΔ}, 4 dias após o plaqueamento (1×10^5 células/mL), na presença (Los 100) e ausência (Los 0) do tratamento com o fármaco Losartan 100 μ M/L. Aumentos de 20x e 40x e marcação nuclear com DAPI. Anticorpo secundário conjugado a FITC.

Em sequência, as figuras 33, 34 e 35, mostram os resultados das imunofluorescência em cultura de fibroblastos de derme para a Tropoelastina na presença (Los 100) e ausência (Los 0) do tratamento com o fármaco Losartan 100 μ M/L para os

genótipo selvagem: *Fbn1*^{+/+} (WT); heterozigotos: *Fbn1*^{mgΔ/+} (HT) e homozigotos: *Fbn1*^{mgΔ/mgΔ} (Ho).

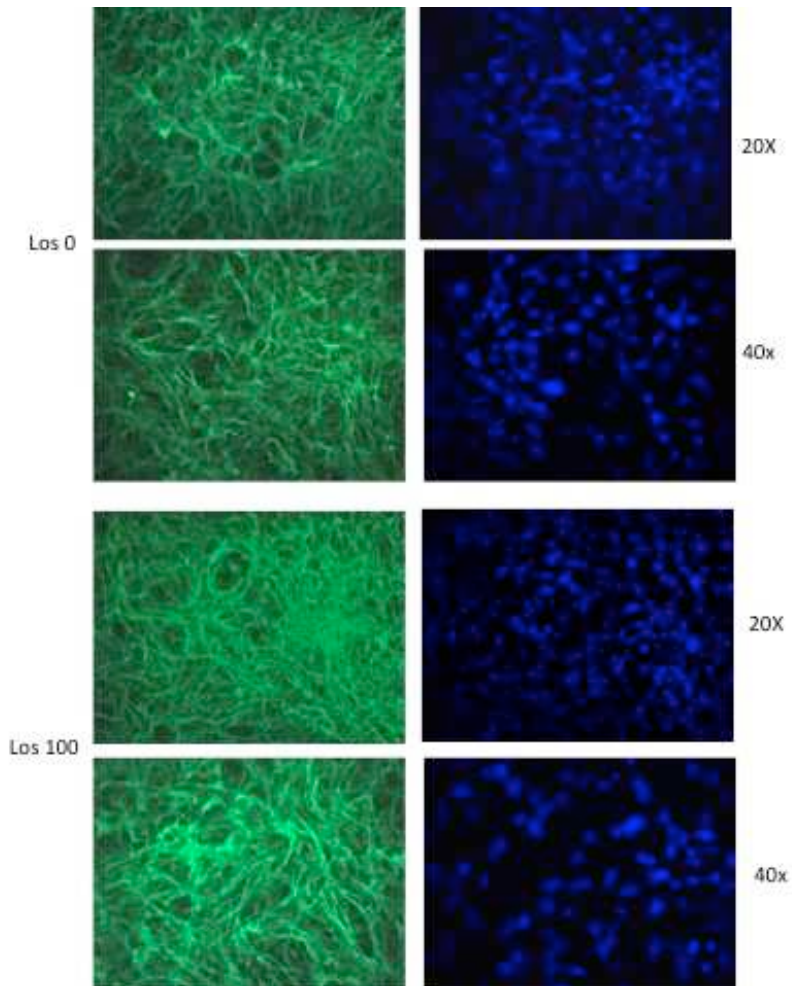


Figura 33 - Imunofluorescência para Tropoelastina em cultura primária de fibroblastos de derme de camundongos selvagem: *Fbn1*^{+/+}, 4 dias após o plaqueamento (1×10^5 células/mL), na presença (Los 100) e ausência (Los 0) do tratamento com o fármaco Losartan 100 μ M/L. Aumentos de 20x e 40x e marcação nuclear com DAPI. Anticorpo secundário conjugado a FITC.

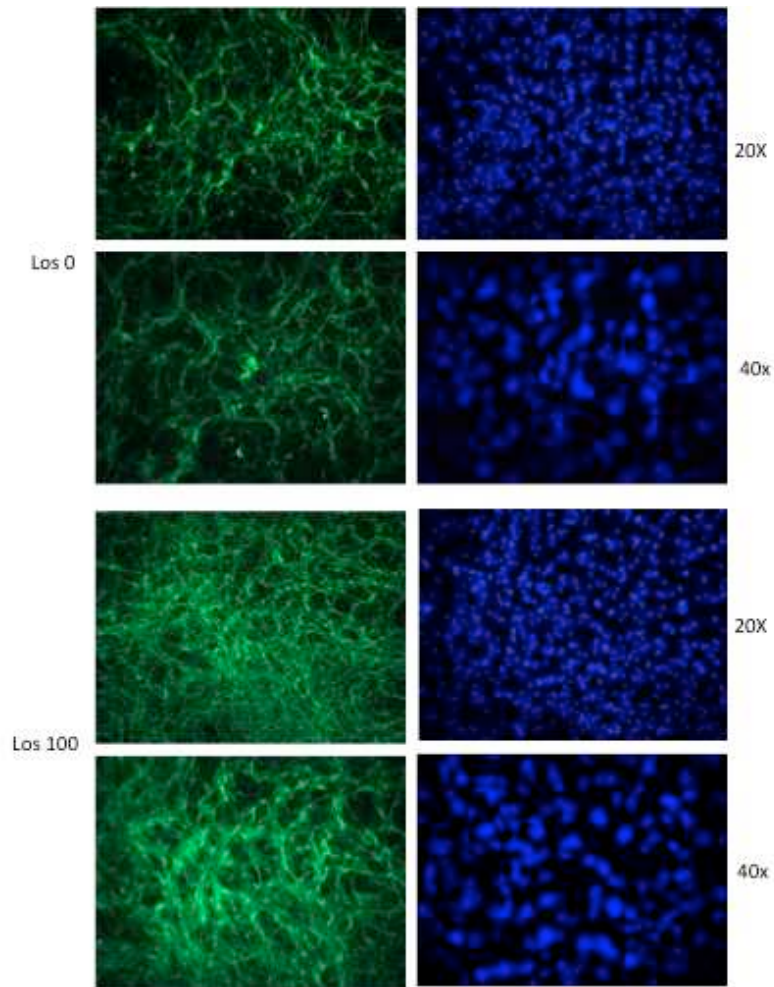


Figura 34 - Imunofluorescência para Tropoelastina em cultura primária de fibroblastos de derme de camundongos heterozigotos: *Fbn1*^{mgΔ/+}, 4 dias após o plaqueamento (1×10^5 células/mL), na presença (Los 100) e ausência (Los 0) do tratamento com o fármaco Losartan 100 μ M/L. Aumentos de 20x e 40x e marcação nuclear com DAPI. Anticorpo secundário conjugado a FITC.

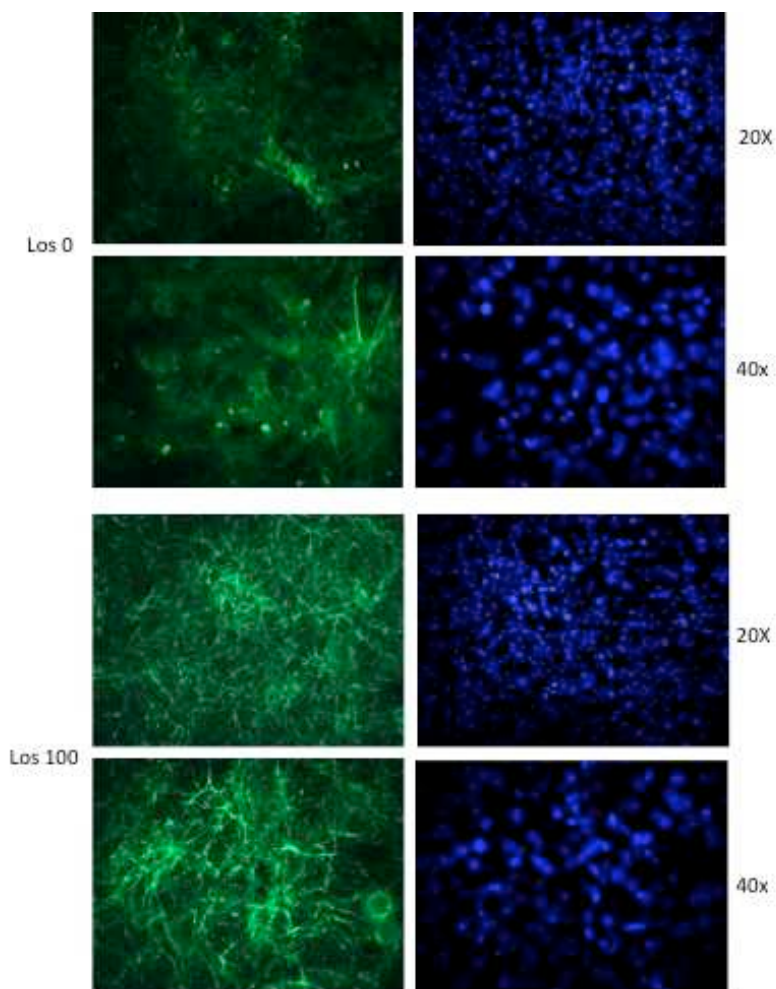
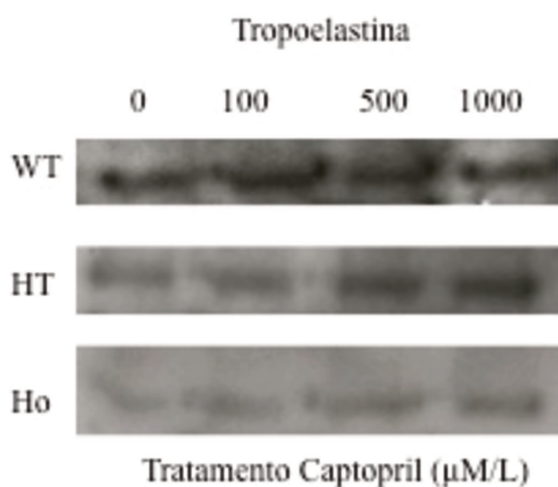


Figura 35 - Imunofluorescência para Tropoelastina em cultura primária de fibroblastos de derme de camundongos homozigotos: *Fbn1*^{mgΔ/mgΔ}, 4 dias após o plaqueamento (1×10^5 células/mL), na presença (Los 100) e ausência (Los 0) do tratamento com o fármaco Losartan 100 μ M/L. Aumentos de 20x e 40x e marcação nuclear com DAPI. Anticorpo secundário conjugado a FITC.

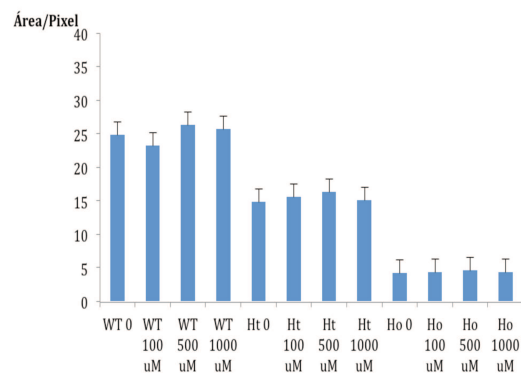
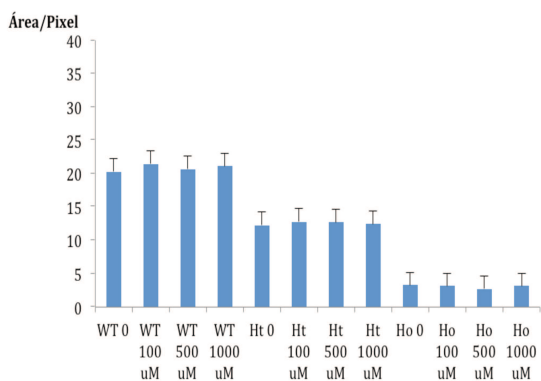
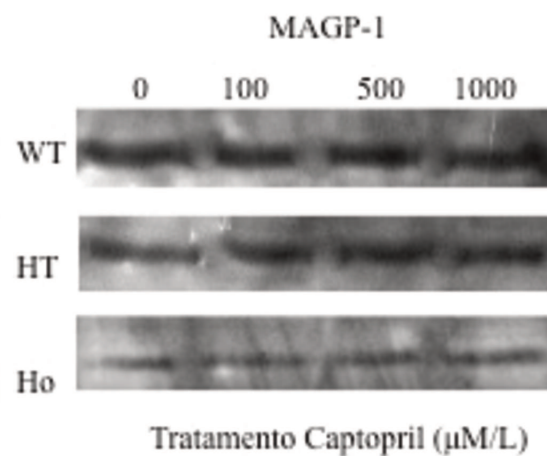
Utilizando o conceito do fármaco Losartan como um inibidor de receptor AT1 e consequente geração de acúmulo de angiotensina II, foi realizado testes para averiguar a deposição das proteínas tropoelastina e MAGP-1 na matriz extracelular de cultura de fibroblastos de derme frente a utilização do fármaco Captopril e os peptídeos

angiotensina I e angiotensina II, como tratamento. Para realização dos testes foi desenvolvida a técnica de Western-Blotting. Para o fármaco Captopril foram utilizadas como concentrações-teste 0, 100, 500 e 1000 $\mu\text{M/L}$; para a Angiotensina I e II foram utilizadas as concentrações de 0 nM/L ; 1 nM/L ; 10 nM/L e 1 $\mu\text{M/L}$. A figura 36, mostram os resultados dos imunoblotting das cultura de fibroblastos de derme derivados de camundongos deficientes em fibrilina-1, para o tratamento com captopril, angiotensina II e angiotensina I.

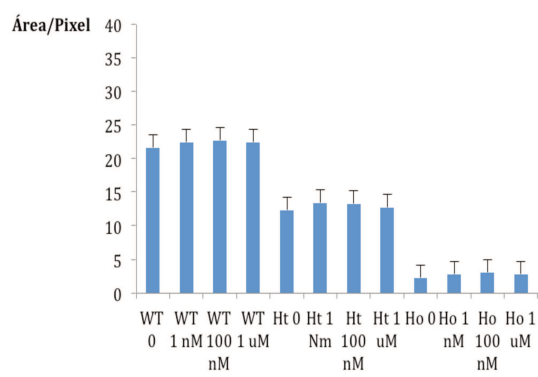
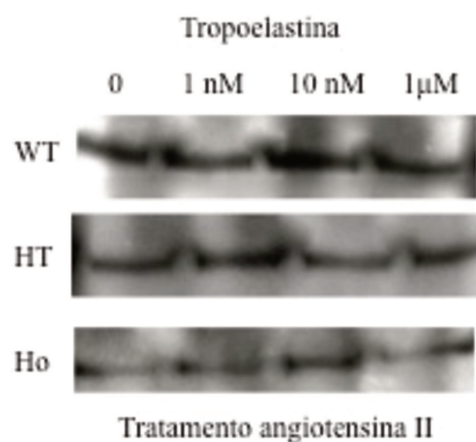
A)



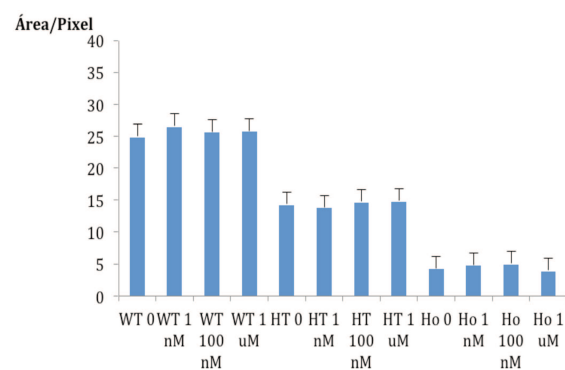
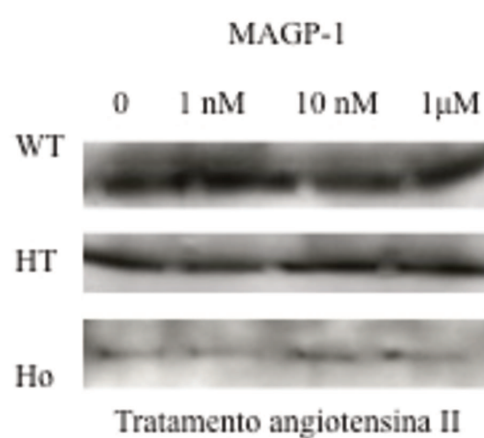
B)



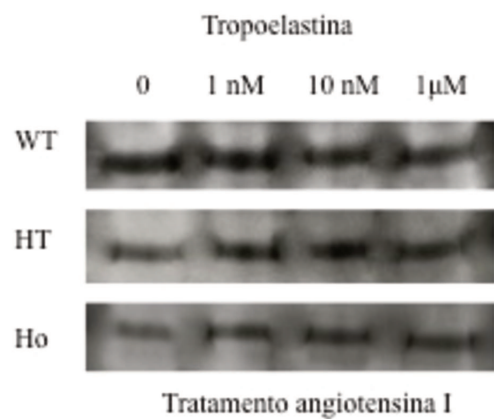
C)



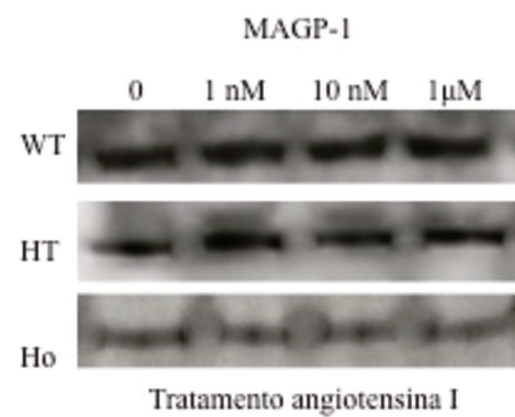
D)



E)



F)



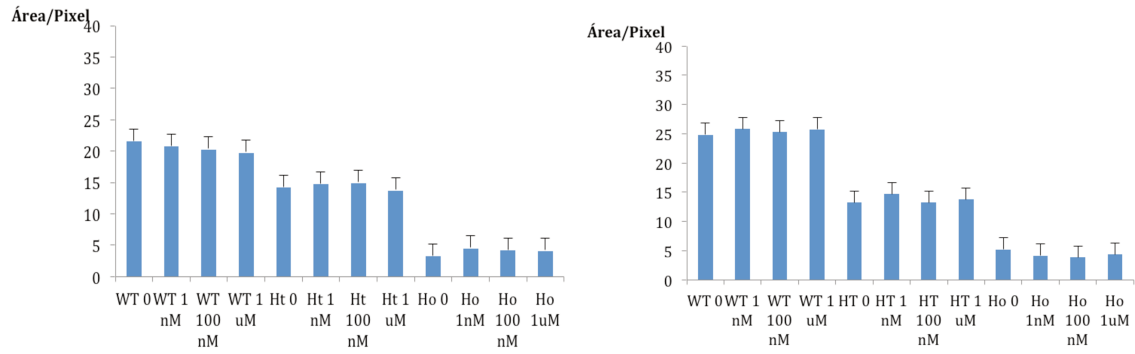


Figura 36 - Western-Blotting das Proteínas MAGP-1 de 31 kDa e Tropoelastina 70 kDa para os tratamentos: A) Captopril (0, 100, 500 e 1000 $\mu\text{M/L}$) ; B) Angiotensina I e II (0 nM/L ; 1 nM/L ; 10 nM/L e 1 $\mu\text{M/L}$), para os genótipos selvagem: *Fbn1*^{+/+} (WT), heterozigoto: *Fbn1*^{mg Δ /+} (HT) e homozigotos: *Fbn1*^{mg Δ /mg Δ} (Ho). Extrato celular de fibroblastos de derme, com 4 dias após o plaqueamento.

DISCUSSÃO

7. Discussão

Dentre os modelos para se estudar a formação de fibras elásticas, 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 foi realizada por PCR assim como estabelecido em nosso laboratório para a genotipagem dos camundongos. Através desta estratégia foram caracterizados os genótipos dos camundongos recém-nascidos bem como das células obtidas a partir de cada animal, onde foram obtidas células de animais que apresentavam a mutação [heterozigotos ($Fbn1^{mg\Delta/+}$) e homozigotos ($Fbn1^{mg\Delta/mg\Delta}$)] e de animais selvagens ($Fbn1^{+/+}$). Estudos posteriores permitiram estabelecer o quarto dia de pós-confluência como o período de crescimento celular adequado para avaliar a capacidade das células em depositar matriz extracelular e ainda verificar o efeito do tratamento de diferentes fármacos na síntese e deposição de tropoelastina, fibrilina-2, MAGP1.

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). A partir disto, foi possível verificar que os tratamentos com Losartan, Captopril, Angiotensina I e II não modificaram características fenotípicas, no entanto, no caso mais específico do Losartan, interfere na capacidade das células depositarem a trama microfibrilar na MEC, ao longo do experimento.

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 tropelastina, que progressivamente coalesce em agregados maiores para eventualmente formar fibras elásticas funcionais (Czirok, Zamir et al. 2006; Kozel, Rongish 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 ligadas às funcionalidades das fibras elásticas e são estruturas que exercem papéis dinâmicos (Ramirez and Sakai 2009). Alterações nas estruturas componentes das fibras elásticas, principalmente das microfibrilas, ocasionam diversos problemas, sendo o mais comum, a síndrome de Marfan (Frydman 2008).

Os resultados semi-quantitativos obtidos no estudo imunoquímico evidenciaram uma diminuição conjunta da deposição das proteínas MAGP-1, fibrilina-2 e tropoelastina e esta diminuição é maior para as células obtidas dos animais homozigotos para a mutação. 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, Godfrey et al. 1990). Durante a formação das fibras elásticas maduras, Kielty *et al* (2005) relataram a importância da Fibrilina-1, além de conduzir a correta deposição de tropoelastina na formação da fibra elástica. Em um 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, Chen et al. 2006; Yamanouchi, Tsuruga 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, fibulina-2 e, de certa forma, a fibrilina-1 (Nakamura, Lozano et al. 2002; Yanagisawa, Davis et al. 2002; Orringer, Kang et al. 2004; McLaughlin, Chen et al. 2006; Sicot, Tsuda et al. 2008; Weinbaum, Broekelmann et al. 2008; Werneck, Vicente et al. 2008).

Os resultados obtidos na caracterização morfológica e imunoquímica de fibroblastos de camundongos selvagens ($Fbn\ 1^{+/+}$) e deficientes em fibrilina-1 [heterozigotos ($Fbn\ 1^{mg\Delta/+}$) e homozigotos ($Fbn\ 1^{mg\Delta/mg\Delta}$)] corroboram com os resultados descritos na literatura e que sugerem que a perda do conteúdo protéico de alguns componentes das fibras elásticas, resulta em desarranjo da trama microfilar 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 gênica de Fibrilina-1, avaliada por imunoquímica 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 na expressões gênica 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 as alterações na síntese/degradação/deposição dos componentes da fibra elástica (Wang, Lu 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.

Os resultados obtidos no demonstram que não houve variações significativas nos níveis de expressão dos genes das proteínas LOX-1, Fibrilina-1, Fibrilina-2, Fibulina-5, MAGP-1, MAGP-2 e tropoelastina entre os genótipos selvagem e deficiente 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.

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 MMP's pode estar contribuindo para diminuição das proteínas Fibrilina-2, MAGP-1 e tropoelastina como nossos dados sugerem, seja pela degradação das moléculas depositadas, seja pela degradação antes da deposição.

Pratt, B. *et al* (2010) relataram em seus estudos, que o aumento na regulação da MMP's em particular a MMP-9, está diretamente ligado aos danos ocorridos na matriz extracelular na síndrome de Marfan (Kang, Foley et al. 2003). Em outro estudo foi verificado que o aumento da metaloproteinase MMP-2 está diretamente ligada ao processo de degradação da fibrilina-2 na matriz extracelular de cultura fibroblastos de ligamento periodontal (Tsuruga, Irie 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, Au Yeung et al. 2007) (Ikonomidis, Jones et al. 2006) (Yasmin, McEniery et al. 2005).

Assim, o aumento nos níveis de expressão das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9 em animais deficientes em fibrilina e as características morfológicas de agregados fibrilares na MEC são sugestivos de que possa haver atuação enzimática dessas metaloproteases sobre as fibras elásticas ou componentes microfibrilares depositadas principalmente pelos fibroblastos de animais homozigotos. Ensaio para medir a atividade destas enzimas podem ser de grande importância para tornar mais clara a possível função destas enzimas neste processo.

A síndrome de Marfan é uma doença caracterizada por uma desordem sistêmica do tecido conjuntivo e tem 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 atribuídas a desregulação e super-ativação de TGF-beta (Neptune, Frischmeyer et al. 2003).

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, Hyytiainen 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, Sengle et al. 2009).

A utilização do fármaco 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 (Jimenez and 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 (ECA), não tem o mesmo efeito.

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 fármaco Losartan nos ensaios de immunoblotting. 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 and Rosenbloom 2008) (Habashi, Judge et al. 2006) (Mates, Nicolae et al. 2004) (Radonic, de Witte et al. 2010), em estudos com o fármaco Losartan na síndrome de Marfan. O tratamento com Losartan também aumentou a quantidade de fibras formadas pelos fibroblastos como evidenciado pelos estudos imunocitoquímicos.

Os dados obtidos sugerem que o tratamento com o fármaco Losartan tem a capacidade de resgatar de forma parcial o conteúdo proteico normal de fibrilina-2, 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 ECA (enzima conversora de angiotensina I) e os peptídios de Angiotensina I e II, buscando averiguar uma possível similaridade com a via de atuação do fármaco Losartan no tratamento da síndrome de Marfan.

De acordo com os dados apresentados, não ocorrem 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. Dados adicionais e complementares como PCR quantitativo estão sendo obtidos para verificar os níveis de expressão das moléculas analisadas nas culturas tratadas com o Losartan. Além disto, as vias de sinalização de transdução de sinal do TGF- β serão analisadas nas células obtidas de animais selvagens e deficientes em fibrilina-1 tratadas e não tratadas com Losartan o que pode ser bastante esclarecedor sobre a participação ou não do TGF- β na formação de fibras elásticas por estes fibroblastos.

De uma maneira geral, nossos dados sugerem um aumento da degradação das moléculas componentes da fibra elástica nos fibroblastos deficientes em fibrilina-1, com um aumento na expressão das MMP 2 e 9. Esta degradação pode ser resultado da menor presença de fibrilina-1 na matriz produzida por estas células, o que acarreta uma menor deposição. O tratamento com Losartan provavelmente aumenta a expressão gênica das moléculas em questão, o que leva, mesmo que parcialmente e de forma anormal, a aumentar a deposição de MAGP-1, fibrilina-2 e tropoelastina na matriz extracelular destas células. As vias de sinalização envolvidas neste processo ainda não estão esclarecidas e serão objeto de estudos em nosso laboratório.

CONCLUSÃO

8. Conclusão

Sobre os dados apresentados nessa dissertação, podemos concluir que:

- A deficiência em Fibrilina-1 ocasionou uma redução conjunta da deposição de Fibrilina-2, MAGP-1 e tropoelastina na matriz extracelular em cultura de fibroblastos de derme.
- Fibroblastos de derme deficientes em fibrilina-1, tem níveis de expressão das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9, aumentados.
- O tratamento das células deficientes em fibrilina-1 com o fármaco Losartan leva a recuperação parcial da deposição das proteínas Fibrilina-2, MAGP-1 e tropoelastina na matriz extracelular.
- O fármaco Captopril não influencia na deposição das proteínas Fibrilina-2, 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 Fibrilina-2, MAGP-1 e tropoelastina na matriz extracelular de cultura de fibroblastos de derme.

- O fármaco Losartan, atua por uma via diferente, não elucidada nessa tese, à utilizada pelos agentes inibidores de ECA, bem como, às vias de acúmulo de Angiotensina I e angiotensina II.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. Bibliografia

1. Aalberts, J. J., A. G. Schuurman, et al. (2010). "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 **18**(2): 85-89.
2. Ahimastos, A. A., A. Aggarwal, et al. (2007). "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 **298**(13): 1539-1547.
3. Biery, N. J., Z. A. Eldadah, et al. (1999). "Revised genomic organization of FBN1 and significance for regulated gene expression." Genomics **56**(1): 70-77.
4. Birkedal-Hansen, H. (1993). "Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases." Journal of periodontology **64**(5 Suppl): 474-484.
5. Bobik, A. (2006). "Transforming growth factor-betas and vascular disorders." Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology **26**(8): 1712-1720.
6. Brooke, B. S., J. P. Habashi, et al. (2008). "Angiotensin II blockade and aortic-root dilation in Marfan's syndrome." The New England journal of medicine **358**(26): 2787-2795.
7. Bunton, T. E., N. J. Biery, et al. (2001). "Phenotypic alteration of vascular smooth muscle cells precedes elastolysis in a mouse model of Marfan syndrome." Circ Res **88**(1): 37-43.
8. Caldini, E. G., N. Caldini, et al. (1990). "Distribution of elastic system fibres in the rat tail tendon and its associated sheaths." Acta anatomica **139**(4): 341-348.
9. Carta, L., L. Pereira, et al. (2005). "Fibrillins 1 and 2 perform partially overlapping functions during aortic development." J Biol Chem.
10. Carta, L., L. Pereira, et al. (2006). "Fibrillins 1 and 2 perform partially overlapping functions during aortic development." J Biol Chem **281**(12): 8016-8023.
11. Charbonneau, N. L., B. J. Dzamba, et al. (2003). "Fibrillins can co-assemble in fibrils, but fibrillin fibril composition displays cell-specific differences." J Biol Chem **278**(4): 2740-2749.
12. Chaudhry, S. S., J. Gazzard, et al. (2001). "Mutation of the gene encoding fibrillin-2 results in syndactyly in mice." Human molecular genetics **10**(8): 835-843.
13. Chung, A. W., K. Au Yeung, et al. (2007). "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 **101**(5): 512-522.
14. Cini, G., A. Carpi, et al. (2009). "Thyroid hormones and the cardiovascular system: pathophysiology and interventions." Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie **63**(10): 742-753.
15. Corson, G. M., N. L. Charbonneau, et al. (2004). "Differential expression of fibrillin-3 adds to microfibril variety in human and avian, but not rodent, connective tissues." Genomics **83**(3): 461-472.

16. Cossins, J. A., J. M. Clements, et al. (1997). "Enhanced expression of MMP-7 and MMP-9 in demyelinating multiple sclerosis lesions." Acta neuropathologica **94**(6): 590-598.
17. Cotta-Pereira, G., F. Guerra Rodrigo, et al. (1976). "Oxytalan, elaunin, and elastic fibers in the human skin." The Journal of investigative dermatology **66**(3): 143-148.
18. Cuzner, M. L., D. Gveric, et al. (1996). "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 **55**(12): 1194-1204.
19. Czirak, A., E. A. Zamir, et al. (2006). "Extracellular matrix macroassembly dynamics in early vertebrate embryos." Curr Top Dev Biol **73**: 237-258.
20. Dallas, S. L., D. R. Keene, et al. (2000). "Role of the latent transforming growth factor beta binding protein 1 in fibrillin-containing microfibrils in bone cells in vitro and in vivo." J Bone Miner Res **15**(1): 68-81.
21. Davis, E. C. (1994). "Immunolocalization of microfibril and microfibril-associated proteins in the subendothelial matrix of the developing mouse aorta." Journal of cell science **107** (Pt 3): 727-736.
22. de Carvalho, H. F. and C. Campos Vidal Bde (1995). "The elastic system of a pressure-bearing tendon of the bullfrog *Rana catesbeiana*." Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft **177**(5): 397-404.
23. de Carvalho, H. F., J. Lino Neto, et al. (1994). "Microfibrils: neglected components of pressure-bearing tendons." Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft **176**(2): 155-159.
24. Dietz, H. C., G. R. Cutting, et al. (1991). "Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene." Nature **352**(6333): 337-339.
25. Dietz, H. C., B. Loeys, et al. (2005). "Recent progress towards a molecular understanding of Marfan syndrome." American journal of medical genetics. Part C, Seminars in medical genetics **139C**(1): 4-9.
26. Edwards, J. G. (1968). "A study of the periodontium during orthodontic rotation of teeth." American journal of orthodontics **54**(6): 441-461.
27. Feng, X. H. and R. Derynck (2005). "Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads." Annual review of cell and developmental biology **21**: 659-693.
28. Frydman, M. (2008). "The Marfan syndrome." The Israel Medical Association journal : IMAJ **10**(3): 175-178.
29. Fukuda, Y., V. J. Ferrans, et al. (1984). "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 **170**(4): 597-629.
30. Gott, V. L. (1998). "Antoine Marfan and his syndrome: one hundred years later." Maryland medical journal **47**(5): 247-252.

31. Gross, J. and C. M. Lapiere (1962). "Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **48**: 1014-1022.
32. Habashi, J. P., D. P. Judge, et al. (2006). "Losartan, an AT1 antagonist, prevents aortic aneurysm in a mouse model of Marfan syndrome." Science **312**(5770): 117-121.
33. Handford, P. A., A. K. Downing, et al. (2000). "Fibrillin: from domain structure to supramolecular assembly." Matrix Biol **19**(6): 457-470.
34. Hilhorst-Hofstee, Y., M. E. Rijlaarsdam, et al. (2010). "The clinical spectrum of missense mutations of the first aspartic acid of cbEGF-like domains in fibrillin-1 including a recessive family." Human mutation **31**(12): E1915-1927.
35. Hollister, D. W., M. Godfrey, et al. (1990). "Immunohistologic abnormalities of the microfibrillar-fiber system in the Marfan syndrome." The New England journal of medicine **323**(3): 152-159.
36. Hyytiainen, M., C. Penttinen, et al. (2004). "Latent TGF-beta binding proteins: extracellular matrix association and roles in TGF-beta activation." Critical reviews in clinical laboratory sciences **41**(3): 233-264.
37. Ikonomidis, J. S., J. A. Jones, et al. (2006). "Expression of matrix metalloproteinases and endogenous inhibitors within ascending aortic aneurysms of patients with Marfan syndrome." Circulation **114**(1 Suppl): I365-370.
38. Isogai, Z., R. N. Ono, et al. (2003). "Latent transforming growth factor beta-binding protein 1 interacts with fibrillin and is a microfibril-associated protein." J Biol Chem **278**(4): 2750-2757.
39. Jeremy, R. W., H. Huang, et al. (1994). "Relation between age, arterial distensibility, and aortic dilatation in the Marfan syndrome." The American journal of cardiology **74**(4): 369-373.
40. Jimenez, S. A. and J. Rosenbloom (2008). "Angiotensin II blockade in Marfan's syndrome." The New England journal of medicine **359**(16): 1732-1733; author reply 1733-1734.
41. Judge, D. P., N. J. Biery, et al. (2004). "Evidence for a critical contribution of haploinsufficiency in the complex pathogenesis of Marfan syndrome." J Clin Invest **114**(2): 172-181.
42. Judge, D. P. and H. C. Dietz (2005). "Marfan's syndrome." Lancet **366**(9501): 1965-1976.
43. Judge, D. P. and H. C. Dietz (2008). "Therapy of Marfan syndrome." Annu Rev Med **59**: 43-59.
44. Kaartinen, V. and D. Warburton (2003). "Fibrillin controls TGF-beta activation." Nature genetics **33**(3): 331-332.
45. Kainulainen, K., L. Pulkkinen, et al. (1990). "Location on chromosome 15 of the gene defect causing Marfan syndrome." The New England journal of medicine **323**(14): 935-939.
46. Kanesaka, T., M. Mori, et al. (2006). "Serum matrix metalloproteinase-3 levels correlate with disease activity in relapsing-remitting multiple sclerosis." Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry **77**(2): 185-188.
47. Kang, H. G., R. C. Foley, et al. (2003). "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 **35**(3): 362-372.
48. Keane, M. G. and R. E. Pyeritz (2008). "Medical management of Marfan syndrome." Circulation **117**(21): 2802-2813.
 49. Khau Van Kien, P., D. Baux, et al. (2010). "Missense mutations of conserved glycine residues in fibrillin-1 highlight a potential subtype of cb-EGF-like domains." Human mutation **31**(1): E1021-1042.
 50. Kielty, C. M. (2006). "Elastic fibres in health and disease." Expert reviews in molecular medicine **8**(19): 1-23.
 51. Kielty, C. M., L. Berry, et al. (1993). "Microfibrillar assemblies of foetal bovine skin. Developmental expression and relative abundance of type VI collagen and fibrillin." Matrix **13**(2): 103-112.
 52. Kielty, C. M., M. J. Sherratt, et al. (2005). "Fibrillin microfibrils." Adv Protein Chem **70**: 405-436.
 53. Kielty, C. M., M. J. Sherratt, et al. (2002). "Elastic fibres." J Cell Sci **115**(Pt 14): 2817-2828.
 54. Kielty, C. M., S. P. Whittaker, et al. (1996). "Fibrillin: evidence that chondroitin sulphate proteoglycans are components of microfibrils and associate with newly synthesised monomers." FEBS letters **386**(2-3): 169-173.
 55. Koo, H. P., E. J. Macarak, et al. (1998). "Temporal expression of elastic fiber components in bladder development." Connective tissue research **37**(1-2): 1-11.
 56. Kozel, B. A., C. H. Ciliberto, et al. (2004). "Deposition of tropoelastin into the extracellular matrix requires a competent elastic fiber scaffold but not live cells." Matrix Biol **23**(1): 23-34.
 57. Kozel, B. A., B. J. Rongish, et al. (2006). "Elastic fiber formation: a dynamic view of extracellular matrix assembly using timer reporters." J Cell Physiol **207**(1): 87-96.
 58. Lee, B., M. Godfrey, et al. (1991). "Linkage of Marfan syndrome and a phenotypically related disorder to two different fibrillin genes." Nature **352**(6333): 330-334.
 59. Leick-Maldonado, E. A., M. Lemos, et al. (1997). "Differential distribution of elastic system fibers in control and bronchoconstricted intraparenchymatous airways in the guinea-pig lung." Journal of submicroscopic cytology and pathology **29**(4): 427-434.
 60. Lillie, M. A., G. J. David, et al. (1998). "Mechanical role of elastin-associated microfibrils in pig aortic elastic tissue." Connective tissue research **37**(1-2): 121-141.
 61. Lin, G., K. Tiedemann, et al. (2002). "Homo- and heterotypic fibrillin-1 and -2 interactions constitute the basis for the assembly of microfibrils." J Biol Chem **277**(52): 50795-50804.
 62. Massague, J. and Y. G. Chen (2000). "Controlling TGF-beta signaling." Genes & development **14**(6): 627-644.
 63. Massague, J. and R. R. Gomis (2006). "The logic of TGFbeta signaling." FEBS letters **580**(12): 2811-2820.

64. Mates, L., C. Nicolae, et al. (2004). "Mice lacking the extracellular matrix adaptor protein matrilin-2 develop without obvious abnormalities." Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology **23**(3): 195-204.
65. McInnes, G. T. (1994). "Role of ACE inhibitors in hypertension complicated by vascular disease." British heart journal **72**(3 Suppl): S33-37.
66. McKusick, V. A. (1995). "Reviews in molecular medicine." Medicine **74**(6): 301-304.
67. McLaughlin, P. J., Q. Chen, et al. (2006). "Targeted disruption of fibulin-4 abolishes elastogenesis and causes perinatal lethality in mice." Mol Cell Biol **26**(5): 1700-1709.
68. Mecham, R. P., G. Lange, et al. (1981). "Elastin synthesis by ligamentum nuchae fibroblasts: effects of culture conditions and extracellular matrix on elastin production." J Cell Biol **90**(2): 332-338.
69. Mizuguchi, T., G. Collod-Beroud, et al. (2004). "Heterozygous TGFBR2 mutations in Marfan syndrome." Nature genetics **36**(8): 855-860.
70. Munger, J. S., J. G. Harpel, et al. (1998). "Interactions between growth factors and integrins: latent forms of transforming growth factor-beta are ligands for the integrin alphavbeta1." Molecular biology of the cell **9**(9): 2627-2638.
71. Munger, J. S., J. G. Harpel, et al. (1997). "Latent transforming growth factor-beta: structural features and mechanisms of activation." Kidney international **51**(5): 1376-1382.
72. Munger, J. S., X. Huang, et al. (1999). "The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis." Cell **96**(3): 319-328.
73. Murdoch, J. L., B. A. Walker, et al. (1972). "Life expectancy and causes of death in the Marfan syndrome." The New England journal of medicine **286**(15): 804-808.
74. Nakamura, T., P. R. Lozano, et al. (2002). "Fibulin-5/DANCE is essential for elastogenesis in vivo." Nature **415**(6868): 171-175.
75. Neptune, E. R., P. A. Frischmeyer, et al. (2003). "Dysregulation of TGF-beta activation contributes to pathogenesis in Marfan syndrome." Nat Genet **33**(3): 407-411.
76. Ono, R. N., G. Sengle, et al. (2009). "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 **284**(25): 16872-16881.
77. Orringer, J. S., S. Kang, et al. (2004). "Connective tissue remodeling induced by carbon dioxide laser resurfacing of photodamaged human skin." Archives of dermatology **140**(11): 1326-1332.
78. Park, E. S., E. A. Putnam, et al. (1998). "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 **78**(4): 350-355.
79. Pereira, L., K. Andrikopoulos, et al. (1997). "Targetting of the gene encoding fibrillin-1 recapitulates the vascular aspect of Marfan syndrome." Nature genetics **17**(2): 218-222.

80. Pereira, L., M. D'Alessio, et al. (1993). "Genomic organization of the sequence coding for fibrillin, the defective gene product in Marfan syndrome." Human Mol. Genet. **2**: 961-968.
81. Pereira, L., S. Y. Lee, et al. (1999). "Pathogenetic sequence for aneurysm revealed in mice underexpressing fibrillin-1." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**: 3819-3823.
82. Radonic, T., P. de Witte, et al. (2010). "Losartan therapy in adults with Marfan syndrome: study protocol of the multi-center randomized controlled COMPARE trial." Trials **11**: 3.
83. Raghunath, M., T. Bachi, et al. (1996). "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 **106**(5): 1090-1095.
84. Ram, M., Y. Sherer, et al. (2006). "Matrix metalloproteinase-9 and autoimmune diseases." Journal of clinical immunology **26**(4): 299-307.
85. Ramirez, F. and H. C. Dietz (2007). "Fibrillin-rich microfibrils: Structural determinants of morphogenetic and homeostatic events." Journal of cellular physiology **213**(2): 326-330.
86. Ramirez, F. and H. C. Dietz (2007). "Marfan syndrome: from molecular pathogenesis to clinical treatment." Curr Opin Genet Dev **17**(3): 252-258.
87. Ramirez, F. and L. Pereira (1999). "The fibrillins." The international journal of biochemistry & cell biology **31**(2): 255-259.
88. Ramirez, F. and D. B. Rifkin (2003). "Cell signaling events: a view from the matrix." Matrix Biol **22**(2): 101-107.
89. Ramirez, F. and D. B. Rifkin (2009). "Extracellular microfibrils: contextual platforms for TGFbeta and BMP signaling." Current opinion in cell biology **21**(5): 616-622.
90. Ramirez, F. and L. Y. Sakai (2009). "Biogenesis and function of fibrillin assemblies." Cell Tissue Res.
91. Ramirez, F., L. Y. Sakai, et al. (2004). "Fibrillin microfibrils: multipurpose extracellular networks in organismal physiology." Physiol Genomics **19**(2): 151-154.
92. Rifkin, D. B. (2005). "Latent transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding proteins: orchestrators of TGF-beta availability." The Journal of biological chemistry **280**(9): 7409-7412.
93. Rittie, L. and G. J. Fisher (2005). "Isolation and culture of skin fibroblasts." Methods in molecular medicine **117**: 83-98.
94. Ritty, T. M., T. J. Broekelmann, et al. (2003). "Fibrillin-1 and -2 contain heparin-binding sites important for matrix deposition and that support cell attachment." The Biochemical journal **375**(Pt 2): 425-432.
95. Robinson, P. N., E. Arteaga-Solis, et al. (2006). "The molecular genetics of Marfan syndrome and related disorders." Journal of medical genetics **43**(10): 769-787.
96. Robinson, P. N., P. Booms, et al. (2002). "Mutations of FBN1 and genotype-phenotype correlations in Marfan syndrome and related fibrillinopathies." Human mutation **20**(3): 153-161.

97. Robinson, P. N. and M. Godfrey (2000). "The molecular genetics of Marfan syndrome and related microfibrilopathies." Journal of medical genetics **37**(1): 9-25.
98. Rosenbloom, J., W. R. Abrams, et al. (1993). "Extracellular matrix 4: the elastic fiber." The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology **7**(13): 1208-1218.
99. Ross, R. and P. Bornstein (1969). "The elastic fiber. I. The separation and partial characterization of its macromolecular components." The Journal of cell biology **40**(2): 366-381.
100. Ross, R., R. J. Fialkow, et al. (1977). "The morphogenesis of elastic fibers." Advances in experimental medicine and biology **79**: 7-17.
101. Sakai, L. Y., D. R. Keene, et al. (1986). "Fibrillin, a new 350-kD glycoprotein, is a component of extracellular microfibrils." The Journal of cell biology **103**(6 Pt 1): 2499-2509.
102. Sakai, L. Y., D. R. Keene, et al. (1991). "Purification and partial characterization of fibrillin, a cysteine-rich structural component of connective tissue microfibrils." J Biol Chem **266**(22): 14763-14770.
103. Sakamoto, H., T. Broekelmann, et al. (1996). "Cell-type specific recognition of RGD- and non-RGD-containing cell binding domains in fibrillin-1." The Journal of biological chemistry **271**(9): 4916-4922.
104. Sauter, M., C. D. Cohen, et al. (2007). "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 **27**(2): 167-172.
105. Sicot, F. X., T. Tsuda, et al. (2008). "Fibulin-2 is dispensable for mouse development and elastic fiber formation." Mol Cell Biol **28**(3): 1061-1067.
106. Sinha, S., C. Nevett, et al. (1998). "Cellular and extracellular biology of the latent transforming growth factor-beta binding proteins." Matrix Biol **17**(8-9): 529-545.
107. Smith, L. B., P. W. Hadoke, et al. (2011). "Haploinsufficiency of the murine Col3a1 locus causes aortic dissection: a novel model of the vascular type of Ehlers-Danlos syndrome." Cardiovascular research **90**(1): 182-190.
108. Suda, N., M. Shiga, et al. (2009). "Marfan syndrome and its disorder in periodontal tissues." Journal of experimental zoology. Part B, Molecular and developmental evolution **312B**(5): 503-509.
109. Swee, M. H., W. C. Parks, et al. (1995). "Developmental regulation of elastin production. Expression of tropoelastin pre-mRNA persists after down-regulation of steady-state mRNA levels." The Journal of biological chemistry **270**(25): 14899-14906.
110. Takagi, M., T. Kazama, et al. (1989). "Differential distribution and ultrastructural staining of oxytalan and elastic fibers in the periodontal ligament of Alligator mississippiensis." The Anatomical record **225**(4): 279-287.
111. ten Dijke, P. and H. M. Arthur (2007). "Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease." Nature reviews. Molecular cell biology **8**(11): 857-869.

112. Thomassin, L., C. C. Werneck, et al. (2005). "The Pro-regions of lysyl oxidase and lysyl oxidase-like 1 are required for deposition onto elastic fibers." J Biol Chem **280**(52): 42848-42855.
113. Tiecke, F., S. Katzke, et al. (2001). "Classic, atypically severe and neonatal Marfan syndrome: twelve mutations and genotype-phenotype correlations in FBN1 exons 24-40." European journal of human genetics : EJHG **9**(1): 13-21.
114. Tsuruga, E., K. Irie, et al. (2007). "Fibrillin-2 degradation by matrix metalloproteinase-2 in periodontium." Journal of dental research **86**(4): 352-356.
115. Vehvilainen, P., M. Hyytiainen, et al. (2009). "Matrix association of latent TGF-beta binding protein-2 (LTBP-2) is dependent on fibrillin-1." Journal of cellular physiology **221**(3): 586-593.
116. Wagenseil, J. E. and R. P. Mecham (2007). "New insights into elastic fiber assembly." Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews **81**(4): 229-240.
117. Wang, M. C., Y. Lu, et al. (2009). "Fibrillin microfibrils: a key role for the interbead region in elasticity." Journal of molecular biology **388**(1): 168-179.
118. Weinbaum, J. S., T. J. Broekelmann, et al. (2008). "Deficiency in microfibril-associated glycoprotein-1 leads to complex phenotypes in multiple organ systems." J Biol Chem **283**(37): 25533-25543.
119. Werneck, C. C., B. C. Trask, et al. (2004). "Identification of a major microfibril-associated glycoprotein-1-binding domain in fibrillin-2." J Biol Chem **279**(22): 23045-23051.
120. Werneck, C. C., C. P. Vicente, et al. (2008). "Mice lacking the extracellular matrix protein MAGP1 display delayed thrombotic occlusion following vessel injury." Blood **111**(8): 4137-4144.
121. Wheatley, H. M., E. I. Traboulsi, et al. (1995). "Immunohistochemical localization of fibrillin in human ocular tissues. Relevance to the Marfan syndrome." Archives of ophthalmology **113**(1): 103-109.
122. Wojakowski, W., J. Gminski, et al. (2001). "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 **2**(1): 37-42.
123. Yamanouchi, K., E. Tsuruga, et al. (2011). "Fibrillin-1 and Fibrillin-2 Are Essential for Formation of Thick Oxytalan Fibers in Human Nonpigmented Ciliary Epithelial Cells In Vitro." Connective tissue research.
124. Yanagisawa, H., E. C. Davis, et al. (2002). "Fibulin-5 is an elastin-binding protein essential for elastic fibre development in vivo." Nature **415**(6868): 168-171.
125. Yasmin, C. M. McEniery, et al. (2005). "Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), MMP-2, and serum elastase activity are associated with systolic hypertension and arterial stiffness." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(2): 372.
126. Zeisberg, M., J. Hanai, et al. (2003). "BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury." Nature medicine **9**(7): 964-968.

127. Zhao, L., T. Liang, et al. (2009). "Two novel FBN1 mutations associated with ectopia lentis and marfanoid habitus in two Chinese families." Molecular vision **15**: 826-832.

ANEXO 1



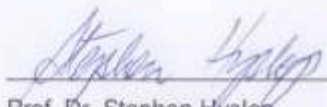

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

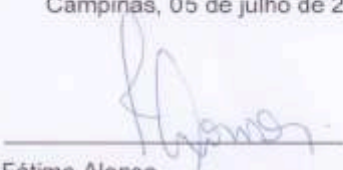
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 2187-1, sobre "Avaliação da síntese de fibras elásticas em cultura de células obtidas de camundongos deficientes em Fibrilina-1. Estudo do efeito do Losartan", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Cláudio Chrysostomo Werneck / Guilherme Gambogi Braga, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em 05 de julho de 2010.

C E R T I F I C A T E

We certify that the protocol nº 2187-1, entitled "_____", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on July 5, 2010.


 Prof. Dr. Stephen Hyslop
 Vice-Presidente


 Fátima Alonso
 Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/cesa/>