JOÃO CARLOS RIBEIRO DA SILVA

Papel da proteína rica em cisteína e glicina 3 (CRP3) na mecanotransdução de células musculares lisas aórticas

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Ciências Médicas
Área de Concentração: Distúrbios Genéticos, do Desenvolvimento e do Metabolismo.

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Krieger

São Paulo

2019

JOÃO CARLOS RIBEIRO DA SILVA

Papel da proteína rica em cisteína e glicina 3 (CRP3) na mecanotransdução de células musculares lisas aórticas

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Ciências Médicas
Área de Concentração: Distúrbios Genéticos, do Desenvolvimento e do Metabolismo.

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Krieger

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Ribeiro-Silva, João Carlos
Papel da proteína rica em cisteína e glicina 3 (CRP3)na mecanotransdução de células musculares lisas aórticas / João Carlos Ribeiro-Silva. -- São Paulo, 2019.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências Médicas.Área de Concentração: Distúrbios Genéticos de Desenvolvimento e Metabolismo.
Orientador: José Eduardo Krieger.

Descritores: 1.Aorta 2.Adesões focais 3.Citoesqueleto de actina 4.Músculo liso 5.Mecanotransdução celular 6.Transdução de sinais

USP/FM/DBD-173/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedico este trabalho aos meus pais Ana e João,

pelos ensinamentos que se prolongam até os dias atuais

e pelo suporte incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço àquele de quem toda sabedoria e conhecimento emanam – **Deus** que, apesar de Sua infinita grandeza e mesmo eu não sendo merecedor, me lapidou dia após dia desde o meu nascimento de forma que este trabalho fosse desenvolvido. Faltam-me palavras para expressar a minha gratidão.

Às pessoas mais nobres que já conheci – **meus pais**, por incansavelmente suportarem o fardo representado pela criação de alguém como eu, por entenderem os momentos de ausência (que foram muitos) e por fornecerem o suporte necessário para que eu fosse capaz de desenvolver este trabalho. É uma honra ser filho de vocês.

Às minhas irmãs, **Ester e Nicole**, por todo o carinho e compreensão, em especial à Nicole, por ser colírio para os olhos e conforto ao coração sempre, por me entender melhor do que ninguém e sempre buscar fazer o seu melhor para me agradar: palavras falham na tarefa de expressar meu carinho por vocês.

Aos meus familiares maternos, especialmente aos meus tios **Edilson**, **Edvaldo**, **Silvia**, **Valmir** e à minha **avó Letícia**, por me apoiarem e acreditarem em mim mesmo quando eu estive em dúvida. Este trabalho não existiria se não fosse por vocês, muito obrigado!

Ao meu orientador, **Prof. Dr. José Eduardo Krieger**, por me conceder o privilégio de ser parte do seu time no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular, pelos desafios e pela contribuição à edificação da minha carreira científica.

À minha mãe (versão científica), **Dra. Ayumi Aurea Miyakawa**, por confiar a mim o projeto do qual este trabalho deriva, por acreditar no meu potencial, por me compreender e pela paciência em todos os dias me ensinar a lidar com as nuances que

fogem ao nosso controle no meio científico. Ser seu pupilo e parte de sua equipe tem sido enriquecedor desde o princípio.

À **Renata Carmona**, por me receber de braços abertos no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular, pela paciência, pelo apoio nos momentos difíceis e pela receptividade constante às minhas críticas e sugestões.

À **Dra. Miriam Alaniz**, por me compreender nas horas de desespero, por compartilhar sua experiência comigo nos momentos oportunos e pela ajuda incansável na bancada.

Ao querido **Dr. Mário Costa Cruz** da Central de Facilidades para Pesquisa (CEFAP, USP), por todo o tempo dedicado à otimização dos meus ensaios, pelo auxílio na obtenção das imagens, pelos conselhos e por dividir comigo sua vasta experiência científica e de vida. Você simplesmente não existe, Mário!

Ao grupo de Biologia Vascular & Genômica Funcional – **Ayumi Miyakawa**, **Miriam Alaniz**, **Thaís Girão**, **Samantha Kuwada**, **Iguaracy Souza**, **Vinicius Souza** e **Luís Fernando** por compartilharem suas experiências e visões científicas comigo, pela compreensão e companheirismo.

Aos demais colegas do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular – **Ana Laura Américo, Agatha Ribeiro, Aline Keusseyan, Acaris Benneti, Bruno Vecchiatto, Camila Zogbi, Cynthia Muller, Daniel Júnior, Danúbia Santos, Fanny Wulkan, Flávia Rodrigues, Flávio Rodrigues, Juliana Alvim, Kallyandra Padilha, Rafael Dariolli, Renato Crajoinas, Thayane Crestani e Theo Gremen**, por me prestarem assistência e companheirismo nesta jornada.

À equipe administrativa do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular – **Ana Maria Piesco**, **Ednalva Pereira**, **Marcelly Rosal**, **Maude** e **Silvana Campos**; aos técnicos: **Bruna Gonçalves**, **Élida Neri**, **Mariliza Rodrigues**, **Márcio Chaves**, **Suelen**

Nascimento, **Thiago Turaça** e à equipe de apoio: **Andrea Souza**, **Brendo Vieira** e **Sileide Lemos**, cujo trabalho árduo e cooperação constituíram as engrenagens do desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus colegas do Laboratório de Biologia Vascular do Instituto do Coração – **Leonardo Tanaka**, **Patrícia Nolasco**, **Percília Oliveira**, **Tiphany Bessa** e **Victor Debbas**, por me socorrerem nos momentos difíceis e pela experiência compartilhada.

Às **Prof^as^. Dr^as^. Marinilce Fagundes** e **Irene Yan** do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, pelo tempo dedicado à resolução das minhas dúvidas, pelos ensinamentos e por sempre deixarem as portas de seus laboratórios abertas para mim.

Aos colaboradores deste trabalho: **Prof. Dr. Adriano Alencar** (Instituto de Física, Universidade de São Paulo) e **Dr. Christoph Ballestreem** (*Wellcome Trust Centre For Cell-Matrix Research*, Universidade de Manchester). A ajuda de vocês foi essencial ao desenvolvimento deste trabalho.

À minha amiga **Luana Nunes**, pela paciência, por me ensinar nos mínimos detalhes, por revisar este trabalho, pelo companheirismo *through thick and thin*. Você é uma cornucópia de inspirações.

Ao epítome de competência, minha amiga **Gabriela Venturini**, pela ininterrupta disponibilidade de discutir os mais variados assuntos, por dia após dia contribuir ao aprimoramento do meu senso crítico, pelas conversas gastronômicas, pelo prazer de poder trabalhar contigo: muito obrigado.

Aos meus amigos **Aline Ferrari**, **André Martelini**, **Andressa Romanel**, **Cecilia Magalhães**, **Gabriela Venturini, Graça Rosas, Havi Araújo, Julliana Carvalho**, **Kieren Egan**, **Luana Nunes**, **Lyub Kovbel**, **Marcos Amorim**, **Nathalia Correa**, **Rafael Buskov, Samuel Lamas** e **Thaís Rodrigues** por me ensinarem, cada

qual ao seu jeito, como a vida realmente é e pelo constante apoio através dos anos. Estou em débito com vocês.

A todos aqueles que, de uma forma ou de outra, foram meus tutores no meio acadêmico – **Lis Mattos**, **Márcia Trípodi**, **Tania Matsui** e **Dr. Malcolm von Schantz**, por dedicarem seu tempo, experiência e paciência para me ensinar e aconselhar. É um privilégio hoje poder chamar de "meus amigos" aqueles que tanto contribuíram (e que ainda contribuem) ao meu amadurecimento nas esferas acadêmicas e pessoais.

Ao **CNPQ** pelo auxílio financeiro (Processo 130142/2016-6) que tornou possível o desenvolvimento deste trabalho.

A **você** que mesmo não mencionado aqui, de alguma forma contribuiu para que este trabalho chegasse ao fim, meu "muito obrigado".

"There are more things in heaven and earth, Horatio,
Than are dreamt of in your philosophy."

Hamlet (1.5.167-168)

William Shakespeare

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

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

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

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

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

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS
LISTA DE TABELAS
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS
LISTA DE SÍMBOLOS
RESUMO
ABSTRACT
1.INTRODUÇÃO.. 2
2.OBJETIVO..... 16
3. MÉTODOS..... 18
3.1 Obtenção de aortas para extração de célula musculares lisas.....18
3.2 Cultura primária de células musculares lisas aórticas 18
3.3 Transfecção de células musculares lisas aórticas 19
3.4 Obtenção de extrato proteico de células musculares lisas aórticas 20
3.5 Determinação da concentração de proteínas 20
3.6 Imunoprecipitação 21
3.7 Eletroforese em gel poliacrilamida-SDS para proteína 21
3.8 *Immunoblotting*.....22
3.9 Imunofluorescência e análise do tamanho médio das adesões focais 23
3.9.1 Imunofluorescência..... 23
3.9.2 Determinação do tamanho das adesões focais..... 24
3.10 Citometria magnético-óptica de oscilação.....25
3.10.1 Adsorção dos grânulos ferromagnéticos por RGD..... 26
3.10.2 Preparo das células para o ensaio 26
3.10.3 A citometria magnético-óptica de oscilação..... 27
3.10.4 Análise dos resultados 28
3.11 Ensaio de contração celular em gel de colágeno 28
3.12 Análise estatística 29

4. RESULTADOS 31
4.1. A proteína rica em cisteína e glicina 3 (CRP3) é uma proteína de adesão focal em células musculares lisas aórticas.....31
4.2 O nocaute de CRP3 é acompanhado de mudança no tamanho médio de adesões focais.....33
4.3 Reduzida expressão de componentes das adesões focais em resposta ao nocaute de CRP3.....37
4.4 Modulação da rigidez celular em resposta ao nocaute de CRP3.....37
4.5 Prejuízo à contratilidade celular em células nocaute para CRP3 39
5. DISCUSSÃO 41
6. CONCLUSÕES..... .51
7. REFERÊNCIAS 54
8. ANEXOS 70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Comutação fenotípica de células musculares lisas e seus marcadores. 2
Figura 2. A interação de SRF com sequências CArG nos promotores e os fatores que ativam e suprimem a expressão de genes de diferenciação de células musculares lisas.. 3
Figura 3. A contração de células musculares lisas. 4
Figura 4. Representação esquemática dos mecanismos moleculares envolvidos na resposta contrátil de células musculares lisas. 6
Figura 5. Papel de ROCK na contração de células musculares lisas. 8
Figura 6. Esquema representando uma célula muscular lisa embebida na matriz extracelular (ECM), constituída, principalmente, por fibras elásticas, fibras colágenas, fibronectina e glicosaminoglicanos. 9
Figura 7. Arquitetura de adesões focais em nanoescala. 10
Figura 8. Vias de sinalização intracelular de controle da resposta de sobrevivência e morte celular. 13
Figura 9. Tratamento das imagens para análise do tamanho das adesões focais..... 25
Figura 10. Representação esquemática do princípio da técnica de citometria magnético-óptica de oscilação. 26
Figura 11. Representação esquemática do ensaio de contração em gel de colágeno. 29
Figura 12. A proteína rica em cisteína e glicina 3 (CRP3) é uma proteína de adesão focal. 32
Figura 13. A ausência de CRP3 confere maior tamanho às adesões focais em condições basais na presença de 3% gelatina 33
Figura 14. A ausência de CRP3 confere maior tamanho às adesões focais em condições basais na presença de fibronectina 34
Figura 15. A ausência de CRP3 prejudica a adaptação das adesões focais em resposta à angiotensina II. 35
Figura 16. Adesões focais permanecem maiores na presença de inibidor de ROCK em células desprovidas de CRP3 36
Figura 17. Imagens representativas e quantificação da análise por immunoblotting da expressão das proteínas FAK, paxilina e a cadeia regulatória da miosina (MLC2)..... 37
Figura 18. A ausência de CRP3 confere maior rigidez celular. *a*. 38

Figura 19. A ausência de CRP3 acarreta em dano à capacidade contrátil de células musculares lisas aórticas..... 39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Anticorpos utilizados para imunoprecipitação de proteínas de adesão focal. 21
Tabela 2. Especificações dos anticorpos utilizados na técnica de immunoblotting 23

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Akt: proteína quinase B

CFL2: cofilina 2

CPI-17: inibidor da fosfatase da cadeia regulatória da miosina

CRP: família de ou proteína rica em cisteína e glicina

CRP3: proteína rica em cisteína e glicina 3

CRP3 KO: célula ou animal nocaute para CRP3

DAG: diacilglicerol

DMEM: meio Eagle modificado por Dulbecco

DTT: ditiotreitol

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

ELC: cadeia essencial da miosina

Elk1: proteína 1 contendo o domínio ETS

FAK: quinase de adesão focal

GDI: fator inibidor de dissociação de guanina

GEF: trocador de nucleotídeo de guanina

ILK: quinase ligada às integrinas

IP_3: trifosfato de inositol

KO: rato ou célula nocaute para CRP3

LIM: domínio de dedo de zinco

LPP: proteína ligante em lipoma

LTCC: canal de cálcio do tipo L

MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno

MKL: proteína de leucemia megacarioblástica

MLC: cadeia leve da miosina

MLCK: quinase da cadeia leve de miosina

MLCP: fosfatase da cadeia leve de miosina

MYH11: gene da cadeia pesada de miosina músculo liso-específica

MYPT1: subunidade 1 da miosina fosfatase

PBS: solução salina tamponada com fosfato

PINCH: proteína rica em cisteína e histidina

PKC: proteína quinase C

PMSF: fluoreto de fenilmetilsulfonila

RGD: tripeptídeo ácido arginilglicilaspártico

RIPA: tampão de radioimunoensaio

ROCK: quinase de Rho

RPM: rotações por minuto

RyR: receptor de rianodina

SDS: dodecil sulfato de sódio

SM22: proteína de músculo liso de 22 kDa

SR: retículo sarcoplasmático

SRF: fator responsivo ao soro

TBS-T: solução salina tamponada com Tris contendo Tween-20

TRP: canal iônico receptor de potencial transitório

WT: célula selvagem

VASP: fosfoproteína ativada por vasodilatador

ZIPK: quinase ligante de domínio em zíper

LISTA DE SÍMBOLOS

±: mais ou menos

%: percentagem

°C: grau Celsius

α: letra grega alfa

β: letra grega beta

γ: letra grega gama

η: letra grega eta

µg: micrograma

µl: microlitro

µM: micromolar

η: histerese (g’’/g’)

Ca^{+2}: íon cálcio

cm^2: centímetro quadrado

cm^3: centímetro cúbico

CO_2: gás carbônico

Cu^{+}: íon cuproso

Cu^{+2}: íon cúprico

D*(w): deslocamento do grânulo

g: grama

g: força centrífuga

G: rigidez celular aparente (0,75Hz)

G’: módulo elástico (0,75Hz)

G’’: módulo dissipativo

h: hora

HCl: ácido clorídrico

Hz: hertz

kDa: unidade de massa atômica kiloDalton

Kg: kilo

mg: miligrama

min: minuto

ml: mililitro

mM: milimolar

mm^3: milímetro cúbico

ms: milissegundos

NaCl: cloreto de sódio

nm: nanômetro

p: nível descritivo de probabilidade do teste

pJ: picoJoule

Pa/nm: Pascal por nanômetro

pH: potencial hidrogenionico

s: segundo

T*(w): torque aplicado

UI: unidade internacional

UV: luz ultravioleta

V: Volt

v/v: volume/volume

RESUMO

Ribeiro-Silva JC. *Papel da proteína rica em cisteína e glicina 3 (CRP3) na mecanotransdução de células musculares lisas aórticas* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2019.

Células de músculo liso vascular são capazes de perceber estímulos mecânicos do sistema cardiovascular, coordenando pressão sanguínea e perfusão tecidual por meio da modulação do tônus e do diâmetro vascular via resposta contrátil. O gatilho inicial à contração é um aumento na concentração intracelular de cálcio e diversas vias de sinalização têm sido descritas na sustentação deste sinal inicial. Evidências atuais indicam que adesões focais desempenham papel crucial na contração através da organização do citoesqueleto de actina e engajamento com o aparato contrátil. Nosso grupo demonstrou que a proteína rica em cisteína e glicina 3 (CRP3) interage com a quinase de adesão focal (FAK) em resposta a um aumento do estiramento mecânico e existem evidências de que CRP3 modula a dinâmica do citoesqueleto de actina. Neste trabalho testamos a hipótese de que a proteína CRP3 atua como uma proteína de adesão focal que regula a contração de células musculares lisas aórticas. Por meio de ensaios de imunoprecipitação e colocalização, verificou-se a presença de CRP3 nas adesões focais de células selvagens. Evidenciou-se que a ausência de CRP3 está associada a aumento no tamanho médio de adesões focais em células musculares lisas aórticas de forma independente do substrato. Entretanto, em resposta à angiotensina II, células nocaute para CRP3 apresentam incapacidade de maturação das adesões focais, um evento que está associado ao reduzido conteúdo proteico de FAK, paxilina e MLC2 (plataformas moleculares envolvidas na maturação de adesões focais) observada em células nocaute. Consistente com o maior tamanho médio das adesões focais, células nocaute são mais rígidas e, portanto, menos elásticas que células selvagens, sendo que a rigidez avaliada por citometria magnético-óptica de oscilação se reflete na reduzida capacidade contrátil, seja em condições basais, em resposta à angiotensina II ou ao inibidor de ROCK, como evidenciado no ensaio de contração em gel de colágeno. Em síntese, os dados deste trabalho mostram que CRP3 está presente nas adesões focais, regulando tamanho e sinalização, com reflexos na rigidez (viscoelasticidade) e capacidade contrátil, variáveis fundamentais ao correto funcionamento de células musculares lisas aórticas. Em conjunto, as evidências deste trabalho suportam a hipótese de que CRP3 é um modulador de contratilidade e mecanotransdução em células musculares lisas aórticas.

Descritores: Aorta, Adesões focais, Citoesqueleto de actina, Músculo liso, Mecanotransdução celular, Transdução de sinais.

ABSTRACT

Ribeiro-Silva JC. *Role of the cysteine and glycine-rich protein 3 (CRP3) in the mechanotransduction of aortic smooth muscle cells* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo", 2019.

Smooth muscle cells act also as mecanosensors of the cardiovascular system, coordinating blood pressure and tissue perfusion by means of vascular tone and diameter modulation via the contractile response. The trigger for contraction is a rise in the intracellular calcium concentration and several signaling pathways have been described to sustain the initial calcium signal. Recent evidences highlight the crucial role of focal adhesions to the contractile response, given its role in actin cytoskeleton assembly and engagement with the actomyosin contractile apparatus. We have demonstrated that the cysteine and glycine-rich protein-3 (CRP3) interacts with focal adhesion kinase (FAK) in response to increased hemodynamic stress. Additionally, it has also been shown that CRP3 modulates actin cytoskeleton dynamics. Here, we tested the hypothesis that CRP3 acts as a focal adhesion protein that regulates the contraction of aortic smooth muscle cells. Through colocalization and immunoprecipitation studies we found that CRP3 is a focal adhesion protein in aortic smooth muscle cells. Focal adhesion mean size evaluation showed that in the baseline, CRP3 KO smooth muscle cells display greater focal adhesion size. However, upon angiotensin II (a contraction-triggering molecule) stimulation, CRP3 KO cells fail to maturate focal adhesions, an event that might be related to the reduced protein levels of FAK, paxillin, and MLC2 (key signaling molecules involved in focal adhesion maturation) observed in KO cells. Consistent with the greater mean focal adhesion size, CRP3 KO cells exhibited increased stiffness and therefore, reduced viscoelasticity when compared to wild type cells. The reduced viscoelasticity of KO cells seems to influence cell contractility, as CRP3 KO cells also displayed reduced contractile response in the baseline and in response to angiotensin II. In summary, these data showed that CRP3 is present at focal adhesions, regulating their size and signaling. Thus, CRP3 at focal adhesions influences cell stiffness and contractile capacity, which are key features of smooth muscle cell physiology. Altogether, our findings support the idea that CRP3 is a key modifier of contractility and mechanotransduction in aortic smooth muscle cells.

Keywords: Aorta, Focal adhesions, Actin cytoskeleton, Smooth muscle, Cellular mechanotransduction, Signal transduction.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Células musculares lisas, situadas na camada média de veias e artérias, podem ser consideradas mecanossensores do sistema cardiovascular, e através da modulação do tônus e do diâmetro vascular, influenciam a pressão sanguínea e regulam a perfusão tecidual (1). São células inerentemente plásticas, nunca assumindo um fenótipo terminal. Ao invés disso, o fenótipo é adotado em concordância com os sinais do meio em que estão inseridas, seja no estiramento e requerimentos funcionais, como no reparo após a lesão vascular e a manutenção da pressão sanguínea (2,3) (Figura 1).

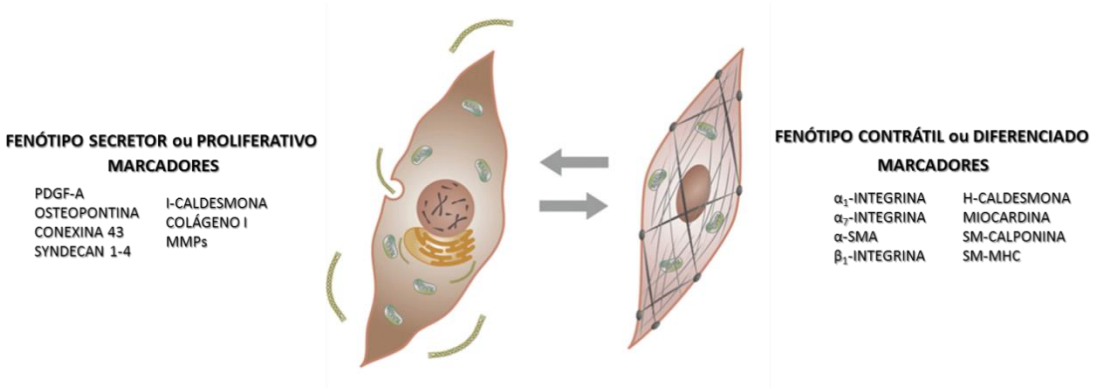


Figura 1. Comutação fenotípica de células musculares lisas e seus marcadores. À esquerda, representa-se o fenótipo secretor, observado durante o desenvolvimento e nos estágios de reparo à lesão vascular. Já a célula representada à direita ilustra o fenótipo contrátil ou diferenciado. As setas indicam a capacidade de interconversão entre os fenótipos. Adaptado de (4).

A plasticidade fenotípica de células musculares lisas é controlada pela atividade do fator de resposta ao soro (SRF), um fator de transcrição da família MADS (MCM1, *Agamous*, *Deficiens* e SRF) que reconhece e se liga à sequência consenso CArG [CC(A/T-rich)$_6$GG] presente no promotor de genes como α-actina (SM α-actina) e cadeia pesada de miosina (MYH11) de músculo liso (5). A especificidade de resposta do SRF é determinada por dois programas distintos de expressão gênica (Figura 2) (2,5). A interação nuclear entre SRF e Elk-1, por exemplo, promove a expressão de

genes precoces imediatos relacionados ao crescimento, como Fos/c-Fos, conferindo às células musculares lisas um "fenótipo proliferativo ou secretor", observado durante a formação e maturação da árvore arterial e durante o reparo à lesão vascular (6).

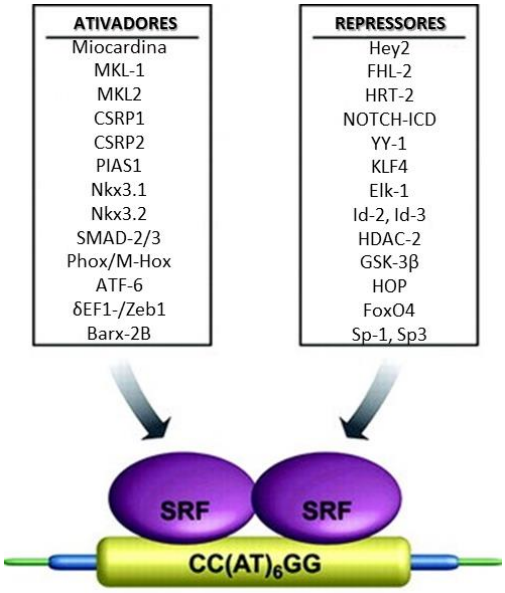


Figura 2. A interação de SRF com sequências CArG nos promotores e os fatores que ativam e suprimem a expressão de genes de diferenciação de células musculares lisas. Fatores como a miocardina desempenham papel na promoção à interação de dímeros SRF com sequências CArG de promotores de genes de fenótipo contrátil e do citoesqueleto, induzindo o recrutamento de RNA polimerase II e a expressão gênica. Em contraste, KLF4, Elk-1 e Herp1 reprimem a expressão de genes de diferenciação de células musculares lisas pela ruptura na interação miocardina-SRF-CArG.

Já a interação de SRF com miocardina e os fatores de transcrição relacionados à miocardina (MKLs) promove o "fenótipo contrátil" (7,8), evidenciado nas células de vasos maduros e que é marcado pela expressão de isoformas músculo liso-específicas de proteínas como α-actina, cadeias leve e pesada de miosina, e h1-calponina (9–14), ao longo da expressão de um amplo leque de proteínas regulatórias de contratilidade, dentre elas: SM22α, h-caldesmona, β-vinculina, metavinculina, telokina, smoothelina, a proteína ligante em lipoma (LPP) e desmina (15–23). Esse fenótipo permite às células musculares lisas gerarem, de maneira anisotrópica, o tônus vascular que contrabalanceia

as tensões radial, axial e circunferencial oriundas da pressão de pulso através de uma resposta contrátil (24,25).

A maquinaria contrátil de células musculares lisas aórticas é formada pela integração entre actina e miosina, na vigência de um citoesqueleto em alto nível organizacional. Os filamentos finos são formados, principalmente, pela oligomerização de moléculas da isoforma músculo liso específica de actina (SM α-actina), enquanto os filamentos espessos são compostos por dímeros de cadeia pesada de miosina (MHC) de músculo liso (MYH11) e quatro cadeias leves: duas cadeias essenciais (ELC) e duas cadeias regulatórias (MLC). Filamentos finos e espessos se reúnem, formando o aparato de actomiosina, cuja ciclagem é responsável pelo desenvolvimento de tensão no citoesqueleto e encurtamento da célula muscular lisa, eventos que caracterizam a contração (25–27) (Figura 3).

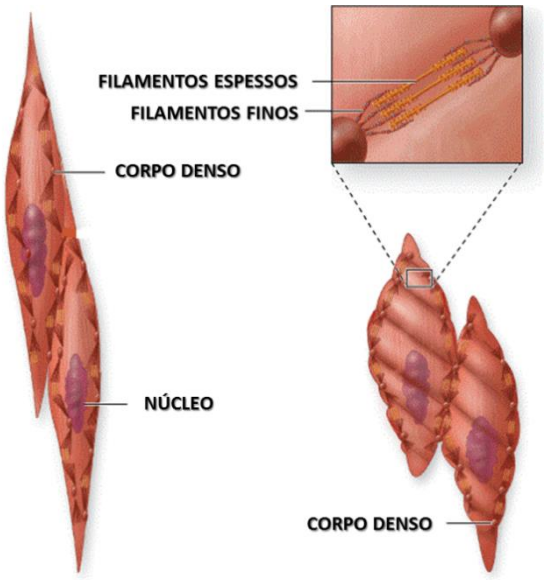


Figura 3. A contração de células musculares lisas. Células musculares lisas apresentam filamentos finos (baseados em actina) e filamentos espessos (baseados em miosina). A junção entre estes filamentos resulta na formação do aparato de actomiosina, responsável pelo desenvolvimento de tensão no citoesqueleto e a contração, caracterizada pelo encurtamento celular. Corpos densos ancoram os filamentos finos. Adaptado de (28).

Como todas as células musculares, o gatilho à contração do músculo liso aórtico é o aumento na concentração intracelular de cálcio $[Ca^{+2}]_i$ (29), que se dá através de fatores mecânicos, humorais e estímulos neurais (30,31). A $[Ca^{+2}]_i$ não só determina o perfil de contratilidade, como afeta a atividade de vários fatores de transcrição cálcio-dependentes e que, portanto, determinam o fenótipo de células musculares lisas (32). A fim de modular as várias funções dependentes de Ca^{+2} e em resposta a diferentes estímulos, o músculo liso vascular utiliza uma variedade de canais de Ca^{+2} presentes tanto na membrana como no retículo sarcoplasmático (SR), produzindo um grande repertório de sinais de Ca^{+2} que diferem em sua distribuição espacial e temporal (33). Esses sinais variam desde mudanças globais na $[Ca^{+2}]_i$ a eventos de entrada ou liberação de Ca^{+2} altamente localizados. A elevação na $[Ca^{+2}]_i$ pode ocorrer a partir do meio extracelular ou pela liberação do maior depósito intracelular, o retículo sarcoplasmático (SR). O influxo de Ca^{+2} extracelular é mediado, principalmente, pela abertura de canais de Ca^{+2} tipo L dependentes de voltagem (LTCC), mas há vários outros canais que modulam a $[Ca^{+2}]_i$, incluindo os canais iônicos receptores de potencial transitório (TRP). Devido à sua alta condutância e expressão em células musculares lisas, os LTCCs têm a maior influência na $[Ca^{+2}]_i$ global, e sua atividade determina em grande parte o estado contrátil de células musculares lisas (29,34). Já a liberação de cálcio dos estoques intracelulares se dá através da interação de agonistas com seus receptores acoplados à fosfolipase C que, por meio de seus segundos mensageiros, ativam os receptores de IP_3 ou os receptores de rianodina (RyR) no retículo sarcoplasmático (35).

O cálcio – quer seja do meio intracelular ou do meio extracelular – se liga à calmodulina, que se associa à quinase da cadeia leve de miosina (MLCK). Esta associação gera mudanças conformacionais em MLCK (36), que sai do estado inativo para o estado ativo, agora capaz de fosforilar o resíduo de serina 19 na cadeia

regulatória da miosina (MLC), ativando o domínio motor da cadeia pesada da miosina e por fim, levando à contração (36–38) (Figura 4).

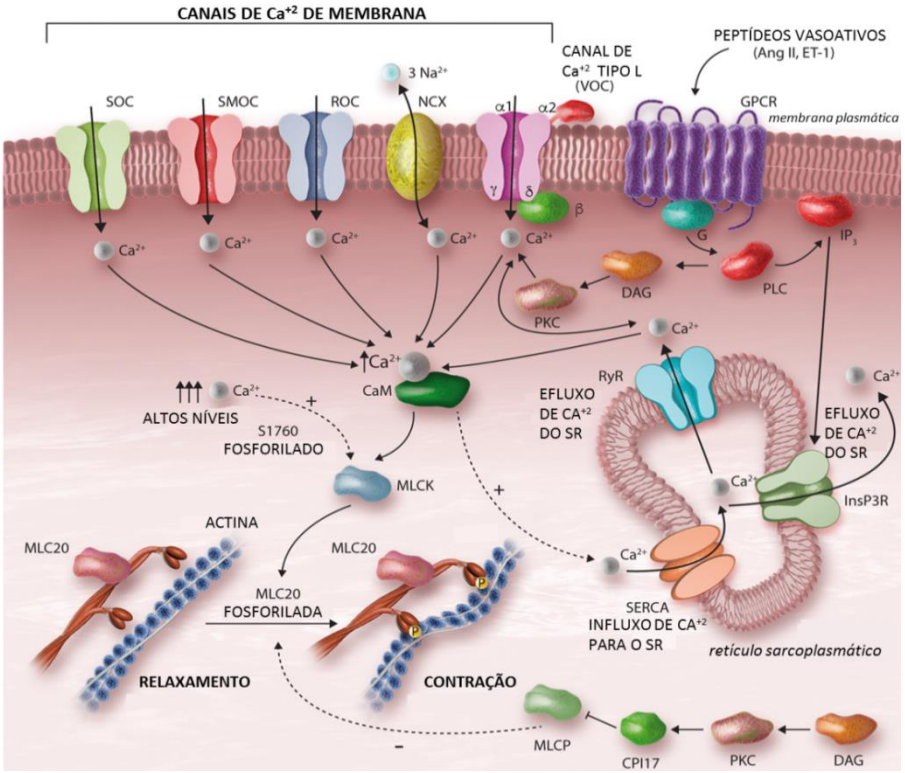


Figura 4. Representação esquemática dos mecanismos moleculares envolvidos na resposta contrátil de células musculares lisas. O aumento na [Ca+2]i se dá principalmente através da abertura de canais de cálcio controlados por voltagem (VOC) ou pela liberação do retículo sarcoplasmático derivada da ativação de receptores acoplados à proteína Gαq/11, com subsequente geração de trifosfato de inositol (IP3). A cadeia regulatória da miosina II (MLC) é então fosforilada pela quinase de MLC ativada por Ca+2/calmodulina (MLCK), que por sua vez, aumenta as interações entre actina e miosina e a contração. Adaptado de (35).

Adicionalmente aos mecanismos cálcio-dependentes, mecanismos cálcio-independentes também regulam a contração de músculo liso vascular através da sensibilização da cadeia regulatória da miosina ao cálcio. Este processo sustenta a geração de força que sucede a dissipação do sinal inicial de cálcio. Duas vias principais de sinalização foram evidenciadas neste fenômeno, incluindo a via diacilglicerol-fosfolipase C-proteína quinase C e a via RhoA-Rho quinase (ROCK) (39). A hidrólise de 4,5-bifosfato de inositol (PIP2) por fosfolipase C gera trifosfato de inositol (IP_3) e

diacilglicerol (DAG). Como mencionado, IP_3 estimula a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático (31,40). Diacilglicerol, por sua vez, ativa a proteína quinase C (PKC) e o inibidor de proteína fosfatase 1 potencializado por PKC de 17 kDa (CPI-17). PKC ativada induz a fosforilação de alvos *downstream*, como canais iônicos, transportadores e proteínas nucleares. PKC ainda fosforila CPI-17, inibidor músculo-liso específico de fosfatase de cadeia regulatória de miosina (MLCP) que, através da ligação ao domínio catalítico de MLCP, inibe sua atividade de fosfatase, facilitando a persistência da resposta contrátil. A isoforma α de PKC também induz a fosforilação de proteínas ligadoras de actina, como calponina e de calmodulina, que promovem a interação actina-miosina (41,42).

Outra via de sinalização envolvida na sensibilização cálcica engloba as serina/treonina quinases ROCK 1 e ROCK 2, que agem como efetoras da pequena GTPase RhoA, que é abundantemente expressa em células musculares lisas e rapidamente ativada por vasoconstritores, como a angiotensina II (40,43) (Figura 5). Dois mecanismos dependentes de ROCK são descritos: o estímulo à fosforilação da subunidade 1 da miosina fosfatase (MYPT1) nos resíduos de treonina 695 ou 853 (44,45); a fosforilação de ZIPK, que estimula a fosforilação de MYPT1 nos resíduos de treonina 696 e treonina 18/serina 19. A fosforilação de MYPT1 interfere na interação de MLCP com MLC, reduzindo sua atividade de fosfatase e prolongando a resposta contrátil (46).

Apesar dos eventos de fosforilação de MLC serem necessários ao início da geração de força, estudos identificaram o requerimento de outros componentes do citoesqueleto para a geração de força em células musculares lisas vasculares. Neste modelo, o aparato de actina-miosina é relativamente estável e amplamente responsável pelo *pool* estável de filamentos de actina encontrado nas células. O estímulo contrátil

estimularia a formação de complexos de interação matriz extracelular–citoesqueleto, as adesões focais, que então seriam responsáveis pela organização da rede filamentosa de actina submembranar e seu engajamento subsequente com o aparato contrátil que culmina no ciclo de formação de pontes cruzadas entre actina e miosina (47–49).

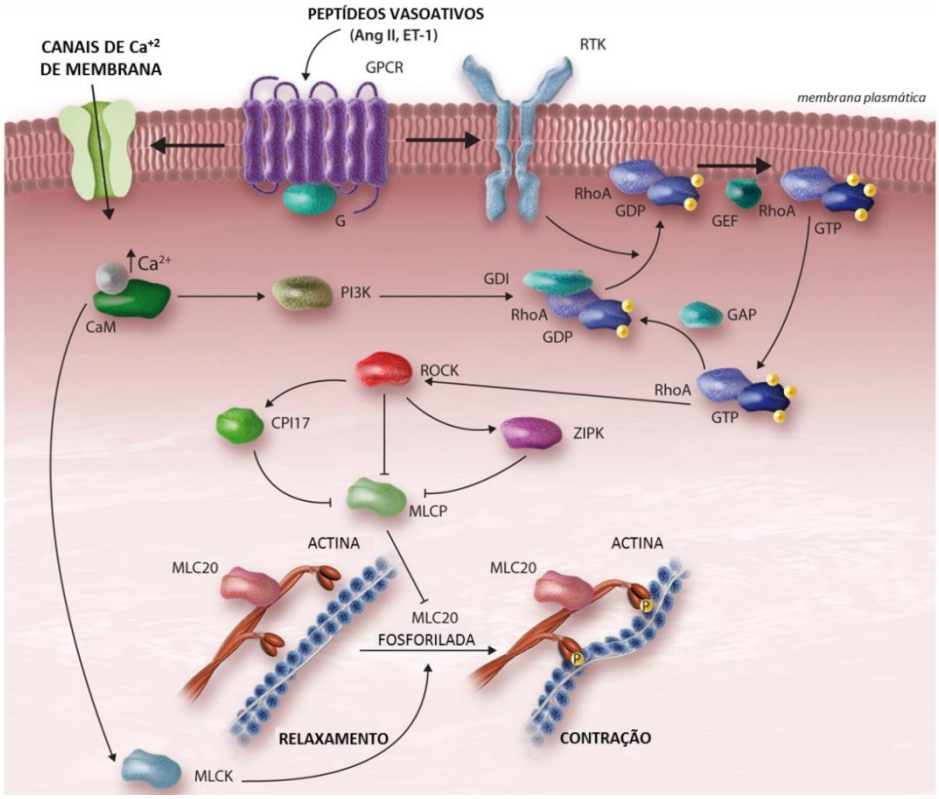


Figura 5. Papel de ROCK na contração de células musculares lisas. A ativação de receptores acoplados à proteína G (GPCRs) libera RhoA de um estado de associação com um inibidor de dissociação de nucleotídeo de guanina (GDI). RhoA se transloca para a membrana, onde trocadores de nucleotídeos de guanina (GEFs) substituem guanina difosfato para uma guanina trifosfato, ativando a via RhoA-ROCK. ROCK ativada leva à inativação de MLCP através da fosforilação de CPI-17 e ou de ZIPK, facilitando a fosforilação de MLC e a contração vascular. Altas concentrações de cálcio também podem ativar ROCK diretamente por vias de sinalização dependentes da quinase de 4,5-bifosfato de fosfatidilinositol (PI3K). Adaptado de (34).

As adesões focais constituem o elo entre a matriz extracelular e o citoesqueleto de actina (49). São estruturas que refletem a maturação dos contatos adesivos celulares, que se localizam nas porções finais dos feixes de actina ou fibras de estresse e possuem papel como sítio de geração de forças em células contráteis (Figura 6). Ao se definir um padrão hierárquico molecular, nota-se que adesões focais são formadas por três

camadas: a camada de sinalização de integrinas, a camada de detecção de força e a camada regulatória de actina (Figura 7) (50). A primeira camada (camada de sinalização de integrinas) é fundamentalmente composta pela matriz extracelular em sua interação com as pontes proteicas, as integrinas. Integrinas são heterodímeros formados por subunidades α e β, que se ligam a motivos específicos presentes na fibronectina, no colágeno e em outras proteínas da matriz extracelular (51). Essa interação descobre suas caudas citoplasmáticas curtas, promovendo a ligação de proteínas que amplificam os sinais derivados do microambiente celular, como a quinase de adesão focal (FAK), que fosforila a quinase ligada às integrinas (ILK) e paxilina no resíduo de tirosina 118, a fim de reforçar a estrutura das adesões focais (52).

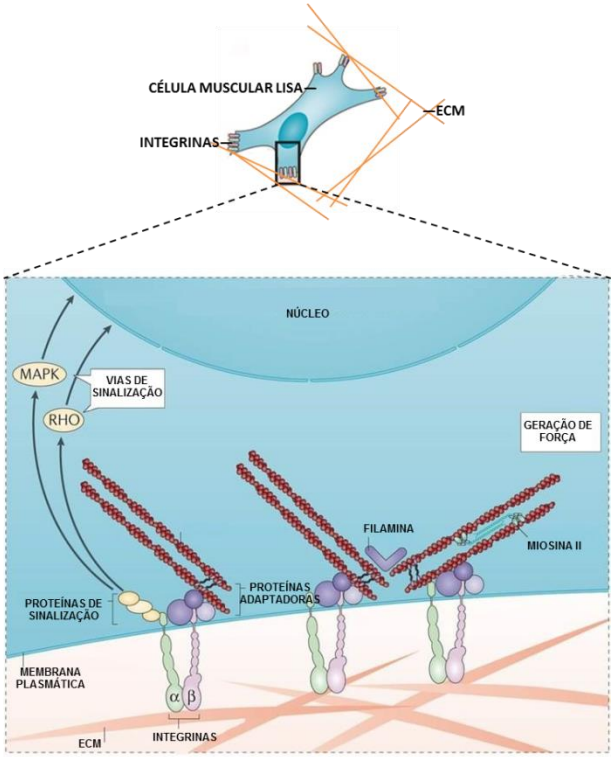


Figura 6. Esquema representando uma célula muscular lisa embebida na matriz extracelular (ECM), constituída, principalmente, por fibras elásticas, fibras colágenas, fibronectina e glicosaminoglicanos. A visão expandida mostra os contatos célula-matriz (adesões focais) estabelecidos por meio de pontes proteicas – integrinas. As integrinas interagem com a matriz extracelular e com moléculas sinalizadoras no meio intracelular, como FAK e paxilina. Essas, por sua vez, são conectadas fisicamente ao citoesqueleto de actina por meio das proteínas adaptadoras (vinculina, talina e o complexo proteico formado por ILK, PINCH e parvina). As principais vias de sinalização ativada por integrinas incluem a via da proteína quinase associada à RhoA (ROCK) e a via do complexo das proteínas quinase ativadas por mitógeno (MAPK). Adaptado de (50).

Na região intermediária (a *camada de detecção de força*) o citoesqueleto de actina é conectado às integrinas através da talina, que se liga à vinculina quando deformada por tensão (51). Associadas de forma mais íntima ao citoesqueleto de actina estão as suas inúmeras proteínas regulatórias, como a fosfoproteína ativada por vasodilatador (VASP), zixina e α-actinina na *camada regulatória de actina* (52–54).

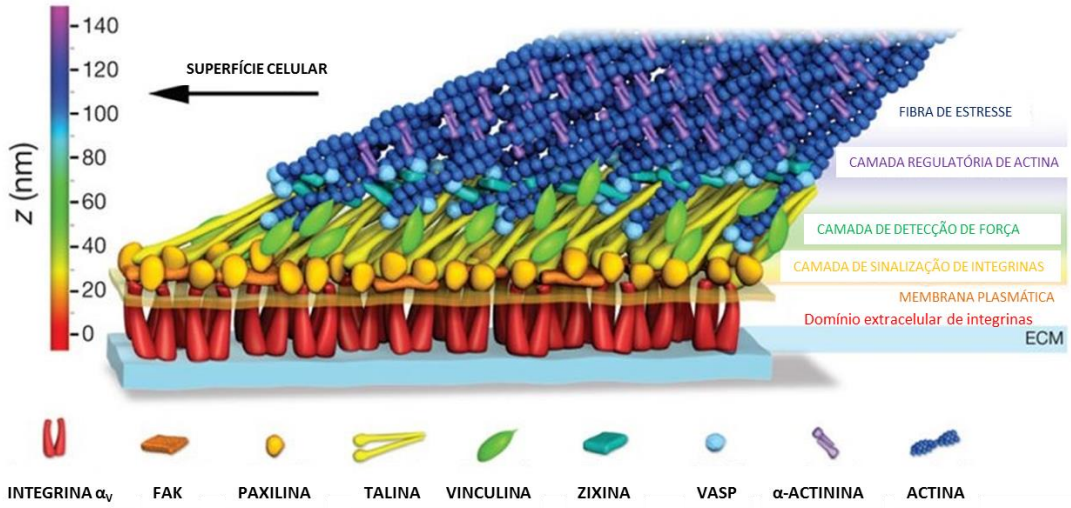


Figura 7. Arquitetura de adesões focais em nanoescala. Verifica-se integrinas ligadas à matriz extracelular por meio de seus domínios extracelulares e interagindo com FAK e paxilina, formando a camada de sinalização de integrinas. Na região medial, evidencia-se a presença de vinculina e talina compondo a camada de detecção de força, responsável por promover o contato inicial das fibras de actina com a cauda citoplasmática das integrinas. Distal à membrana, encontram-se zixina, VASP e α-actinina, proteínas regulatórias de actina. A escala z demonstra a distância em nanômetros das três camadas em relação à membrana plasmática. Adaptado de (52).

Estudos demonstram que as proteínas da camada regulatória de actina zixina e α-actinina interagem com a proteína rica em cisteína e glicina 3 (CRP3) em células de músculo estriado a fim de promover a organização do citoesqueleto (55). CRP3 é o terceiro membro da família de proteínas ricas em cisteína e glicina (CRP), conservadas evolutiva e funcionalmente (57). Estruturalmente, essas proteínas exibem dois domínios LIM, regiões ricas em glicina e um sinal de localização nuclear (58). Desde a sua descrição inicial, a determinação da localização e interação com outras proteínas tem

sido parte integral da caracterização do papel intracelular de CRP3, o que culminou na descoberta da participação de CRP3 em uma série de processos fisiológicos. No núcleo, CRP3 atua como potencializador da miogênese através da interação com os fatores de transcrição MyoD e miogenina (57) e promotor de sobrevivência celular na presença de estímulo mecânico através da interação com Miz-1 (58). Por intermédio de estudos realizados com amostras humanas com mutações de CRP3 e amostras de animais CRP3 *knockout* (CRP3 KO), verificou-se que CRP3 é crítico à manutenção da estrutura de células cardíacas, dada a perturbação da citoarquitetura e o desarranjo cardíaco observado nessas amostras (59–61). Acredita-se que esse efeito seja, primariamente, mediado por sua localização e interação proteica nos discos Z, onde CRP3 forneceria uma plataforma à formação de complexos macromoleculares envolvendo o citoesqueleto de actina. Neste sentido, foi caracterizado o papel de CRP3 na dinâmica do citoesqueleto de actina. Papalouka *et al.* demonstraram que CRP3 interage com a proteína músculo-específica de despolimerização de actina – cofilina-2 (CFL2) e a estequiometria dessas proteínas mostrou-se ser de profundos efeitos na dinâmica do citoesqueleto de actina, onde mudanças na taxa CRP3/CFL2 resultaram tanto em aumento quanto em supressão dos efeitos mediados por CFL2 na despolimerização do citoesqueleto de actina (62). Em consonância com este achado, Hoffmann *et al*. demonstrou que CRP3 liga, estabiliza e reticula filamentos de actina em feixes (63).

Além de seu papel estrutural, sugere-se que CRP3 participa da sinalização iniciada por estiramento celular e, portanto, da mecanotransdução. O disco Z ancora as extremidades dos filamentos de actina e através disso, intermedeia a transmissão de força de um sarcômero a outro, o que, por fim, chega às porções finais do cardiomiócitos (64,65). As grandes proteínas nebulina, obscurina e titina são exemplos de mecanossensores em cardiomiócitos e postula-se que CRP3 esteja envolvido nas vias

de sinalização mediadas por tais proteínas, uma vez que cardiomiócitos de animais CRP3 KO apresentam defeitos intrínsecos na resposta ao estiramento por disfunção na detecção de estiramento passivo (59,60). O mecanismo de propagação de sinal por CRP3 é incerto, mas suas modificações pós-traducionais (acetilação no resíduo de lisina 69 e fosforilação em diversos sítios) têm sido consideradas como fundamentais nesse processo (66,67). Os costâmeros possuem crítica atuação na transmissão de força bidirecional (do sarcômero para o sarcolema e para a matriz extracelular), mantendo a integridade mecânica do sarcolema e mecanicamente orquestrando sinais para modulação de tamanho e contração de miofibrilas (68–70) e a interação de CRP3 com as proteínas desta estrutura (zixina e β1-espectrina) (55,71) explica, em parte, sua função na mecanotransdução cardíaca.

Em células musculares lisas, o nosso laboratório demonstrou expressão constitutiva de CRP3 em artéria mamária e ausência de expressão em veia safena. Em resposta à arterialização venosa, um processo onde uma veia é submetida ao regime arterial de alta pressão e fluxo pulsátil, ocorre indução à expressão de CRP3, de forma dependente do aumento no estiramento de células musculares lisas (72). A fim de melhor elucidar o papel de CRP3 neste processo, foi gerado um rato CRP3 KO, cujo *background* serviu à aplicação de um modelo de arterialização *in vivo*, onde uma anastomose da artéria carótida com a veia jugular foi realizada. Verificou-se que, quando comparados aos ratos selvagens, ratos CRP3 KO demonstraram maior remodelamento, uma resposta atribuída à ausência de eventos apoptóticos observados em ratos selvagens nos estágios precoces da arterialização venosa (73,74). Observou-se também que esta proteção à apoptose se mantinha em células musculares lisas de jugular em cultura submetidas ao estiramento associado ao tratamento com ceramida, estratégia utilizada para mimetizar a arterialização e induzir apoptose, respectivamente.

A análise do eixo de sinalização β_1-integrina-FAK-AKT que coordena morte e sobrevivência celular em resposta a estímulos mecânicos apresentou alteração de resposta nas células que não expressam CRP3. Em células de músculo liso de veia jugular selvagem (Figura 8A), a apoptose ocorreu por diminuição da ativação da via β_1-integrina-FAK-AKT, levando ao aumento de Bax, responsável pela liberação de fatores pró-apoptóticos (como citocromo c) e morte celular. Já em células de veia jugular CRP3 KO (Figura 8B) essa via permaneceu ativada, sem diminuição no perfil de fosforilação de FAK e AKT, e, portanto, sem ativação de via apoptótica mitocondrial.

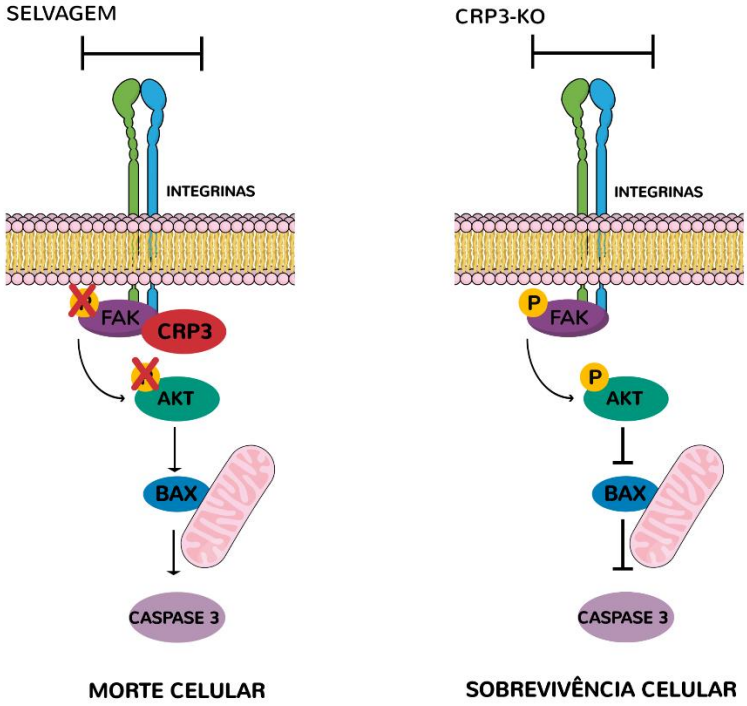


Figura 8. Vias de sinalização intracelular de controle da resposta de sobrevivência e morte celular. A ceramida associada ao estiramento, leva à diminuição de pFAK e pAKT, culminando no aumento da expressão de Bax e clivagem de caspase-3, o que leva à apoptose (A). Células CRP3 KO demonstram uma ruptura nessa via, favorecendo, portanto, a sobrevivência celular (B).

Através de imunoprecipitação, demonstramos que CRP3 interage com a quinase de adesão focal (FAK), o que explica a ativação desregulada em células musculares lisas CRP3 KO (74). Estes achados associados com os indícios de participação de CRP3

na dinâmica no citoesqueleto de actina (62,63) sugerem que CRP3 participaria do acoplamento de sinais mecânicos com o citoesqueleto de actina nas adesões focais. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi testar a hipótese de que a proteína rica em cisteína e glicina 3 (CRP3) atua como uma proteína de adesão focal que regula as propriedades contráteis de células musculares lisas aórticas.

2. OBJETIVO

2. OBJETIVO

O objetivo desta dissertação foi testar a hipótese de que a proteína rica em cisteína e glicina 3 (CRP3) atua como uma proteína de adesão focal que regula as propriedades contráteis de células musculares lisas aórticas.

3. MÉTODOS

3. MÉTODOS

3.1 Obtenção de aortas para extração de célula musculares lisas

Ratos selvagens e nocautes para CRP3 (KO, *background*: wistar) obtidos do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pesando entre 250 e 350 g e com três meses de idade foram utilizados para a obtenção de aortas neste trabalho. Para esta finalidade, os ratos foram eutanasiados por injeção letal de anestésico (pentobarbital) e, em seguida, as aortas foram removidas, dissecadas e mantidas em PBS (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na_2HPO_4 10 mM; KH_2PO_4 2 mM; pH 7,4) contendo antibiótico/antimicótico 100 U/ml até o processamento em ambiente de cultivo celular. Este protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto do Coração (SDC: 3299/09/050; CAPPesq 0824/09;) e todos os procedimentos realizados estiveram de acordo com as normas institucionais de cuidado e utilização de animais de laboratório.

3.2 Cultura primária de células musculares lisas aórticas

A técnica de *explant* foi utilizada para a obtenção de células musculares lisas de aorta de rato, como estabelecido no laboratório (72,74). Após a remoção do tecido conjuntivo da face externa, as aortas foram abertas longitudinalmente e, com o auxílio de uma pinça, a camada endotelial foi removida. Os vasos foram cortados em fragmentos de aproximadamente 0,5 cm² e transferidos para placas de seis poços previamente tratadas com gelatina porcina a 3 % e contendo 1 ml de meio basal (DMEM *high glucose* suplementado com 20 % de soro fetal bovino (FBS) inativado), 100 μl/ml de estreptomicina e 100 U/ml de penicilina, sendo que a face luminal foi colocada em contato com a gelatina. Após a incubação por 5 min no fluxo laminar para aderência dos fragmentos, as placas foram mantidas por uma semana em estufa de 37

°C, com atmosfera umedecida e enriquecida com 5 % de CO_2. O período de manutenção das placas na estufa teve por objetivo garantir a adesão definitiva dos fragmentos, bem como o início da migração e proliferação das células em resposta à presença de soro no meio de cultura. Após esse período, o meio de cultura foi substituído em dias alternados por aproximadamente duas semanas, quando já havia um número de células suficientes para a remoção dos fragmentos e ampliação da cultura através da exposição à solução de tripsina/EDTA, seguida da transferência para garrafas de 75 cm². As garrafas foram mantidas em cultura até a formação de monocamada, quando as culturas foram devidamente ampliadas e semeadas para os ensaios. Respeitou-se um limite de seis passagens para cada linhagem celular.

3.3 Transfecção de células musculares lisas aórticas

Câmaras de cultivo de oito poços (*Culture Slides*, Falcon - Corning) foram utilizadas para o plaqueamento de 1 x 10^4 células em meio basal. No dia seguinte, o meio basal foi removido e as células foram transfectadas com 500 ng de DNA plasmidial codificante de CRP3 marcado com GFP na porção C-terminal, em associação com lipofectamina 3000 e em meio OPTEM ® (Lonza), de acordo com as instruções do fabricante. Após 4 h, o meio de transfecção foi substituído por meio basal. Com base em testes prévios, determinou-se 48 h como tempo ótimo de expressão da proteína recombinante e, portanto, 48 h após a transfecção as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 30 min à temperatura ambiente. Posteriormente, as câmaras foram lavadas e armazenadas com PBS a 4 °C para a realização de imunofluorescência.

3.4 Obtenção de extrato proteico de células musculares lisas aórticas

Placas de cultivo de 60 mm previamente tratadas com 3 % de gelatina foram utilizadas para o plaqueamento de 4×10^5 células em meio basal. Para as análises basais, as células foram privadas de soro por 24 h (meio *DMEM high glucose* suplementado com 0,1 % de FBS), lavadas com PBS e lisadas com tampão RIPA (NaCl 150 mM; 0,5 % desóxicolato de sódio; 1 % Triton ®; Tris-HCl 50 mM; 0,1 % SDS; inibidores de fosfatases e proteases 1:300 v/v; PMSF 1:1000 v/v; pH 8). Nos experimentos indicados, no dia que sucedeu a privação de soro, as células foram estimuladas com angiotensina II (Sigma, 1 µM) ou inibidor de ROCK (iROCK, 5 µM, Sigma Y27632) por 2,5 min, lavadas com PBS e lisadas com tampão RIPA. Para a obtenção de extratos para a imunoprecipitação, células selvagens foram plaqueadas à densidade de 1×10^6 em placas de 100 mm em meio basal, privadas de soro por 24 h e lisadas com tampão RIPA.

3.5 Determinação da concentração de proteínas

As amostras proteicas foram centrifugadas a 14000 RPM por 15 min em centrifuga refrigerada a 4 °C para remoção de debris. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e uma alíquota foi retirada para a dosagem de proteínas. A determinação da concentração proteica dos extratos foi feita através do método de Pierce (75), que consiste na combinação entre a "reação de biureto" de redução de Cu^{+2} a Cu^{+} na presença de proteína em meio alcalino e a detecção colorimétrica do cátion Cu^{+} através de um reagente contendo ácido bicinconínico. Como resultado dessa combinação, um produto arroxeado é formado, de absorção máxima de 562 nm, cuja leitura foi feita em um espectrofotômetro *Wallac Victor²* (Perkin Elmer).

3.6 Imunoprecipitação

Na imunoprecipitação, um anticorpo ligado a microesferas magnéticas foi utilizado para precipitar o antígeno (76). Para esta finalidade, alíquotas de 1 mg de proteínas obtidas de células selvagens foram incubadas a 4 °C sob agitação, por 16 h com os anticorpos primários descritos na tabela 1 (1 µg de anticorpo para cada 100 µg de proteína). Após este período, microesferas de agarose adsorvidas por proteína G (*Dynabeads® Protein G*, Invitrogen) previamente lavadas com PBS foram acrescentadas e novamente as amostras foram incubadas por 16 h a 4 °C, sob agitação. No dia seguinte, com o auxílio de uma estante magnética, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo (para confirmar a imunoprecipitação posteriormente), as microesferas foram lavadas três vezes com tampão RIPA por 5 min à temperatura ambiente em agitação baixa no vortéx, e as proteínas foram eluídas com tampão de amostra para eletroforese (Tris-HCl 200 mM; 40 % Glicerol; 2 % SDS, DTT 200 mM, 1 % azul de bromofenol, pH 6.8).

Tabela 1. Anticorpos utilizados para imunoprecipitação de proteínas de adesão focal.

PROTEÍNA-ALVO	FORNECEDOR	CATÁLOGO
FAK	Cell Signaling Technology	#3285
ILK	Abcam	ab52480
Paxilina	Abcam	ab32084
Vinculina	Santa Cruz Biotechnology	sc-7649
Zixina	Abcam	ab71842

3.7 Eletroforese em gel poliacrilamida-SDS para proteína

Alíquotas dos extratos proteicos obtidos ou dos anticorpos utilizados na imunoprecipitação foram ressuspendidas em tampão de amostra para eletroforese, fervidas a 95 °C por 10 min e submetidas à eletroforese vertical em gel de

poliacrilamida-SDS. De forma a acompanhar a corrida e determinar o peso molecular aproximado das proteínas, 10 µl de padrão de peso molecular (*Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Standards*, Bio-Rad) correram em paralelo. A corrida eletroforética foi realizada de acordo com Laemmli (77), onde géis de corrida e de empilhamento à espessura de 1,5 mm foram utilizados. As amostras foram aplicadas nos poços do gel contendo tampão de eletroforese (Tris-base 25 mM pH 7,4; Glicina 192 mM) e a corrida foi iniciada (100 V até as amostras deixarem o gel de empilhamento; 120 V até o fim da corrida). A corrida foi interrompida quando as amostras atingiram o limite inferior do gel.

3.8 *Immunoblotting*

Após a eletroforese, as proteínas contidas no gel foram transferidas para uma membrana de PVDF (*Amersham™ Hybond™*, GE Healthcare). Para isso, a membrana foi hidratada com metanol 100 % por 1 min, lavada com tampão TBS-T (Tris-HCl 50 mM; NaCl 150 mM; 0,1 % Tween-20) e equilibrada em tampão de transferência (Tris-base 25 mM; glicina 192 mM; 20 % metanol). A transferência ocorreu através de um sistema sanduíche-símile imerso em tampão de transferência, sobre o qual uma corrente de 90 V foi aplicada por duas horas a 4 °C. Imediatamente após a transferência, a membrana foi colocada em solução de bloqueio de ligações inespecíficas (Tris-HCl 50 mM; NaCl 150 mM; 0,1 % Tween-20; 5 % albumina sérica bovina) e incubada por 1 hora à temperatura ambiente, sob agitação. Subsequentemente, a membrana foi incubada com a solução de anticorpo primário (Tabela 2) até o dia seguinte sob agitação a 4 °C.

Tabela 2. Especificações dos anticorpos utilizados na técnica de immunoblotting

ANTICORPO PRIMÁRIO	FORNECEDOR E CATÁLOGO	DILUIÇÃO v/v	ANTICORPO SECUNDÁRIO	DILUIÇÃO v/v
CRP3	Santa Cruz (sc-98827)	1:1000	Coelho IgG conformação-específico	1:2000
FAK	Cell Signaling (#3285)	1:1000	Coelho IgG	1:2000
GAPDH	Abcam (ab22555)	1:2000	Coelho IgG	1:2000
Paxilina	Abcam (ab32084)	1:1000	Coelho IgG	1:2000
MLC2	Cell Signaling (#8505)	1:500	Coelho IgG	1:2000

Ao final da incubação, 3 lavagens de 10 min com tampão TBS-T foram realizadas e a membrana foi incubada por 1 h à temperatura ambiente com o anticorpo secundário (Invitrogen) em solução de bloqueio. A membrana foi novamente lavada, e exposta por 1 minuto ao ECL (solução para detecção quimioluminescente: Tris 1,5 M pH 8,9; luminol 1,25 mM; ácido p-coumárico 200 µM; peróxido de hidrogênio 5,4 mM e água), seguida da visualização das bandas em fotodocumentador (*ImageQuant LAS 4000*, GE Healthcare) para análise posterior por densitometria (Image J).

3.9 Imunofluorescência e análise do tamanho médio das adesões focais

3.9.1 Imunofluorescência

Células musculares lisas aórticas foram plaqueadas à densidade de 3 x 10^3 em placas de 35 mm contendo lamínula de 20 mm^2 (In Vitro Scientific), previamente tratadas com gelatina porcina a 3 % em água ou solução de fibronectina a 50 µg/ml em solução salina balanceada de Hank (Gibco). No dia seguinte, as células foram privadas de soro (DMEM *high glucose* suplementado com 0,1 % soro) e mantidas nesta condição

por 24 h. Após este período, o meio foi removido e as células foram fixadas com solução de paraformaldeído a 4 % em PBS por 30 min.

As células contidas nas placas de 35 mm ou nas câmaras de oito poços (item 3.3) foram permeabilizadas com solução de Triton ® a 0,5 % por 5 min à temperatura ambiente, seguida da incubação com solução de anticorpo primário anti-paxilina (1:100 v/v; vide tabela 1) em 2 % de albumina bovina sérica até o dia seguinte. O anticorpo primário foi removido e as placas foram lavadas 3x com PBS. As placas foram incubadas à temperatura ambiente com solução contendo faloidina 1:300 v/v (Molecular Probes, Thermo Fischer), DAPI (1:500 v/v) e anticorpo secundário conjugado com fluoróforo (1:300, Molecular Probes, Thermo Fischer) por 1 h. As placas foram então lavadas por 3x com PBS e fixadas novamente com solução de paraformaldeído a 4 % por 5 min. Imagens das células foram adquiridas utilizando o microscópio confocal LSM 510 META Zeiss em aumento de 40 x.

3.9.2 Determinação do tamanho das adesões focais

Imagens derivadas da microscopia de fluorescência foram processadas utilizando o software Fiji Image J (versão 1.48d). A quantificação de adesões focais marcadas por paxilina foi realizada através da definição de um limite fixo para imagens em preto e branco de 8 *bits* de canal único (Figura 9). O tamanho das adesões focais foi então determinado através da função de análise de partículas, como descrito na literatura (78). Foram utilizadas três replicatas biológicas para cada genótipo (WT e KO), sendo que para cada replicata, foram analisadas de 20 a 40 células para a quantificação.

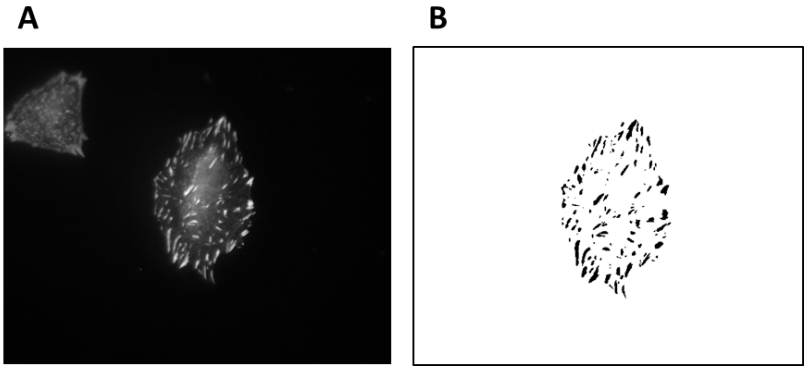


Figura 9. Tratamento das imagens para análise do tamanho das adesões focais. A. Imagem de imunofluorescência para paxilina, marcador de adesões focais, posteriormente deconvoluída (B) para a avaliação do tamanho das adesões focais via análise de partículas no software Image J.

3.10 Citometria magnético-óptica de oscilação

A técnica de citometria magnético-óptica de oscilação é uma ferramenta que permite verificar a rigidez cortical celular em função da aplicação de um torque magnético em grânulos ferromagnéticos ligados ao citoesqueleto celular (80,81) (Figura 10). A ligação ao citoesqueleto é promovida pela adsorção dos grânulos pelo tripeptídeo ácido arginilglicilaspártico (RGD), um motivo proveniente da estrutura da fibronectina, que se liga às integrinas na membrana celular, que por sua vez estão conectadas ao citoesqueleto de actina (82). O movimento dos grânulos adsorvidos em função do torque magnético é registrado, quantificado e traduzido na rigidez do córtex celular. A técnica pode ser dividida em quatro períodos: a preparação dos grânulos revestidos por RGD, a preparação das células para o ensaio, o ensaio propriamente dito e a análise dos resultados.

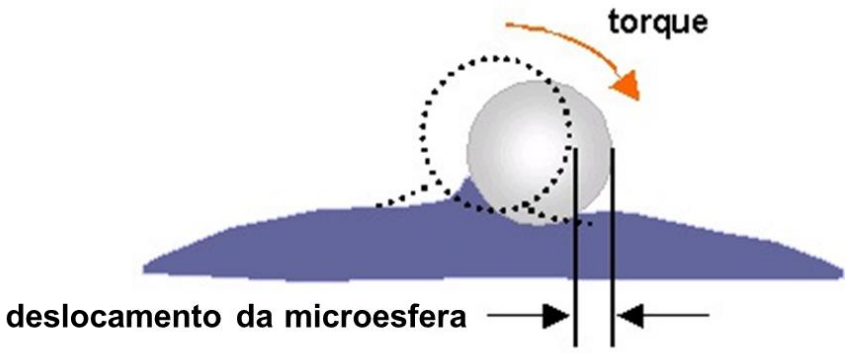


Figura 10. Representação esquemática do princípio da técnica de citometria magnético-óptica de oscilação. As células são incubadas com grânulos ferromagnéticos recobertos por RGD, que é reconhecido por integrinas no córtex celular. Ao aplicar-se um torque magnético, o deslocamento dos grânulos refletirá na rigidez cortical da célula.

3.10.1 Adsorção dos grânulos ferromagnéticos por RGD

Grânulos ferromagnéticos de 4,5 µm de diâmetro suspensos em tubos contendo solução de etanol foram obtidos no Laboratório de Microrreologia e Fisiologia Molecular do Instituto de Física da Universidade de São Paulo, onde os ensaios foram realizados. Cinco ciclos de lavagem com PBS e centrifugação foram feitos, seguidos da ressuspensão em solução tamponada de carbonato estéril a 1 mg/ml. O tripeptídeo sintético RGD foi adicionado aos grânulos e estes foram mantidos em rotação contínua em temperatura de 4 a 6 °C até o uso.

3.10.2 Preparo das células para o ensaio

As células foram ampliadas através da exposição à solução de tripsina/EDTA, seguida da contagem em câmara de Neubauer e plaqueamento à densidade de 1,5 x 10^4 células/ poço em placas de 96 poços previamente tratadas com gelatina porcina a 3 % em água. No dia seguinte, as células foram privadas de soro, os grânulos ferromagnéticos foram acrescentados à concentração de 10 µg por poço e a placa foi incubada por 20 min em estufa de 37 °C, com atmosfera umedecida e enriquecida com 5 % de CO_2. A fim de remover os grânulos frouxamente ligados, as células foram

lavadas uma vez com meio de cultura ao término do período de incubação. As análises foram realizadas no basal e mediante estimulação com angiotensina II (Sigma, 1 µM) e citocalasina D (Sigma, 2 µM).

3.10.3 A citometria magnético-óptica de oscilação

Os poços contendo as células recobertas por grânulos ferromagnéticos foram posicionados individualmente no centro de uma placa cercada por bobinas de magnetização em um microscópio invertido (Leica DMI-4000), com câmera de vídeo e dispositivo de carga acoplado (câmera CCD). Inicialmente, os grânulos foram magnetizados rapidamente no plano horizontal a 9.000 G, e então um campo magnético oscilatório (0,75 Hz) vertical de 90 G foi aplicado, levando à rotação dos grânulos que por sua vez, deformaram o citoesqueleto. O movimento dos grânulos em função da oscilação foi registrado pela câmera CCD por intermédio de fotos obtidas em aumento de 10 x.

A razão entre a Transformada de Fourier do torque aplicado (T*ω) e o deslocamento do grânulo (d*ω) definiu o módulo complexo (g*) (Equação 1), que é expresso em pascal por nanômetro (Pa/nm) e está relacionado por um fator geométrico com o módulo complexo de cisalhamento da célula. Deste valor, deriva-se: módulo elástico (g') que reflete a elasticidade do citoesqueleto adjacente, o módulo dissipativo (g''), representando a fricção ou resistência e a histerese – η (g''/g').

$$g^*(\omega) = g'(\omega) + ig''(\omega) = \frac{T^*(\omega)}{d^*(\omega)} \qquad (1)$$

3.10.4 Análise dos resultados

Cada experimento originou um documento de texto contendo as posições dos grânulos identificados, nos eixos x e y, em todas as imagens analisadas em um dado intervalo de tempo previamente estabelecido. Posteriormente, o documento de texto foi analisado utilizando um programa desenvolvido pela unidade onde o experimento foi realizado e adaptado às condições experimentais utilizadas. Nesta análise, as variáveis resultantes (G, g', g'' e η) por grânulo analisado demonstraram a rigidez das células em um dado poço.

3.11 Ensaio de contração celular em gel de colágeno

Células musculares lisas aórticas ($4x10^5$ células/disco) foram tripsinizadas, ressuspendidas em meio de cultura e adicionadas a uma solução contendo água, colágeno I (BD Biosciences), NaOH 1 N e PBS 10x. A mistura resultante foi homogeneizada, colocada em poços de placas de 24 poços (1 ml/poço) e incubada por 1 h a 37 °C para a polimerização do colágeno e formação de um disco (Figura 11). Após este período, formaram-se discos de colágeno, que foram retirados e depositados em poços de placas de 12 poços. O diâmetro dos discos foi medido nos tempos 0 e 24 h; no basal e em resposta à angiotensina II (1 µM, Sigma) e ao inibidor de ROCK (5 µM, Sigma Y27632) por meio do programa Image J. Os resultados foram expressos como a porcentagem de redução do diâmetro dos discos de colágeno em relação ao tempo 0 (100 %).

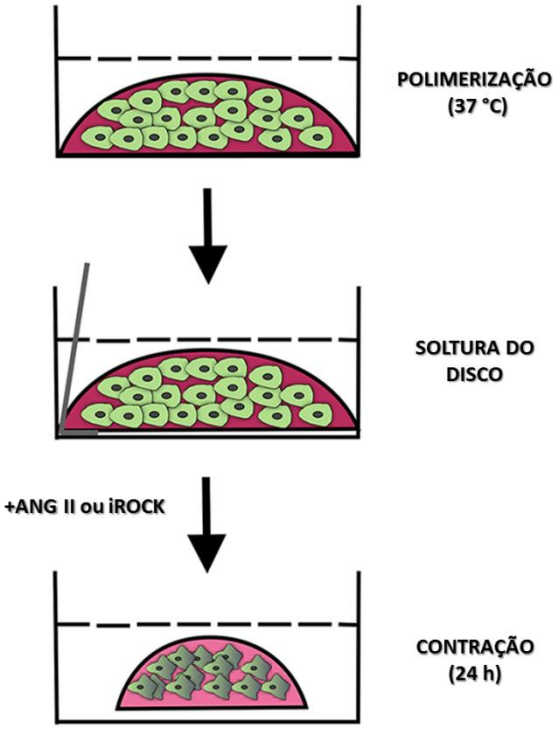


Figura 11. Representação esquemática do ensaio de contração em gel de colágeno. Células foram acrescentadas a uma solução de colágeno que polimeriza em uma matriz tridimensional após 1 h a 37 °C. O disco formado foi solto do poço e após 24 h em exposição a um estímulo, verificou-se a resposta contrátil da célula por meio da medida do diâmetro do disco 0 h versus 24 h. Adaptado de (83).

3.12 Análise estatística

Os resultados apresentados são expressos como mediana ± intervalo interquartil. Os dados foram analisados via Teste de Mann-Whitney (Software GraphPad Prism 5) e valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. O número de experimentos realizados foi representado por "*n*".

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. A proteína rica em cisteína e glicina 3 (CRP3) é uma proteína de adesão focal em células musculares lisas aórticas

A fim de averiguar se CRP3 seria parte das adesões focais, ensaios de imunoprecipitação foram realizados em extratos proteicos de células musculares lisas selvagens, utilizando anticorpos contra proteínas pertencentes às três camadas moleculares de adesões focais: i. camada de sinalização de integrinas, representada pelas proteínas FAK, ILK e paxilina; ii. camada de detecção de força, de onde pertence a proteína vinculina e iii. camada regulatória de actina, representada por zixina (Figura 12a). Após o *immunoblotting*, verificou-se recuperação positiva de CRP3 juntamente com FAK, paxilina, ILK, vinculina e zixina, demonstrando a presença de CRP3 no cerne proteico das adesões focais em células musculares lisas aórticas de forma independente da camada molecular ao qual pertence à proteína de estudo (Figura 12a).

Uma vez que a imunoprecipitação é uma técnica de detecção indireta, objetivou-se avaliar se CRP3 localizaria nas adesões focais por meio da expressão de uma versão marcada de CRP3 (CRP3-GFP) em associação com imunofluorescência para paxilina, marcador de adesões focais. Inicialmente, verificou-se marcação de CRP3 ao longo de toda a célula, com marcações mais intensas em regiões da periferia celular, que em muito recapitulam a marcação de paxilina (Figura 12b). Ao sobrepor as marcações de CRP3 (verde) e paxilina (vermelho), observa-se o surgimento de um sinal alaranjado, indicativo de colocalização das proteínas paxilina e CRP3 e, portanto, que CRP3 está localizado nas adesões focais de células musculares lisas aórticas.

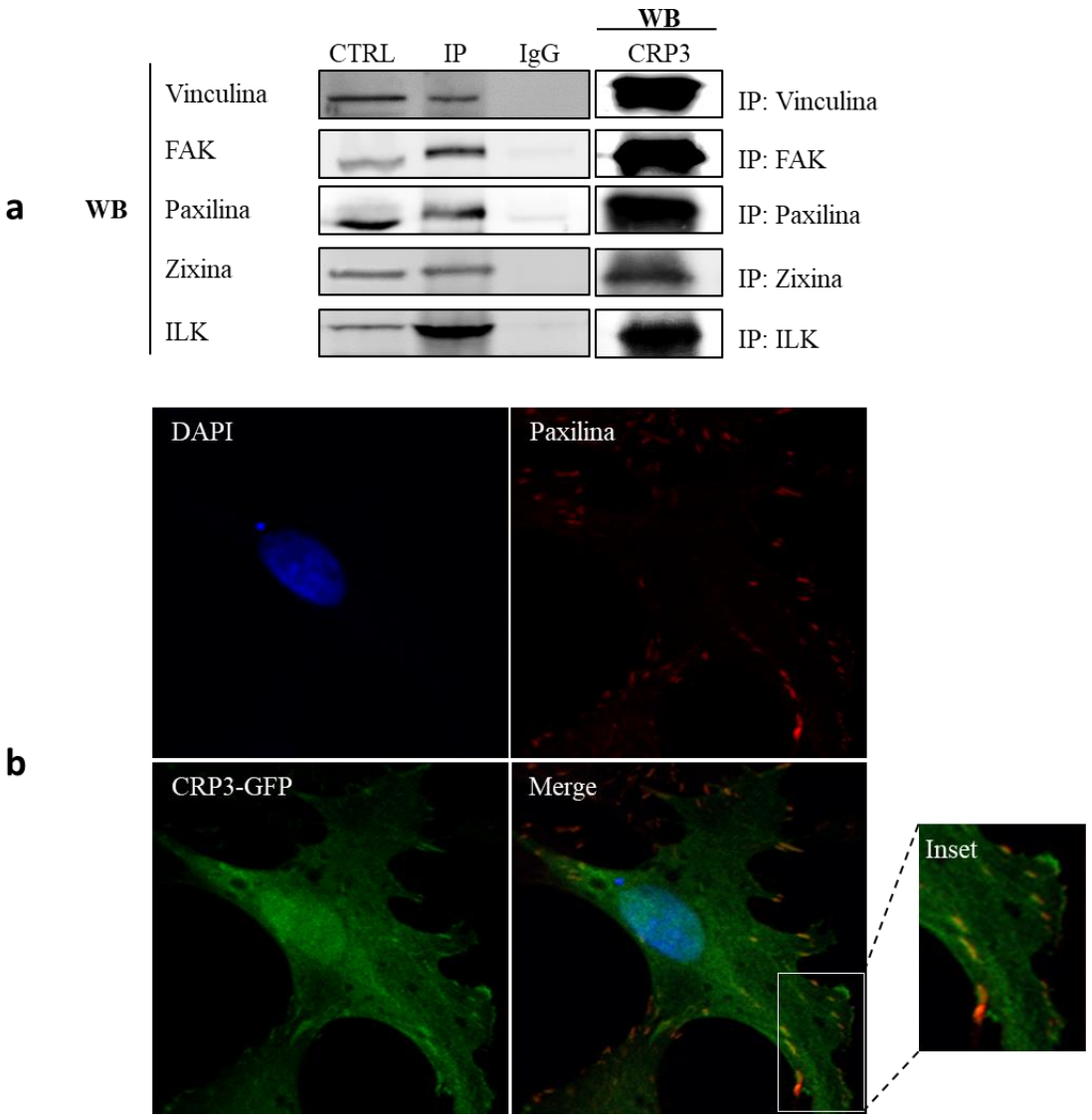


Figura 12. A proteína rica em cisteína e glicina 3 (CRP3) é uma proteína de adesão focal. a. imagens representativas do immunoblotting resultante das proteínas imunoprecipitadas e de CRP3. A presença de CRP3 nas adesões focais foi avaliada através de imunoprecipitação de proteínas essenciais à formação deste complexo proteico, seguida do immunoblotting para a proteína-alvo e para CRP3. Nota-se immunoblotting positivo para CRP3 em todas as imunoprecipitações realizadas, sendo IgG controle negativo da imunoprecipitação, (IP). *n*=4/proteína demonstrada. b. Imagens representativas da imunofluorescência para paxilina, realizada em células musculares lisas aórticas selvagens expressando CRP3-GFP. Verifica-se marcação padrão de paxilina nos limites da membrana e uma marcação mais difusa de CRP3, porém com concentrações na membrana. Ao sobrepor as imagens, verifica-se que CRP3 colocaliza com paxilina nas adesões focais, evidenciado pelo surgimento do sinal alaranjado de fluorescência, visto em maior aumento no inset. Magnificação: 40x *n*=3.

4.2 O nocaute de CRP3 é acompanhado de mudança no tamanho médio de adesões focais

Sendo CRP3 uma proteína de adesão focal, avaliou-se o efeito do nocaute de CRP3 no tamanho das adesões focais através da deconvolução de imagens derivadas da marcação por imunoflourescência de paxilina, um marcador de adesões focais. Evidenciou-se que, em condições basais, as células KO apresentam maior tamanho médio de adesões focais quando comparadas às células selvagens (Figura 13), sem diferenças na área celular ocupada pelas adesões focais.

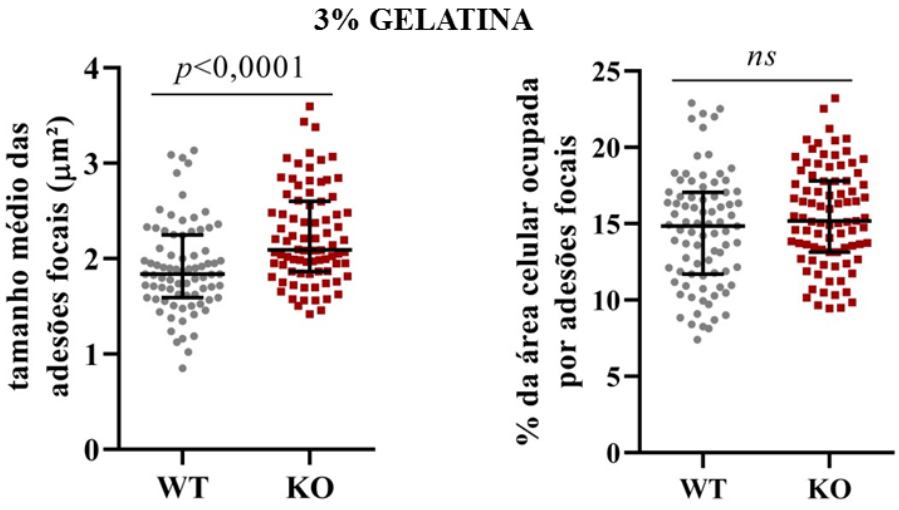


Figura 13. A ausência de CRP3 confere maior tamanho às adesões focais em condições basais na presença de 3% gelatina. A análise do tamanho e da área celular ocupada por adesões focais na presença de gelatina 3 % mostra que células KO apresentam maior tamanho médio de adesões focais quando comparadas às células selvagens, porém sem diferença na área celular ocupada por adesões focais (*n*=78 WT e *n*=82 KO).

Uma vez que existe dependência do substrato no tamanho das adesões focais, testou-se a hipótese de que a diferença entre selvagem e KO se manteria caso o substrato fosse mudado, de gelatina (condição basal) para fibronectina. A análise mostra que o mesmo padrão se repete: células KO apresentam adesões focais maiores em condições basais (Figura 14). Interessantemente, neste substrato, a área celular ocupada

por adesões focais também é maior em células KO quando comparadas às células selvagens.

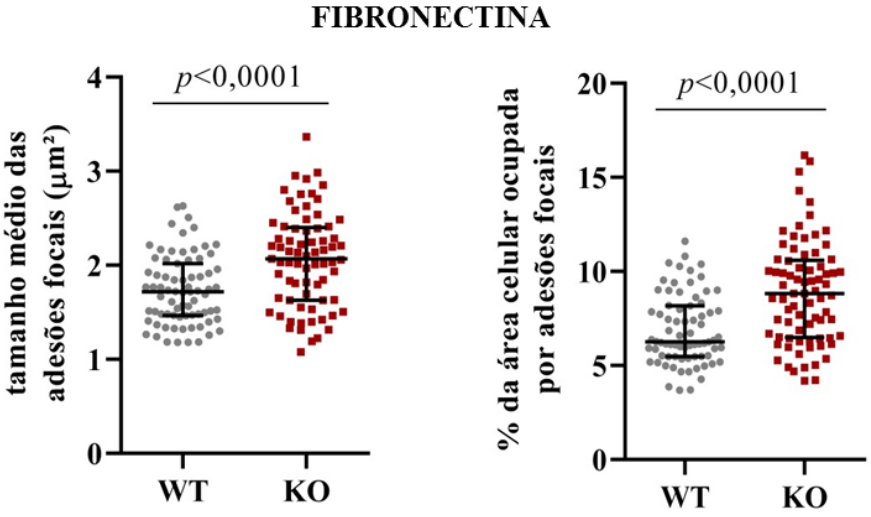


Figura 14. A ausência de CRP3 confere maior tamanho às adesões focais em condições basais na presença de fibronectina. A análise do tamanho e da área celular ocupada por adesões focais na presença de fibronectina mostra que células KO apresentam maior tamanho médio de adesões focais e maior área da célula ocupada por adesões focais quando comparadas às células selvagens (*n*=75 WT e *n*=73 KO).

O próximo passo foi avaliar como as adesões focais de células selvagens e KO responderiam à angiotensina II, um agente contrátil e ao inibidor de ROCK, um indutor de relaxamento. Observou-se aumento no tamanho das adesões focais e na área celular ocupada por adesões focais em células selvagens estimuladas com angiotensina II nos períodos de 2,5 min (Figura 15a) e aumento no tamanho das adesões focais em 24 h (Figura 15b). Em contraste, nos mesmos períodos, células KO não apresentaram mudanças no tamanho ou na área celular ocupada por adesões focais (Figura 15).

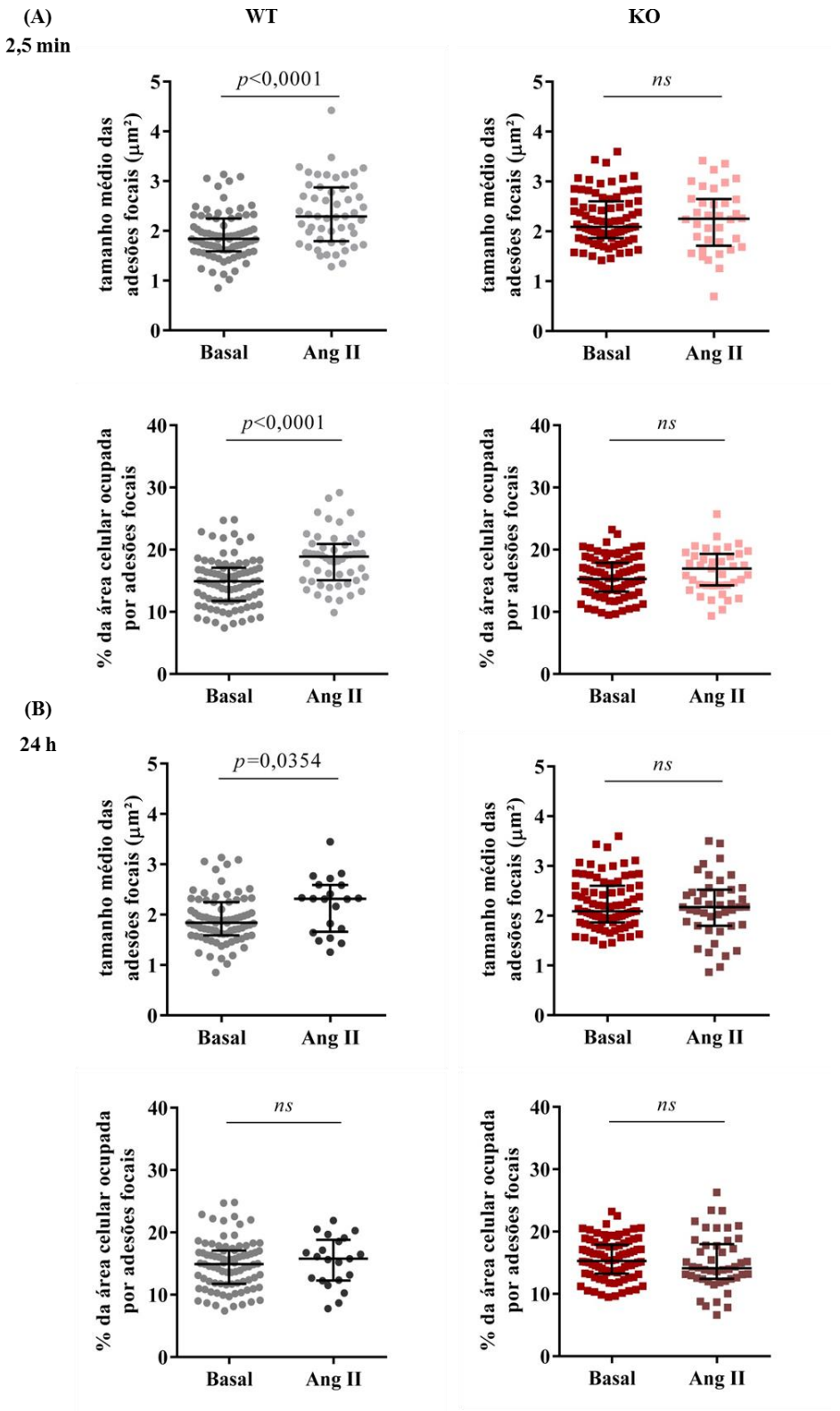


Figura 15. A ausência de CRP3 prejudica a adaptação das adesões focais em resposta à angiotensina II. Na presença de angiotensina II, observou-se aumento no tamanho médio de adesões focais e da área celular ocupada em células selvagens nos períodos de 2,5 min (A) e 24 h (B), eventos não observados em células KO (Basal: *n*=85 WT e *n*=88 KO; Ang II 2,5 min *n*=52 WT e *n*=39 KO; Ang II 24 h *n*=21 WT e *n*=46 KO).

Na presença do inibidor de ROCK, se observou redução no tamanho das adesões focais de células selvagens e KO, porém tanto o tamanho médio das adesões focais quanto a área celular ocupada por adesões focais se apresentaram maiores em células KO (Figura 16).

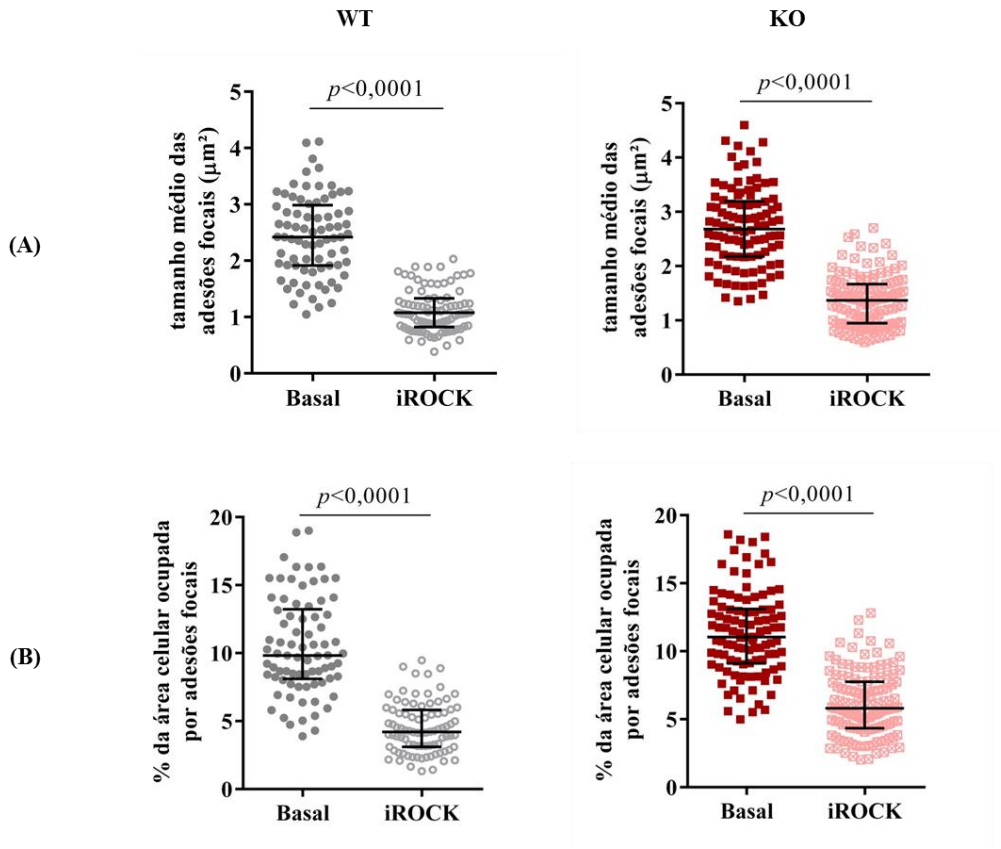


Figura 16. Adesões focais permanecem maiores na presença de inibidor de ROCK em células desprovidas de CRP3. *a*. Na presença de inibidor de ROCK, observou-se redução no tamanho médio de adesões focais e *b*. da área celular ocupada em células selvagens no período de 24 h, eventos atenuados em células KO (Basal: *n*=85 WT e *n*=102 KO; iROCK *n*=77 WT e *n*=129 KO).

4.3 Reduzida expressão de componentes das adesões focais em resposta ao nocaute de CRP3

Buscando entender a ausência de adaptação das adesões focais de células nocaute em resposta à angiotensina II, analisou-se a expressão de três proteínas que participam da maturação de adesões focais: FAK, paxilina e MLC2 em células selvagens e KO por *immunoblotting.* Verificou-se que células KO apresentavam reduzida expressão dos três componentes (Figura 17).

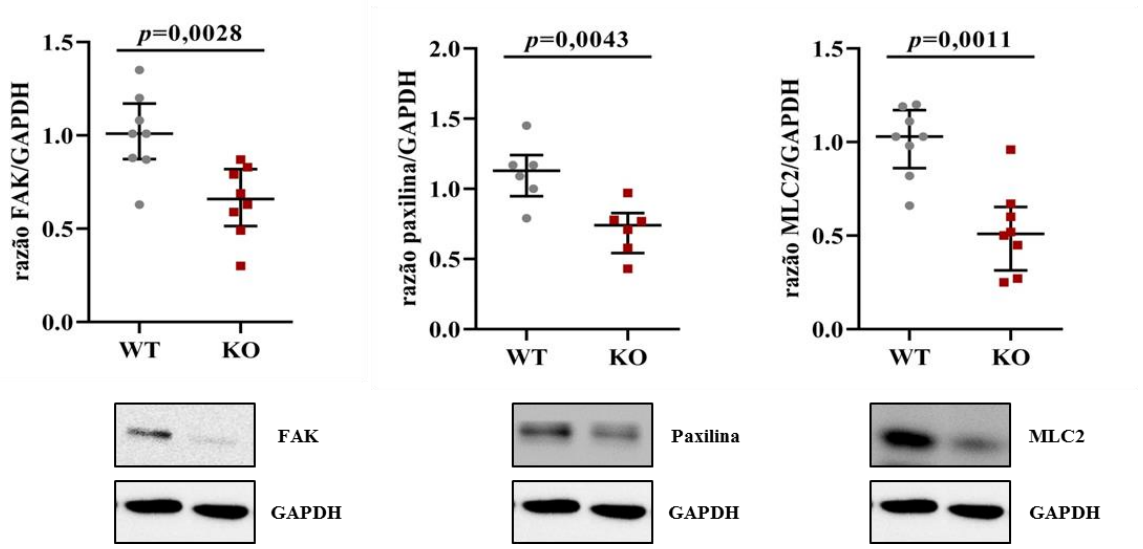


Figura 17. Imagens representativas e quantificação da análise por immunoblotting da expressão das proteínas FAK, paxilina e a cadeia regulatória da miosina (MLC2), evidenciando reduzida expressão em células KO. *n*=8 (FAK e MLC2) *n*=6 (paxilina).

4.4 Modulação da rigidez celular em resposta ao nocaute de CRP3

Considerando que o tamanho das adesões focais é dependente da rigidez do citoesqueleto adjacente, foi testada a participação de CRP3 na rigidez cortical de células musculares lisas aórticas selvagens e nocautes através da técnica de citometria magnético-óptica de oscilação. Em concordância com o tamanho das adesões focais, evidenciou-se que a rigidez basal é maior em células KO quando comparadas às células

selvagens (Figura 18a). Em resposta à angiotensina II, observou-se aumento na rigidez (Figura 18a), sendo o delta de aumento na rigidez mais pronunciado em células KO (Figura 18b). Ambos os genótipos convergem para o mesmo padrão de rigidez ao se acrescentar citocalasina D, uma molécula que inibe a polimerização de actina (Figura 18a).

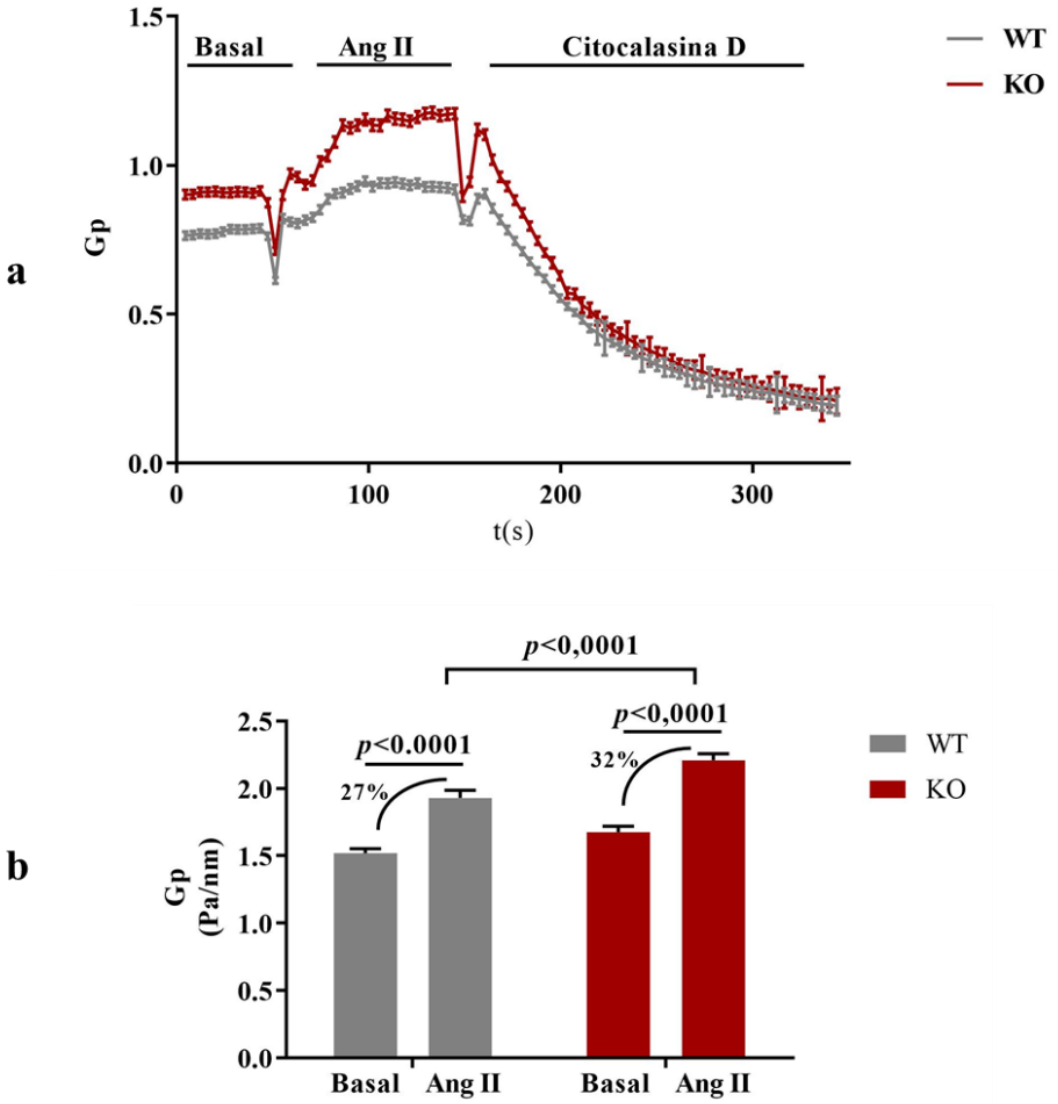


Figura 18. A ausência de CRP3 confere maior rigidez celular. *a*. Em comparação com células selvagens (WT), células KO apresentam maior rigidez em condições basais. O acréscimo de agonista (Ang II) resulta em aumento na rigidez de ambas as células, convergindo para um mesmo comportamento após a adição de citocalasina D. *b*. Gráfico comparativo do delta de resposta basal versus angiotensina II, demonstrando maior amplitude de resposta em células KO quando comparadas às células selvagens. *n*=1419 microesferas WT e *n*=1546 microesferas KO.

4.5 Prejuízo à contratilidade celular em células nocaute para CRP3

Uma vez que a rigidez celular é dependente do citoesqueleto de actina e que este, por sua vez, coordena a capacidade contrátil celular, a contratilidade de células selvagens e KO foi avaliada em gel de colágeno no período de 24 h. Em condições basais, verificou-se que a contração de células KO é reduzida em comparação com células selvagens. Em resposta à angiotensina II, verificou-se maior taxa de contração em células selvagens do que em células KO. Quando realizado na presença do inibidor da Rho quinase (iROCK), observou-se reduzida contratilidade em ambos os genótipos, porém com resposta mais pronunciada em células KO (Figura 19).

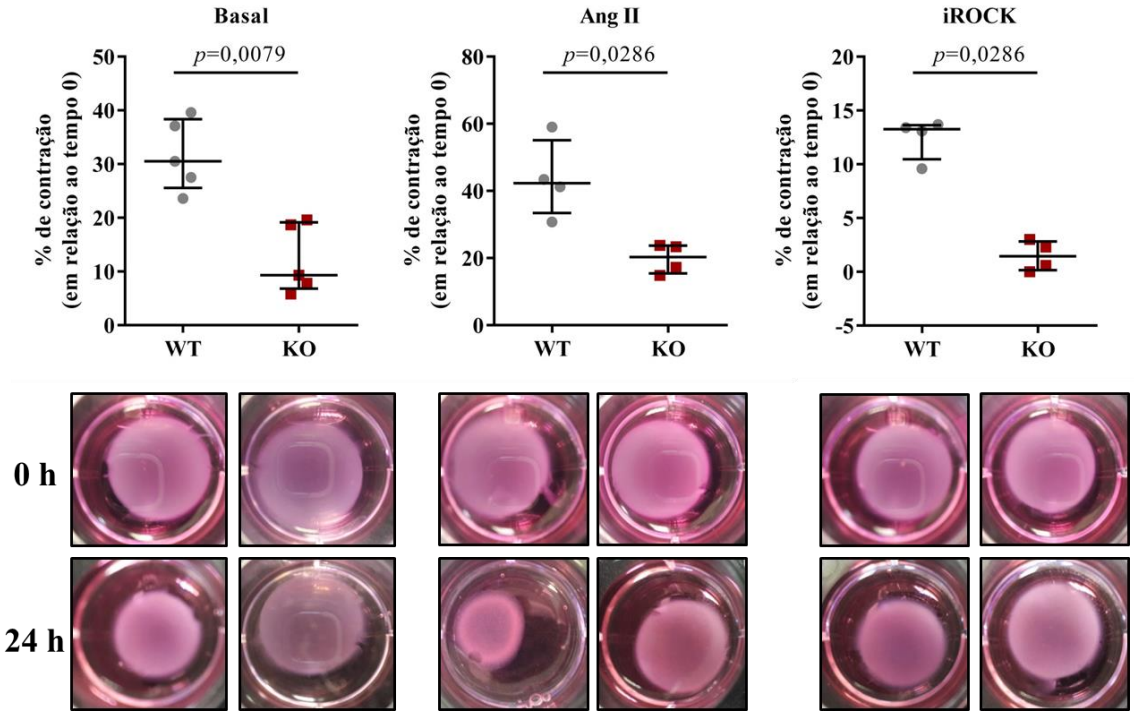


Figura 19. A ausência de CRP3 acarreta em dano à capacidade contrátil de células musculares lisas aórticas. Quantificação e imagens representativas do ensaio de contração em gel de colágeno, mostrando a contratilidade basal, em resposta à angiotensina II e a ablação da contratilidade em resposta ao inibidor de ROCK (iROCK) após 24 h, eventos notórios em células selvagens, porém tênues em células KO (*n*=5 basal e *n*=4 Ang II ou iROCK).

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A proteína rica em cisteína e glicina 3 (CRP3) apresenta múltiplas facetas na fisiologia e fisiopatologia do músculo estriado (84). Neste contexto, as diversas funções estruturais, regulatórias e sensoriais são baseadas na promoção de complexos proteína-proteína (85), entretanto, pouco se sabe a respeito do papel de CRP3 na fisiologia vascular. Os achados do presente trabalho evidenciam, pela primeira vez, a presença de CRP3 nas adesões focais, cuja ausência resultou em alterações estruturais que culminam em prejuízo na contratilidade de células musculares lisas aórticas.

Como etapa inicial à determinação do papel de CRP3 na contração, foi avaliado se CRP3 seria parte das adesões focais de células musculares lisas aórticas. Verificou-se que após a imunoprecipitação das proteínas de adesão focal: paxilina, FAK, ILK, vinculina e zixina, é possível recuperar CRP3 (Figura 12a), um achado posteriormente confirmado pela localização de CRP3 nas regiões periféricas celulares e pela colocalização de CRP3 com paxilina, um marcador de adesões focais (Figura 12b). Estudos que datam à descoberta das proteínas da família CRP não foram capazes de verificar colocalização de CRP3 com resíduos de fosfotirosina (86), uma marcação utilizada à época para identificar as adesões focais. Entretanto, neste mesmo estudo, verificou-se que as CRPs interagiam com zixina e α-actinina, proteínas que, nos dias atuais, são consideradas cruciais à mediação do *crosstalk* entre o citoesqueleto de actina e as adesões focais (52,87,88), refletindo limitações técnicas associadas à época de desenvolvimento dos estudo. Em contrapartida, por proteoma, foi demonstrado que os parálogos de CRP3 – CRP1 e CRP2 são proteínas presentes nas adesões focais (52,89,90), sugerindo que, apesar do alto grau de homologia entre as proteínas da família, as similaridades estruturais e os ligantes em comum, essas proteínas apresentam papeis célula- ou tecido-específicos (55,87). Adicionalmente, outros estudos

demonstraram a interação de CRP3 com proteínas presentes nas adesões focais, como é o caso da interação com ILK, necessária ao fortalecimento das junções neuromusculares em *zebrafish* (91), bem como a capacidade de formação do complexo proteico actina-zixina-CRP3-α-actinina em células de músculo estriado (55). No âmbito vascular, nosso grupo demonstrou que CRP3 interage com a quinase de adesão focal (74), sendo que a ausência de CRP3 no contexto de arterialização venosa resultou em ruptura no controle do eixo de sinalização integrina-β_1-FAK-AKT, culminando em ausência de eventos apoptóticos e consequentemente, remodelamento vascular desenfreado. Em termos de função de CRP3 nas adesões focais, pode-se especular que CRP3 esteja envolvida no endereçamento de proteínas para as adesões focais ou na formação de cernes proteicos úteis às vias de sinalização intracelular (85). Em linha com este raciocínio, foi demonstrado que CRP3 e vinculina codistribuem-se ao longo da linha Z na periferia de células de músculo cardíaco, e que em resposta ao nocaute de CRP3, observa-se perda da distribuição periférica de vinculina (61).

Adesões focais são construídas dinamicamente após a interação de integrinas com componentes da matriz extracelular, dentre eles a fibronectina, vitronectina, colágeno e laminina (92). A afinidade de integrinas por seu ligante na matriz extracelular pode ser modulada dentro da célula, um processo denominado sinalização *inside-out* ou por forças mecânicas exercidas no meio extracelular, induzindo a adoção de uma conformação de alta afinidade (88,93). Após estes eventos, as integrinas são ativadas, se agrupam e reforçam os contatos moleculares na interface célula-matriz. Enquanto o domínio extracelular está em contato com a matriz, as caudas citoplasmáticas das integrinas interagem com o citoesqueleto de actina via uma ampla gama de proteínas adaptadoras que formam o cerne das adesões focais (88). Uma vez que foi demonstrada a presença de CRP3 neste cerne, avaliou-se qual seria o efeito de

CRP3 no tamanho das adesões focais, que refletem a capacidade celular de interação com a matriz extracelular. Verificou-se que independente do substrato fornecido à célula (seja gelatina ou fibronectina), células CRP3 KO apresentam maior tamanho médio de adesões focais quando comparadas às células selvagens (Figuras 13 e 14), sugerindo que células selvagens e CRP3 KO apresentam diferentes percepções do ambiente. Evidências ressaltam o papel da GTPase RAC1 como sensor dos sinais derivados da matriz extracelular (94), promovendo aumento da associação miosina IIA com as adesões focais através de um mecanismo dependente de PKC (94). Considerando que foi demonstrado que a atividade de RAC1 (95) e de PKCα (66) apresentam-se aumentadas em resposta ao nocaute de CRP3 em corações de camundongos e transpondo o cenário cardíaco para os dados deste trabalho, pode-se conjecturar que a diferente percepção do ambiente em células CRP3 KO deriva da ativação descompensada do eixo PKC-RAC1, resultando no maior tamanho médio de adesões focais observado em células nocaute quando comparadas às células selvagens (Figuras 13 e 14). Em contrapartida, em resposta à angiotensina II, uma condição que resulta na maturação das adesões focais para geração de forças, observa-se incapacidade das células CRP3 KO de maturar as adesões focais, evidenciada pela ausência de crescimento das adesões focais (Figura 15). Sabe-se que a ligação de angiotensina II ao receptor AT1 induz ativação da via Rhoa-ROCK, induzindo sustentação do estímulo inicial de cálcio (40,43). Em paralelo, adesões focais se remodelam em função de um processo de reciclagem. É descrito que o equilíbrio entre a atividade de RAC1 e RhoA coordena a montagem e desmontagem de adesões focais (96), logo, a atividade descompensada de RAC1 (descrita em corações CRP3 KO), deslocaria este equilíbrio, impedindo o crescimento das adesões em células CRP3 KO. Em consonância com este raciocínio, na presença do inibidor de ROCK, a redução no tamanho das adesões focais

é atenuada em células CRP3 KO (Figura 16), que ainda apresentam adesões maiores do que células selvagens, favorecendo a hipótese do equilíbrio RAC1-RhoA.

Outra possível explicação para a incapacidade de maturação de adesões focais seria a expressão de FAK, paxilina e MLC2, proteínas centrais ao amadurecimento de adesões focais. Observou-se reduzida expressão destas proteínas em células CRP3 KO (Figura 17) e estes achados levaram à hipótese de que o *pool* disponível no basal é suficiente para sustentar a sinalização desordenada em células KO, entretanto, frente a um estímulo como a angiotensina II, o *pool* disponível não é suficiente para que a célula responda de forma eficiente e por isso, não consegue deslocar o equilíbrio no sentido de crescimento das adesões focais. Pode-se também especular que a estabilidade de proteínas como FAK e paxilina é dependente da presença ou mesmo da interação com CRP3. Foi demonstrado que pacientes contendo a mutação C58G no gene *CSRP3* (gene que codifica a proteína CRP3), apresentam atividade anormal de proteassoma, complexo proteico responsável pelo *turnover* de proteínas citoplasmáticas. A proteína CRP3 mutante interage com Bag3, resultando em uma resposta proteotóxica acompanhada da indução de proteínas de choque térmico (HSPs) e que tem como desfecho o desenvolvimento de cardiomiopatia dilatada (97). Uma outra possibilidade para a redução nos níveis dessas proteínas seria a ação de CRP3 como cofator na transcrição gênica. Sabe-se que CRP3 é uma proteína responsiva a estímulos mecânicos (59,72,74) e apesar dos dedos de zinco dos domínios LIM não exibirem capacidade de ligação direta ao DNA (98), foi demonstrada a interação de CRP3 com fatores de transcrição envolvidos na promoção da adaptação e sobrevivência em resposta a estímulos mecânicos (57,58). CRP1 e CRP2 (parálogos de CRP3) são descritos como cofatores de SRF e GATA4, promovendo a diferenciação de células pró-epicárdicas em células musculares lisas (99). Vários mecanismos moleculares estão envolvidos neste

evento, um processo que requer reorganização do citoesqueleto de actina (100), onde monômeros de actina (G-actina) se ligam aos cofatores de SRF da família MKL, que sofrem translocação nuclear e promovem a expressão de genes do citoesqueleto acessórios à contratilidade (5,101–105). Essas evidências associadas à interação de CRP3 com proteínas de adesão focal que se ligam à actina permitem postular que CRP3 desempenha papel na promoção da expressão de genes envolvidos na manutenção do fenótipo contrátil de células musculares lisas, principalmente se considerada a descrita interação de CRP3 com SRF (99).

Além da responsividade às mudanças na composição e mecânica da matriz extracelular, adesões focais também servem como os pontos utilizados pelas células para ajustar seu próprio estado mecânico. Para isso, a célula muda arquitetura do citoesqueleto, resultando em aumento ou diminuição em sua viscoelasticidade ou na geração de uma resposta contrátil como reação às forças aplicadas no meio externo (106). Este equilíbrio entre o estado mecânico interno e externo das células é denominado homeostase tensional (ou *tensegrity*) (107,108) e dada a participação das integrinas neste processo (92), a técnica de citometria magnético-óptica de oscilação é uma ferramenta útil na avaliação da homeostase tensional (109). Em concordância com o tamanho das adesões focais em condições basais (Figura 13), em resposta ao torque magnético, verificou-se que células nocaute são mais rígidas que células selvagens (Figura 18a). Ao adicionar-se angiotensina II, observou-se aumento na rigidez em ambos os genótipos, sempre mais acentuada em células nocaute, como evidenciado pelo delta de resposta (Figura 18b). Os dados obtidos em células selvagens vão de acordo com o observado na literatura em linhagem de células aórticas que, em resposta ao ácido lisofosfatídico, aumentam a tensão no citoesqueleto, avaliada por osciladores magnéticos e posteriormente confirmada *in vivo* (110). Já a maior rigidez observada em

células CRP3 KO está alinhada com a reduzida complacência e resistência mecânica prejudicada observada em corações de animais CRP3 KO, que desenvolvem cardiomiopatia dilatada nos primeiros meses de vida (61).

O correto funcionamento do sistema cardiovascular é dependente das propriedades biomecânicas dos vasos e estas, como a de qualquer material, são determinadas por seus componentes e suas respectivas organizações (111,112). Logo, a rigidez arterial é estabelecida primariamente pelas células musculares lisas (presentes em maior abundância) e pela matriz extracelular (113). A rigidez arterial prediz e é a causa adjacente das doenças cardiovasculares (112,113) e, considerando os dados obtidos neste trabalho, pode-se inferir que animais nocaute para CRP3 são mais propensos ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Utilizando um modelo de lesão arterial com balão de angioplastia, verificou-se maior remodelamento em artérias femorais de animais CRP3 KO quando comparadas às artérias femorais de animais selvagens (114). Em concordância com estes achados, em um modelo murino de arterialização venosa que conectava a artéria carótida à veia jugular, evidenciou-se maior resposta de remodelamento em veia jugular de animais CRP3 KO (74), uma resposta associada à sustentação de uma via de sinalização mediada por FAK, confirmando a hipótese de maior propensão ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares em resposta ao nocaute de CRP3 via modulação das propriedades mecânicas celulares.

O acoplamento mecânico formado pela associação dinâmica entre integrinas ligadas à matriz extracelular e o aparato contrátil de actomiosina é denominado *molecular clutch* e depende de proteínas que conectam as integrinas às fibras de actina, dada a ausência de um domínio de ligação à actina nas integrinas. Com o engajamento de proteínas como talina e vinculina no *molecular clutch*, o poder cinético do fluxo

retrógrado de actina e do aparato de actomiosina é convertido em força de tração que "puxa" a matriz extracelular (115–118). Foi demonstrado que proteínas como CRP3, que possui domínios LIM, são recrutadas para as adesões focais de forma dependente de força (89) e a fim de verificar qual seria o desfecho da ausência de CRP3 nas adesões focais considerando o modelo de *molecular clutch,* foi avaliada a contratilidade celular em gel de colágeno. Evidenciou-se que, apesar do maior tamanho médio de adesões, já em condições basais células CRP3 KO apresentam reduzida contratilidade (Figura 19) quando comparadas às células selvagens. Em resposta à angiotensina II, observou-se ainda tímidos níveis de contração em células nocaute e, em resposta ao inibidor de ROCK, a capacidade contrátil zera em células nocaute, enquanto células selvagens ainda apresentam contração residual de aproximadamente 10% (Figura 19). Componentes do *molecular clutch* são considerados mecanossensores, proteínas intracelulares capazes de perceber e responder a estímulos mecânicos e para esta finalidade, devem atender a uma série de requisitos, sendo eles: capacidade de exposição de sítios crípticos para interação com outras proteínas (51); capacidade de sofrer mudanças pós-traducionais (119–125); serem capazes de translocação (126–132); capacidade de formação de complexos macromoleculares (133). Todas essas características são encontradas em CRP3: ensaios de modelagem demonstraram que a região inter-LIM é extremamente flexível e foi descrita a interação com proteínas nesta região que é desprovida de um domínio definido (62); CRP3 é fosforilado por PKCα (66) e acetilado (67); em resposta a agentes como fenilefrina, sofre translocação nuclear em células cardíacas (134) e promove a formação de complexos proteicos envolvidos no ancoramento de fibras de actina nos discos Z e nos costâmeros (55,60,61,67,135,136). Em face dessas características de CRP3 e aos achados deste trabalho, pode-se especular

que CRP3 é parte do *molecular clutch* nas adesões focais de células musculares lisas aórticas.

Mecanotransmissão via *molecular clutch* estabelece o equilíbrio mecânico entre a resistência da matriz extracelular e a contratilidade intracelular (137). Logo, relaxamento ou ruptura das ligações transdutoras de força no *molecular clutch* podem extinguir a mecanotransmissão. Em um cenário onde CRP3 seria essencial ao *molecular clutch* das adesões focais de células musculares lisas aórticas, pode-se especular que sua ausência leva ao enfraquecimento das interfaces proteína-proteína, resultando em reduzida meia-vida do *molecular clutch* e, portanto, reduzida mecanotransmissão com resultante mecanotransdução defeituosa (menor capacidade contrátil). Corroborando este modelo, em resposta ao silenciamento da proteína α-actinina (um ligante de CRP3), observou-se percepção aberrante da matriz extracelular e perda da capacidade contrátil (138), o que foi atribuído à capacidade de α-actinina de transmitir forças às adesões nascentes (precursoras das adesões focais), favorecendo a maturação das adesões focais de forma força-dependente (139). No coração, a cooperatividade de integrinas com o sistema de distrofina-sarcoglicano medeia a interação do aparato contrátil (sarcômero) com a matriz extracelular em sítios de banda Z especializados, os costâmeros (69). A discreta distribuição dos costâmeros em correspondência aos discos intercalares e às bandas Z eficientemente transmite as forças para os sarcômeros (68,69,136). Na ausência de CRP3, observa-se dramática ruptura na organização miofibrilar cardíaca de camundongos, com alteração no padrão de distribuição de vinculina (principal proteína do *molecular clutch* nas adesões focais) e consequente aumento na marcação para junções aderentes. Ao avaliar a resposta de cardiomiócitos CRP3 KO ao agonista β-adrenérgico isoproterenol, verificou-se aspecto lacerado, sugestivo de resistência defeituosa ao estresse mecânico (61). Evidências sugerem que mutações no gene *CSRP3*

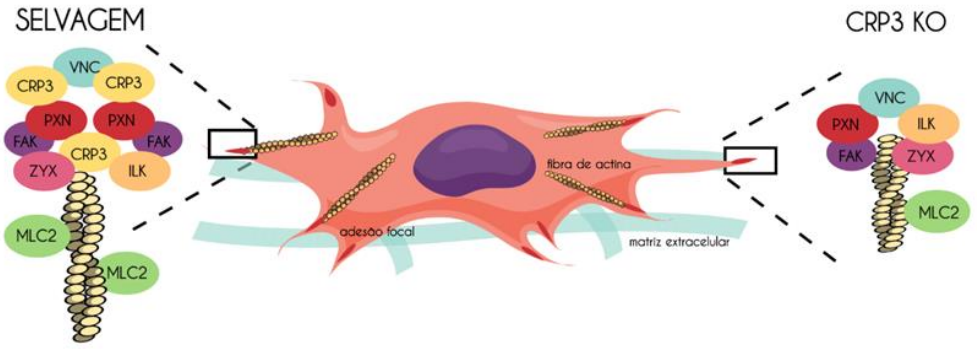
(codificador de CRP3) são fonte de cardiomiopatia dilatada e hipertrófica familiar, fenótipo observado em humanos que carregam tais mutações (59,97). Estes achados corroboram as evidências deste trabalho, que fornecem os pilares para a solidificação do papel de CRP3 como mecanossensor no sistema cardiovascular.

Em síntese, os dados deste trabalho revelam a presença de CRP3 nas adesões focais, regulando tamanho e sinalização, com reflexos na viscoelasticidade e capacidade contrátil, variáveis fundamentais ao correto funcionamento de células musculares lisas. Em conjunto, as evidências deste trabalho suportam a hipótese de que CRP3 é um modulador de contratilidade e mecanotransdução em células musculares lisas aórticas.

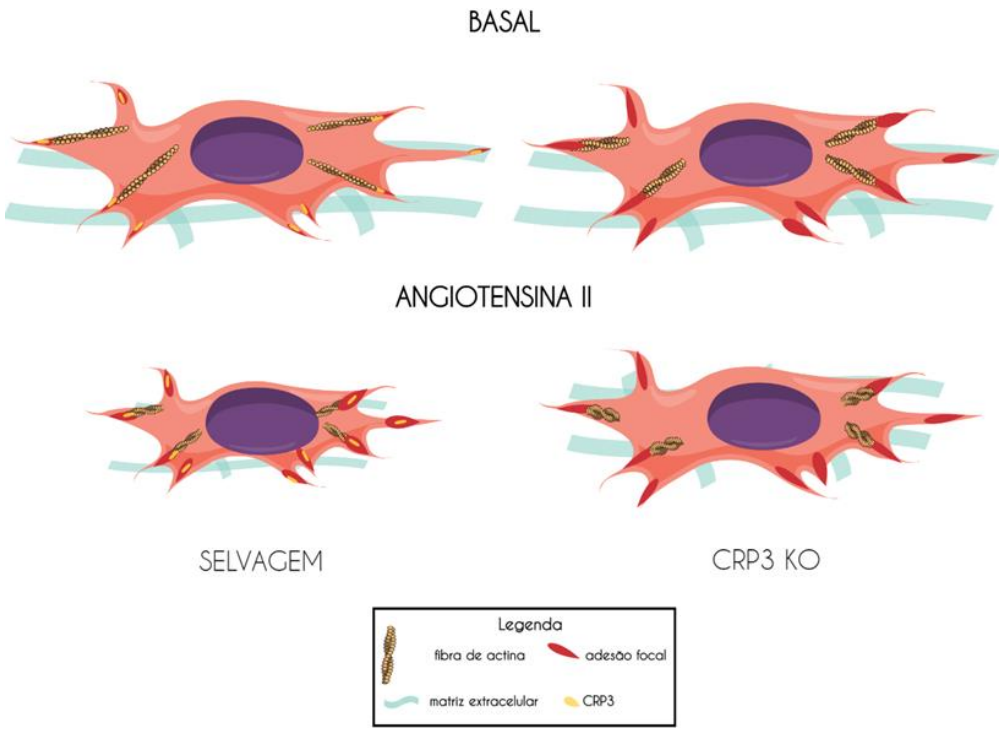
6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

CRP3 é uma proteína de adesão focal em células musculares lisas aórticas, cuja ausência resulta em redução no pool de FAK, paxilina e MLC2.



CRP3 é parte do complexo sensor de estresse nas adesões focais, sendo que sua ausência leva ao aumento no tamanho médio das adesões focais, com consequente aumento na tensão do citoesqueleto de actina. Em resposta à angiotensina II, células musculares lisas aórticas CRP3 KO falham em maturar as adesões focais e apresentam prejuízo à capacidade contrátil.



7. REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

1. Halka AT, Turner NJ, Carter A, Ghosh J, Murphy MO, Kirton JP, et al. The effects of stretch on vascular smooth muscle cell phenotype in vitro. Cardiovascular Pathology. 2008.

2. Owens GK. Molecular Regulation of Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation in Development and Disease. Physiol Rev. 2004;

3. Birukov KG, Shirinsky VP, Stepanova O V., Tkachuk VA, Hahn AWA, Resink TJ, et al. Stretch affects phenotype and proliferation of vascular smooth muscle cells. Mol Cell Biochem. 1995;

4. Yokoyama U, Ishikawa Y. Reconstruction of Elastic Fibers in Three-Dimensional Smooth Muscle Cells. In: Akashi M, Akagi T, Matsusaki M, editors. Engineered Cell Manipulation for Biomedical Application. Tokyo: Springer Japan; 2014. p. 159–74.

5. Alexander MR, Owens GK. Epigenetic Control of Smooth Muscle Cell Differentiation and Phenotypic Switching in Vascular Development and Disease. Annu Rev Physiol. 2012;

6. Posern G, Treisman R. Actin' together: serum response factor, its cofactors and the link to signal transduction. Trends in Cell Biology. 2006.

7. Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. Physiol Rev. 2004;

8. SOMLYO AP, SOMLYO A V. Ca2+ Sensitivity of Smooth Muscle and Nonmuscle Myosin II: Modulated by G Proteins, Kinases, and Myosin Phosphatase. Physiol Rev. 2003;

9. Gabbiani G, Schmid E, Winter S, Chaponnier C, de Ckhastonay C, Vandekerckhove J, et al. Vascular smooth muscle cells differ from other smooth muscle

cells: predominance of vimentin filaments and a specific alpha-type actin. Proc Natl Acad Sci. 1981;

10. Owens GK, Loeb A, Gordon D, Thompson MM. Expression of smooth muscle-specific α-isoactin in cultured vascular smooth muscle cells: relationship between growth and cytodifferentiation. J Cell Biol. 1986;

11. Rovner AS, Murphy RA, Owens GK. Expression of smooth muscle and nonmuscle myosin heavy chains in cultured vascular smooth muscle cells. J Biol Chem. 1986;

12. Rovner AS, Thompson MM, Murphy RA. Two different heavy chains are found in smooth muscle myosin. Am J Physiol. 1986;

13. Hasegawa Y, Ueda Y, Watanabe M, Morita F. Studies on amino acid sequences of two isoforms of 17-kDa essential light chain of smooth muscle myosin from porcine aorta media. J Biochem. 1992;

14. Miano JM, Cserjesi P, Ligon KL, Periasamy M, Olson EN. Smooth muscle myosin heavy chain exclusively marks the smooth muscle lineage during mouse embryogenesis. Circ Res. 1994;

15. Hansson GK, Jonasson L, Holm J, Claesson-Welsh L. Class II MHC antigen expression in the atherosclerotic plaque: smooth muscle cells express HLA-DR, HLA-DQ and the invariant gamma chain. Clin. exp. Immunol. 1986.

16. Winder SJ, Walsh MP. Structural and functional characterization of calponin fragments. Biochem Int. 1990;

17. Sobue K, Sellers JR. Caldesmon, a novel regulatory protein in smooth muscle and nonmuscle actomyosin systems. Journal of Biological Chemistry. 1991.

18. Geiger B, Tokuyasu KT, Dutton AH, Singer SJ. Vinculin, an intracellular protein localized at specialized sites where microfilament bundles terminate at cell membranes. Proc Natl Acad Sci. 1980;

19. Herring BP, Smith AF. Telokin expression is mediated by a smooth muscle cell-specific promoter. Amer J Physiol-Cell Physiol. 1996;

20. Van Der Loop FTL, Gabbiani G, Kohnen G, Ramaekers FCS, Van Eys GJJM. Differentiation of smooth muscle cells in human blood vessels as defined by smoothelin, a novel marker for the contractile phenotype. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1997;

21. Gorenne I, Nakamoto RK, Phelps CP, Beckerle MC, Somlyo APA V. LPP, a LIM protein highly expressed in smooth muscle. Am J Physiol Cell Physiol. 2003;

22. Mericskay M, Parlakian A, Porteu A, Dandré F, Bonnet J, Paulin D, et al. An overlapping CArG/octamer element is required for regulation of desmin gene transcription in arterial smooth muscle cells. Dev Biol. 2000;

23. Wasteson P, Johansson BR, Jukkola T, Breuer S, Akyurek LM, Partanen J, et al. Developmental origin of smooth muscle cells in the descending aorta in mice. Development. 2008;

24. Dobrin PB. Mechanical properties of arterises. Physiol Rev. 1978;58(2):397–460.

25. Milewicz DM, Trybus KM, Guo DC, Sweeney HL, Regalado E, Kamm K, et al. Altered smooth muscle cell force generation as a driver of thoracic aortic aneurysms and dissections. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 2017.

26. Rensen SSM, Doevendans PAFM, Van Eys GJJM. Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. Netherlands Heart Journal. 2007.

27. Milewicz DM, Kwartler CS, Papke CL, Regalado ES, Cao J, Reid AJ. Genetic variants promoting smooth muscle cell proliferation can result in diffuse and diverse vascular diseases: Evidence for a hyperplastic vasculomyopathy. Genetics in Medicine. 2010.

28. Mescher A. Junqueira Basic Histology Text and Atlas 14th Edition. McGraw-Hill Education. 2016.

29. Brozovich F V., Nicholson CJ, Degen C V., Gao YZ, Aggarwal M, Morgan KG. Mechanisms of Vascular Smooth Muscle Contraction and the Basis for Pharmacologic Treatment of Smooth Muscle Disorders. Pharmacol Rev. 2016;

30. Allen BG, Walsh MP. The biochemical basis of the regulation of smooth-muscle contraction. Trends in Biochemical Sciences. 1994.

31. Ikebe M. Regulation of the function of mammalian myosin and its conformational change. Biochem Biophys Res Commun. 2008;

32. Hill-Eubanks DC, Gomez MF, Stevenson AS, Nelson MT. NFAT regulation in smooth muscle. Trends in Cardiovascular Medicine. 2003.

33. Amberg GC, Navedo MF. Calcium Dynamics in Vascular Smooth Muscle. Microcirculation. 2013;

34. Knot HJ, Nelson MT. Regulation of arterial diameter and wall [Ca2+] in cerebral arteries of rat by membrane potential and intravascular pressure. J Physiol. 1998;

35. Touyz RM, Alves-Lopes R, Rios FJ, Camargo LL, Anagnostopoulou A, Arner A, et al. Vascular smooth muscle contraction in hypertension. Cardiovascular Research. 2018.

36. Kamm KE, Stull JT. Dedicated Myosin Light Chain Kinases with Diverse Cellular Functions. Journal of Biological Chemistry. 2001.

37. Zhang WC, Peng YJ, Zhang GS, He WQ, Qiao YN, Dong YY, et al. Myosin light chain kinase is necessary for tonic airway smooth muscle contraction. J Biol Chem. 2010;

38. He WQ, Peng YJ, Zhang WC, Lv N, Tang J, Chen C, et al. Myosin Light Chain Kinase Is Central to Smooth Muscle Contraction and Required for Gastrointestinal Motility in Mice. Gastroenterology. 2008;

39. Loirand G, Pacaud P. The role of Rho protein signaling in hypertension. Nature Reviews Cardiology. 2010.

40. Wynne BM, Chiao CW, Webb RC. Vascular smooth muscle cell signaling mechanisms for contraction to angiotensin II and endothelin-1. Journal of the American Society of Hypertension. 2009.

41. Ringvold HC, Khalil RA. Protein Kinase C as Regulator of Vascular Smooth Muscle Function and Potential Target in Vascular Disorders. In: Advances in Pharmacology. 2017.

42. Khalil RA. Protein kinase C inhibitors as modulators of vascular function and their application in vascular disease. Pharmaceuticals. 2013.

43. Deissler HL, Lang GE. The protein Kinase C inhibitor: Ruboxistaurin. Dev Ophthalmol. 2015;

44. Rahman A, Davis B, Lövdahl C, Hanumaiah VT, Feil R, Brakebusch C, et al. The small GTPase Rac1 is required for smooth muscle contraction. J Physiol. 2014;

45. Brisset AC, Hao H, Camenzind E, Bacchetta M, Geinoz A, Sanchez JC, et al. Intimal smooth muscle cells of porcine and human coronary artery express S100A4, a marker of the rhomboid phenotype in vitro. Circ Res. 2007;

46. Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, et al. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. Nature. 1997;

47. McGregor E, Kempster L, Wait R, Gosling M, Dunn MJ, Powell JT. F-actin capping (CapZ) and other contractile saphenous vein smooth muscle proteins are altered by hemodynamic stress: a proteonomic approach. MolCell Proteomics. 2004;

48. CIPOLLA MJ, GOKINA NI, Osol G. Pressure-induced actin polymerization in vascular smooth muscle as a mechanism underlying myogenic behavior. FASEB J. 2002;

49. Gunst SJ, Zhang W. Actin cytoskeletal dynamics in smooth muscle: a new paradigm for the regulation of smooth muscle contraction. AJP Cell Physiol. 2008;

50. Humphrey JD, Dufresne ER, Schwartz MA. Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2014.

51. Del Rio A, Perez-Jimenez R, Liu R, Roca-Cusachs P, Fernandez JM, Sheetz MP. Stretching single talin rod molecules activates vinculin binding. Science (80-). 2009;323(5914):638–41.

52. Kanchanawong P, Shtengel G, Pasapera AM, Ramko EB, Davidson MW, Hess HF, et al. Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. Nature. 2010;468(7323):580–4.

53. Stutchbury B, Atherton P, Tsang R, Wang D-Y, Ballestrem C. Distinct focal adhesion protein modules control different aspects of mechanotransduction. J Cell Sci. 2017;130(9):1612–24.

54. Liu J, Wang Y, Goh WI, Goh H, Baird MA, Ruehland S, et al. Talin determines the nanoscale architecture of focal adhesions. Proc Natl Acad Sci. 2015;112(35):E4864–73.

55. Louis HA, Pino JD, Schmeichel KL, Pomiès P, Beckerle MC. Comparison of three members of the cysteine-rich protein family reveals functional conservation and divergent patterns of gene expression. J Biol Chem. 1997;

56. Weiskirchen R, Günther K. The CRP/MLP/TLP family of LIM domain proteins: Acting by connecting. BioEssays. 2003.

57. Kong Y, Flick MJ, Kudla AJ, Konieczny SF. Muscle LIM protein promotes myogenesis by enhancing the activity of MyoD. Mol Cell Biol. 1997;

58. Buyandelger B, Mansfield C, Kostin S, Choi O, Roberts AM, Ware JS, et al. ZBTB17 (MIZ1) Is Important for the Cardiac Stress Response and a Novel Candidate Gene for Cardiomyopathy and Heart Failure. Circ Cardiovasc Genet. 2015;

59. Knöll R, Hoshijima M, Hoffman HM, Person V, Lorenzen-Schmidt I, Bang ML, et al. The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy. Cell. 2002;

60. Knoll R, Kostin S, Klede S, Savvatis K, Klinge L, Stehle I, et al. A common MLP (Muscle LIM protein) variant is associated with cardiomyopathy. Circ Res. 2010;

61. Arber S, Hunter JJ, Ross J, Hongo M, Sansig G, Borg J, et al. MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organization, dilated cardiomyopathy, and heart failure. Cell. 1997;

62. Papalouka V, Arvanitis DA, Vafiadaki E, Mavroidis M, Papadodima SA, Spiliopoulou CA, et al. Muscle Lim Protein Interacts with Cofilin 2 and Regulates F-Actin Dynamics in Cardiac and Skeletal Muscle . Mol Cell Biol. 2009;

63. Hoffmann C, Moreau F, Moes M, Luthold C, Dieterle M, Goretti E, et al. Human Muscle LIM Protein Dimerizes along the Actin Cytoskeleton and Cross-Links Actin Filaments. Mol Cell Biol. 2014;

64. Luther PK. The vertebrate muscle Z-disc: Sarcomere anchor for structure and signalling. J Muscle Res Cell Motil. 2009;

65. Buyandelger B, Ng KE, Miocic S, Gunkel S, Piotrowska I, Ku CH, et al. Genetics of mechanosensation in the heart. J Cardiovasc Transl Res. 2011;

66. Lange S, Gehmlich K, Lun AS, Blondelle J, Hooper C, Dalton ND, et al. MLP and CARP are linked to chronic PKCα signalling in dilated cardiomyopathy. Nat Commun. 2016;

67. Gupta MP, Samant SA, Smith SH, Shroff SG. HDAC4 and PCAF bind to cardiac sarcomeres and play a role in regulating myofilament contractile activity. J Biol Chem. 2008;

68. Bloch RJ, Gonzalez-Serratos H. Lateral force transmission across costameres in skeletal muscle. Exerc Sport Sci Rev. 2003;

69. Peter AK, Cheng H, Ross RS, Knowlton KU, Chen J. The costamere bridges sarcomeres to the sarcolemma in striated muscle. Prog Pediatr Cardiol. 2011;

70. Bershadsky AD, Balaban NQ, Geiger B. Adhesion-Dependent Cell Mechanosensitivity. Annu Rev Cell Dev Biol. 2003;19(1):677–95.

71. Flick MJ, Konieczny SF. The muscle regulatory and structural protein MLP is a cytoskeletal binding partner of betaI-spectrin. J Cell Sci. 2000;

72. Campos LCG, Miyakawa AA, Barauna VG, Cardoso L, Borin TF, Dallan LADO, et al. Induction of CRP3/MLP expression during vein arterialization is dependent on stretch rather than shear stress. Cardiovasc Res. 2009;

73. Borin TF, Miyakawa AA, Cardoso L, De Figueiredo Borges L, Gonçalves GA, Krieger JE. Apoptosis, cell proliferation and modulation of cyclin-dependent kinase inhibitor p21cip1in vascular remodelling during vein arterialization in the rat. Int J Exp Pathol. 2009;

74. Campos LCG, Ribeiro-Silva JC, Menegon AS, Barauna VG, Miyakawa AA, Krieger JE. Cyclic stretch-induced Crp3 sensitizes vascular smooth muscle cells to apoptosis during vein arterialization remodeling. Clin Sci. 2018;

75. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem. 1985;

76. Lin-Lee YC, Pham L V., Tamayo AT, Fu L, Zhou HJ, Yoshimura LC, et al. Nuclear localization in the biology of the CD40 receptor in normal and neoplastic human B lymphocytes. J Biol Chem. 2006;

77. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970;

78. Atherton P, Stutchbury B, Wang DY, Jethwa D, Tsang R, Meiler-Rodriguez E, et al. Vinculin controls talin engagement with the actomyosin machinery. Nat Commun. 2015;6.

79. Humphries MJ. Cell-Substrate Adhesion Assays. Curr Protoc Cell Biol. 2004;

80. Park CY, Tambe D, Alencar AM, Trepat X, Zhou EH, Millet E, et al. Mapping the cytoskeletal prestress. AJP Cell Physiol. 2010;

81. Fabry B, Maksym GN, Shore SA, Moore PE, Panettieri RA, Butler JP, et al. Selected Contribution: Time course and heterogeneity of contractile responses in cultured human airway smooth muscle cells. J Appl Physiol. 2001;

82. Ruoslahti E, Pierschbacher MD. Arg-Gly-Asp: A versatile cell recognition signal. Cell. 1986;

83. Gutiérrez J, Droppelmann CA, Contreras O, Takahashi C, Brandan E. RECK-mediated β1-integrin regulation by TGF-β1 is critical for wound contraction in mice. PLoS One. 2015;

84. Vafiadaki E, Arvanitis DA, Sanoudou D. Muscle LIM Protein: Master regulator of cardiac and skeletal muscle functions. Gene. 2015.

85. Kadrmas JL, Beckerle MC. The LIM domain: From the cytoskeleton to the nucleus. Vol. 5, Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2004. p. 920–31.

86. Arber S, Caroni P. Specificity of single LIM motifs in targeting and LIM/LIM interactions in situ. Genes Dev. 1996;

87. Smith MA, Blankman E, Gardel ML, Luettjohann L, Waterman CM, Beckerle MC. A Zyxin-mediated mechanism for actin stress fiber maintenance and repair. Dev Cell. 2010;

88. Zaidel-Bar R, Itzkovitz S, Ma'ayan A, Iyengar R, Geiger B. Functional atlas of the integrin adhesome. Nat Cell Biol. 2007;9(8):858–67.

89. Schiller HB, Friedel CC, Boulegue C, Fäsignssler R. Quantitative proteomics of the integrin adhesome show a myosin II-dependent recruitment of LIM domain proteins. EMBO Rep. 2011;

90. Smith MA, Hoffman LM, Beckerle MC. LIM proteins in actin cytoskeleton mechanoresponse. Trends in Cell Biology. 2014.

91. Postel R, Vakeel P, Topczewski J, Knöll R, Bakkers J. Zebrafish integrin-linked kinase is required in skeletal muscles for strengthening the integrin-ECM adhesion complex. Dev Biol. 2008;

92. Hynes RO. Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. Vol. 110, Cell. 2002. p. 673–87.

93. Ivaska J, Heino J. Interplay between cell adhesion and growth factor receptors: From the plasma membrane to the endosomes. Cell and Tissue Research. 2010.

94. Pasapera AM, Plotnikov S V., Fischer RS, Case LB, Egelhoff TT, Waterman CM. Rac1-dependent phosphorylation and focal adhesion recruitment of myosin IIA regulates migration and mechanosensing. Curr Biol. 2015;

95. Kitajima N, Watanabe K, Morimoto S, Sato Y, Kiyonaka S, Hoshijima M, et al. TRPC3-mediated Ca2+ influx contributes to Rac1-mediated production of reactive oxygen species in MLP-deficient mouse hearts. Biochem Biophys Res Commun. 2011;

96. Wehrle-Haller B. Assembly and disassembly of cell matrix adhesions. Current Opinion in Cell Biology. 2012.

97. Ehsan M, Kelly M, Hooper C, Yavari A, Beglov J, Bellahcene M, et al. Mutant Muscle LIM Protein C58G causes cardiomyopathy through protein depletion. J Mol Cell Cardiol. 2018;

98. Schmeichel KL, Beckerle MC. The LIM domain is a modular protein-binding interface. Cell. 1994;

99. Chang DF, Belaguli NS, Iyer D, Roberts WB, Wu SP, Dong XR, et al. Cysteine-rich LIM-only proteins CRP1 and CRP2 are potent smooth muscle differentiation cofactors. Developmental Cell. 2003.

100. Lu J, Landerholm TE, Wei JS, Dong XR, Wu SP, Liu X, et al. Coronary smooth muscle differentiation from proepicardial cells requires rhoa-mediated actin reorganization and p160 rho-kinase activity. Dev Biol. 2001;

101. Miralles F, Posern G, Zaromytidou AI, Treisman R. Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. Cell. 2003;

102. Vartiainen MK, Guettler S, Larijani B, Treisman R. Nuclear actin regulates dynamic subcellular localization and activity of the SRF cofactor MAL. Science (80-). 2007;

103. Wang Z, Wang DZ, Hockemeyer D, McAnally J, Nordheim A, Olson EN. Myocardin and ternary complex factors compete for SRF to control smooth muscle gene expression. Nature. 2004;

104. Parmacek MS. Myocardin-related transcription factors: Critical coactivators regulating cardiovascular development and adaptation. Circulation Research. 2007.

105. Kuwahara K, Barrientos T, Teg Pipes GC, Li S, Olson EN. Muscle-specific signaling mechanism that links actin dynamics to serum response factor. Mol Cell Biol. 2005;

106. Webster KD, Ng WP, Fletcher DA. Tensional homeostasis in single fibroblasts. Biophys J. 2014;

107. Brown RA, Prajapati R, McGrouther DA, Yannas I V., Eastwood M. Tensional homeostasis in dermal fibroblasts: Mechanical responses to mechanical loading in three-dimensional substrates. J Cell Physiol. 1998;

108. Parker KK, Ingber DE. Extracellular matrix, mechanotransduction and structural hierarchies in heart tissue engineering. Philos Trans R Soc B Biol Sci. 2007;362(1484):1267–79.

109. Butler JP, Tolic-Norrelykke IM, Fabry B, Fredberg JJ. Traction fields, moments, and strain energy that cells exert on their surroundings. AJP Cell Physiol. 2002;

110. Saphirstein RJ, Gao YZ, Jensen MH, Gallant CM, Vetterkind S, Moore JR, et al. The Focal Adhesion: A Regulated Component of Aortic Stiffness. PLoS One. 2013;

111. Mitchell GF. Effects of central arterial aging on the structure and function of the peripheral vasculature: implications for end-organ damage. J Appl Physiol. 2008;

112. Mitchell GF, Hwang SJ, Vasan RS, Larson MG, Pencina MJ, Hamburg NM, et al. Arterial stiffness and cardiovascular events: The framingham heart study. Circulation. 2010;

113. Greenwald SE. Ageing of the conduit arteries. Journal of Pathology. 2007.

114. Wang X, Li Q, Adhikari N, Hall JL. A role for muscle LIM protein (MLP) in vascular remodeling. J Mol Cell Cardiol. 2006;

115. Chan CE, Odde DJ. Traction dynamics of filopodia on compliant substrates. Science (80-). 2008;

116. Giannone G, Mège RM, Thoumine O. Multi-level molecular clutches in motile cell processes. Trends in Cell Biology. 2009.

117. Swaminathan V, Waterman CM. The molecular clutch model for mechanotransduction evolves. Nature Cell Biology. 2016.

118. Mitchison T, Kirschner M. Cytoskeletal dynamics and nerve growth. Neuron. 1988.

119. Sawada Y, Tamada M, Dubin-Thaler BJ, Cherniavskaya O, Sakai R, Tanaka S, et al. Force Sensing by Mechanical Extension of the Src Family Kinase Substrate p130Cas. Cell. 2006;

120. Ng Y-W, Lau L-S, Manser E, Lim L, Dong J-M. Paxillin nuclear-cytoplasmic localization is regulated by phosphorylation of the LD 4 motif: evidence that nuclear paxillin promotes cell proliferation . Biochem J. 2008;

121. Hayakawa K, Tatsumi H, Sokabe M. Actin filaments function as a tension sensor by tension-dependent binding of cofilin to the filament. J Cell Biol. 2011;

122. Swift J, Ivanovska IL, Buxboim A, Harada T, Dingal PCDP, Pinter J, et al. Nuclear lamin-A scales with tissue stiffness and enhances matrix-directed differentiation. Science (80-). 2013;

123. Guilluy C, Osborne LD, Van Landeghem L, Sharek L, Superfine R, Garcia-Mata R, et al. Isolated nuclei adapt to force and reveal a mechanotransduction pathway in the nucleus. Nat Cell Biol. 2014;

124. Sathe AR, Shivashankar G V., Sheetz MP. Nuclear transport of paxillin depends on focal adhesion dynamics and FAT domains. J Cell Sci. 2016;

125. Lachowski D, Cortes E, Robinson B, Rice A, Rombouts K, Del Río Hernández AE. FAK controls the mechanical activation of YAP, a transcriptional regulator required for durotaxis. FASEB J. 2018;

126. Gumbiner BM. Signal transduction by β-catenin. Curr Opin Cell Biol. 1995;

127. Gottardi CJ, Arpin M, Fanning AS, Louvard D. The junction-associated protein, zonula occludens-1, localizes to the nucleus before the maturation and during the remodeling of cell-cell contacts. Proc Natl Acad Sci. 2002;

128. Huber O, Korn R, McLaughlin J, Ohsugi M, Herrmann BG, Kemler R. Nuclear localization of β-catenin by interaction with transcription factor LEF-1. Mech Dev. 1996;

129. Lewis JM, Baskaran R, Taagepera S, Schwartz MA, Wang JY. Integrin regulation of c-Abl tyrosine kinase activity and cytoplasmic-nuclear transport. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996;

130. Orsulic S, Peifer M. An in vivo structure-function study of Armadillo, the β-catenin homologue, reveals both separate and overlapping regions of the protein required for cell adhesion and for wingless signaling. J Cell Biol. 1996;

131. Nix DA, Beckerle MC. Nuclear-cytoplasmic shuttling of the focal contact protein, zyxin: A potential mechanism for communication between sites of cell adhesion and the nucleus. J Cell Biol. 1997;

132. Dupont S, Morsut L, Aragona M, Enzo E, Giulitti S, Cordenonsi M, et al. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. Nature. 2011;

133. Humphries JD, Wang P, Streuli C, Geiger B, Humphries MJ, Ballestrem C. Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin. J Cell Biol. 2007;179(5):1043–57.

134. Boateng SY, Senyo SE, Qi L, Goldspink PH, Russell B. Myocyte remodeling in response to hypertrophic stimuli requires nucleocytoplasmic shuttling of muscle LIM protein. J Mol Cell Cardiol. 2009;

135. Heineke J, Ruetten H, Willenbockel C, Gross SC, Naguib M, Schaefer A, et al. Attenuation of cardiac remodeling after myocardial infarction by muscle LIM protein-calcineurin signaling at the sarcomeric Z-disc. Proc Natl Acad Sci. 2005;

136. Boateng SY, Belin RJ, Geenen DL, Margulies KB, Martin JL, Hoshijima M, et al. Cardiac dysfunction and heart failure are associated with abnormalities in the subcellular distribution and amounts of oligomeric muscle LIM protein. Am J Physiol Circ Physiol. 2007;

137. Schoen I, Pruitt BL, Vogel V. The Yin-Yang of Rigidity Sensing: How Forces and Mechanical Properties Regulate the Cellular Response to Materials. Annu Rev Mater Res. 2013;

138. Meacci G, Wolfenson H, Liu S, Stachowiak MR, Iskratsch T, Mathur A, et al. ?-Actinin links extracellular matrix rigidity-sensing contractile units with periodic cell-edge retractions. Mol Biol Cell. 2016;

139. Roca-Cusachs P, del Rio A, Puklin-Faucher E, Gauthier NC, Biais N, Sheetz MP. Integrin-dependent force transmission to the extracellular matrix by -actinin triggers adhesion maturation. Proc Natl Acad Sci. 2013;110(15):E1361–70.

8. ANEXOS

8. ANEXOS

SDC: 3299/09/050

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

À

Comissão Científica do InCor

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa-CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU** na sessão de 20.05.15 a execução do subprojeto intitulado **"Caracterização do interatoma de CRP3: Implicações nos processos fisiológicos e patológicos vasculares"**, como **tese de doutorado** de **João Carlos R. da Silva** sob orientação da **Ayumi Aurea Miyakawa.**

O referido projeto faz parte do **Protocolo de Pesquisa nº 0824/09**, intitulado **"Avaliação dos mecanismos regulatórios da CRP3/MLP durante a arterialização de enxertos venosos em sistemas ex vivo, in vitro e in vivo"**, aprovado por esta CAPPesq em 19.08.09.

CAPPesq, 20 de Maio de 2015

COMISSÃO CIENTÍFICA RECEBIDO 21/05/2015

Prof. Dr. Alfredo José Mansur
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar - CEP 05403-010 - São Paulo - SP.
Fone: 55 11 3069-6442 ramais 16, 17, 18 e 20 - e-mail: cappesq@hcnet.usp.br

USP - HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação dos Mecanismos regulatórios da CRP3/MLP durante a arterialização de enxertos venosos em sistemas ex vivo, in vitro e in vivo

Pesquisador: Jose Eduardo Krieger

Área Temática: Genética Humana:
(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 1

CAAE: 69401817.3.0000.0068

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO
Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Outros

Detalhe: troca de título do subprojeto, troca de orientador,troca de Programa de vinculação

Justificativa: Solicita-se alteração do título do subprojeto: "Caracterização do interatoma de CRP3:

Data do Envio: 10/04/2019

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.281.345

Apresentação da Notificação:

Os pesquisadores submeteram para a apreciação da CAPPesq, em carta datada de 08 de abril de 2019, a solicitação de alteração do título do subprojeto vinculado ao protocolo inicial (CAAE 69401817300000068) de "Caracterização do interatoma de CRP3: implicações nos processos fisiológicos e patológicos vasculares" para "Papel da proteína rica em cisteína e glicina 3 (CRP3) na mecanotransdução de células musculares lisas aórticas". Além disso, foi solicitado também a alteração da orientação do aluno João Carlos Ribeiro da Silva, de Dra Ayumi Miyakawa Yamaguchi para Dr José Eduardo Krieger, bem como a alteração do programa de Pós-graduação de Fisiologia Experimental para Ciências Médicas.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5° andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Objetivo da Notificação:

Envio de relatório parcial e solicitação de alterações do título do subprojeto, além da orientação do aluno de mestrado, bem como do programa de Pós-graduação a que está vinculado.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Nenhum

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

O relatório parcial apresentado contempla os resultados obtidos até o momento, e aponta que outras avaliações serão realizadas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Nenhuma.

Recomendações:

Nenhuma.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Adequado para aprovação.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	2019_carta_3299.pdf	10/04/2019 16:38:16	Jose Eduardo Krieger	Postado
Outros	2019_relatorio_parcial_joao.pdf	10/04/2019 16:42:39	Jose Eduardo Krieger	Postado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Ovidio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

USP - HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE

Continuação do Parecer: 3.281.345

SAO PAULO, 24 de Abril de 2019

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Ovidio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br