



Universidade de São Paulo
Instituto de Biociências

Rodrigo Barbosa de Souza



Estudo morfológico e hemodinâmico da aorta e análise do remodelamento das microfibrilas nos órgãos do sistema circulatório do modelo $mg\Delta^{lpn}$ sob a terapêutica com Losartan®.

Morphological and hemodynamic study of the aorta and analysis of remodeling of microfibrils in the organs of the circulatory system of the $mg\Delta^{lpn}$ model under Losartan® therapy.

São Paulo

2020

Rodrigo Barbosa de Souza

Estudo morfológico e hemodinâmico da aorta e análise do remodelamento das microfibrilas nos órgãos do sistema circulatório do modelo $mg\Delta^{lpn}$ sob a terapêutica com Losartan®.

Morphological and hemodynamic study of the aorta and analysis of remodeling of microfibrils in the organs of the circulatory system of the $mg\Delta^{lpn}$ model under Losartan® therapy.

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biologia – Genética

Orientadora: Profa. Lygia da Veiga Pereira Carramaschi

Co-orientador: Ivan Hong Jun Koh

São Paulo

2020

Autorizo a reprodução total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca do Instituto de Biociências da USP,
com os dados fornecidos pelo (a) autor (a) no formulário:
'<https://biblioteca.ib.usp.br/ficha-catalografica/src/ficha.php>'

Barbosa de Souza, Rodrigo
Estudo morfológico e hemodinâmico da aorta e
análise do remodelamento das microfibrilas nos
órgãos do sistema circulatório do modelo mg?l^{pr} sob a
terapêutica com Losartan®. / Rodrigo Barbosa de
Souza ; orientadora Lygia da Veiga Pereira
Carramaschi ; coorientador Ivan Hong Jun Koh -- São
Paulo, 2020.
134 p.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo. Departamento de Genética
e Biologia Evolutiva.

1. Síndrome de Marfan. 2. tecido conjuntivo. 3.
fibrilina-1. 4. modelo animal. 5. anormalidades
cardiovasculares . I. da Veiga Pereira Carramaschi,
Lygia , orient. II. Hong Jun Koh, Ivan, coorient.
III. Título.

Bibliotecária responsável pela catalogação:
Elisabete da Cruz Neves - CRB - 8/6228

*“Caminhante são suas pegadas a estrada e nada mais;
caminhante não tem caminho: o caminho é feito caminhando.” (Antonio Machado).*

Dedicatória

Eu dedico esse trabalho a minha avó, Marlene Barbosa de Souza, um exemplo vivo de resiliência e determinação, minha referência de vida. Ao longo da minha trajetória acadêmica, incentivou-me constantemente a buscar meus objetivos, sempre com conversas afáveis e firmes.

Agradecimentos Especiais.

Gostaria de agradecer à minha orientadora professora Lygia da Veiga Pereira por toda ajuda e atenção dedicada ao longo do desenvolvimento do projeto. É imprescindível dizer a honra que eu tive em ser orientado por ela, além das valiosas discussões, sempre foi muito atenciosa, incentivando constantemente meu progresso acadêmico. Durante o projeto, a professora estimulou-me a aprender diversas expertises, as quais foram ferramentas importantíssimas para ampliar a compreensão do projeto.

Também gostaria de agradecer ao meu co-orientador professor Ivan Hong Jun Koh, por toda ajuda e atenção ao longo dos anos. Tive a oportunidade de ser orientado por ele antes do projeto de doutorado, desde 2013. Além das valiosas discussões ao longo dos anos, me ensinou a destreza da microcirurgia e a intersecção de diferentes tópicos acadêmicos na elucubração dos fenômenos biológicos.

Além de agradecer aos meus orientadores, eu agradeço à Rachel Lang, minha namorada, que me apoiou e estimulou o desenvolvimento de cada etapa desse projeto. Além da calma e compreensão de escutar e corrigir as apresentações e os textos, esteve do meu lado em todos os momentos, sempre me incentivando e dizendo que tudo seria possível.

Agradecimentos

Embora não tenha sido oficialmente formalizado como meu co-orientador, não posso deixar de agradecer ao Dr. Luis Ernesto Farinha-Arcieri por toda ajuda nesses anos, tanto nos esclarecimentos e nas metodologias, quanto na atenção e nas discussões de elaboração de relatórios e trabalhos acadêmicos. Uma pessoa ímpar, que sempre esteve ao meu lado, auxiliando em todos os aspectos, desde o período anterior ao doutorado.

Curiosamente, a vida nos apresenta pessoas que se tornam grandes amigos e companheiros para todas as horas, como o Dr. Renan Barbosa Lemes, que encontrei, ao acaso, nos cafés da tarde da Universidade de São Paulo e, ao começar a discutirmos alguns tópicos, iniciou-se uma grande amizade e alguns cálculos não convencionais.

Durante esse período, pude construir uma amizade com Raquel Sarafian, Juliana Borsoi, Isabela Gyuricza e Carolina Mendonça. Gostaria de agradecer toda ajuda nesses anos, as conversas e o companheirismo em todos os momentos.

Também gostaria de agradecer aos amigos do laboratório Lance: Yordanca, Gustavo, Raissa, Daniel, Fabiano, Mariana, Glauco e Patricia, por todo companheirismo nesse período e pelas valiosas discussões dos meus resultados nesses anos.

Não posso deixar de agradecer as amizades formadas no laboratório de microcirurgia: Ana Alvim, José Custódio, Ye Ran Kang, Marta Nakamae, Sayone Moura, Giovana Obara, Lissa, Karine Rhein, Germano, Ernesto. Grandes amigos para todas as horas, grandes auxílios ao longo do tempo e sempre deixando na memória motivos alegres para recordar.

Gostaria de agradecer ao Professor Ricardo Toma, por sua ajuda nesses anos todos. É um grande amigo e me possibilitou construir pontes em diversos conhecimentos.

Sou imensamente agradecido por ter a colaboração do Instituto Biológico de São Paulo, que abriu as portas para mim desde a graduação. Com destaque para a Profa. Marcia Helena Braga Catroxo, do Laboratório de Microscopia Eletrônica e para a Profa. Ana Maria Cristina R.B.F. Martins do Laboratório LISA.

Particularmente eu gostaria de agradecer à Luara Lucena Cassiano, a qual foi minha veterana na graduação e ao longo de toda a minha trajetória acadêmica auxiliou em todos os aspectos. Além da amizade, a Luara auxiliou em todos os protocolos morfológicos para execução das técnicas em histologia e imunohistoquímica.

Durante o doutorado tive a oportunidade de fazer uma visita acadêmica em Cardiff University's School of Optometry and Vision Sciences, coordenada pelo Prof. Keith Meek, o qual me orientou nesse período em técnicas de ultra-estrutura e em reconstrução de estruturas de componentes da matriz extra celular. Foi um período de grandes aprendizagens, único e memorável. Gostaria de agradecer o acolhimento e o auxílio do Prof. Keith Meek, Philip Lewis, Sally Hayes, Rob Young e Eleanor Feneck.

Gostaria de agradecer ao professor Dieter P. Reinhardt da McGill University, Department of Anatomy and Cell Biology and Faculty of Dentistry, Montreal, Quebec, Canada, por fornecer o anticorpo de anti-fibrilina-1 para executar o trabalho.

Também gostaria de agradecer toda ajuda do prof. Alberto F. Ribeiro, coordenador do Laboratório de Biologia Celular, e os técnicos Sheila Schuindt do Carmo, Waldir Caldeira e Marcio V Cruz por toda ajuda na aquisição e interpretação dos achados ultra-estruturais.

Gostaria de agradecer as grandes e pertinentes discussões com os professores Ricardo Smith, Roberto Tedesco, Marcelo e Maldonado da disciplina de Anatomia Descritiva e Topográfica da Universidade Federal de São Paulo. Por toda a paciência e calma ao explicar-me as associações morfológicas e suas repercussões.

Não posso deixar de agradecer todo auxílio da professora Janette Cerutti e da Thais Biude do departamento de Morfologia e Genética da Universidade Federal de São Paulo. Por sempre auxiliar nos experimentos.

Ao longo do período de doutorado, tive a honra e a oportunidade de conviver com o professor Afonso Caricatti-Neto que me auxiliou nos experimentos morfofuncionais, sempre incentivando meu progresso científico e trazendo discussões que abordavam diferentes pontos de vista.

Gostaria de agradecer imensamente ao Christian Alber e à Jacqueline do biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo por toda ajuda nesses anos, ao fornecer os animais para esse projeto e pelo cuidado que sempre tiveram ao tratar dos camundongos.

Gostaria de agradecer ao Flávio e à Carolina Luposeli, por todo auxílio nesses anos, sempre incentivando meu progresso.

Gostaria também de agradecer à Silvia Abuchain e à Nivia Stela pelo apoio e companheirismo em todos esses anos, desde 2013. Por sempre estarem ao meu lado, incentivando e acreditando no meu potencial.

Além disso, tenho muito que agradecer à Ana Patrícia e à Erika Takamoto pela paciência de explicar-me, de forma constante, algumas burocracias, sem me desestimular o progresso.

Por último, não posso deixar de agradecer à minha família pelo apoio nesses anos durante a execução da tese.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Projeto. 2016/16077-0.

Lista de Figuras

Figura 1. Medida para definir o fenótipo esquelético	37
Figura 2. Fragmentação das fibras elásticas	38
Figura 3. Mensurações cardíacas	38
Figura 4. Mensuração pulmonar	39
Figura 5. Mensurações do rim	40
Figura 6. Mensuração da intensidade da imunofluorescência	40
Figura 7. Gráfico de expressão do gene <i>Fbn1</i> no pulmão aos 3 meses	43
Figura 8. Gráfico de expressão do gene <i>Fbn1</i> no pulmão aos 6 meses	44
Figura 9. Fenótipo esquelético 3 meses	45
Figura 10. Fenótipo esquelético 6 meses	46
Figura 11. Análise das fibras elásticas por meio de microscopia eletrônica de varredura	47
Figura 12. Taxa de integridade de fibras elásticas	48
Figura 13. Fluxo sanguíneo da aorta torácica	49
Figura 14. Curva Spectral do fluxo sanguíneo da aorta torácica aos 3 meses	50
Figura 15. Curva Spectral do fluxo sanguíneo da aorta torácica aos 6 meses	51
Figura 16. Morfologia Cardíaca aos 3 meses.	53
Figura 17. Fibrilina-1 e o tecido cardíaco aos 3 meses	54
Figura 18. MMP-9 e o tecido cardíaco aos 3 meses	55
Figura 19. Fibronectina e o tecido cardíaco aos 3 meses	56
Figura 20. Morfologia Cardíaca aos 6 meses	57
Figura 21. Fibrilina-1 e o tecido cardíaco aos 6 meses	58
Figura 22. MMP-9 e o tecido cardíaco aos 6 meses	59
Figura 23. Fibronectina e o tecido cardíaco aos 6 meses	60
Figura 24. Morfologia pulmonar aos 3 meses	61
Figura 25. Morfometria do pulmão aos 3 meses	62
Figura 26. Fibrilina-1 e o tecido pulmonar 3 meses	63
Figura 27. MMP-9 e o tecido pulmonar 3 meses	64
Figura 28. Fibronectina e o tecido pulmonar 3 meses	65
Figura 29. α -actina de músculo liso e o tecido pulmonar 3 meses	66
Figura 30. Morfologia pulmonar aos 6 meses	67
Figura 31. Morfometria do pulmão aos 6 meses	68
Figura 32. Fibrilina-1 e o tecido pulmonar 6 meses	69

Figura 33. MMP-9 e o tecido pulmonar 6 meses	69
Figura 34. Fibronectina e o tecido pulmonar 6 meses	70
Figura 35. α -actina de músculo liso e o tecido pulmonar 6 meses	71
Figura 36. Morfologia das estruturas glomerulares aos 3 meses	73
Figura 37. Fibrilina-1 e o tecido renal 3 meses	74
Figura 38. MMP-9 e o tecido renal 3 meses	75
Figura 39. Fibronectina e o tecido renal 3 meses	76
Figura 40. α -actina e o tecido renal 3 meses	77
Figura 41. Morfologia das estruturas glomerulares aos 6 meses	78
Figura 42. Fibrilina-1 e o tecido renal 6 meses	79
Figura 43. MMP-9 e o tecido renal 6 meses	80
Figura 44. Fibronectina e o tecido renal 6 meses	81
Figura 45. α -actina e o tecido renal 6 meses	82

Lista de abreviação e Nomenclatura

MFS – Síndrome de Marfan

MEC – Matriz extracelular

MAGP – Glicoproteína associada a microfibrila

TGF β – Fator de Crescimento Transformador β

MMP – Metaloproteinase

VSMC – Célula da musculatura lisa vascular

SMTN – Smoothelina

mg Δ^{lpn} - mg Δ LoxPneo

WT – Animais selvagens

AT1 – Receptor do tipo I

AngII – Angiotensina II

MFS^{Trat} - mg Δ^{lpn} tratados com Losartan®

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

DNA – Ácido desoxirribonucleico

RT-PCR – Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

PBS – Tampão Fosfato

SEM – Microscopia eletrônica de varredura

qPCR – Quantitative Real Time PCR

KI – *Kyphosis Index*

(N) – Numero fragmentações das fibras elásticas

EFI – Índice de integridade das fibras elásticas

MMP-9 – Metaloproteinase-9

ERK – Sinal regulado quinase

MMP-2 – Metaloproteinase-2

Th1 – Célula T *helper* 1

Th17 – Célula T *helper* 17

Resumo

A síndrome de Marfan (MFS) (OMIM #154700) é uma doença autossômica dominante que apresenta mutação no gene *FBN1*, o qual codifica a proteína fibrilina-1, localizada na aorta, coração, pulmão e rim, órgãos principais no eixo cardiovascular. O defeito da fibrilina-1 desempenha um papel de remodelamento tecidual, ativando outras proteínas da MEC e a terapia com Losartan® tem potencial para atenuar as alterações matriciais na síndrome de Marfan. Dado os limites metodológicos na clínica, é usual a utilização de modelos experimentais para a compreensão dos mecanismos intrínsecos de doenças. O modelo $mg\Delta^{lpn}$ recapitula as alterações clínicas e tem uma alta sobrevivência. Por essa razão, o estudo objetivou analisar as repercussões estruturais dos órgãos do eixo cardiovascular no modelo $mg\Delta^{lpn}$ e a influência da terapêutica do Losartan® aos 3 meses e aos 6 meses. No presente trabalho foram utilizados 72 camundongos, sendo eles distribuídos nos grupos: Selvagens (WT), $mg\Delta^{lpn}$ (MFS) e $mg\Delta^{lpn}$ tratados com Losartan® (MFS^{Trat}). Em cada grupo havia animais nas idades de 3 meses e 6 meses, com 12 animais por idade. Para caracterizar as alterações no modelo foram utilizadas as técnicas: raio-x, rtPCR, análise de hemodinâmica, histomorfometria, ultra-estrutural e imunohistoquímicas (fibrilina-1; MMP-9; fibronectina e α -actina de músculo liso). O modelo $mg\Delta^{lpn}$ apresentou defeito da coluna torácica, o qual teve a capacidade de mudar o trajeto da aorta, alterando a dinâmica do fluxo sanguíneo. Uma vez alterado, o fluxo sanguíneo na aorta sobrecarrega o coração, hipertrofiando principalmente o ventrículo esquerdo. Concomitantemente, o pulmão apresentou enfisema e o rim apresentou uma significativa redução do glomérulo, do polo vascular e do espaço urinário. Além disso, notou-se uma redução significativa da proteína fibrilina-1 e um aumento de MMP-9, tanto aos 3 meses quanto aos 6 meses, indicando uma degradação progressiva das fibras elásticas em todos os órgãos analisados. A terapia com Losartan® mostrou uma efetividade na atenuação fenotípica somente aos 3 meses, aumentando a expressão de fibronectina e reduzindo a expressão de MMP-9. Embora notoriamente tenham sido observadas de forma sistêmica alterações nas proteínas fibrilina-1 e MMP-9, foi notado que o remodelamento tecidual foi órgão dependente, além de ter diferentes respostas ao longo do tempo, características as quais impulsionarão novos estudos futuros.

Palavras Chaves: Síndrome de Marfan, tecido conjuntivo, fibrilina-1, modelo animal, anormalidades cardiovasculares.

Abstract

Marfan syndrome (MFS) (OMIM # 154700) is an autosomal dominant disease that has a mutation in the FBN1 gene, which encodes the fibrillin-1 protein, located in the aorta, heart, lung and kidney, Organs main organs in the cardiovascular axis. The fibrillin-1 defect plays a role in tissue remodeling, activating other ECM proteins, and Losartan® therapy has the potential to mitigate matrix changes in Marfan syndrome. Given the methodological limits in the clinic, it is usual to use experimental models to understand the intrinsic mechanisms of diseases. The $mg\Delta^{lpn}$ model recapitulates the clinical changes and has a high survival rate. For this reason, the study aimed to analyze the structural repercussions of the cardiovascular axis organs in the $mg\Delta^{lpn}$ model and the influence of Losartan® therapy at 3 months and 6 months. In the present study, 72 mice were used, distributed in the groups: Savages (WT), $mg\Delta^{lpn}$ (MFS), and $mg\Delta^{lpn}$ treated with Losartan® (MFStrat). In each group, there were animals at the ages of 3 months and 6 months, with 12 animals per age. To characterize the changes in the model, the following techniques were used: x-ray, rtPCR, hemodynamic analysis, histomorphometry, ultrastructural, and immunohistochemistry (fibrillin-1; MMP-9; fibronectin and smooth muscle α -actin). The $mg\Delta^{lpn}$ model presented a defect in the thoracic spine, which had the ability to change the path of the aorta, changing the dynamics of blood flow. Once altered, the blood flow in the aorta overloads the heart, mainly hypertrophying the left ventricle. Concomitantly, the lung presented emphysema and the kidney showed a significant reduction in the glomerulus, vascular pole, and urinary space. In addition, there was a significant reduction in fibrillin-1 protein and an increase in MMP-9, both at 3 months and 6 months, indicating a progressive degradation of elastic fibers in all analyzed organs. Losartan® therapy showed effectiveness in phenotypic attenuation only at 3 months, increasing the expression of fibronectin and reducing the expression of MMP-9. Although changes in fibrillin-1 and MMP-9 proteins have been noted systemically, it was noted that tissue remodeling was organ dependent, in addition to having different responses over time, characteristics which will spur further future studies.

Key Words: Marfan syndrome, connective tissue, fibrillin-1, animal model, cardiovascular abnormalities.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	20
1.1 A Síndrome de Marfan	21
1.2. O gene <i>FBN1</i> e a proteína fibrilina-1	21
1.3. TGFβ1 e suas repercussões	22
1.4 Aspectos clínicos	23
1.5 Outros aspectos que influenciam o fenótipo aórtico na Síndrome de Marfan	24
1.6 Influência de outros órgãos nos aspectos vasculares na Síndrome de Marfan	24
1.7 Modelo Animal para MFS	25
1.8 Terapêutica na MFS	26
OBJETIVO	28
2.1 Objetivo Geral	29
2.2 Objetivos Específicos	29
MÉTODO	30
3.1. Animal	31
3.2 Grupos	31
3.3 Procedimentos	31
3.3.1 Administração da droga losartan	31
3.3.2 Anestesia	31
3.3.3 Radiografia	32
3.3.4 Ato Operatório	32
3.3.4.1 Laparotomia	32

3.3.4.2 Hemodinâmica	32
3.3.4.2 Eutanásia	32
3.3.5 Coleta de amostras	33
3.3.5.1 Coleta dos fragmentos	33
3.3.5.2 Extração de RNA	33
3.3.5.2.1 Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)	34
3.3.5.2.2 <i>Quantitative Real Time PCR (qPCR)</i>	35
3.3.5.3 Histologia	35
3.3.5.4 Microscopia eletrônica de varredura (SEM)	36
3.3.5.5 Imunohistoquímica	36
3.4. Monitoramento	37
3.4.1 Coluna vertebral	37
3.4.2 Morfologia	37
3.4.2.1 Fenótipo Aórtico	37
3.4.2.2 Fenótipo Cardíaco	38
3.4.2.3 Fenótipo Pulmonar	39
3.4.2.4 Fenótipo Renal	39
3.4.2.5 Intensidade das Imunofluorescências	40
3.4 Análise Estatística	41
RESULTADOS	42
4.1 Expressão gene <i>Fbn1</i>	43
4.1.1 3 meses	43

4.1.2 6 meses	44
4.2 Fenótipo da Coluna vertebral	44
4.2.1 3 meses	44
4.2.2 6 meses	45
4.3 Fenótipo aórtico	46
4.3.1 Aspectos morfológicos.	46
4.3.2 Taxa de integridade das fibras elásticas.	47
4.3.3 Fluxo sanguíneo da aorta.	48
4.3.4 Fluxo sanguíneo da aorta: Curva espectral.	50
4.3.4.1 3 meses	50
4.3.4.2 6 meses	51
4.4 Fenótipo Cardíaco.	52
4.4.1 3 meses	52
4.4.1.1 Imunomarcacão	53
4.4.1.1.1 Fibrilina-1	53
4.4.1.1.2 Metaloproteinase-9	54
4.4.1.1.3 Fibronectina	55
4.4.2 6 meses	56
4.4.2.1 Imunomarcacão	58
4.4.2.1.1 Fibrilina-1	58
4.4.2.1.2 Metaloproteinase-9	59
4.4.2.1.3 Fibronectina	60

4.5 Fenótipo pulmonar	61
4.5.1 3 meses.	61
4.5.2 Imunomarcacão	62
4.5.2.1 Fibrilina-1	62
4.5.2.2 Metaloproteinase-9	63
4.6.2.3 Fibronectina	64
4.6.2.4 α -actina de músculo liso	65
4.6.3 6 meses	66
4.6.3.1 Imunomarcacão	68
4.6.3.1.1 Fibrilina-1	68
4.6.3.1.2 Metaloproteinase-9.	69
4.6.2.3.3 Fibronectina	70
4.6.2.3.4 α -actina de músculo liso	71
4.6 Fenótipo Renal	72
4.6.1 3 meses	72
4.6.2 Imunomarcacão	73
4.6.2.1 Fibrilina-1	73
4.6.2.2 Metaloproteinase-9	74
4.6.2.3 Fibronectina	75
4.6.2.4 α -actina de músculo liso	76
4.6.3 6 meses	77
4.6.3.1 Imunomarcacão	78

4.6.3.1.1 Fibrilina-1	78
4.6.3.1.2 Metaloproteinase-9	79
4.6.3.1.3 Fibronectina	80
4.6.3.1.4 α -actina de músculo liso	81
5.DISCUSSÃO	83
5.1 Discussão	84
6. CONCLUSÕES	106
6.1 Conclusões	107
7. REFERÊNCIAS	109
8. PUBLICAÇÕES	127
8.1 Publicações relacionadas à tese	128
9. Anexos	129
9.1 Anexo A. Protocolo do Comitê de ética no Uso de Animais do IB aprovado para	130
9.2 Anexo B. I- Publicação relacionadas à tese	131
este trabalho.	
9.3 Anexo C. II- Publicação relacionadas à tese	132
9.4 Anexo D. III- Publicação relacionadas à tese	133
9.5 Anexo E. IV- Publicação relacionadas à tese	134

1. INTRODUÇÃO

1.1 A Síndrome de Marfan

A Síndrome de Marfan (MFS) (OMIM #154700) é uma doença genética com alterações no tecido conjuntivo, que apresenta um padrão de herança autossômica dominante, com incidência estimada de 1 para 5.000 nascidos vivos (CHIU et al., 2014). A doença, descrita pela primeira vez em 1896 pelo pediatra francês Antoine Bernard Marfan (BEIGHTON, 1993), é provocada por mutações no gene *FBN1* (15q21.1) que apresenta uma organização genômica de 65 *exons*, com 200 Kb e um mRNA de 9663 nucleotídeos (PEREIRA et al. 1993; CORSON et al. 1993; BIERY et al. 1999).

1.2. O gene *FBN1* e a proteína fibrilina-1

O gene *FBN1* codifica a proteína fibrilina-1, uma glicoproteína ligante de cálcio (HANDFORD, 2000), encontrada na matriz extracelular (MEC) do osso, da pele, pulmões, rins, vasos sanguíneos, cartilagens, tendões, músculos, córnea e zônula ciliar (SAKAI et al. 1991). A fibrilina-1 é uma das principais e a mais abundante proteína do componente fibrilar na formação do sistema de fibras elásticas (SHERRATT et al. 2001).

A formação do sistema de fibras elásticas decorre da interação dos componentes fibrilares (fibrilina-1, fibrilina-2, fibronectina-4, fibulina-8 e com as MAGP (glicoproteínas associadas à microfibrila) com o componente amorfo, a elastina (KIELTY et al. 2002; BALDWIN et al. 2013). Conforme o componente amorfo (moléculas de tropoelastina) se interliga com os componentes fibrilares, formam-se arranjos que são classificados em três tipos de fibras: oxitalânicas, elaunínicas e elástica madura.

Pela ampla distribuição da proteína fibrilina-1 na MEC, encontra-se na MFS alterações em seus sítios de predominância, como: dismorfologia óssea, escolioses, enfisema pulmonar, edema pulmonar, ruptura dos alvéolos pulmonares, pneumotórax espontâneo, glomerulonefrite com membrana proliferativa, glomeruloesclerose segmentar e focal, dilatação da aorta, aneurismas, dissecções da aorta, ectopia da lente, ceratocone, córnea plana e hérnias no sistema digestório (ROBINSON, GODFREY, 2000; SALLUM et al. 2002; NEPTUNE et al. 2003; BOSEMAN et al. 2008; GLARD et al. 2008; BALDWIN et al., 2013; PYERITZ, 2018).

A fibrilina-1, além de fazer parte da formação do sistema de fibras elásticas, apresenta uma ação antagônica com a citocina TGF- β , que é estabelecida pela ancoragem da citocina na fibrilina-1 e, dessa forma, a citocina é sequestrada na proteína, transformando-a, no seu estado de latência. (KAARTINEN, WARBOUOTON, 2003; BYERS, 2004; KIELTY, 2006; SENGLE et al. 2012).

1.3. TGF β 1e suas repercussões

A principal causa de óbito na MFS é a ruptura da aorta nos processos aneurismáticos e na dissecação clássica (SOUZA et al. 2017; PYERITZ, 2018). Por essa razão, os estudos da repercussão da citocina TGF β são direcionados para as estruturas na aorta.

Na MFS, a alteração da fibrilina-1 inibe o sequestro da citocina TGF β , que se ativa em excesso na MEC, promovendo uma expressão acentuada das metaloproteinases (MMP), cuja função é degradar elementos matriciais. Sua ativação na MFS promove a deterioração das propriedades mecânicas da aorta, aumento da elastólise, baixa contratilidade, aumento da apoptose e da osteopontina nas células de musculatura lisa vascular (VSMC), tornando o vaso suscetível ao desenvolvimento de aneurisma, de dissecação e ruptura (BUNTON et al. 2001; CHUNG et al. 2007; BALDWIN et al. 2013; CROSAS-MOLIST et al. 2015).

As contrações das VSMCs, em condições fisiológicas, regulam a integridade de resistência à tração da parede da aorta, e, na MFS, essa integridade de resistência à tração na aorta apresenta-se limitada. (CHUNG et al. 2007). CROSAS-MOLIST et al. (2015) mostraram que a persistência da sinalização crônica do TGF β 1 na MFS era um potente regulador das VSMC, podendo alterar o fenótipo de diferenciação basal das mesmas.

Nos estudos com o modelo experimental C1039G (CHUNG et al. 2007; e SYYONG et al. 2009), foi observada uma redução na contração das VSCMs e, em estudos com pacientes com MFS, notou-se uma alta expressão de α -actina, smoothelin (SMTN), proteína-22alpha do músculo liso, calponina-1 e colágeno-I na parede da aorta (CROSAS-MOLIST et al. 2015).

Concomitantemente, é visto que as células da VSCM na MFS entram em apoptose (CHUNG et al. 2007), expondo na sua superfície celular as caspases, que contribuem para degradação da elastina (EMRICH et al. 2015), o que induz a uma

maior deficiência na integridade de resistência à tração da parede da aorta (CHUNG et al. 2007).

Observa-se que a MFS é uma doença que apresenta fenótipos vasculares imprevisíveis e complexos pelo comprometimento da parede vascular, podendo levar os pacientes a apresentarem em alguns casos múltiplos aneurismas ou, até mesmo, aneurismas e dissecções. O cenário caótico que a doença apresenta faz com que a cirurgia e o tratamento sejam um desafio para os cirurgiões e os clínicos. (CRAWFORD et al. 1990; VIRGILIO et al. 1994; NIINAMI et al. 1999; MAGNONI et al. 2012; SAITO et al. 2014).

1.4 Aspectos clínicos

O desequilíbrio matricial da fibrilina-1 é visto em diferentes órgãos resultando nos pacientes em alterações em outros sistemas. No sistema esquelético, por exemplo: Os pacientes apresentam altura acima da média, membros longos e com alta mobilidade, escoliose e malformações do esterno e do palato (GLARD et al. 2008; PYERITZ, 2018). Essas alterações causam dores musculares, nos ossos e nas articulações. Além disso, alguns pacientes apresentam dificuldade na fala devido a malformações do palato. As malformações e fragilidade da coluna espinhal podem acarretar graves danos e alguns casos de óbito já foram relatados em pacientes que sofreram subluxação espontânea atlanto-axial (GLARD et al. 2008; PYERITZ, 2018).

Além disso, as alterações oculares também são comuns em pacientes afetados pela MFS (PYERITZ 2018). Cerca de 60% dos pacientes diagnosticados apresentam deslocamento do cristalino (*Ectopia lentis*), característica considerada chave para o diagnóstico clínico da MFS, uma vez que outras doenças com características semelhantes como síndrome Loeys-Dietz não apresentam essa característica (MEESTER et al. 2017). Acredita-se que a *Ectopia lentis* ocorre devido à fragilidade do tecido conectivo que sustenta o cristalino (ESFANDIARI et al. 2019).

Como já mencionado, a causa de morte da MFS é a ruptura da aorta, contudo as alterações cardiovasculares são distribuídas em diferentes fenótipos. Segundo a revisão de STUART e WILLIAMS, (2007): 60% a 80% dos pacientes são diagnosticados com dilatação da aorta e posteriormente desenvolvem dissecção; 76% com dilatação da artéria pulmonar com ocasionais processos de dissecção; 80% a 100% com dilatação da parte descendente da aorta ocasionando posteriormente a sua dissecção. Além disso, as

alterações cardíacas observadas foram: 52% a 68% com prolapso primário da valva mitral com posterior desenvolvimento de arritmias; 36% com disfunção ventricular esquerda (em crianças); 20%-30% com arritmias, 4% com prolapso da valva tricúspide; 4% com defeito do septo atrial e, em menos de 1%, com formação de aneurisma nas artérias coronárias.

1.5 Outros aspectos que influenciam o fenótipo aórtico na Síndrome de Marfan

As alterações na aorta da MFS são um conjunto complexo de fatores intrínsecos e extrínsecos. Aetiopatogenia dos fatores pode ter origem decorrente das alterações dos componentes da MEC da aorta e das alterações na estrutura do fluxo sanguíneo, desencadeando um processo aterosclerótico na aorta (BUNTON et al., 2001; CHUNG et al., 2007; BALDWIN et al., 2013; QUERZOLI et al., 2014; CROSAS-MOLIST et al., 2015; EMRICH et al., 2015).

Considerando que o principal papel da aorta é conduzir o fluxo sanguíneo para atender as demandas metabólicas e nutricionais do corpo, sua camada média é constituída de fibras elásticas e outras fibrilas, as quais foram projetadas para fornecer a elasticidade necessária para a expansão e recuo resultante dos batimentos cardíacos ao longo da vida (KIELTY, 2017). Na MFS as alterações nos componentes estruturais que constituem a parede da aorta torácica indicam um mecanismo comprometido de amortecimento da pressão sistólica com maior rigidez da parede aórtica e, portanto, apresenta uma limitada complacência para absorver as pressões sistólicas (SOUZA et al. 2019).

Além disso, acredita-se que o defeito na MEC de alguns modelos de experimentação e pacientes resulta em tortuosidade da aorta com lúmen dismórfico. Isso, por sua vez, pode levar a um fluxo sanguíneo turbulento e sua força de cisalhamento pode apresentar um padrão de fluxo de vórtice / hélice aberrante com potencial de desencadear lesões na parede aórtica (QUERZOLI et al. 2014; GEIGER, et al. 2017; SOUZA et al. 2019).

1.6 Influência de outros órgãos nos aspectos vasculares na Síndrome de Marfan

A aorta pertence ao sistema circulatório e é um dos principais vasos que tem a função de retirar sangue do coração e conduzir o fluxo sanguíneo para o corpo (KIELTY 2017; SCHRENKET al. 2018). Em razão dessa relação, tanto o coração

quanto a aorta podem exercer influência um sobre o outro, por exemplo: Processos de remodelamento cardíaco podem influenciar a demanda sanguínea aórtica e em situações patológicas gerar insuficiência cardíaca (GALLO et al. 2019). Curiosamente, foram observados defeitos cardíacos em pacientes e modelos da MFS que podem piorar o fenótipo aórtico (ALPENDURADA et al. 2010; KIOTSEKOGLOU et al. 2008; RADKE et al. 2014; COOK et al. 2014; CAMPENS et al. 2015; LEE et al. 2016; TAE et al. 2016; ARUNAMATA et al. 2018; SOUZA et al. 2019).

Interessantemente, processos de remodelamento cardíaco (hipertrofia das câmaras ventriculares) podem influenciar a dinâmica circulatória do pulmão e o parênquima pulmonar pode influenciar a dinâmica circulatória, culminando em hipertensão pulmonar (McLUNE e PEACOCK 2009; NAEIJE 2013; BHATNAGAR et al. 2018; GALLO et al. 2019). Além disso, sabe-se que o rim tem a capacidade de influenciar a fisiologia pulmonar, a cardíaca e a hemodinâmica, principalmente nas funções de regular o equilíbrio da água e do sódio (no controle da pressão arterial) e no tamponamento pulmonar. (PALM, NORDQUIST, 2011; WADEI, TEXTOR, 2012; HUSAIN-SYED et al. 2016). Em processos patológicos, o rim tem um papel importantíssimo na fisiopatologia das doenças pulmonares (hipertensão pulmonar e doença pulmonar obstrutiva crônica) e cardiovasculares (resistência vascular, hipertensão e hipertrofia dos ventrículos direito e esquerdo) (CROWLEY et al. 2006; GAITA et al. 2012; BASU, WHEETER, 2012; HUSAIN-SYED et al. 2016; VISCONTI et al. 2016; SALLECK, JOHN, 2017; KUMAR et al. 2019).

Contudo, a interligação desses órgãos nos processos patológicos da MFS ainda não foram relacionados, embora eles tenham um papel importantíssimo no eixo cardiovascular.

1.7 Modelo Animal para MFS

Dado o limitado conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na doença vascular na MFS e a limitação ética em estudos clínicos, houve a necessidade de criar modelos animais que pudessem simular as manifestações clínicas a fim de auxiliar sua melhor compreensão (HAMILTON, YU, 2012; CHIU et al., 2014).

Os primeiros modelos experimentais, o *mgΔ* e o *mgR*, desenvolvidos por PEREIRA et al. (1997) e PEREIRA et al. (1999), respectivamente, apresentam baixa expressão do alelo mutado de *Fbn1* e, assim, apenas os homozigotos apresentam

características da síndrome (PEREIRA et al. 1997; PEREIRA et al. 1999; JUDGE et al. 2004).

Posteriormente, observou-se que estes modelos não forneciam meios confiáveis para testar a interferência dominante negativa do alelo mutante (JUDGE et al. 2004).

Em seguida, ocorreu a criação do modelo murino C1039G, que, apesar de apresentar alterações esqueléticas em heterozigose, apresenta fenótipo vascular discreto. (JUDGE et al. 2004).

O modelo mais recente é o $mg\Delta^{lpn}$, que manifesta a dominância negativa da doença e apresenta alterações esqueléticas, cardiovasculares e um processo inflamatório crônico dos pulmões.

Interessantemente, a mutação do modelo $mg\Delta^{lpn}$ apresenta comportamento diferente dependendo da cepa dos animais, por exemplo: A cepa 129 / Sv apresentam uma ampla variabilidade clínica de fenótipos considerados leves até muito graves, antes dos 6 meses de idade. Diferentemente, na cepa C57/Black6 os fenótipos graves aparecem principalmente aos 6 meses (LIMA et al. 2010).

SOUZA et al. (2019) mostraram que os animais $mg\Delta^{lpn}$ tem alterações nos componentes estruturais que constituem a parede da aorta torácica como: Presença de fragmentação severa e desorganização das fibras elásticas, fibras interlamelares desconectadas e presença de colágeno tipo I. Além disso, no grupo de animais que tinham aneurisma e dissecção aórtica foram observadas alterações na curva espectral do fluxo sanguíneo, aumento da frequência cardíaca e redução do fluxo sanguíneo quando comparados aos animais WT, indicando alterações na biomecânica da aorta, além da presença de insuficiência cardíaca de alto débito.

1.8 Terapêutica na MFS

As terapias vigentes para a MFS visam à redução dos fatores de estresse da macrocirculação, por meio de β -bloqueadores e inibidores da Angiotensina II. O uso de β -bloqueadores resulta na diminuição da pressão sanguínea, frequência cardíaca e dilatação da aorta (LOYES, 2015); já o uso de inibidores do receptor tipo I (AT1) da Angiotensina II, resulta na redução da resistência arterial periférica e subsequente redução da pressão arterial, (HABASHI et al. 2006; HABASHI et al. 2011; CRAGO et al. 2014. COOK et al. 2014).

Um inibidor da Angiotensina II (Ang II), com destaque na terapia da MFS é o Losartan®, que inibe o receptor AT1 da Ang II. Seu uso tem sido promissor no tratamento em camundongos, sendo capaz de reduzir a atividade de TGF β 1 e reverter os fenótipos pulmonares e aórticos, como a restauração das fibras elásticas, redução da atividade das MMP 2 e 9, além de recuperar as propriedades mecânicas das células da musculatura lisa vascular (SYYONG et al. 2009; HABASHI et al. 2006).

A efetividade da terapia de Losartan® na MFS se dá pelo fato dela diminuir a fosforilação e a translocação nuclear de Smad2 (transdutor de sinal intracelular e um modulador da transcrição ativada por TGF- β). Essa diminuição da fosforilação da Smad2 tem efeito direto na sinalização de TGF- β , que resulta em sua diminuição, visto que na MFS o excesso da sinalização por TGF- β apresenta um papel no alargamento da raiz da aorta (HABASHI et al. 2006; HABASHI et al. 2011)

Contudo, a terapia com Losartan®, como já mencionado, inibe somente AT1 da Ang II, deixando ativa a sinalização do receptor tipo 2 (AT2) da Ang II. Segundo HABASHI et al. (2011), a ativação da sinalização AT2 resulta numa diminuição da proliferação celular e um aumento da apoptose (HABASHI et al. 2011).

A efetividade da terapia com Losartan® nos modelos experimentais tem provocado muito entusiasmo, o que ocasionou o início de vários ensaios clínicos na MFS, que resultaram na diminuição significativa do crescimento do seio da Valsalva na aorta e da pressão sistólica central e diastólica arterial (LOEYS, 2015; BAHTT et al. 2015). Contudo, FRANKEN et al. (2015) referem que a efetividade do Losartan® é dependente da dominância negativa das mutações do gene FBN1.

Apesar das terapias vigentes para o controle do dismorfismo aórtico atenuarem o fenótipo vascular, o óbito por ruptura da aorta continua persistindo, denotando a necessidade de aprofundar o conhecimento relativo às possíveis influências sistêmicas na MFS.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Estudar a repercussão estruturais dos órgãos que influenciam o sistema circulatório no modelo $mg\Delta^{lpn}$ da síndrome de Marfan e a influência da terapêutica do Losartan®.

2.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar o fenótipo clássico do modelo $mg\Delta^{lpn}$ e a influência da terapêutica do Losartan® aos 3 meses e 6 meses.
2. Avaliar o fenótipo cardíaco quanto a sua morfologia e as proteínas envolvidas na formação das microfibrilas no modelo $mg\Delta^{lpn}$ com e sem a terapia com Losartan ® aos 3 meses e 6 meses.
3. Avaliar o fenótipo pulmonar quanto a sua morfologia e as proteínas envolvidas na formação das microfibrilas no modelo $mg\Delta^{lpn}$ com e sem a terapia com Losartan ® aos 3 meses e 6 meses.
4. Avaliar o fenótipo renal quanto a sua morfologia e as proteínas envolvidas na formação das microfibrilas no modelo $mg\Delta^{lpn}$ com e sem a terapia com Losartan ® aos 3 meses e 6 meses.
5. Intersectar os achados morfológicos e estruturais dos órgãos que influenciam o sistema circulatório no modelo $mg\Delta^{lpn}$ da síndrome de Marfan aos 3 meses e 6 meses.

3. MÉTODO

3.1. Animal

O modelo animal utilizado nesta pesquisa foi o de camundongos fêmeas $mg\Delta^{lpn}$, de 3 e 6 meses, mantidos no Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em gaiolas coletivas e em ambiente com dispositivo automatizado que proporciona claro/escuro (6h00min – 18h00min). Os animais receberam dieta Labina®, água *ad libitum* e permaneceram em aclimação, por um período de sete dias anteriores à realização do estudo. Posteriormente, foram transportados para o Biotério do Departamento de Cirurgia da Escola Paulista de Medicina, onde ficaram em adaptação e aclimação, por pelo menos oito dias antes de serem manuseados para o experimento.

Esta linhagem de camundongos $mg\Delta^{lpn}$ é um modelo para MFS que apresenta uma deleção in-frame dos exons 19-24, e o heterozigoto manifesta fenótipos cardiovasculares, esqueléticos e pulmonares (LIMA et al. 2010; GYURICZA et al. 2020).

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Uso e Cuidado Institucional de Animais do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Protocolo ID: Processo CEA / IBUSP 272/2016 16.1.632.41.7. (Anexo A)

3.2 Grupos

No presente trabalho foram utilizados 72 camundongos, sendo eles distribuídos nos grupos: Selvagens na linhagem 129/Sv (Grupo WT), grupo de animais $mg\Delta^{lpn}$ na linhagem 129/Sv (Grupo MFS) e de animais $mg\Delta^{lpn}$ na linhagem 129/Sv tratados com losartan (Grupo MFS^{Trat}). Em cada grupo havia animais nas idades de 3 meses e 6 meses, com 12 animais por idade.

3.3 Procedimentos

3.3.1 Administração da droga losartan

Os animais $mg\Delta^{lpn}$ pertencentes a linhagem 129/sv receberam a administração oral da droga Losartan® (Cozaar®), desde o desmame até o período de estudo (3 e 6 meses). A droga foi diluída em um razão de 0,6 g/L em água e oferecida diariamente aos animais de forma livre.

3.3.2 Anestesia

A anestesia geral foi realizada nos animais com idade de 3 e 6 meses após aferição do peso em balança digital. Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com uma associação de Ketamina® e Xylazina® (4:1), na dose de 0,1 mL/100 g de massa por via intraperitoneal.

3.3.3 Radiografia

Após a anestesia, os animais foram fixados em cassetes contendo filme para radiografia. Seus membros posteriores e anteriores foram distendidos para que possamos avaliar o grau de lordose da coluna. Posteriormente, foram expostos a 4,0 Kv de raio-x durante o período de 3,0 ms (milissegundos) (Tecno-Design – 500Ma/ 125 Kv).

3.3.4 Ato Operatório

Após a anestesia, os animais foram imobilizados em prancha cirúrgica, em decúbito dorsal, com suas extremidades fixadas com fitas adesivas. A seguir, foi realizada a antisepsia da parede abdominal ventral com álcool a 70% e posterior colocação dos campos cirúrgicos fenestrados e esterilizados.

3.3.4.1 Laparotomia

Posterior à colocação dos campos cirúrgicos, foi realizada a abertura da parede abdominal mediante incisão longitudinal mediana de todos os planos anatômicos, com aproximadamente cinco centímetros, utilizando-se bisturi com lâmina 15 e tesoura tipo Mayo-Hegar reta. Em seguida, foi exposto o intestino delgado, rebatendo-se ambas as estruturas para a exposição da aorta, da veia cava inferior e do rim.

Em todos os procedimentos operatórios, foi utilizado o microscópio cirúrgico modelo M900 D.F. Vasconcellos®, além de instrumental microcirúrgico em condições de assepsia.

3.3.4.2 Hemodinâmica

Por meio de probes (2SB, T206, Transonic Systems Inc, Ithaca, NY) na aorta abdominal supra-frênica foi realizado a mensuração do fluxo desse vaso.

3.3.4.2 Eutanásia

A eutanásia foi realizada após os monitoramentos, por meio da secção da aorta abdominal (próximo ao ramo da artéria ilíaca comum direita e esquerda) e subsequente choque hipovolêmico sob a anestesia geral.

3.3.5 Coleta de amostras

3.3.5.1 Coleta dos fragmentos

Imediatamente após a eutanásia, foram retirados fragmentos de pulmão, aorta torácica, coração e rim. Os fragmentos foram destinados para análise histológica, ultra-estruturais (Microscopia eletrônica de Varredura) e imunomarcção. Para análise de expressão de mRNA, foi coletado fragmento de pulmão, o qual foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -80°C.

Para precisão da escolha dos fragmentos das regiões dos órgãos almejados, foi utilizado microscópio cirúrgico modelo M900 D.F. Vasconcellos®.

3.3.5.2 Extração de RNA

Previamente à extração de RNA, fragmentos de pulmão congelados em nitrogênio líquido foram macerados em cadinhos contendo nitrogênio líquido até que virassem pó. Após esse procedimento, foi adicionado um volume equivalente a 1mL de TRIzol e homogeneizado com auxílio de pistilo. O conteúdo dos cadinhos foi transferido para tubos de 2 mL e, com o objetivo de desfazer possível restos de tecidos, o conteúdo passou cerca de 12 vezes por seringa de 1 mL com agulha de 21 Gauges. As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80°C até que fosse feita a extração de RNA.

Para a extração de RNA, as amostras de pulmão foram incubadas no gelo por 5 minutos e, em seguida, foram adicionados 200µL de clorofórmio a cada amostra, agitando vigorosamente. As amostras foram incubadas por 2 minutos no gelo e centrifugadas a 12000 g a 4°C por 15 minutos, para a separação de três fases: Superior, média e inferior. A fase superior continha o RNA de interesse.

O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo, o qual foi adicionado 1 mL de etanol 70%, diluído em dietil pirocarbonato, homogeneizando as amostras por inversão. Em seguida, o RNA das amostras foram purificados utilizando colunas *RNeasy MiniSpin* do kit de extração de RNA, *RNeasy MiniKit* (Qiagen, 74106), seguindo instruções do fabricante. Durante a purificação de RNA nas colunas, foi feita a

depleção de DNA por meio de digestão com DNase utilizando-se *RNase-Free DNase Set* (Qiagen, 79254), de acordo com as instruções do fabricante.

Após esse procedimento, as amostras foram quantificadas e realizada uma PCR para β -actina para confirmar a ausência de contaminação por DNA. Para isso utilizamos os seguintes oligonucleotídeos, que amplificam um fragmento de 154pb (T_m 60°C):

ActbF: 5' – GGC TGT ATT CCC CTC CAT CG – 3'

ActbR: 5' – CCA GTT GGT AAC AAT GCC ATG T – 3'

As condições de amplificação foram: Etapa 1 (1 ciclo) – 94°C por 3 minutos; etapa 2 (40 ciclos) – 94°C por 30 segundos; 60°C por 20 segundos; 72°C por 15 segundos; etapa 3 (1 ciclo) – 72°C por 4 minutos.

As reações foram montadas adicionando 1 μ L de cada oligonucleotídeo (concentração final de 200nM), 2 μ L de solução tampão 10x (Invitrogen), 0,8 μ L MgCl₂ (50Mm, Invitrogen), 0,32 μ L de dNTPs (5mM; Invitrogen), 0,2 μ L da enzima *taq DNA polimerase* (Invitrogen), 1 μ L do RNA água deionizada para um volume final de 20 μ L para cada reação. Após o término da etapa de amplificação, as amostras foram avaliadas por corrida eletroforética em gel de agarose 3%.

3.3.5.2.1 Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

A partir das amostras de RNA, foi feita a síntese de DNA complementar (cDNA) utilizando *SuperScriptTM III Reverse Transcriptase* (Termo Fisher, 18080044), a partir de 500ng de RNA total, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante. Na primeira etapa do procedimento foram adicionados 1 μ L de oligo(dt) (50 μ M), 500 ng de RNA total de cada amostra e 1 μ L de 10mM Dntp mix (10mM cada dATP, dGTP, dCTIP e dTTP). A mistura desses componentes foi aquecida a 65°C por 5 minutos. A seguir, foi adicionado 4 μ L do tampão *5X First-Strand Buffer*, 1 μ L de 0,1M DTT, 1mL de *RNaseOUTTM Recombinant RNase Inhibitor* (Termofischer, 10777-019) e 1 μ L da enzima *SuperScriptTM III RT*, em cada amostra. Depois dessa etapa, as amostras foram incubadas a 50°C por 60 minutos e a reação foi inativada aquecendo as amostras a 70° por 15 minutos. Para confirmar que a síntese de cDNA foi bem sucedida, foi realizada uma PCR para β -actina como descrito no item 3.3.5.2.

3.3.5.2.2 *Quantitative Real Time PCR (qPCR)*

Depois de ter obtido o cDNA das amostras de pulmão descrito no item 3.3.5.2.1 foi analisada a expressão gênica do gene *Fbn1*, utilizando sondas/*primers* responsáveis por amplificar *Fbn1* selvagem e mutante.

Oligonucleotídeo para amplificação do alelo *Fbn1* mgΔ^{lpn} (Tm 57°C):

Alelo mutante KO F: 5' – GGG ATA TGA AGT AGA CAT AAC TGG GAA A – 3'

Alelo mutante KO R: 5' – GAG GCT GGG TAT CAT CTT GCA – 3'

Sonda KO: 5' – ACT GTG TCG ATA TCA ATG – 3'

Oligonucleotídeo para a amplificação do alelo *Fbn1* selvagem (Tm 55°C)

WT F: 5' – ACA TAA CTG GGA AAA ACT GTC TCG ATA – 3'

WT-R: 5' – TTC CAG GTG TGT TTC GAC ATT GT – 3'

Sonda WT: 5' TGT GCT GAA CAG TCT ACT – 3'

Foram utilizados 40ng de cDNA para cada reação, as quais foram analisadas em triplicada. Para realização do teste foram utilizados os *kits TaqMan Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems, 4304437). As sondas utilizadas foram *TaqMan Gene Expression Assay* para *Fbn1*(Thermofisher, *Mn01334119_m1*) e *Actb* (Termofisher, *Mn00607939_s1*), como controle endógeno da reação. O experimento foi realizado com auxílio do aparelho *StepOnePlus™ Real-Time PCR System*.

3.3.5.3 *Histologia*

Os fragmentos foram fixados por imersão em solução de paraformaldeído 4% em tampão PBS 0,1M, pH 7,4. Após a fixação, as amostras foram submetidas a duas lavagens por imersão no mesmo tampão por um período de 10 minutos. A seguir, foram submetidas à desidratação em série crescente de etanol nas concentrações 50% a 100%, durante 10 minutos a cada passagem. Após esse procedimento, as amostras foram mantidas por aproximadamente 12 horas (*overnight*) em solução de etanol absoluto e historesina (Thecnovit 7100®) em partes iguais (1:1). Em seguida, as amostras foram imersas em resina pura por um período de 4 horas e posteriormente incluída em resina e polimerizador em moldes plásticos apropriados. Os cortes foram equidistantes de 3 µm de espessura e foram obtidos com auxílio de micrótomo American Optical model 820®

e corados pela técnica de Azul de Toluidina Boratada 1%. A observação e registro das imagens foram realizados sob microscópio de luz Carl-Zeiss Axio Scope.A1® e *software* de captura de imagem Zen®.

3.3.5.4 Microscopia eletrônica de varredura (SEM)

Os fragmentos foram fixados durante a noite em fixador de Karnovsky modificado (2,5% de glutaraldeído e 2% de paraformaldeído em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2) com uma concentração final de 0,05% de ácido tânico. Após a fixação o material foi colocado em nitrogênio líquido por 30 segundos e logo em seguida foi criofraturado para acessar as estruturas internas. Após a criofratura, as amostras foram então lavadas em tampão cacodilato de sódio 3 vezes por 10 min e em água destilada por 5 min. As amostras foram fixadas posteriormente em tetróxido de ósmio a 1% por 3 horas e enxaguadas com água destilada 3 vezes por 20 min. As amostras foram então desidratadas em uma série de etanol 70-100% e secas em ponto crítico. Os fragmentos foram revestidos de ouro de acordo com os procedimentos padrão. As amostras foram examinadas a 5 kV usando o estágio de alta resolução do microscópio eletrônico Zeiss Sigma VP.

3.3.5.5 Imunohistoquímica

Os fragmentos foram fixados por imersão em solução de paraformaldeído 4% em tampão PBS 0,1M, pH 7,4. Após a fixação, as amostras foram submetidas a duas lavagens por imersão no mesmo tampão por um período de 10 minutos. A seguir foi submetida à desidratação em série crescente de etanol nas concentrações 50% a 100%, durante 10 minutos a cada passagem. Após a desidratação as amostras foram passadas em 3 banhos de xilol com duração de 15 minutos para diafanizar. Em seguida, as amostras foram mantidas por aproximadamente 12 horas em parafina histológica derretida a 56°C. Os cortes para imunofluorescência foram de 5µm de espessura e foram desparafinados e preparados conforme descrito (BEENE et al. 2013; CASSIANO et al. 2017). Antifibrilina-1 (mrFbn1-C-74-F) (BEENE et al. 2013), anticorpo anti-MMP9 (Abcam), anti-fibronectina (Abcam) e anti- α -actina (Abcam) foram usados. Seções montadas em ProLong Gold Anti-Fading Reagent com 40,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; Invitrogen), visualizadas e fotografadas usando um microscópio Carl-Zeiss Imager.D2.

3.4. Monitoramento

3.4.1 Coluna vertebral

As alterações da coluna vertebral foram avaliadas por meio de Raio X. A imagem radiográfica de cada animal foi analisada no software ZEN com o intuito de quantificar o desvio de coluna. O desvio da coluna é calculado por KI, o qual é uma razão entre o comprimento de uma linha reta da última vértebra cervical até a sexta vértebra lombar (AB) e o comprimento de uma linha perpendicular a esta, da borda dorsal da vértebra no ponto de maior curvatura até a primeira linha (CD). A gravidade da lordose é inversamente proporcional ao valor de KI.



Figura 1. Medida para definir o fenótipo esquelético. Imagens do raio-x de um animal selvagem exemplificando o método de quantificação do fenótipo esquelético, o KI, indicando as linhas para executar o cálculo (razão AB/CD).

3.4.2 Morfologia

Para selecionar os fragmentos de aorta, utilizou-se a coloração de Azul de Toluidina com bórax 1%, pois é um corante de rápida ação.

De cada fragmento dos órgãos escolhidos neste estudo foram feitos 3 cortes equidistantes e destinados a diferentes mensurações.

3.4.2.1 Fenótipo Aórtico

Para cada animal foram analisados três cortes transversais da aorta e, por microscopia óptica, foram contadas as fragmentações das fibras elásticas (N) de cada corte. Por meio do número de fragmentações foi desenvolvido o índice de integridade das fibras elásticas (EFI), calculado seguindo GYURICZA et al. (2020):

$$EFI = \frac{1}{N + 1}$$

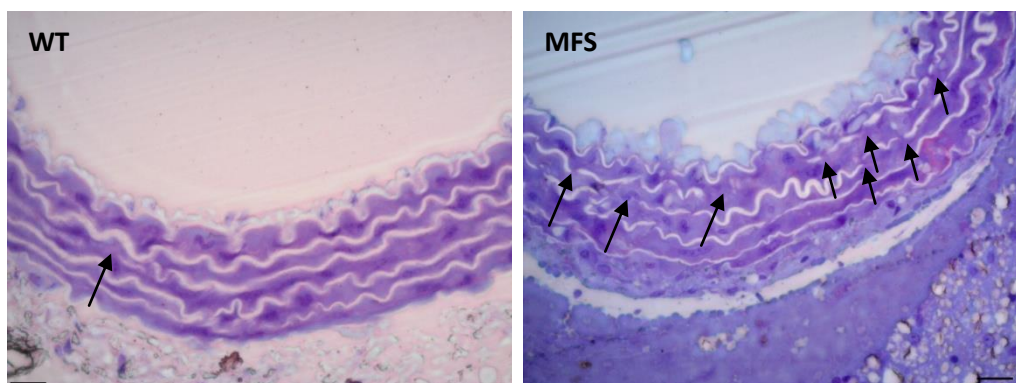


Figura 2. Fragmentação das fibras elásticas. Imagens exemplificando o método de quantificação das fragmentações das fibras elásticas. Microfotografia de corte transversal das aortas no aumento 400x no grupo selvagem (WT) e no grupo Marfan (MFS). As setas indicam a ruptura das fibras elásticas. Barra 10µm

3.4.2.2 Fenótipo Cardíaco

Os cortes coronais do coração foram microfotografados em aumento 25x. A área total do corte coronal foi mensurada por meio da ferramenta "contourn" do *software* ZEN. As espessuras dos ventrículos foram mensuradas por linhas traçadas da borda luminal das cavidades ventriculares até a borda do tecido de revestimento cardíaco de cada cavidade ventricular por meio da ferramenta "*line*" do *software* ZEN

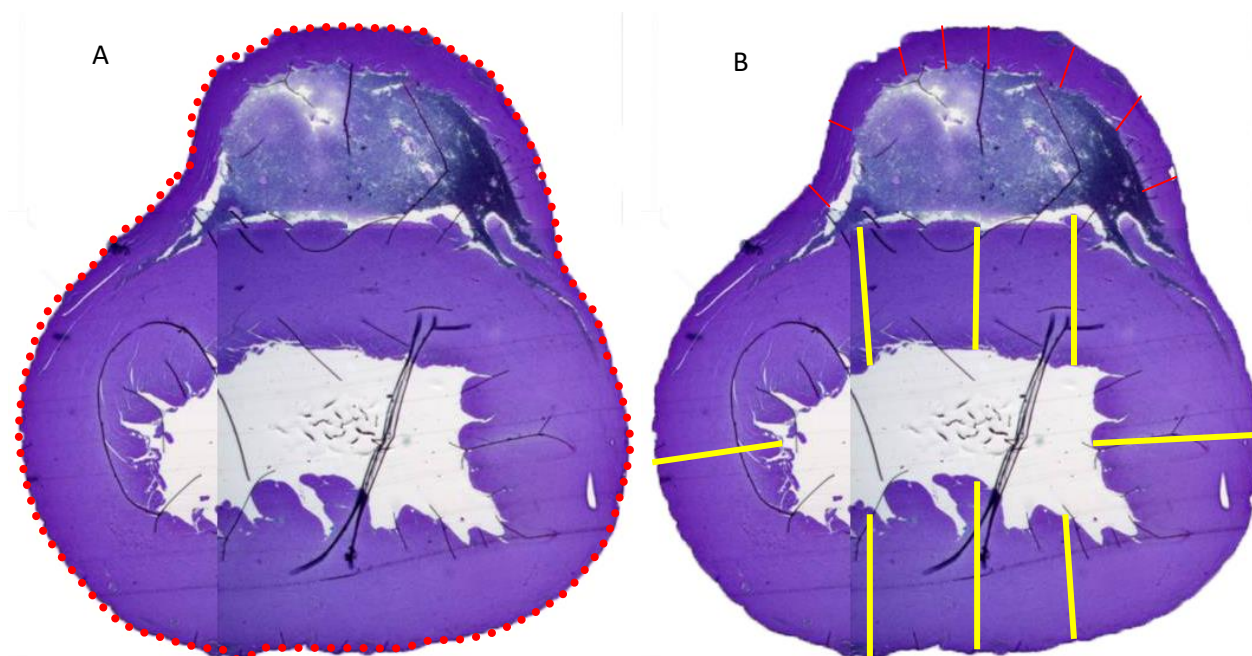


Figura 3. Mensurações cardíacas. Imagens exemplificando o método de quantificação das medidas do fenótipo cardíaco. Microfotografia do corte coronal do coração no aumento 25x no grupo selvagem (WT). Em “A” as linhas vermelhas pontilhadas representam a área total do corte coronal e em “B” as retas vermelhas representam a espessura do ventrículo direito e as setas amarelas representam a espessura do ventrículo esquerdo. Barra 200µm.

3.4.2.3 Fenótipo Pulmonar

Os cortes pulmonares foram fotografados em aumento 400x na periferia do corte em todos os grupos. A área dos alvéolos foi mensurada usando a ferramenta "contourn" do *software* ZEN.

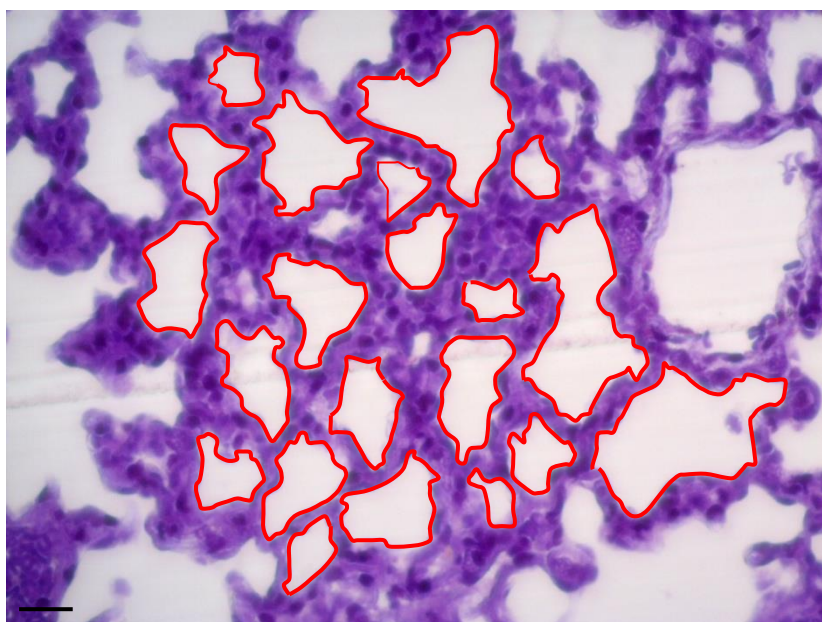


Figura 4. Mensuração pulmonar. Imagens exemplificando o método de quantificação da medida do fenótipo pulmonar. Microfotografia do corte transversal de pulmão no aumento 400x no grupo selvagem (WT). As áreas tracejadas em vermelho representam área alveolar mensurada. Barra 10µm.

3.4.2.4 Fenótipo Renal

Os cortes renais foram fotografados em aumento 400x na região cortical do rim. Após identificados os glomérulos nas microfotografias, a cápsula glomerular e o polo vascular foram contornados por meio da ferramenta "contourn" do *software* ZEN. O

espaço urinário do glomérulo foi calculado por meio da subtração da área da cápsula glomerular e da área do polo vascular de cada glomérulo.

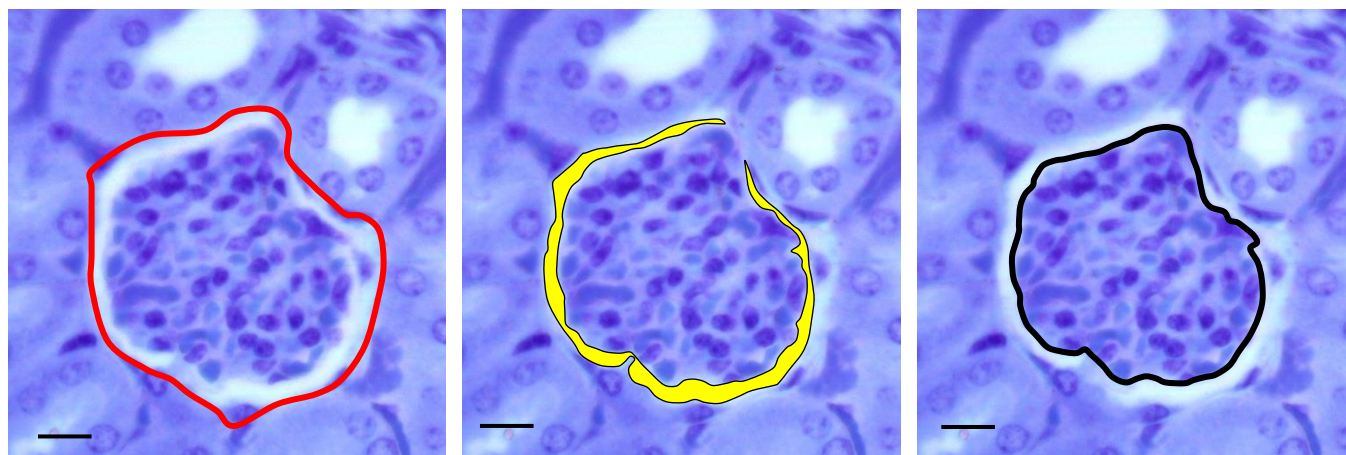


Figura 5. Mensurações do rim. Imagens exemplificando o método de quantificação das medidas do fenótipo renal. Microfotografia do corte transversal de rim no aumento 400x no grupo selvagem (WT). A área tracejada em vermelho representa a área da cápsula glomerular, a área preenchida em amarelo representa a área do espaço urinário e a área trajada em preto representa a área do polo vascular. Barra 10µm.

3.4.2.5 Intensidade das Imunofluorescências

Os cortes imunomarcados pela técnica de imunofluorescência foram fotografados em aumento 400x na região de interesse. Após a microfotografia, foi definida a intensidade das colorações azul, cinza, verde e vermelho por meio da ferramenta "perfil" do software ZEN.

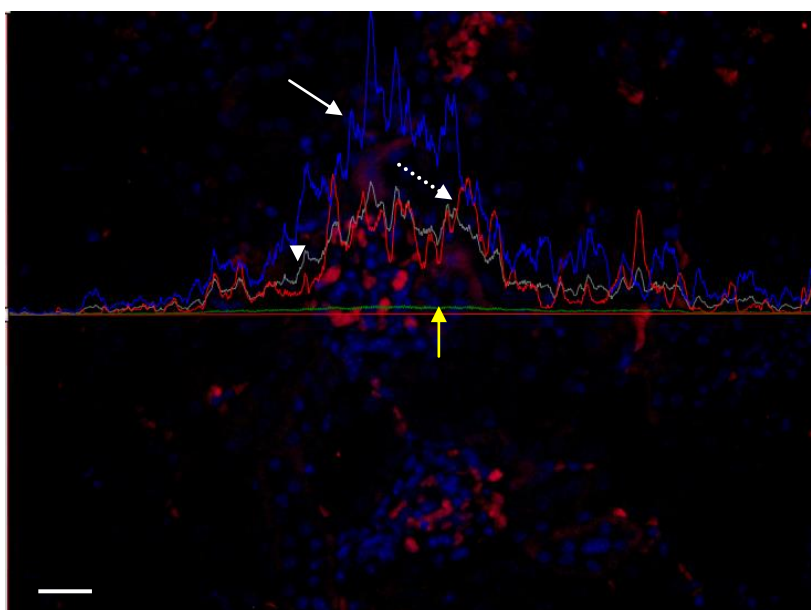


Figura 6. Mensuração da intensidade da imunofluorescência. Imagens exemplificando o método de quantificação da intensidade das cores das microfotografias. Microfotografia do corte transversal de rim no aumento 400x no grupo selvagem (WT). A seta branca indica a intensidade de azul, a cabeça de seta branca a intensidade do cinza, a seta branca pontilhada a intensidade do vermelho e a seta amarela a intensidade do verde na microfotografia. Barra 10µm.

3.4 Análise Estatística

Para o presente estudo foi utilizado o teste de *Kolmogorov-Smirnov* para testar a normalidade. Quando os dados apresentaram uma distribuição normal, foi utilizado o teste *t* de *Student* para amostras independentes. Contudo, quando os dados apresentaram uma distribuição considerada não normal pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov*, foi utilizado o teste *U* de *Mann-Whitney*. Qualquer valor *p* inferior a 0,05 foi determinado como estaticamente significativo. Para esse estudo foi utilizado o software *Prism 5.0*.

4. RESULTADOS

Para esse estudo foram utilizados os animais da cepa 129/Sv devido a sua variabilidade fenotípica. Especificamente para esses experimentos, foram selecionados aqueles animais com fenótipo esquelético grave.

4.1 Expressão gene *Fbn1*

4.1.1 3 meses

Aos 3 meses observou-se que os níveis de expressão do gene *Fbn1* total e do alelo selvagem dos animais do grupo WT foram significativamente maiores quando comparados com os animais dos grupos MFS e MFS^{Trat}. Por outro lado, notou-se que os animais do grupo MFS^{Trat} apresentaram expressão dos alelos *Fbn1* selvagem e mutante do gene *Fbn1* significativamente maior quando comparado com grupo MFS. Mostramos que a terapia com Losartan estimula a expressão do gene *Fbn1*, sem discriminação dos alelos selvagens ou mutantes.

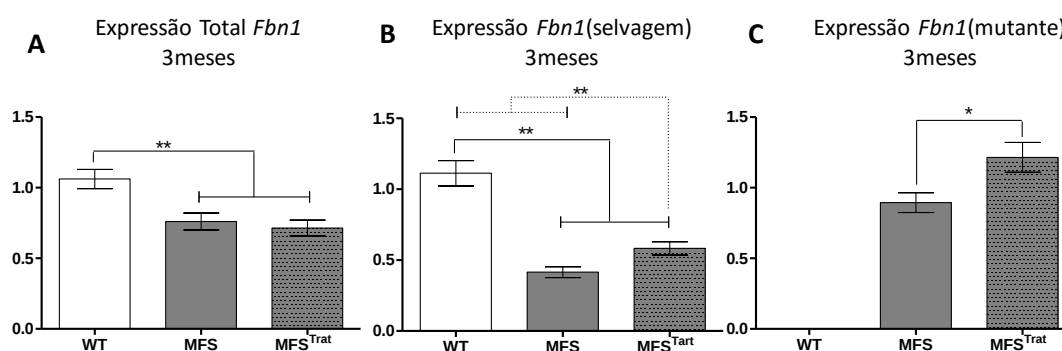


Figura 7. Gráfico de expressão do gene *Fbn1* no pulmão aos 3 meses. A expressão do gene *Fbn1* no pulmão dos grupos WT, MFS e MFS^{Trat}. Em “A” evidenciou a expressão total do gene *Fbn1*, o qual mostrou uma redução significativa nos grupos MFS e MFS^{Trat} quando comparado com o grupo WT. Em “B” evidenciou a expressão do gene *Fbn1* selvagem e observou-se que os animais do grupo MFS e MFS^{Trat} apresentaram uma expressão significativamente menor quando comparada com o grupo WT. Em “C” evidenciou a expressão do gene *Fbn1* mutante e os animais dos grupos MFS e MFS^{Trat} apresentaram uma expressão significativamente maior quando comparado com o grupo WT. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,005$.

4.1.2 6 meses

Aos 6 meses observamos que o nível de expressão total e do alelo selvagem de *Fbn1* apresentou-se significativamente maior no grupo WT quando comparado com os grupos MFS e MFS^{Trat}. Diferentemente do período de 3 meses, aos 6 meses não foi observada diferença estatística entre os grupos MFS e MFS^{Trat} na expressão total, alelo selvagem e alelo mutante do gene *Fbn1*, mostrando que a terapia não influenciou na expressão do gene da *Fbn1* aos 6 meses.

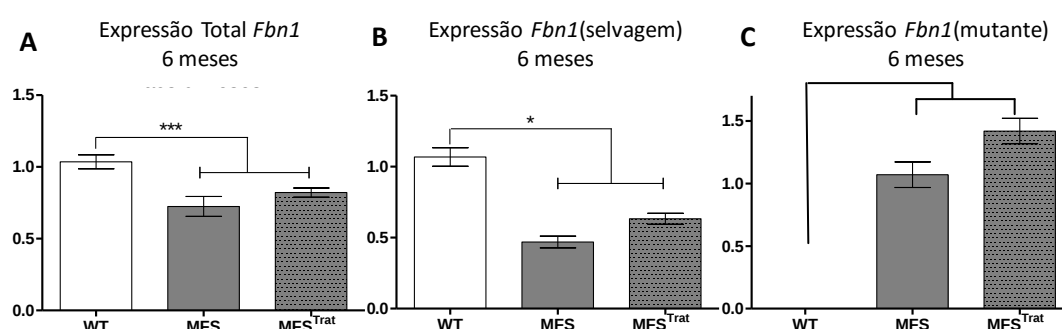


Figura 8. Gráfico de expressão do gene *Fbn1* no pulmão aos 6 meses. A expressão do gene *Fbn1* no pulmão dos grupos WT, MFS e MFS^{Trat}. Em “A” evidenciou a expressão total do gene *Fbn1*, o qual mostrou uma redução significativa nos grupos MFS e MFS^{Trat} quando comparado com o grupo WT. Em “B” evidenciou a expressão do gene *Fbn1* selvagem e observou-se que os animais do grupo MFS e MFS^{Trat} apresentaram uma expressão significativamente menor quando comparada com o grupo WT. Em “C” evidenciou a expressão do gene *Fbn1* mutante e os animais dos grupos MFS e MFS^{Trat} apresentaram uma expressão significativamente maior quando comparado com o grupo WT. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,0001$ |

Esse resultado da expressão gênica da *Fbn1* sugere que o modelo $mg\Delta^{lpn}$ é um modelo de mutação dominante negativa, pois expressa o alelo selvagem em menor quantidade que o alelo mutante, além de expressar o alelo mutante.

4.2 Fenótipo da Coluna vertebral

4.2.1 3 meses

Os defeitos na coluna vertebral são uma das características principais da MFS, tanto em modelos animais quanto nos pacientes. Observou-se aos 3 meses que os animais do grupo MFS e MFS^{Trat} apresentaram hiperlordose.

Por meio do Índice de Cifose (“Kyphosis index”, KI) o fenótipo esquelético foi quantificado. Tanto os animais do grupo MFS quanto os animais do grupo MFS^{Trat} apresentaram um valor significativamente menor de KI quando comparados com os

animais do grupo WT, mostrando que a terapia com Losartan não altera o fenótipo aos 3 meses de idade

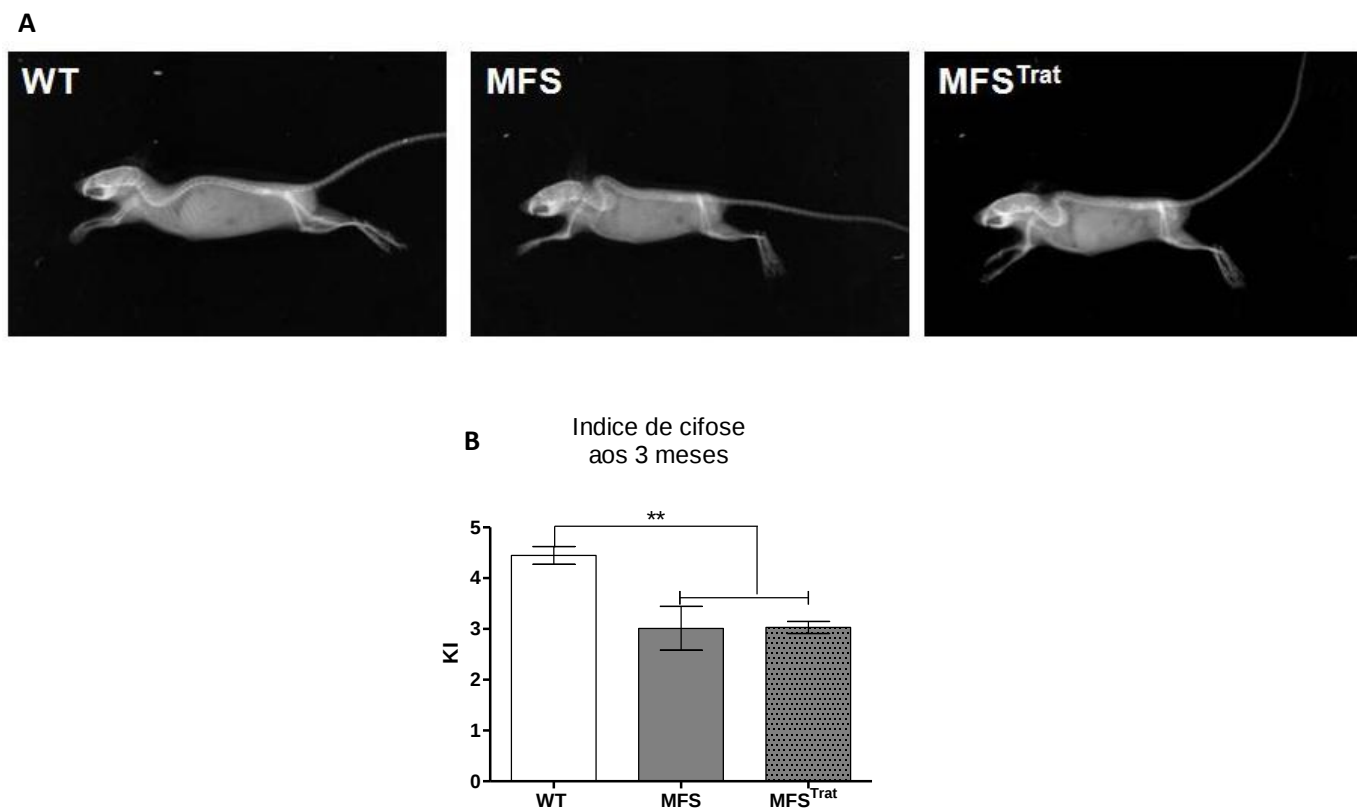
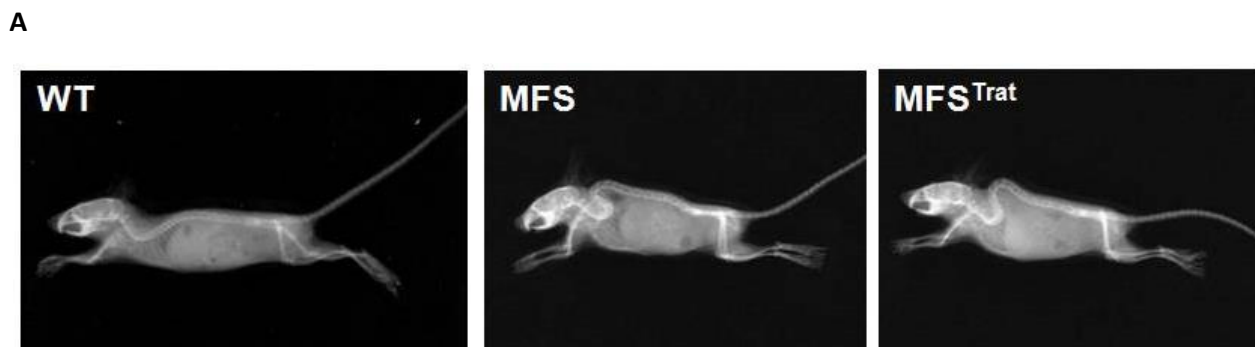


Figura 9. Fenótipo esquelético 3 meses. Em “A” são as radiografias representativas dos grupos WT, MFS e MFS^{Trat}. Em “B” é o gráfico do índice de KI, o qual evidenciou que os grupos MFS e MFS^{Trat} foram significativamente menor quando comparado com grupo WT. Além disso, não se observou diferença estatística entre os grupos MFS e MFS^{Trat}. ** P<0,005

4.2.2 6 meses

Aos 6 meses, observamos que os animais do grupo MFS e MFS^{Trat} apresentaram características semelhantes ao período de 3 meses, como a hiperlordose na região torácica e uma redução significativa do KI. Indicando que o Losartan não tem efeito sobre o defeito da coluna vertebral no modelo $mg\Delta^{lpn}$



B

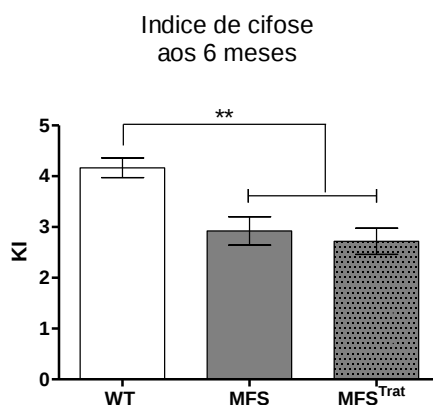


Figura 10. Fenótipo esquelético 6 meses. Em “A” são as radiografias representativas dos grupos WT, MFS e MFS^{Trat}. Em “B” é o gráfico do índice de KI, o qual evidenciou que os grupos MFS e MFS^{Trat} foram significativamente menor quando comparado com grupo WT. Além disso, não se observou diferença estatística entre os grupos MFS e MFS^{Trat}. ** P<0,005

4.3 Fenótipo aórtico

4.3.1 Aspectos morfológicos.

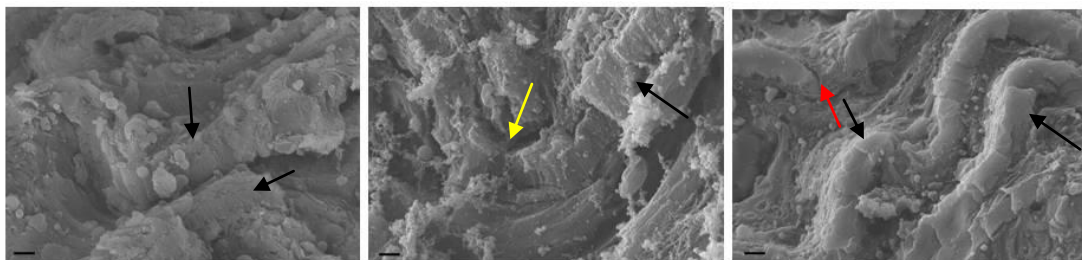
A fragmentação das fibras elásticas é uma característica típica na síndrome de Marfan. Em análises, por meio de microscopia de varredura, foram observadas fragmentações nas fibras elásticas no grupo MFS, tanto aos 3 meses quanto aos 6 meses. Nota-se que além das fragmentações das fibras elásticas o tecido apresentou uma dismorfologia do tecido. Por outro lado, ao analisar o tecido do grupo MFS^{Trat}, observamos atenuação das fragmentações das fibras elásticas e das alterações teciduais.

3 meses

WT

MFS

MFS^{Trat}



6 meses

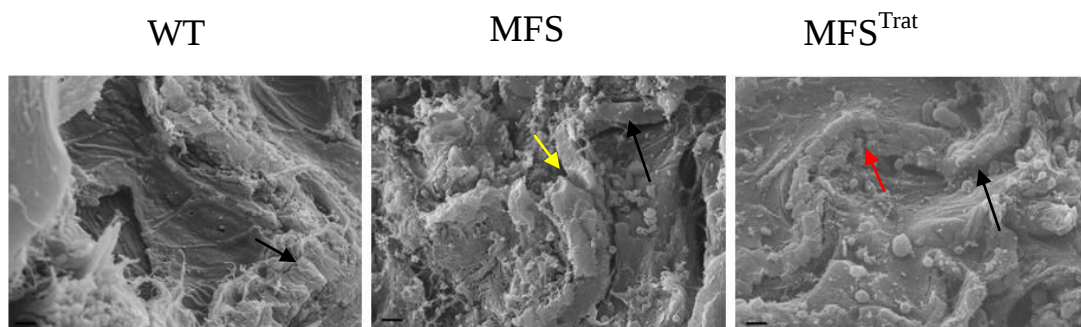


Figura 11. Análise das fibras elásticas por meio de microscopia eletrônica de varredura. As eletromicrografias são representativas dos grupos WT, MFS e MFS^{Trat} tanto aos 3 meses quanto aos 6 meses. Observou-se que as fibras elásticas no grupo WT apresentaram sua característica clássica com forma contínua com trajeto serpenteado (seta preta). No grupo MFS observou-se fragmentações/ruptura das fibras elásticas (seta amarela). No grupo MFS^{Trat} observou-se pequenas fissuras nas fibras elásticas (seta vermelha), indicando atenuação do fenótipo das fibras elásticas. A descrição de cada grupo foi observada tanto aos 3 meses quanto aos 6 meses. As setas pretas indicam as fibras elásticas. Barra 1µm.

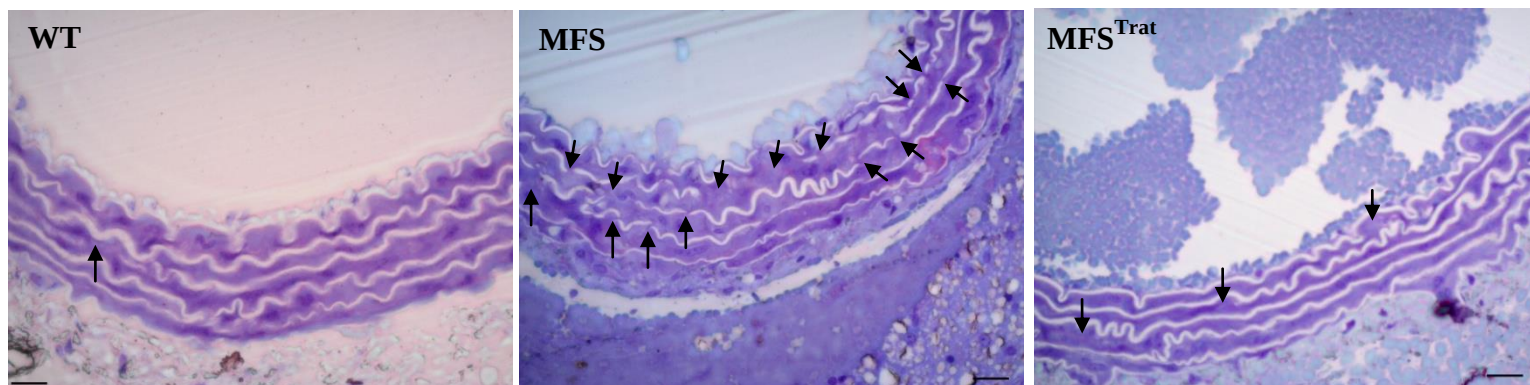
4.3.2 Taxa de integridade das fibras elásticas.

Ao mensuramos a integridade das fibras elásticas nos grupos aos 3 meses, observa-se que os animais WT apresentam um índice de 0,95, indicando um arranjo estrutural íntegro. Por outro lado, na MFS esse índice foi de 0,70, indicando uma significativa e intensa fragmentação das fibras elásticas, sendo esta uma característica pertencente da MFS. Interessantemente, o grupo MFS^{Trat} apresentou um índice de 0,81, indicando uma melhora fenotípica quando comparado aos animais MFS, contudo apresentou-se significativamente menos íntegro que nos animais do grupo WT.

O grupo WT aos 6 meses apresentou um índice de 0,95, o qual além de indicar um arranjo estrutural íntegro das fibras elásticas, manteve o mesmo índice ao longo do tempo. Opostamente a essa situação, o grupo MFS aos 6 meses apresentou um índice de 0,59, o qual foi significativamente menor que o índice do grupo WT, além de ter mostrado um declínio estrutural ao longo do tempo ao comparar com o grupo MFS com 3 meses. Já no grupo MFS^{Trat} foi apresentado um índice de 0,83, o qual foi significativamente maior que o índice do grupo MFS, porém foi significativamente menor que o grupo WT.

Esses resultados sugerem que os animais do grupo MFS apresentam um declínio estrutural ao longo do tempo. Interessantemente, o tratamento com Losartan indica uma melhora do fenótipo tanto aos 3 quanto aos 6 meses.

A



B

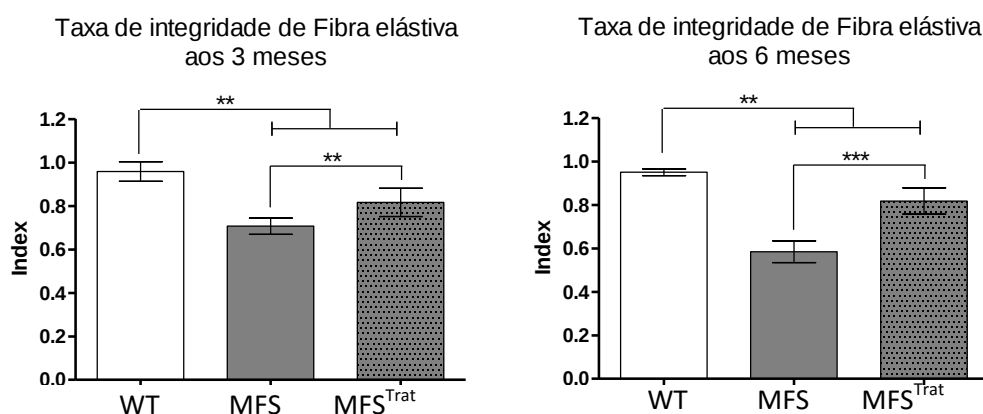


Figura 12. Taxa de integridade de fibras elásticas. Em “A” são microfotografias representativas dos grupos WT, MFS e MFS^{Trat} de uma região da aorta torácica. As setas representam as fragmentações das fibras elásticas. Em “B” observou-se que tanto aos 3 meses quanto aos 6 meses o grupo MFS apresentou uma taxa de integridade de fibra elástica significativamente reduzida quando comparado com os grupo WT e MFS^{Trat}. Por outro lado, o grupo MFS^{Trat} apresentou uma taxa de integridade de fibra elástica significativamente menor que o grupo WT. Barra 10µm. ** p<0,005, *** p<0,0001.

4.3.3 Fluxo sanguíneo da aorta.

A aorta é um vaso de suma importância, pois distribui o fluxo sanguíneo do coração para todos os órgãos do corpo. Além disso, o fluxo sanguíneo da aorta está envolvido em diversos processos fisiológicos e patológicos.

Aos 3 meses os animais do grupo WT apresentaram um valor médio de 1,57 mL/min $\pm$ 0,36 mL/min de fluxo sanguíneo. Já os animais do grupo MFS apresentaram

um valor médio de $1,43 \text{ mL/min} \pm 0,44 \text{ mL/min}$ sem apresentar diferença estatística com o grupo WT. Contudo, os animais do grupo MFS^{Trat} apresentaram um valor médio de $1,18 \text{ mL/min} \pm 0,39 \text{ mL/min}$, que foi significativamente menor que os valores de fluxo sanguíneo dos animais dos grupos WT e MFS.

Observa-se que aos 6 meses o grupo WT apresentou um valor médio de $1,56 \text{ mL/min} \pm 0,26 \text{ mL/min}$ de fluxo sanguíneo, sendo este valor médio próximo ao valor médio do grupo WT aos 3 meses, o que indica que nesse período de 3 a 6 meses da vida do camundongo o fluxo sanguíneo se manteve com valores próximos. Por outro lado, os animais do grupo MFS apresentaram $1,21 \text{ mL/min} \pm 0,36 \text{ mL/min}$ de fluxo sanguíneo, sendo significativamente menor que o grupo WT. Já os animais do grupo MFS^{Trat} apresentaram um valor médio de $1,28 \text{ mL/min} \pm 0,41 \text{ mL/min}$, tendo um fluxo sanguíneo significativamente menor apenas quando comparado ao grupo WT.

Esses resultados sugerem que os animais selvagens apresentam nesse período de vida (3 a 6 meses de idade) um valor médio constante de fluxo sanguíneo. Contudo, esse perfil do macro-fluxo sanguíneo da aorta não foi observado no grupo MFS indicando alterações no fluxo sanguíneo nesse período analisado. Por fim, sugere-se que a terapia dos animais MFS^{Trat} tem efeito de reduzir o fluxo sanguíneo apenas aos 3 meses, uma vez que aos 6 meses seus valores não apresentaram diferença estatística quando comparados com os animais MFS.

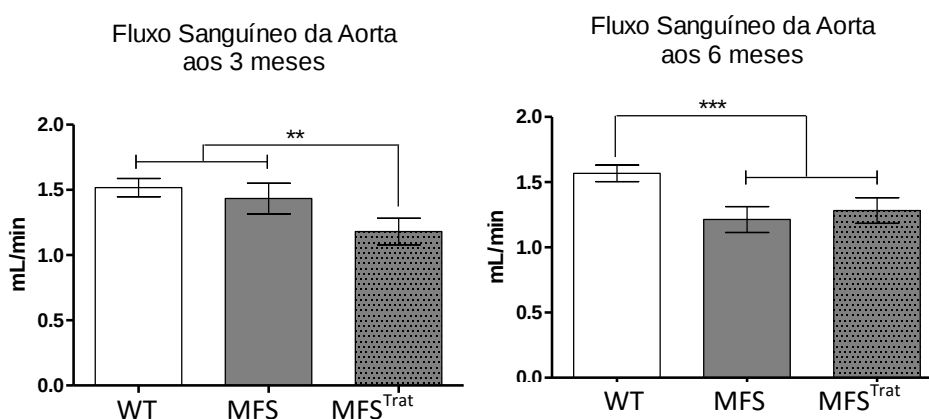


Figura 13. Fluxo sanguíneo da aorta torácica. O fluxo sanguíneo foi avaliado por meio de probes 2SB, T206, Transonic Systems Inc. Aos 3 meses o grupo MFS^{Trat} mostrou um fluxo sanguíneo significativamente menor quando comparado com o grupo WT e MFS. Além disso, foi observada uma não diferença significativa entre os grupos WT e MFS. Por outro lado, aos 6 meses, tanto o grupo MFS como o MFS^{Trat} apresentaram um fluxo sanguíneo significativamente menor quando comparado com grupo WT. Ademais, não se observou diferença entre os grupos MFS e MFS^{Trat} . ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0001$.

4.3.4 Fluxo sanguíneo da aorta: Curva espectral.

4.3.4.1 3 meses

Ao mensurar o fluxo sanguíneo da aorta, observou-se que os animais do grupo WT apresentaram uma curva espectral monofásica com picos sistólicos e curva de diástole uniforme. Por outro lado, Os animais do grupo MFS, apresentaram figuras atípicas na curva de diástole e extrasístole na curva espectral, além de apresentar uma irregularidade dos picos sistólicos característicos de ser arrítmicos. Interessantemente, os animais do grupo MFS^{Trat} apresentaram, uma curva espectral uniforme, porém com picos sistólicos menores, quando comparado com o grupo WT.

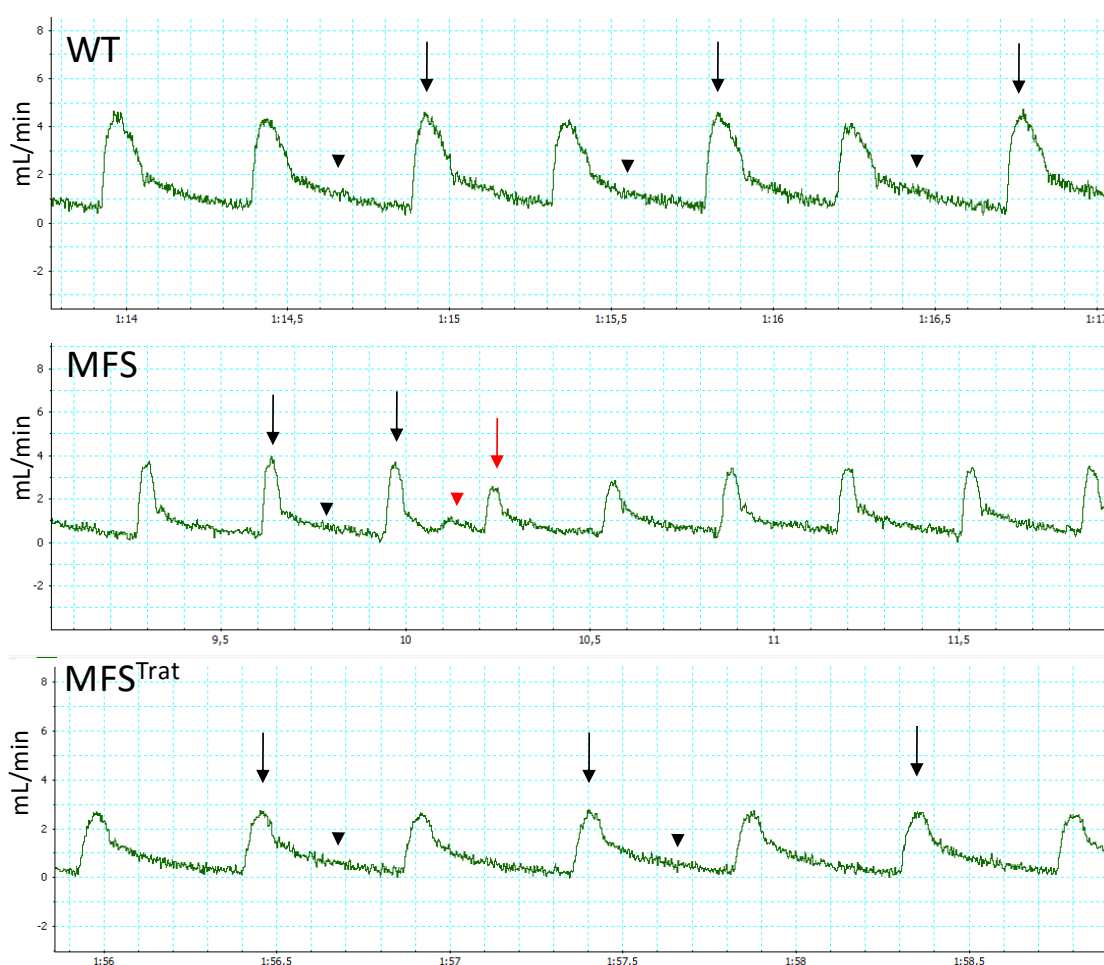


Figura 14. Curva Spectral do fluxo sanguíneo da aorta torácica aos 3 meses. A curva spectral do fluxo sanguíneo no grupo WT apresenta um pico sistólico (seta preta) uniforme e uma curva diastólica (ponta de seta) retilínea. Já no grupo MFS observa-se picos sistólicos em diferentes alturas (setas pretas e seta vermelha) e uma curva diastólica alterada (cabeça de seta vermelha). Já no grupo MFS^{Trat} observa-se a recuperação da uniformidade do fluxo sanguíneo com pico sistólico uniforme (seta preta) e curva diastólica retilínea (cabeça de seta)

4.3.4.1 6 meses

Semelhantemente aos animais de 3 meses observou que os animais do grupo WT apresentaram uma curva espectral monofásica com picos sistólicos e curva de diástole uniforme. Já os animais do grupo MFS, apresentaram figuras atípicas na curva de diástole, extra sístole e picos arrítmicos na curva espectral. Sugerindo que os animais do grupo MFS, apresentam um distúrbio no fluxo sanguíneo em ambos períodos analisados.

Já os animais do grupo do grupo MFS^{Trat} apresentaram, uma curva espectral uniforme com picos sistólicos menores, quando comparado com o grupo WT. Sugerindo que a terapia modifica o fluxo sanguíneo atenuando as figuras atípicas.

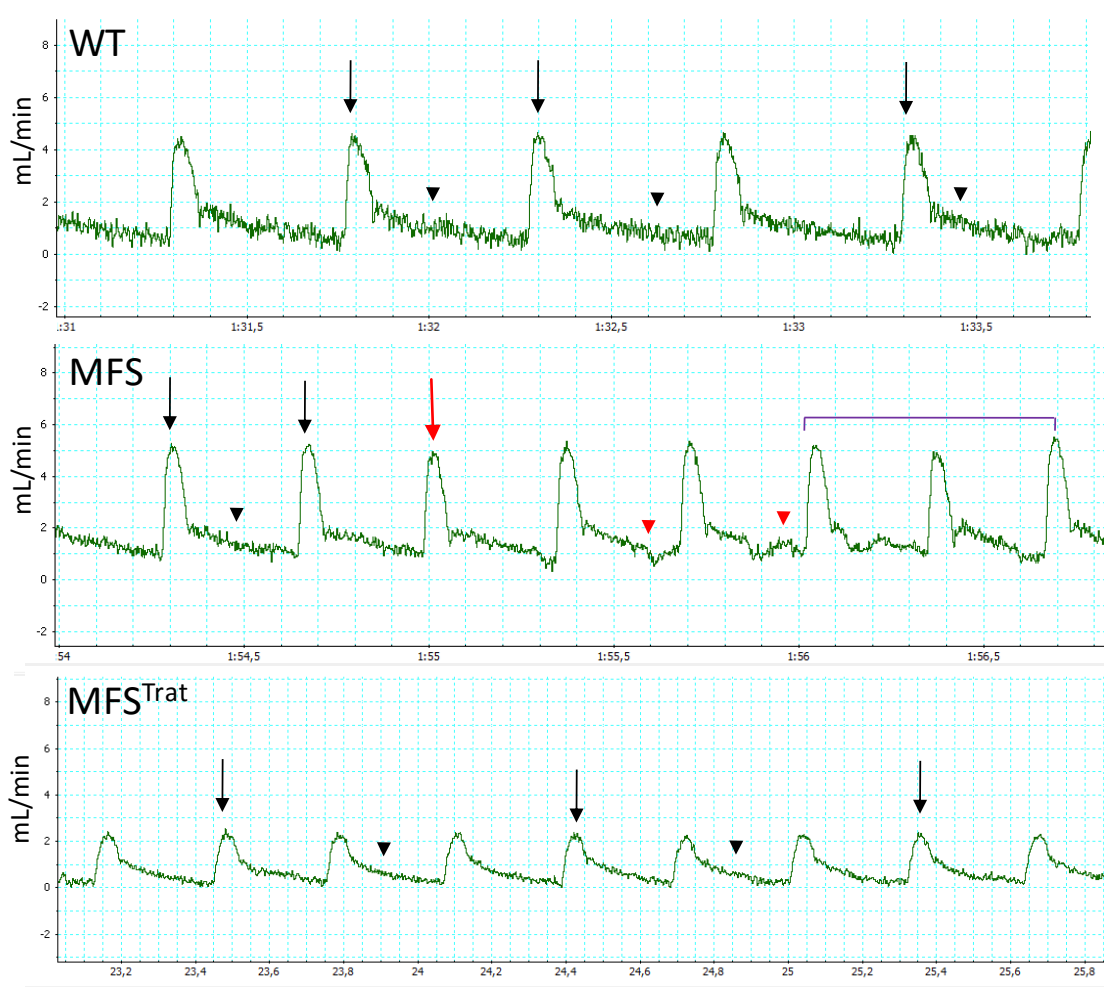


Figura 15. Curva Spectral do fluxo sanguíneo da aorta torácica aos 6 meses. A curva spectral do fluxo sanguíneo no grupo WT apresenta um pico sistólico (seta preta) uniforme e uma curva diastólica (ponta de seta) retilínea. Já no grupo MFS observa-se picos sistólicos em diferentes alturas (setas pretas e seta vermelha), uma curva diastólica alterada (cabeça de seta vermelha) e picos arrítmicos sugestivos (chave roxa). Já no grupo MFS^{Trat} observa-se a recuperação da uniformidade do fluxo sanguíneo com pico sistólico uniforme (seta preta) e curva diastólica retilínea (cabeça de seta)

4.4 Fenótipo Cardíaco.

4.4.1 3 meses

O coração é um órgão essencial para o sistema circulatório, o qual impulsiona, por meio de bombeamentos, o fluxo sanguíneo para os vasos. Observou-se que os animais WT apresentaram $0,931 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ de área total. Diferentemente dos animais WT, os animais do grupo MFS ($1,161 \times 10^6 \mu\text{m}^2$) apresentaram uma área total do coração significativamente maior comparada ao grupo WT. Já os animais do grupo MFS^{Trat} apresentaram $1,101 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ de área cardíaca e não se observou uma diferença estatística em relação ao grupo MFS, apesar de apresentarem uma área total significativamente maior comparados ao grupo WT. Esses resultados mostraram que a dilatação cardíaca ocorre nos animais MFS aos 3 meses, independentemente da terapia.

Nota-se também que a espessura do ventrículo esquerdo do grupo WT apresentou como média $568,1 \mu\text{m} \pm 102,6 \mu\text{m}$, que foi significativamente menor quando comparado com o grupo MFS ($662,9 \mu\text{m} \pm 113,9$), sugerindo um processo de hipertrofia ventricular. Por outro lado, os animais do grupo MFS^{Trat} apresentaram um espessamento de $471,7 \mu\text{m} \pm 154,9$, que foi significativamente menor que os animais do grupo WT e MFS.

Já o ventrículo direito dos animais do grupo WT mostrou uma espessura média de $172,5 \mu\text{m} \pm 34,72$, que foi significativamente menor que nos animais do grupo MFS, os quais apresentaram um valor de médio de $208,1 \mu\text{m} \pm 44,23$. Além disso, observou-se que os animais do grupo MFS^{Trat} apresentaram um valor médio de $190,2 \mu\text{m} \pm 43,5$, sendo significativamente menor apenas quando comparados com os animais do grupo MFS.

Esses resultados sugerem que os animais MFS apresentam alterações cardíacas e que o tratamento com Losartan atenua o fenótipo do ventrículo esquerdo.



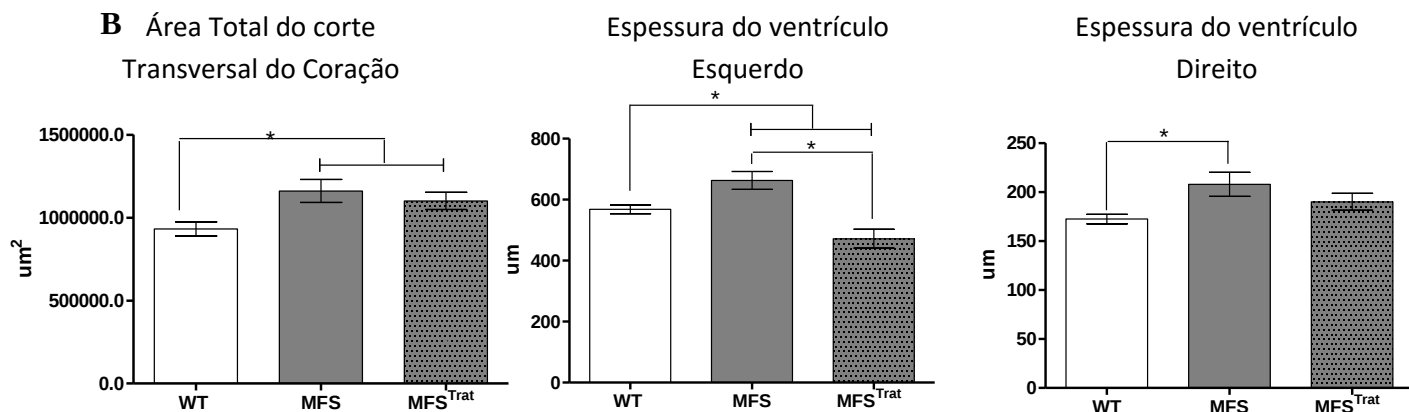
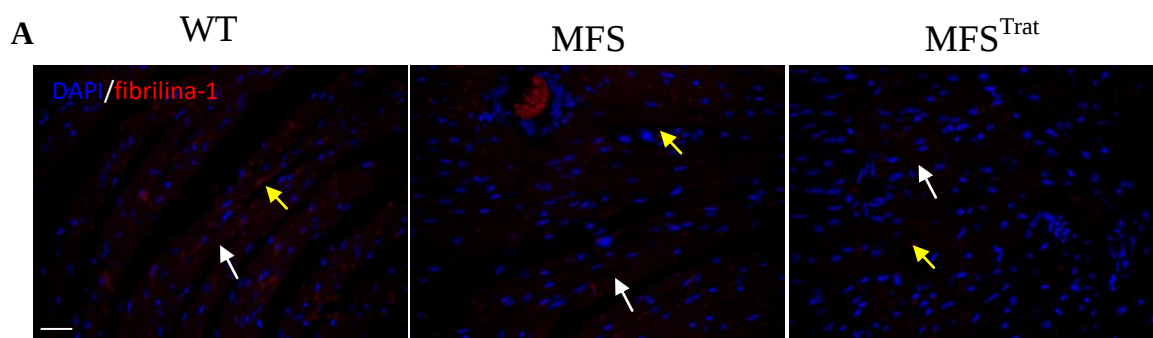


Figura 16. Morfologia Cardíaca aos 3 meses. Em “A” são microfotografias representativas do corte coronal do coração dos grupos WT, MFS e MFS^{Trat}. Em “B” foi observado que tanto o grupo MFS quanto o grupo MFS^{Trat} apresentaram uma área total significativamente maior quando comparado com o grupo WT. Além disso, entre o grupo MFS e MFS^{Trat} não se observou diferença estatística. A espeçura do ventrículo esquerdo do grupo MFS apresentou-se significativamente maior quando comparado com o grupo WT. Já a do grupo MFS^{Trat} apresentou-se significativamente menor quando comparado com os grupos WT e MFS. A espeçura do ventrículo direito do grupo MFS apresentou-se significativamente maior quando comparado apenas com o grupo WT.

4.4.1.1 Imunomarcação

4.4.1.1.1 Fibrilina-1

Sabidamente, a fibrilina-1 é um componente importantíssimo para as microfibrilas e estas apresentam uma expressão abundante no ventrículo esquerdo do coração. Foi observado que os animais do grupo MFS apresentaram uma imunomarcação significativamente menor de fibrilina-1 quando comparados com os animais do grupo WT, sugerindo que a redução da proteína fibrilina-1 pode contribuir para os fenótipos cardíacos da síndrome de Marfan. Interessantemente, os animais do grupo MFS^{Trat} apresentaram uma imunomarcação significativamente menor que os animais dos grupos WT e MFS.



B

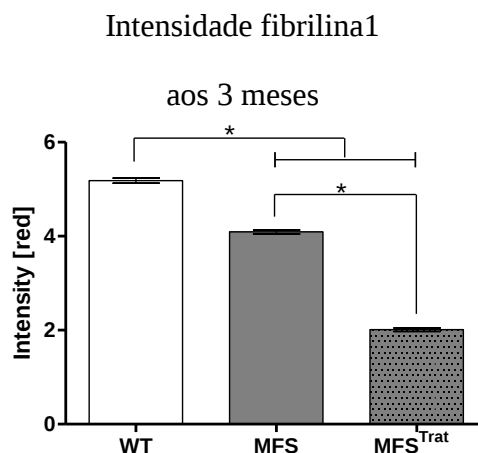


Figura 17. Fibrilina-1 e o tecido cardíaco aos 3 meses. Em “A” são microfotografia representativas da imunomarcção de fibrilina-1 na parede ventricular do coração dos grupos WT, MFS MFS^{Trat}. Foi observada a presença de fibrilina-1 no citoplasma do músculo cardíaco (seta branca) e de uma intensidade maior no endocárdio (seta amarela). Em “B” é um gráfico que apresenta a intensidade do vermelho. No grupo MFS observou-se que sua intensidade é significativamente menor quando comparado com o grupo WT, e o grupo MFS^{Trat} apresentou uma imunomarcção significativamente menor quando comparado com os grupos WT e MFS. Barra 10µm. * p<0,05.

4.4.1.1.2 Metaloproteinase-9

Interessantemente, a imunomarcção da MMP-9 apresentou-se em menor intensidade quando comparada com outros tecidos. Aos 3 meses observou-se que os animais do grupo WT apresentaram uma imunomarcção significativamente menor quando comparada com os animais dos grupos MFS e MFS^{Trat}.

Além disso, observou que no grupo MFS apresentou uma imunomarcção significativamente maior quando comparada com grupo MFS^{Trat}, sugerindo que a terapia tem efeito sobre a imunomarcção de MMP-9.

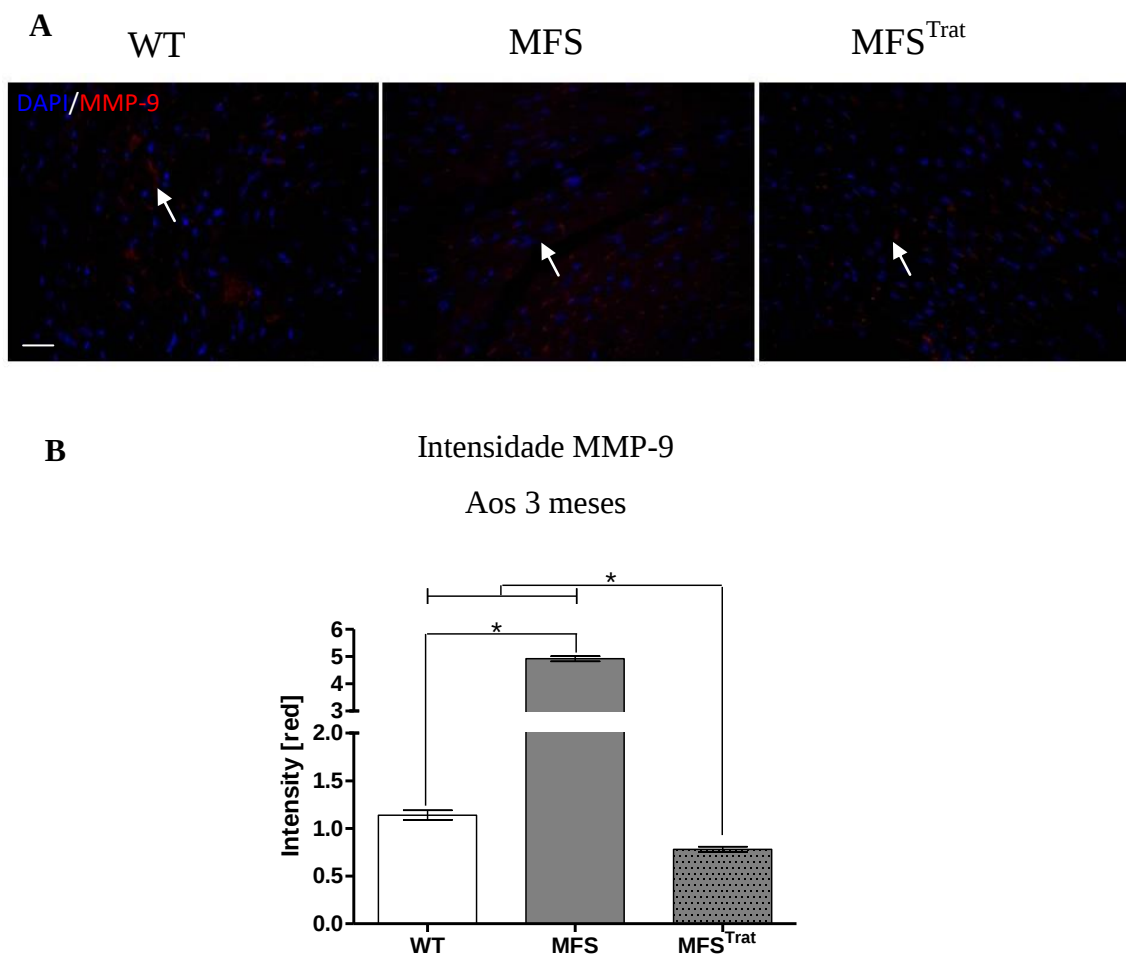


Figura 18. MMP-9 e o tecido cardíaco aos 3 meses. Em “A” são microfotografia representativas da imunomarcção de MMP-9 na parede ventricular do coração dos grupos WT, MFS MFS^{Trat}. Foi observada a presença de MMP-9 no citoplasma do músculo cardíaco (seta branca). Em “B” é um gráfico que apresenta a intensidade do vermelho. No grupo MFS observou-se que sua intensidade é significativamente maior quando comparado com o grupo WT e MFS^{Trat}, e o grupo MFS^{Trat} apresentou uma imunomarcção significativamente menor quando comparado com os grupos WT e MFS. Barra 10µm. * p<0,05.

4.4.1.1.3 Fibronectina

Ao avaliar fibronectina, que é uma microfibrila que auxilia nas interações na MEC, observou-se que a imunomarcção desse componente no grupo MFS foi significativamente maior quando comparado com os animais do grupo WT, sugerindo que possa ter uma compensação de componentes microfibrilares, uma vez que se observou uma redução das fibras elásticas. Interessantemente, os animais MFS^{Trat} apresentaram uma imunomarcção significativamente maior quando comparados com os animais WT e MFS, sugerindo que a terapia pode aumentar a imunomarcção na

tentativa de compensar os desarranjos estruturais causados pela deficiência das fibras elásticas.

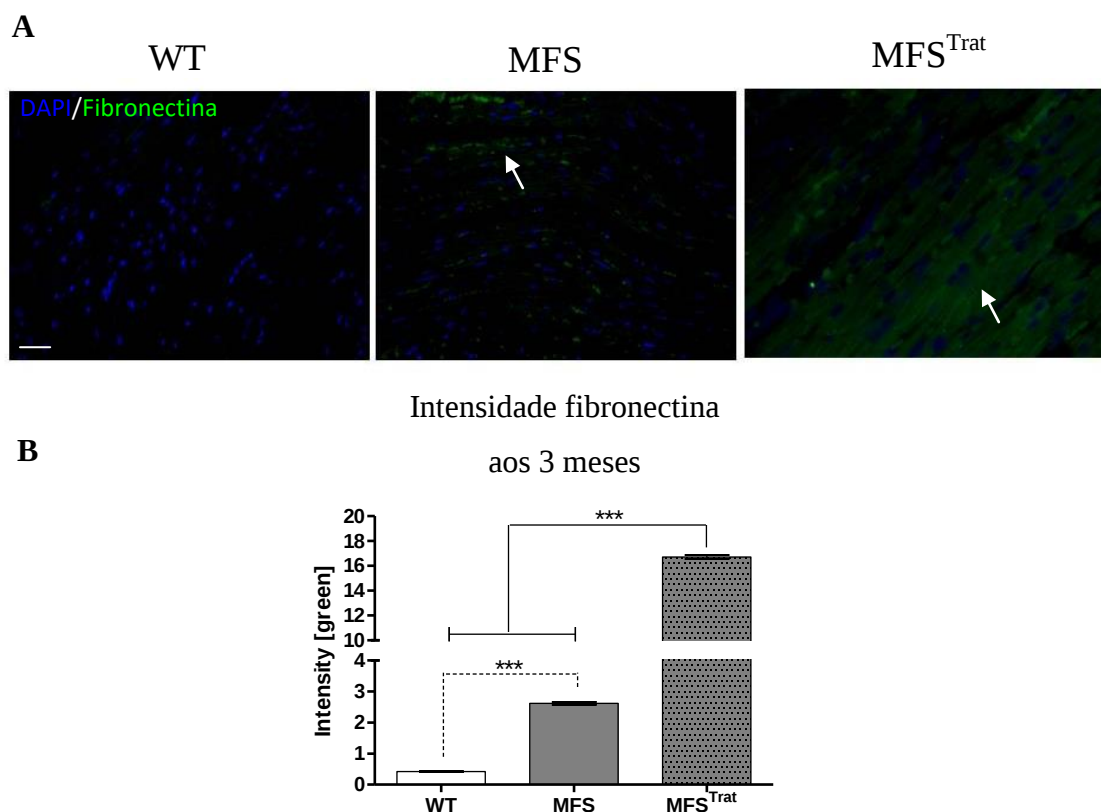


Figura 19. Fibronectina e o tecido cardíaco aos 3 meses. Em “A” são microfotografia representativas da imunomarcção de fibronectina na parede ventricular do coração dos grupos WT, MFS e MFS^{Trat}. Foi observada a presença de fibronectina no citoplasma do músculo cardíaco em maior destaque nos grupos MFS e MFS^{Trat} (seta branca). Em “B” é um gráfico que apresenta a intensidade do verde. No grupo MFS observou-se que sua intensidade é significativamente maior quando comparado com o grupo WT, e o grupo MFS^{Trat} apresentou uma imunomarcção significativamente maior quando comparado com os grupos WT e MFS. Barra 10µm. *** p<0,0001.

4.4.2 6 meses

Ao analisar os fenótipos cardíacos aos 6 meses, observou-se que a área total do corte coronal do coração não apresentou diferença estatística entre os grupos, embora o valor médio dos animais do grupo MFS apresentou uma média maior quando comparado com o grupo WT e MFS^{Trat}.

A espessura do ventrículo esquerdo do grupo WT apresentou uma média de 534,7µm ± 92,65µm e foi significativamente menor que o grupo MFS, o qual apresentou

uma média de $629,8\mu\text{m} \pm 127,90\mu\text{m}$. Esse resultado sugere que os animais do grupo MFS aos 6 meses apresentam um processo de hipertrofia concêntrica do ventrículo esquerdo. Por outro lado, o grupo MFS^{Trat} apresentou uma média de $452,9\mu\text{m} \pm 99,16\mu\text{m}$, que foi significativamente menor que os grupos WT e MFS, indicando uma atenuação do fenótipo.

Interessantemente, o grupo MFS apresentou o ventrículo direito ($215,5\mu\text{m} \pm 47,13\mu\text{m}$) significativamente maior quando comparado com o grupo WT ($177,6\mu\text{m} \pm 31,26\mu\text{m}$), sugerindo um processo de hipertrofia concêntrica do ventrículo direito. Além disso, foi observado que os animais do grupo MFS^{Trat} apresentaram um valor médio de $240\mu\text{m} \pm 41,84\mu\text{m}$, sendo significativamente maior que os animais dos grupos WT e MFS.

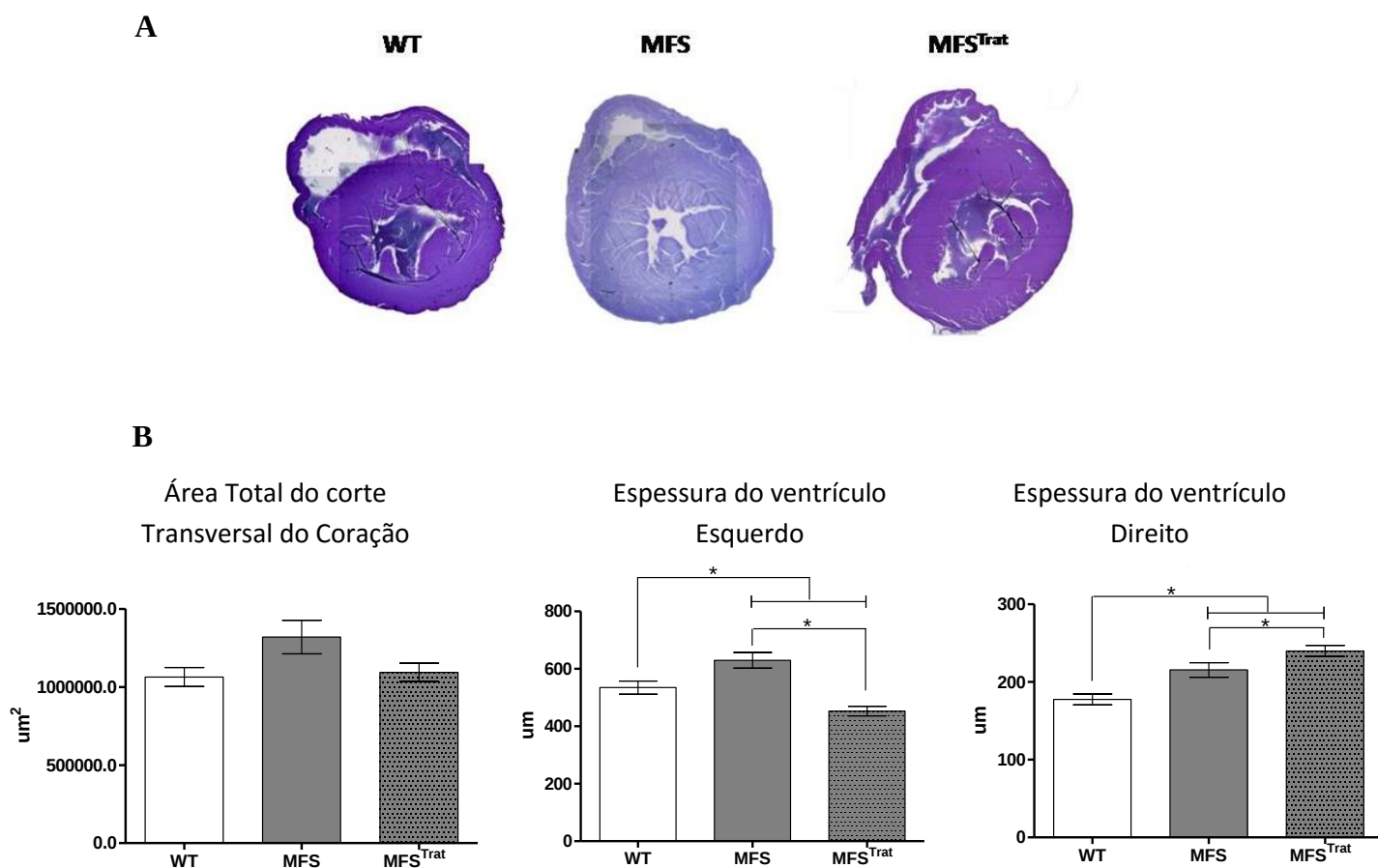


Figura 20. Morfologia Cardíaca aos 6 meses. Em “A” são microfotografia representativas do corte coronal do coração dos grupos WT, MFS e MFS^{Trat} . Em “B” foi observado uma não diferença estatística entre os três grupo WT, MFS e MFS^{Trat} . A espessura do ventrículo esquerdo do grupo MFS apresentou-se significativamente maior quando comparado com o grupo WT e MFS^{Trat} , já o grupo MFS^{Trat} apresentou-se significativamente menor quando comparado com os grupos WT e MFS. A espessura do ventrículo direito do grupo MFS apresentou-se significativamente maior quando comparado apenas com os grupos WT e MFS^{Trat} , já no grupo MFS^{Trat} apresentou-se significativamente maior quando comparado com os grupos WT e MFS.

4.4.2.1 Imunomarcação

4.4.2.1.1 Fibrilina-1

Aos 6 meses foi observada persistência na redução significativa da proteína de fibrilina-1 no grupo MFS quando comparado com o grupo WT, sugerindo que os animais do grupo MFS apresentam uma constante redução da imunomarcação das fibrilinas1. Por outro lado, observou-se que o grupo MFS^{Trat} apresentou uma imunomarcação significativamente maior quando comparado com os grupos WT e MFS, sugerindo que cronicidade da terapia pode promover um aumento de fibrilina-1 no tecido cardíaco.

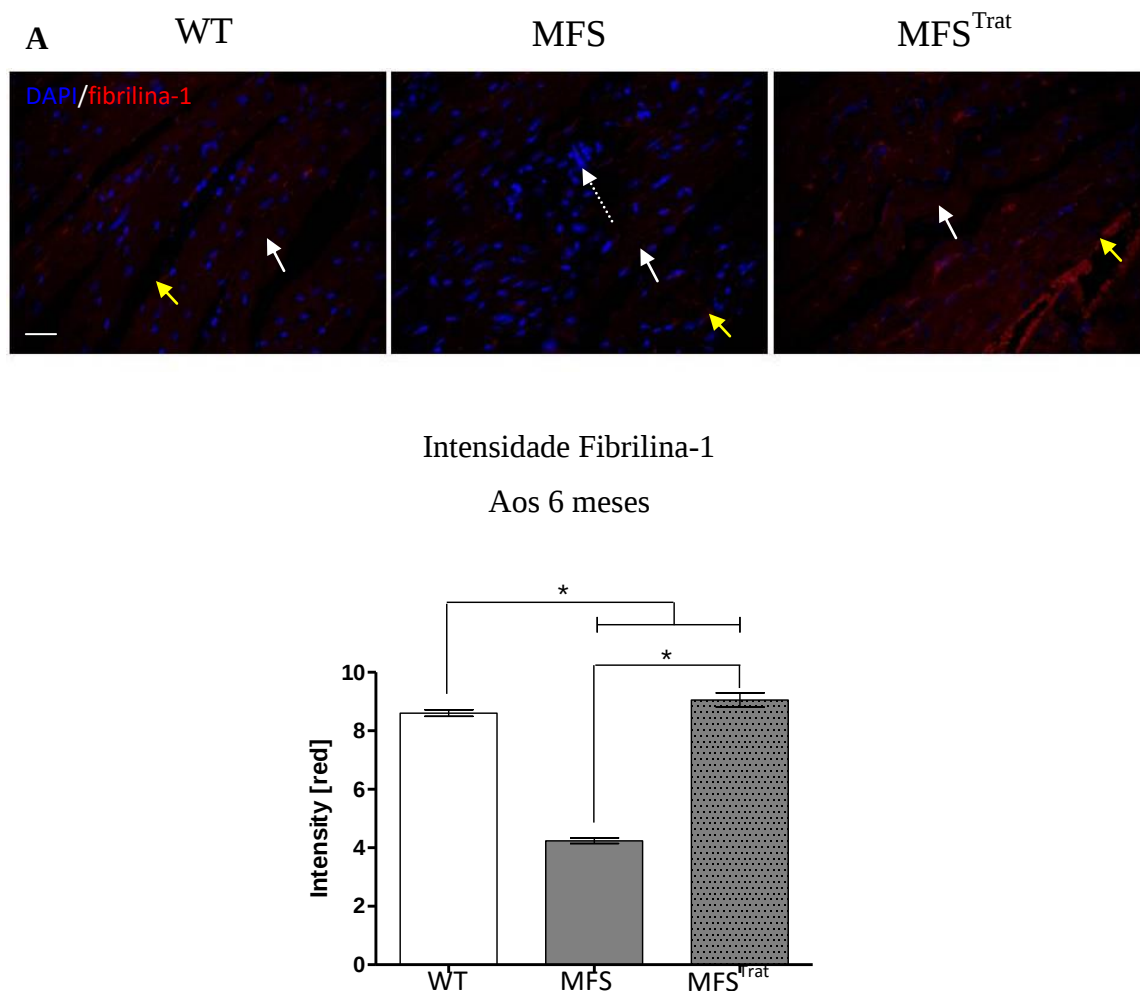


Figura 21. Fibrilina-1 e o tecido cardíaco aos 6 meses. Em “A” são microfotografia representativas da imunomarcação de fibrilina-1 na parede ventricular do coração dos grupos WT, MFS MFS^{Trat}. Foi observada a presença de fibrilina-1 no citoplasma do músculo cardíaco (seta branca) e uma intensidade maior no endocárdio (seta amarela). Além disso, no grupo MFS foi apresentada uma aglomeração de núcleos de forma não estrutural (seta branca pontilhada). Em “B” é um gráfico que apresenta a intensidade do vermelho. No grupo MFS observou-se que sua intensidade é significativamente menor quando comparado com o grupo WT e MFS^{Trat}. Já o grupo MFS^{Trat} apresentou uma imunomarcação significativamente maior quando comparado com os grupos WT e MFS. Barra 10µm. * p<0,05.

4.4.2.1.2 Metaloproteinase-9

Observa-se aos 6 meses um perfil semelhante dos grupos WT e MFS, quando comparados ao período de 3 meses. Os animais do grupo MFS apresentaram uma imunomarcacão significativamente maior quando comparados com os animais do grupo WT. Curiosamente, os animais do grupo MFS^{Trat} apresentaram uma imunomarcacão significativamente maior quando comparados com o grupo WT e menor quando comparado MFS, sugerindo que os animais do grupo MFS^{Trat} podem ter uma apresenta o uma atenua o fenotípica.

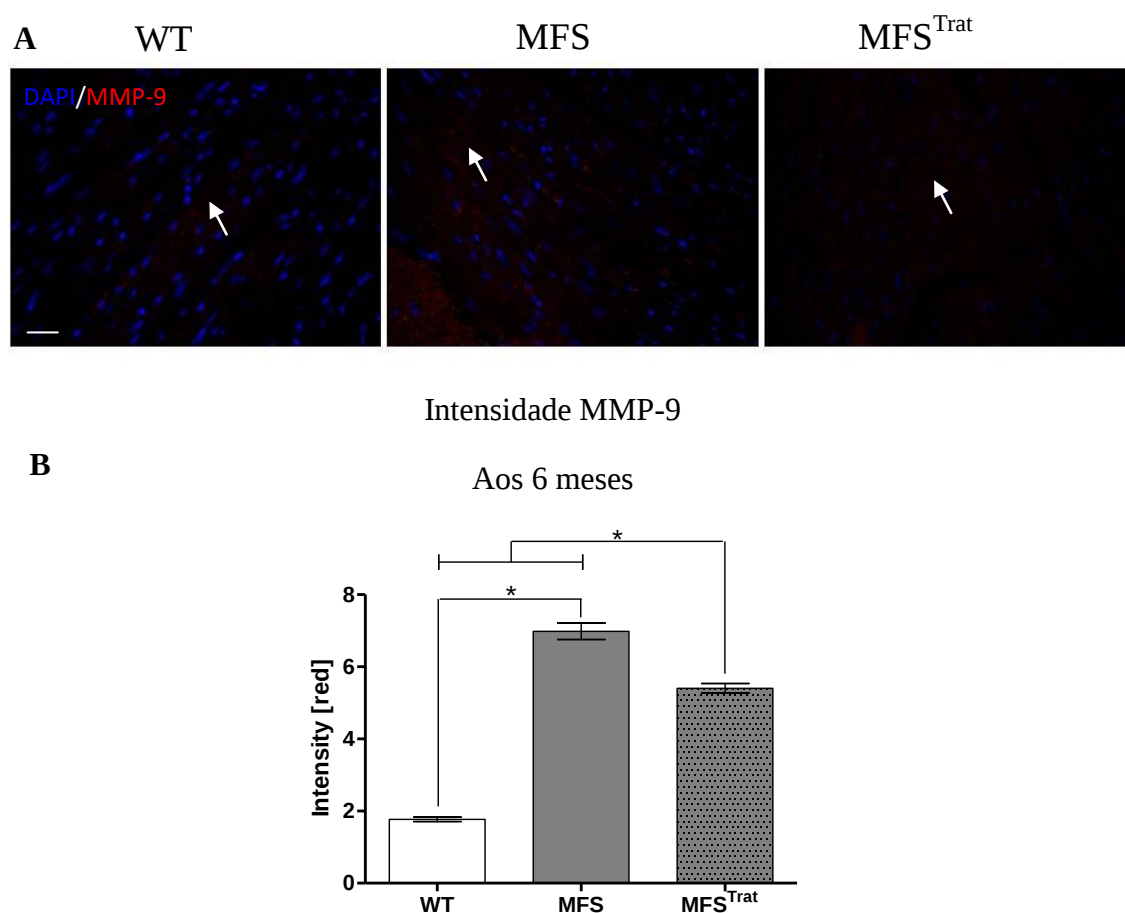


Figura 22. MMP-9 e o tecido cardíaco aos 6 meses. Em “A” são microfotografias representativas da imunomarcacão de MMP-9 na parede ventricular do cora o dos grupos WT, MFS e MFS^{Trat}. Foi observada a presença de MMP-9 no citoplasma do músculo cardíaco (seta branca). Em “B” é um gráfico que apresenta a intensidade do vermelho. No grupo MFS observou-se que sua intensidade é significativamente maior quando comparado com o grupo WT e MFS^{Trat}, e o grupo MFS^{Trat} apresentou uma imunomarcacão significativamente maior quando comparado com os grupos WT. Barra 10 m. * p<0,05.

4.4.2.1.3 Fibronectina

Como já mencionado, a fibronectina auxilia na formação das fibras elásticas e, opostamente ao período de 3 meses, observa-se que os animais do grupo MFS apresentaram uma imunomarcacão significativamente menor quando comparada com os animais do grupo WT. Esse resultado sugere que os animais do grupo MFS apresentam um declínio progressivo das microfibrilas ao longo do tempo. Por outro lado, o grupo MFS^{Trat} apresentou uma imunomarcacão significativamente maior quando comparada com os grupos WT e MFS, sugerindo que a terapia ao longo do tempo estimula a produção de fibronectina no tecido cardíaco.

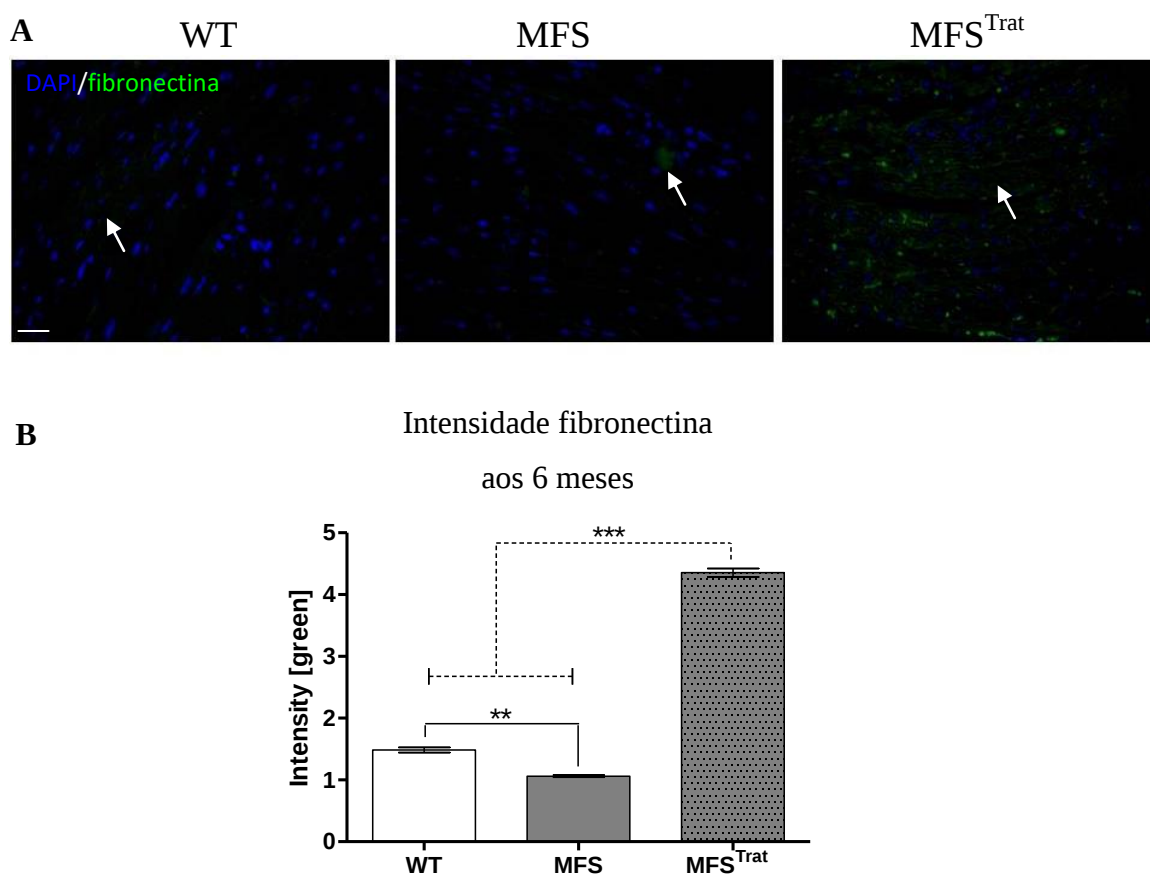


Figura 23. Fibronectina e o tecido cardíaco aos 6 meses. Em “A” são microfotografia representativas da imunomarcacão de fibronectina na parede ventricular do coraco dos grupos WT, MFS e MFS^{Trat}. Foi observada a presença de fibronectina no citoplasma do musculo cardíaco em maior destaque nos grupos WT, MFS e MFS^{Trat} (seta branca). Em “B” e um grafico que apresenta a intensidade do verde. No grupo MFS observou-se que sua intensidade e significativamente menor quando comparado com o grupo WT e MFS^{Trat}. Ja o grupo MFS^{Trat} apresentou uma imunomarcacão significativamente maior quando comparado com os grupos WT e MFS. Barra 10µm. ** p<0,005, *** p<0.0001.

4.5 Fenótipo pulmonar

4.5.1 3 meses.

Uma das características do fenótipo da síndrome de Marfan é alteração do parênquima pulmonar. Foi observado aos 3 meses que os animais do grupo WT apresentaram o fenótipo clássico: Aparência de “cachos de uva”, composto internamente por um epitélio de células pavimentosas sustentadas por um tecido conjuntivo frouxo, o qual é entremeado por capilares. Os animais do grupo MFS apresentam um alargamento do epitélio, com espessamento do tecido conjuntivo na base do epitélio, embora, concomitantemente, tenham sido observadas fragmentações do tecido conjuntivo entre os alvéolos. Interessantemente, os animais do grupo MFS^{Trat} apresentaram uma atenuação das alterações do parênquima alveolar.

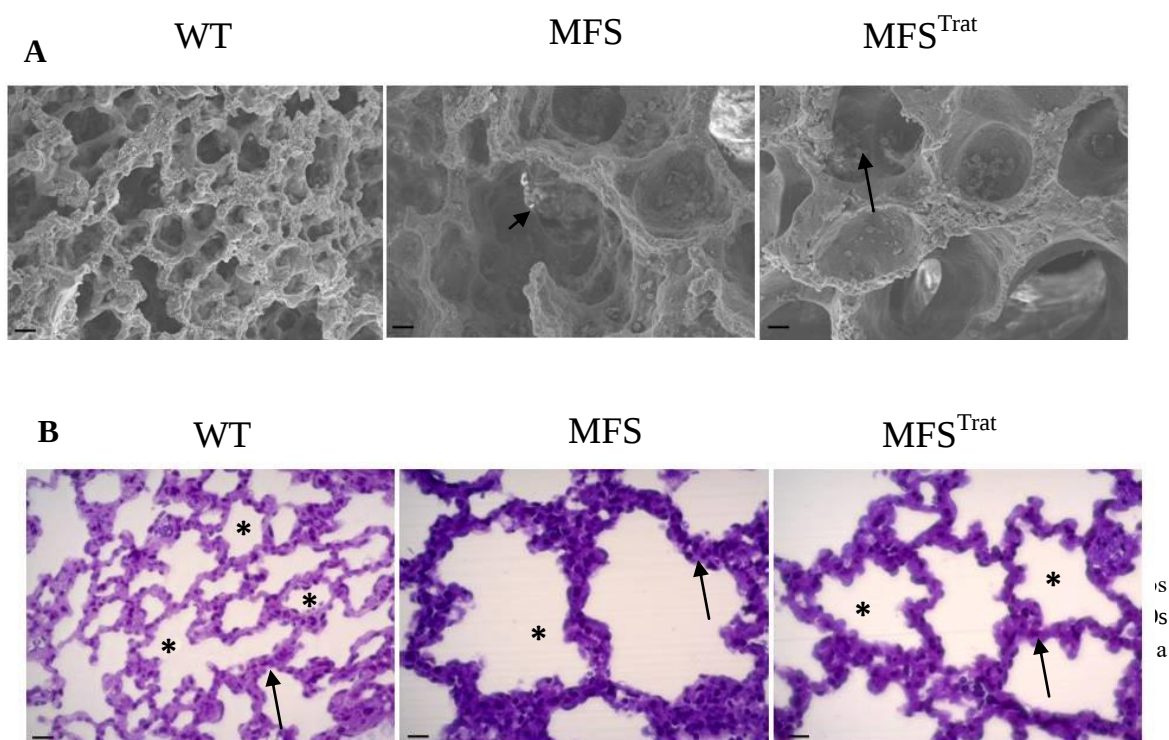


Figura 24. Morfologia pulmonar aos 3 meses. Em “A” são eletromicrografias representativas do pulmão dos grupos WT, MFS e MFS^{Trat}. Em “B” são microfotografias representativas do pulmão dos grupos WT, MFS e MFS^{Trat}. Os asteriscos mostram a luz alveolar e as setas indicam a parede do tecido pulmonar. Em “A” a barra é 1μm e em “B” a barra é 10μm

Os valores das áreas dos alvéolos pulmonares no grupo WT apresentaram como valor médio $208,6 \mu\text{m}^2$ e o grupo MFS apresentou uma área média de $1339 \mu\text{m}^2$, sendo significativamente maior quando comparado com o grupo WT. A literatura revela que a terapia com Losartan tem potencial na atenuação fenotípica, fato esse observado em nossos achados. No grupo MFS^{Trat} observou-se uma área de $838,7 \mu\text{m}^2$, sendo estatisticamente menor que o grupo MFS, contudo significativamente maior que o grupo WT. Esse resultado sugere que, com 3 meses de terapia, nota-se uma atenuação fenotípica com redução da área alveolar, embora ainda tenha se observado um aumento quando comparado com WT.

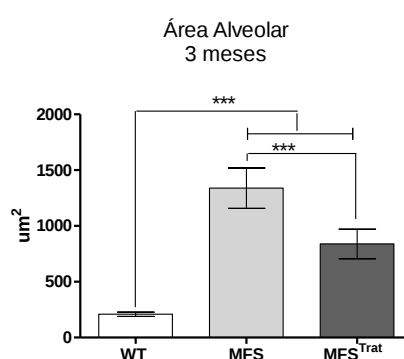


Figura 25. Morfometria do pulmão aos 3 meses. Foi observado que a área da luz alveolar no grupo MFS foi significativamente maior quando comparado com o grupo WT e MFS^{Trat} . Por outro lado, o MFS^{Trat} apresentou-se significativamente maior que os animais WT. *** $p < 0,0001$.

4.5.2 Imunomarcção

4.5.2.1 Fibrilina-1

A proteína fibrilina-1 é uma das principais proteínas que compõem o sistema elástico e está amplamente distribuída na parede alveolar. Aos 3 meses observa-se no grupo WT uma ampla imunomarcção ao redor dos alvéolos, sendo uma característica presente em animais selvagens. Por outro lado, no grupo MFS, observa-se uma imunomarcção significativamente reduzida quando comparada com grupo WT. Este fato sugere que possa ser decorrente da mutação presente na doença. Curiosamente, o tratamento com Losartan no grupo MFS^{Trat} apresentou uma imunomarcção significativamente reduzida quando comparada com o grupo WT e MFS. Esse fato sugere que o tratamento nesse período não teve efeito na produção da proteína de fibrilina-1.

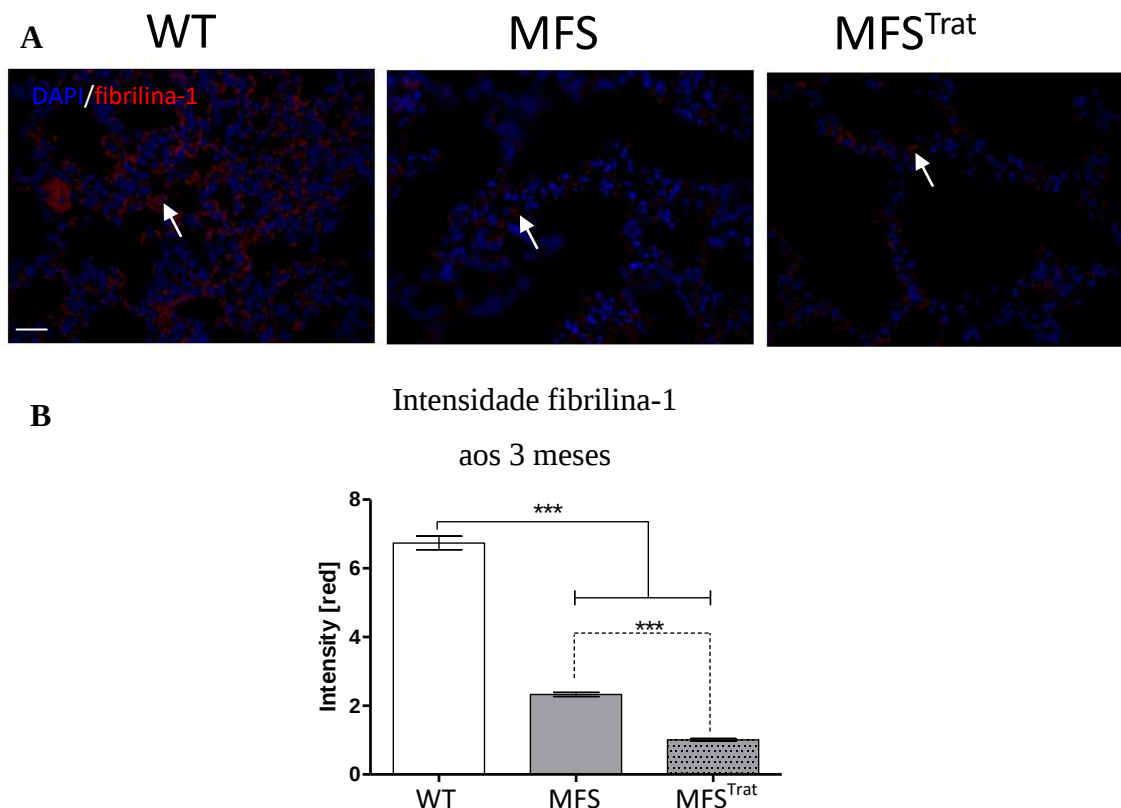


Figura 26. Fibrilina-1 e o tecido pulmonar 3 meses. Em “A” são microfotografias representativas da imunomarcção de fibrilina-1 nas paredes alveolares dos grupos WT, MFS MFS^{Trat}. Foi observada a presença de fibrilina-1 no parênquima pulmonar de forma difusa em toda extensão dos alvéolos. Em “B” é um gráfico que apresenta a intensidade do vermelho. No grupo MFS observou-se que sua intensidade é significativamente menor quando comparado com o grupo WT. Por outro lado, o grupo MFS^{Trat} apresentou uma imunomarcção significativamente menor tanto quando comparado com grupo WT, quanto com o grupo MFS. Barra 10µm. ***

4.5.2.2 Metaloproteinase-9

A MMP-9 é uma enzima responsável por degradar fibras elásticas e neste estudo observou-se a presença dessa proteína na parede alveolar dos animais. Notou-se também que tanto os animais do grupo WT quanto MFS não tiveram diferença estatística na intensidade da imunomarcção. Sugerimos que possa ser decorrente da diferença numérica dos alvéolos, uma vez que os animais do grupo MFS apresentam menos alvéolos por foto em razão do seu alargamento. Por outro lado, a imunomarcção dessa proteína nos animais do grupo MFS^{Trat} mostrou-se significativamente reduzida quando comparado com os animais do grupo WT e MFS.

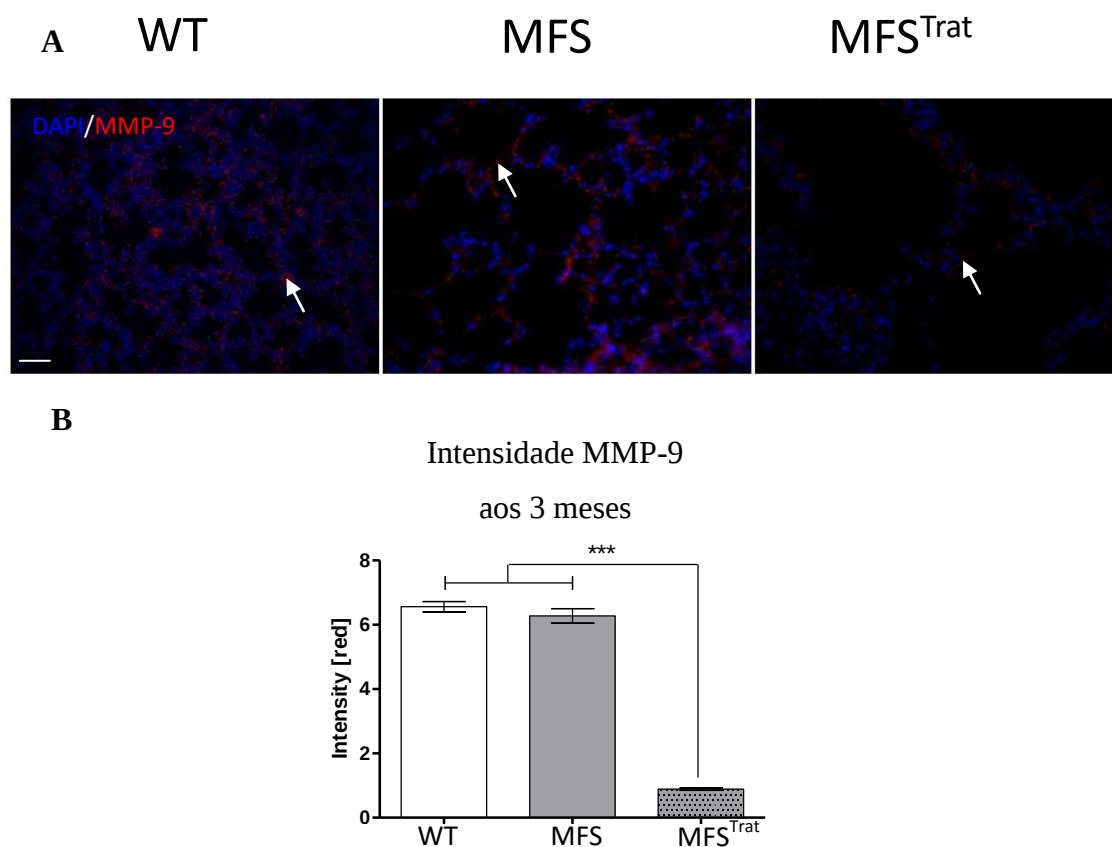


Figura 27. MMP-9 e o tecido pulmonar 3 meses. Em “A” são microfotografias representativas da imunomarcção de MMP-9 nas paredes alveolares dos grupos WT, MFS MFS^{Trat}. Foi observada a presença de MMP-9 em torno da parede dos alvéolos de todos os grupos, porém com intensidades diferentes. Em “B” é um gráfico que apresenta a intensidade do vermelho. Não foi observada diferença estatística entre os animais do grupo WT e MFS. No entanto, o grupo MFS^{Trat} apresentou uma imunomarcção significativamente menor tanto quando comparado com grupo WT, quanto com o grupo MFS. Barra 10µm. *** p<0,0001.

4.5.2.3 Fibronectina.

A fibronectina é uma proteína da MEC que desempenha diversas funções teciduais, como no auxílio da formação das fibras elásticas. Novamente observamos uma ampla distribuição desse componente na parede alveolar dos animais de todos os grupos. Interessantemente, observamos que no grupo MFS houve uma imunomarcção significante mais forte ao comparar com os animais do grupo WT. Sugerimos que esse aumento significativo no grupo MFS possa ser uma maneira do tecido se adaptar na ausência de outros componentes microfibrilares. Além disso, notou-se que os animais MFS^{Trat} apresentaram uma imunomarcção significativamente mais forte quando comparado com os grupos WT e MFS, sugerindo que o tratamento possa aumentar as microfibras no parênquima pulmonar.

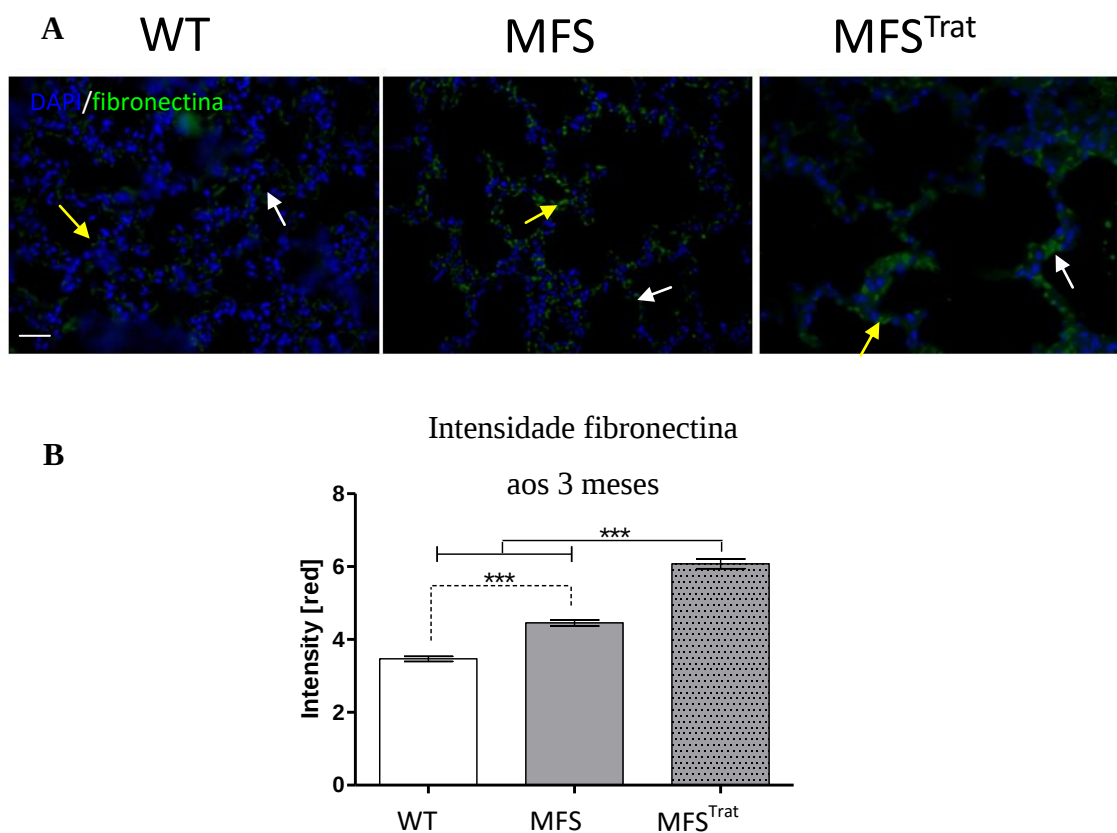


Figura 28. Fibronectina e o tecido pulmonar 3 meses. Em “A” são microfotografias representativas da imunomarcção de fibronectina nas paredes alveolares dos grupos WT, MFS e MFS^{Trat}. Foi observada a presença de fibronectina em torno da parede dos alvéolos de todos os grupos (seta branca). Além disso, observou-se a presença de fibronectina de marcação com maior intensidade próxima aos núcleos (seta amarela). Em “B” é um gráfico que apresenta a intensidade do verde. No grupo MFS foi observado uma intensidade de verde significativamente maior quando comparado com o grupo WT. No entanto, o grupo MFS^{Trat} apresentou uma imunomarcção significativamente maior tanto quando comparado com grupo WT, quanto com o grupo MFS. Barra 10µm. *** p<0,0001.

4.5.2.4 α -actina de Músculo Liso

Ao avaliar α -actina de músculo liso, observou-se que os animais do grupo WT mostraram uma imunomarcção significativamente mais forte que os animais do grupo MFS e MFS^{Trat}. Além disso, observou-se que os animais do grupo MFS apresentaram uma imunomarcção significativamente maior que os animais MFS^{Trat}. Esses resultados sugerem que o grupo MFS tem uma redução da força ativa na parede alveolar, o que pode contribuir com fenótipo de alargamento alveolar.

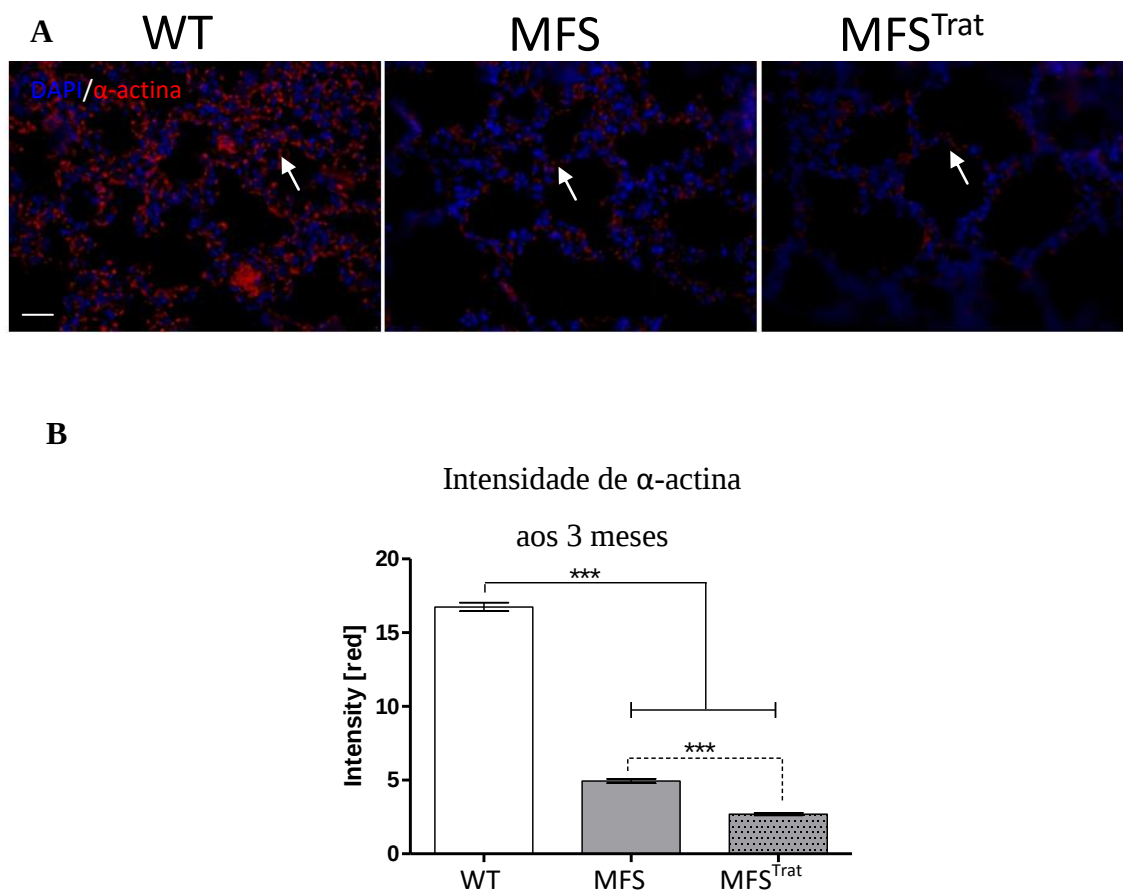


Figura 29. α -actina de músculo liso e o tecido pulmonar 3 meses. Em “A” são microfotografias representativas da imunomarcção de α -actina de músculo liso nas paredes alveolares dos grupos WT, MFS MFS^{Trat}. Foi observada a presença de α -actina de músculo liso em torno da parede dos alvéolos de forma difusa em todos os grupos (seta branca), porém com diferentes intensidades. Em “B” é um gráfico que apresenta a intensidade do vermelho. No grupo MFS foi observada uma intensidade de vermelho significativamente menor quando comparado com o grupo WT. Contudo, o grupo MFS^{Trat} apresentou uma imunomarcção significativamente menor tanto quando comparado com grupo WT, quanto com o grupo MFS. Barra 10 μ m. *** p<0,0001.

4.5.2 6 meses.

Aos 6 meses observou-se que os animais dos grupos WT e MFS apresentaram as mesmas características que os animais com idade de 3 meses. Contudo, os animais do grupo MFS^{Trat} apresentaram um alargamento alveolar, tendo aspecto semelhante aos alvéolos do grupo MFS.

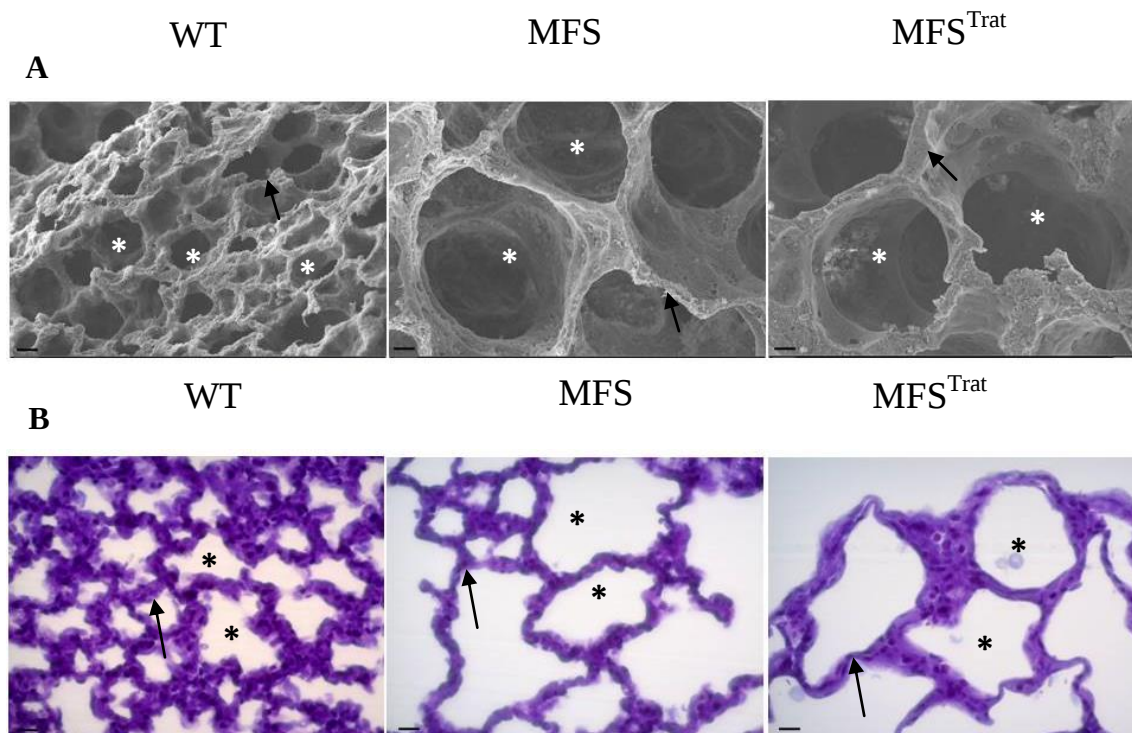


Figura 30. Morfologia pulmonar aos 6 meses. Em “A” são eletromicrografias representativas do pulmão dos grupos WT, MFS e MFS^{Trat}. Em “B” são microfotografias representativas do pulmão dos grupos WT, MFS e MFS^{Trat}. Os asteriscos mostram a luz alveolar e as setas indicam a parede do tecido pulmonar. Em “A” a barra é 1 μm e em “B” a barra é 10 μm.

A área alveolar do grupo WT apresentou um valor médio $230,2 \mu\text{m}^2$ e do grupo MFS apresentou um valor médio de $1123 \mu\text{m}^2$, sendo este significativamente maior que WT. Já os animais do grupo MFS^{Trat} apresentaram uma área média de $1128 \mu\text{m}^2$, sendo esta significativamente maior que nos animais WT, porém não apresentaram diferença estatística com os animais do grupo MFS. Esse resultado sugere que a cronicidade da terapia não atenua o fenótipo pulmonar.

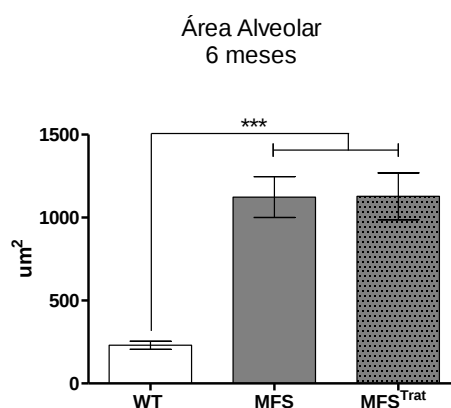


Figura 31. Morfometria do pulmão aos 6 meses. Foi observado que a área da luz alveolar no grupo MFS e MFS^{Trat} foi significativamente maior quando comparado com o grupo WT. Além disso, não foi observada diferença estatística entre os grupos MFS e MFS^{Trat}. *** $p < 0,0001$.

4.5.3 Imunomarcção

4.5.3.1 Fibrilina-1

A imunomarcção da proteína fibrilina-1 aos 6 meses mostrou um padrão diferente em relação aos animais com 3 meses. Nesse período observou-se que os animais do grupo MFS apresentaram uma imunomarcção significativamente menor quando comparado com os animais WT e MFS^{Trat}, sugerindo que os animais do grupo MFS apresentaram um declínio da expressão da fibrilina-1 ao longo do tempo. Opostamente, os animais MFS^{Trat} mostraram uma imunomarcção significativamente maior quando comparados com os animais do grupo WT e MFS, sugerindo que ao longo do tempo o parênquima pulmonar aumenta a expressão da proteína fibrilina-1.

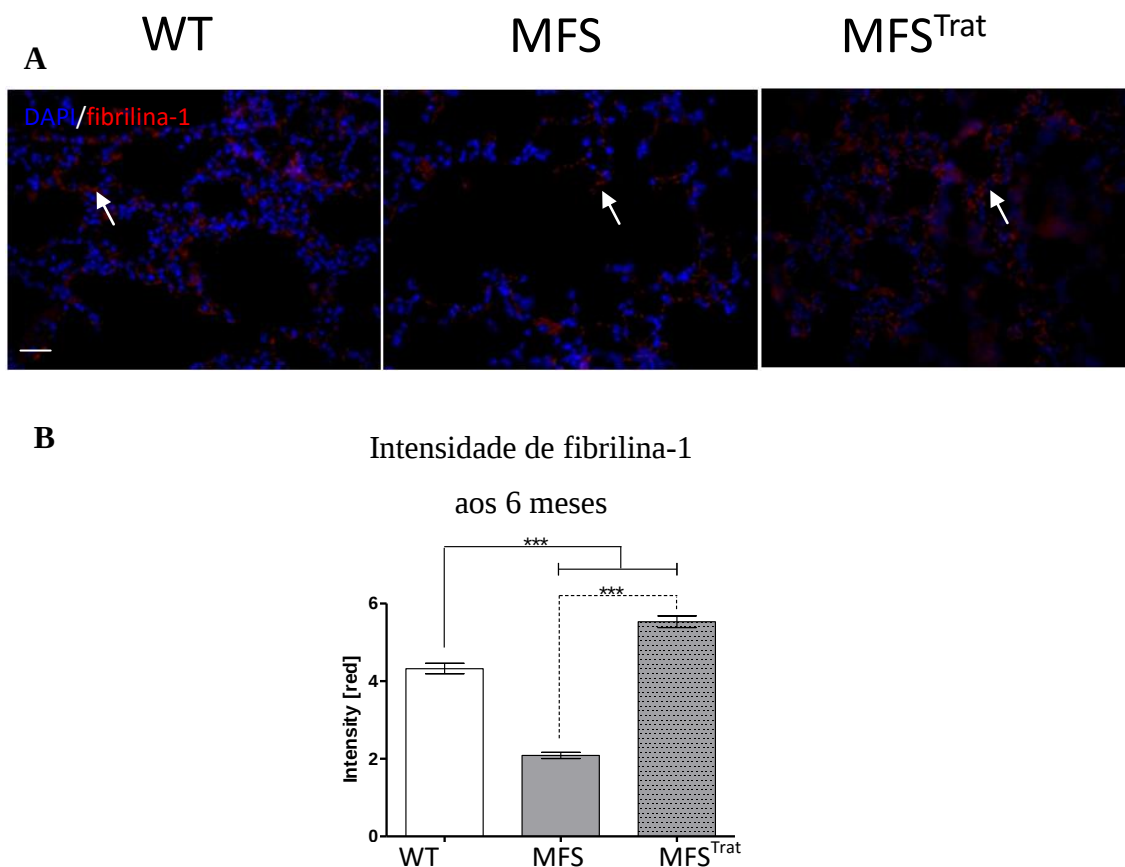


Figura 32. Fibrilina-1 e o tecido pulmonar 6 meses. Em “A” são microfotografias representativas da imunomarcção de fibrilina-1 nas paredes alveolares dos grupos WT, MFS MFS^{Trat}. Foi observada a presença de fibrilina-1 no parênquima pulmonar de forma difusa em toda extensão dos alvéolos (seta branca). Em “B” é um gráfico que apresenta a intensidade do vermelho. No grupo MFS observou-se que sua intensidade é significativamente menor quando comparado com os grupos WT e MFS^{Trat}. Por outro lado, o grupo MFS^{Trat} apresentou uma imunomarcção significativamente maior tanto quando comparado com grupo WT, quanto com o grupo MFS. Barra 10µm. *** p<0,0001.

4.5.3.2 Metaloproteínase-9

Como já mencionado, a MMP-9 é uma enzima que tem como principal função degradar as fibras elásticas. Observou-se nesse estudo que os animais com MFS apresentaram uma imunomarcção significativamente maior quando comparado com os animais do grupo WT. Sugerimos que esse aumento possa ser decorrente de outros fatores bioquímicos presentes na MFS, porém, uma vez aumentada, pode contribuir na deterioração das fibras elásticas. Também foi observado que os animais do grupo MFS^{Trat} apresentaram uma imunomarcção significativamente maior quando comparados com ambos os grupos (WT MFS), sugerindo que a cronicidade da terapia pode induzir um aumento da MMP-9 e, conseqüentemente, um aumento da elastase.

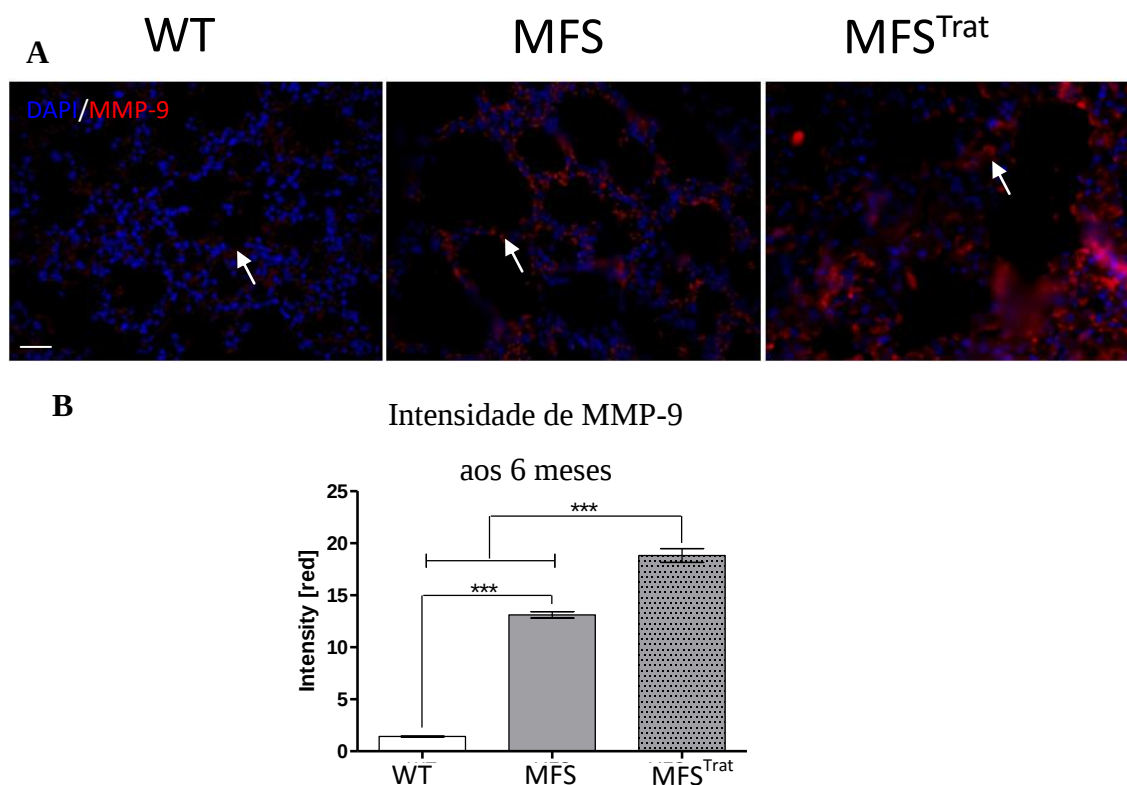


Figura 33. MMP-9 e o tecido pulmonar 6 meses. Em “A” são microfotografias representativas da imunomarcção de MMP-9 nas paredes alveolares dos grupos WT, MFS MFS^{Trat}. Foi observada a presença de MMP-9 em torno da parede dos alvéolos de todos os grupos, porém com intensidades diferentes. Em “B” é um gráfico que apresenta a intensidade do vermelho. O grupo MFS apresentou uma imunomarcção significativamente maior quando comparado com o WT e significativamente menor que o grupo MFS^{Trat}. O grupo MFS^{Trat} apresentou uma imunomarcção significativamente maior tanto quando comparado com grupo WT, quanto com o grupo MFS. Barra 10µm. *** p<0,0001.

4.5.3.3 Fibronectina

Aos 6 meses observou-se que a imunomarcção da fibronectina nos animais MFS foi significativamente maior quando comparada com os animais do grupo WT, sugerindo que possa estar acontecendo uma adaptação tecidual no parênquima pulmonar dos animais do grupo MFS. Já nos animais do grupo MFS^{Trat} observou-se uma imunomarcção significativamente mais forte em comparação com os animais do grupo WT e MFS, fato esse que nos leva a crer que a terapia com Losartan pode estimular a formação de novas fibras da MEC, auxiliando no processo de remodelamento tecidual.

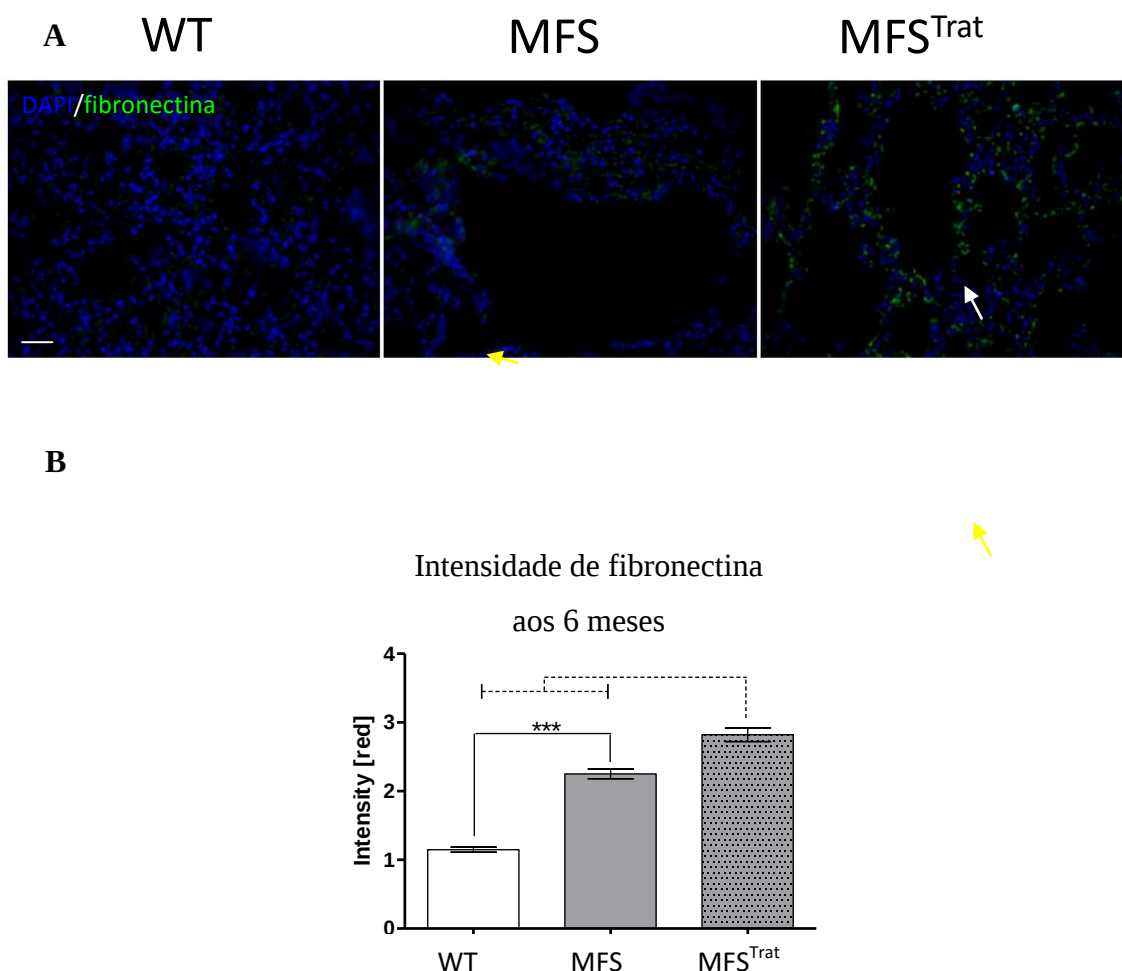


Figura 34. Fibronectina e o tecido pulmonar 6 meses. Em “A” são microfotografias representativas da imunomarcção de fibronectina nas paredes alveolares dos grupos WT, MFS e MFS^{Trat}. Foi observada a presença de fibronectina em torno da parede dos alvéolos de todos os grupos (seta branca). Além disso, observou-se a presença de fibronectina de marcação com maior intensidade próxima aos núcleos (seta amarela). Em “B” é um gráfico que apresenta a intensidade do verde. No grupo MFS foi observado uma intensidade de verde significativamente maior quando comparado com o grupo WT. Já o grupo MFS^{Trat} apresentou uma imunomarcção significativamente maior tanto quando comparado com grupo WT, quanto com o grupo MFS. Barra 10µm. *** p<0,0001.

4.5.3.4 α -actina de Músculo Liso

A α -actina de músculo liso está presente na parede alveolar dos animais de todos os grupos. Observou-se aos 6 meses que os animais do grupo MFS apresentaram uma imunomarcacão significativamente maior quando comparado com o grupo WT e MFS^{Trat}, sugerindo que o parênquima pulmonar necessita de processos ativos no remodelamento tecidual. Já no grupo MFS^{Trat} a imunomarcacão apresentou-se significativamente mais fraca que nos animais do grupo MFS, porém mostrou-se mais forte que nos animais do grupo WT, indicando que a terapia pode atenuar o fenótipo, todavia não o recupera.

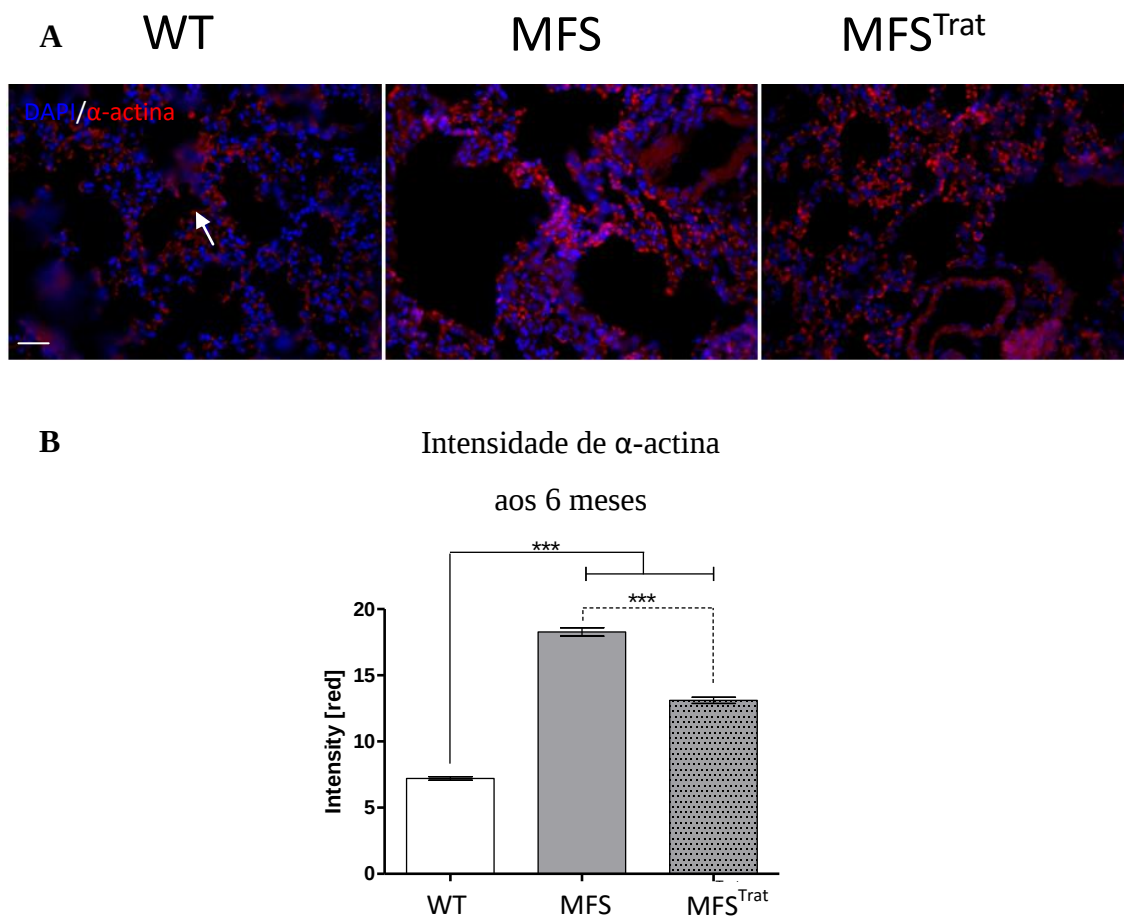


Figura 35. α -actina de músculo liso e o tecido pulmonar 6 meses. Em “A” são microfotografias representativas da imunomarcacão de α -actina de músculo liso nas paredes alveolares dos grupos WT, MFS e MFS^{Trat}. Foi observada a presença de α -actina de músculo liso em torno da parede dos alvéolos de forma difusa em todos os grupos (seta branca), porém com diferentes intensidades. Em “B” é um gráfico que apresenta a intensidade do vermelho. No grupo MFS foi observada uma intensidade de vermelho significativamente maior quando comparado com o grupo WT e MFS^{Trat}. Já o grupo MFS^{Trat} apresentou uma imunomarcacão significativamente maior quando comparado com o grupo WT. Barra 10 m. *** $p < 0,0001$.

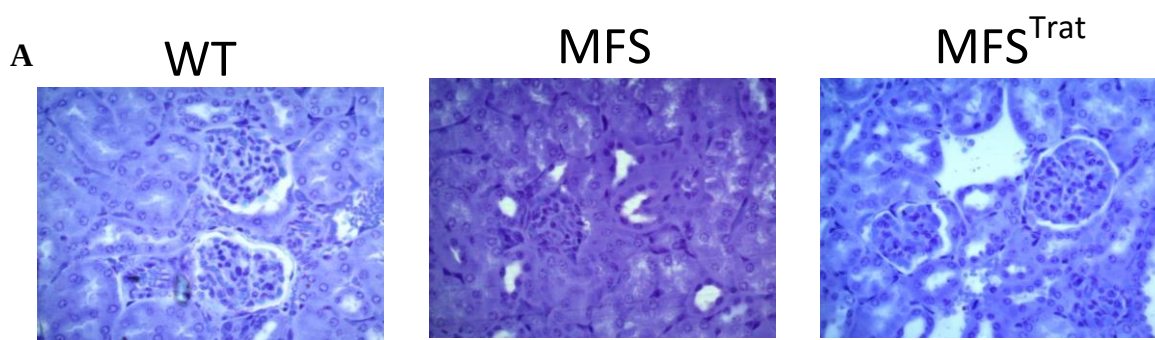
4.6 Fenótipo Renal

4.6.1 3 meses.

O rim é um órgão de extrema importância para o organismo, pois tem a capacidade de conservar sais minerais e água e excretar resíduos metabólicos. Esse fenômeno só é possível, porque o rim apresenta sua unidade funcional, o néfron, interligada aos capilares arteriais. A região do néfron, que é interligada aos capilares, se chama de glomérulos, sendo esta a estrutura de interesse nesse estudo.

Observou-se que aos 3 meses os animais do grupo MFS apresentaram uma área total glomerular significativamente menor quando comparada aos grupos WT e MFS^{Trat}. Por outro lado, o grupo MFS^{Trat} mostrou uma recuperação, sendo significativamente maior que o grupo MFS, embora tenha ainda sido significativamente menor que o grupo WT.

Já a área total do pólo vascular glomerular tanto no grupo MFS quanto no grupo MFS^{Trat} mostrou-se significativamente menor quando comparada com os animais do grupo WT. Além disso, não se observou diferença estatística entre o grupo MFS e o grupo MFS^{Trat}. Interessantemente, entre a cápsula glomerular (estrutura que delimita o glomérulo) e a área do pólo vascular encontra-se uma estrutura chamada de espaço urinário. Nessa região, notou-se que nos animais do grupo MFS a área do espaço urinário foi significativamente menor quando comparada com o grupo WT e MFS^{Trat}. No grupo MFS^{Trat}, embora a área do espaço urinário tenha se mostrado significativamente maior que nos animais MFS, apresentou-se significativamente menor que nos animais do grupo WT. Esses resultados sugerem que os animais MFS apresentam uma dismorfologia na região de interligação vascular na unidade funcional do rim e que a terapia com Losartan atenua as alterações presentes na síndrome de Marfan.



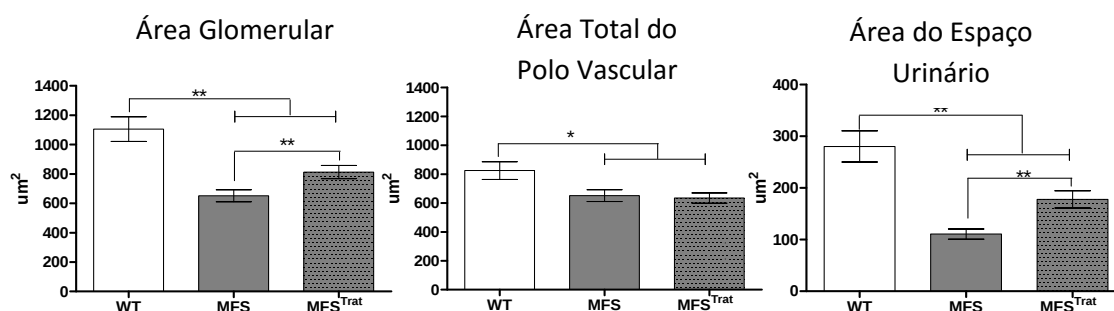
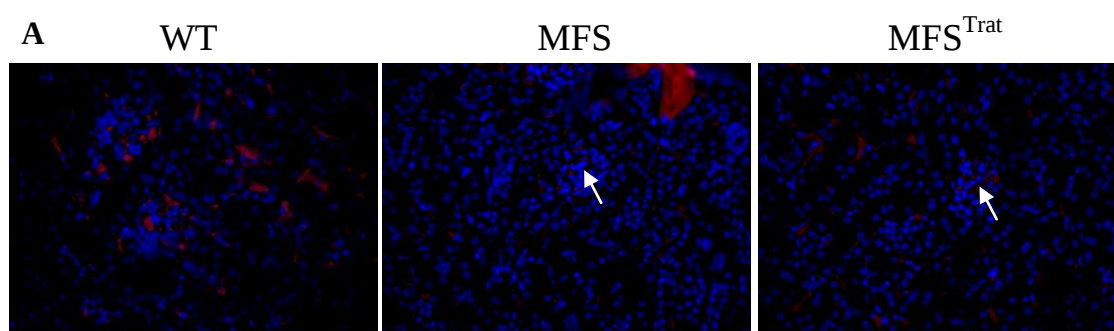
B

Figura 36. Morfologia das estruturas glomerulares aos 3 meses. Em “A” são microfotografias representativas da morfologia glomerular dos grupos WT, MFS e MFS^{Trat}. Em “B” são apresentados gráficos que representam as estruturas mensuráveis do glomérulo. Foi observada nos grupos MFS e MFS^{Trat} uma redução significativa da área glomerular, pólo vascular do glomérulo e do espaço urinário quando comparado com o grupo WT. Já o grupo MFS^{Trat} apresentou uma área glomerular total e uma área do espaço urinário significativamente maior quando comparado com o grupo MFS. Barra 10µm. * p<0,05; ** p<0,005.

4.6.2. Imunomarcacão

4.6.2.1 Fibrilina-1

A proteína fibrilina1 é crucial para formação das fibras elásticas, sendo um dos principais componentes estruturais do rim. Observou-se que o grupo WT apresentou uma imunomarcacão com intensidade significativa maior quando comparado com os animais do grupo MFS e MFS^{Trat}. Já os animais do grupo MFS^{Trat} mostraram uma imunomarcacão significativamente maior que os animais do grupo MFS. Esses resultados sugerem que os animais do grupo MFS apresentam uma possível alteracão da estrutura do rim e que a terapia com Losartan atenua as alteracões estruturais provocadas pela doenca, embora não restaure o fenótipo.



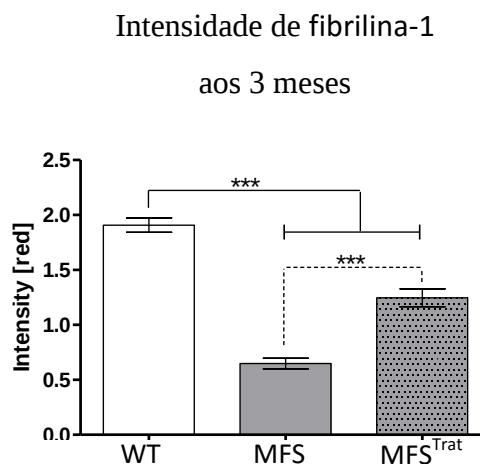
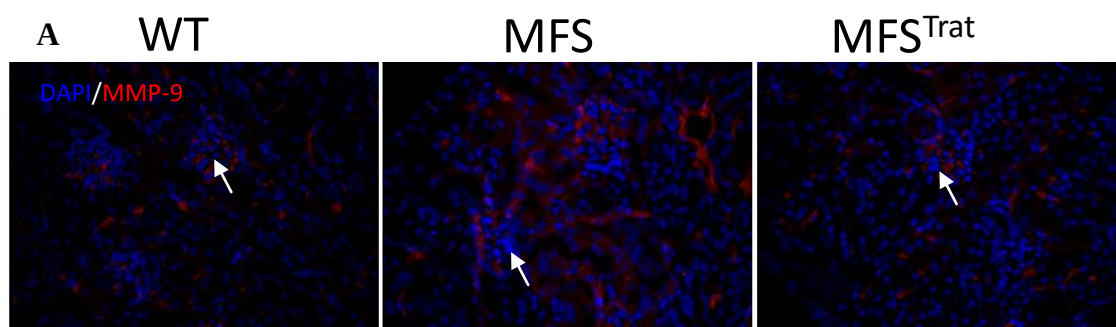
B

Figura 37. Fibrilina-1 e o tecido renal 3 meses. Em “A” são microfotografias representativas da imunomarcção de fibrilina-1 distribuída no parênquima renal com uma maior intensidade no glomérulo (seta branca). Em “B” é um gráfico que apresenta a intensidade do vermelho. No grupo MFS observou-se que sua intensidade é significativamente menor quando comparado com os grupos WT e MFS^{Trat}. Por outro lado, o grupo MFS^{Trat} apresentou uma imunomarcção significativamente maior quando comparado com grupo MFS, porém significativamente menor quando comparado com o grupo WT. Barra 10µm. *** $p < 0,0001$.

4.6.2.2 Metaloproteinase-9

A MMP-9 é uma enzima que tem como principal função degradar fibras elásticas. Nesse estudo observou-se que o grupo MFS apresentou uma imunomarcção significativamente maior quando comparado com os animais dos grupos WT e MFS^{Trat}. Interessantemente, os animais do grupo MFS^{Trat} não apresentaram diferença estatística quando comparados com os animais do grupo WT. Esses resultados sugerem que a MMP-9 pode agravar o fenótipo nos animais do grupo MFS e que a terapia com Losartan atenua a imunomarcção dessa enzima no tecido renal, sugerindo que pode ter uma atenuação das alterações das fibras elásticas.



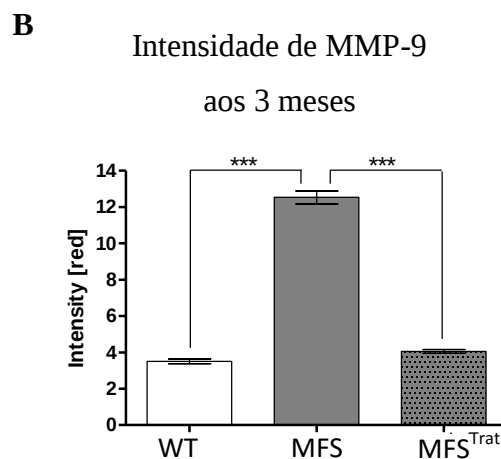
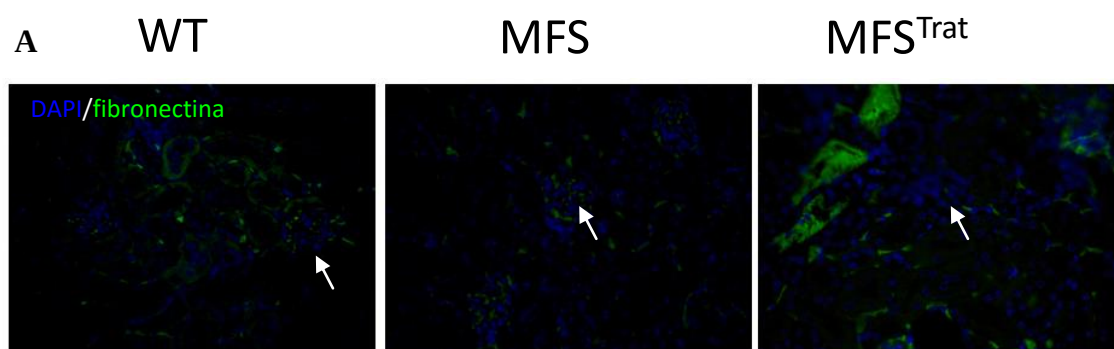


Figura 38. MMP-9 e o tecido renal 3meses. Em “A” são microfotografias representativas da imunomarcção de MMP-9 distribuída no parênquima renal com uma maior intensidade no glomérulo (seta branca) nos grupos WT, MFS e MFS^{Trat}. Em “B” é um gráfico que apresenta a intensidade do vermelho. O grupo MFS apresentou uma imunomarcção significativamente maior quando comparado com os grupos WT e MFS^{Trat}. Não foi observada diferença estatística entre os grupos WT e MFS^{Trat}. Barra 10µm. *** p<0,0001.

4.6.2.3 Fibronectina

A fibronectina é uma microfibrila que também está presente no parênquima renal com função de estruturação. Observou-se uma imunomarcção no grupo WT significativamente maior quando comparada com os grupos MFS e MFS^{Trat}. Além disso, observou-se que os animais do grupo MFS^{Trat} apresentaram um aumento significativo em comparação com os animais do grupo MFS. Esse resultado sugere uma recuperação fenotípica no grupo MFS^{Trat}, embora ainda seja significativamente menor quando comparado com os animais pertencentes ao grupo WT.



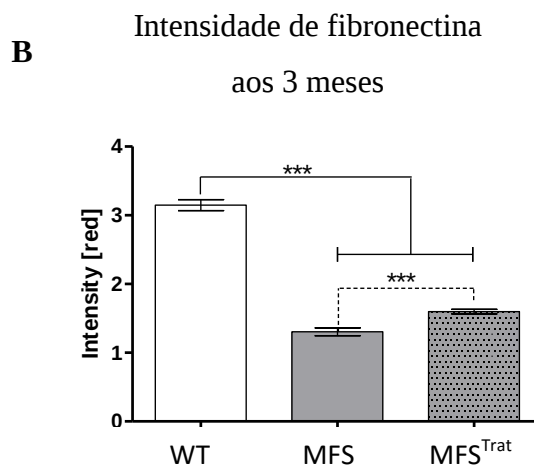
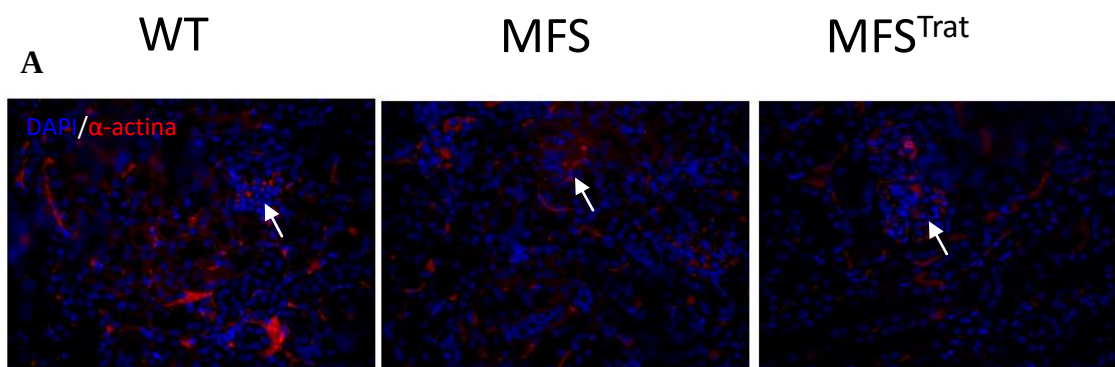


Figura 39. Fibronectina e o tecido renal 3 meses. Em “A” são microfotografias representativas da imunomarcção de fibronectina no parênquima renal nos grupos WT, MFS e MFS^{Trat}. Foi observada a presença de fibronectina nos glomérulos de todos os grupos (seta branca). Em “B” é um gráfico que apresenta a intensidade do verde. No grupo MFS foi observada uma intensidade de verde significativamente menor quando comparado com os grupos WT e MFS^{Trat}. Já o grupo MFS^{Trat} apresentou uma imunomarcção significativamente maior quando comparado com grupo MFS e menor quando comparado com grupo WT. Barra 10µm. *** p<0,0001.

4.6.2.4 α -actina de músculo liso

A α -actina de músculo liso tem uma função crucial nas estruturas celulares do rim. Observou-se que os animais do grupo WT apresentaram uma imunomarcção significativamente maior quando comparados com os grupos MFS e MFS^{Trat}. Ademais, observou-se que os animais do grupo MFS^{Trat} apresentaram uma imunomarcção significativamente menor quando comparados com os animais do grupo MFS.



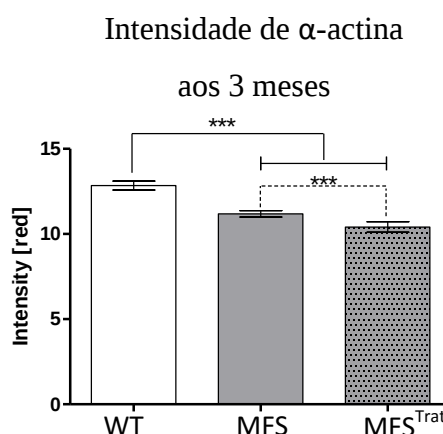
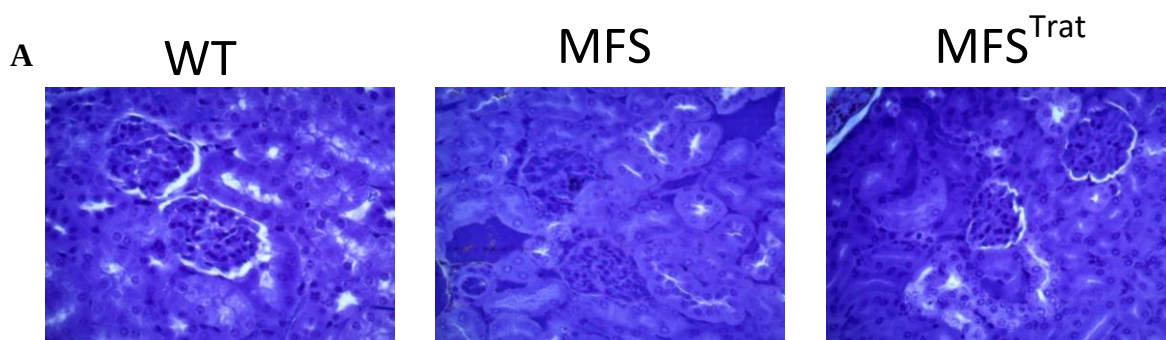
B

Figura 40. α -actina e o tecido renal 3 meses. Em “A” são microfotografias representativas da imunomarcção de α -actina no parênquima renal nos grupos WT, MFS MFS^{Trat}. Foi observada a presença de α -actina nos glomérulos de todos os grupos (seta branca). Em “B” é um gráfico que apresenta a intensidade do vermelho. No grupo MFS foi observada uma intensidade de vermelho significativamente menor quando comparado com o grupo WT e significativamente maior quando comparado MFS^{Trat}. Já o grupo MFS^{Trat} apresentou uma imunomarcção significativamente menor quando comparado com grupo WT. Barra 10 μ m. *** p<0,0001.

4.6.3 6 meses

Observou-se que no período de 6 meses a área total do glomérulo do grupo WT foi significativamente maior quando comparada com os grupos MFS e MFS^{Trat}. Contudo, não houve diferença estatística entre os grupos MFS e MFS^{Trat}, sugerindo que o efeito terapêutico na síndrome de Marfan é temporário.

Interessantemente, tanto a área total do pólo vascular do glomérulo, quanto o espaço urinário do grupo WT foram significativamente maiores quando comparados com os grupos MFS e MFS^{Trat}. Porém, semelhantemente ao resultado da área glomerular total, não se encontrou diferença estatística entre os grupos MFS e MFS^{Trat}, sugerindo que a dismorfologia da MFS persiste até aos 6 meses e que a terapia com Losartan não tem efeito na MFS ao longo do tempo.



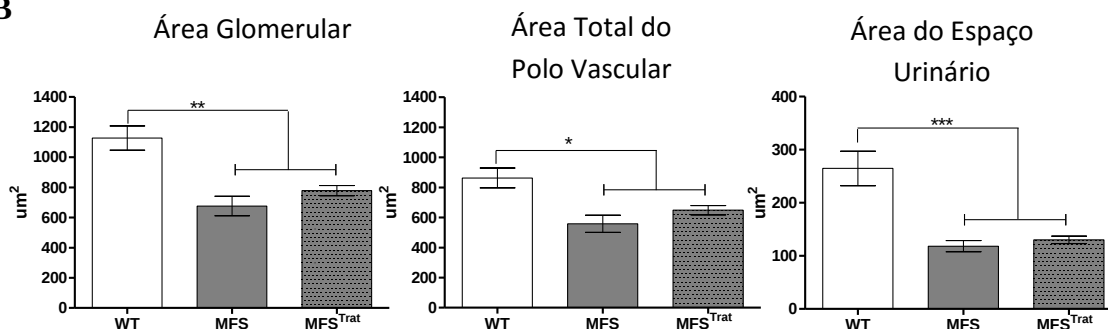
B

Figura 41. Morfologia das estruturas glomerulares aos 6 meses. Em “A” são microfotografias representativas da morfologia glomerular dos grupos WT, MFS e MFS^{Trat}. Em “B” são apresentados gráficos que representam as estruturas mensuráveis do glomérulo. Foi observada nos grupos MFS e MFS^{Trat} uma redução significativa da área glomerular, pólo vascular do glomérulo e do espaço urinário quando comparado com o grupo WT. Já o grupo MFS^{Trat} apresentou uma área glomerular total significativamente maior quando comparado com o grupo MFS. Barra 10 μm . * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0001$.

4.6.3.1 Imunomarcacão

4.6.3.1.1 Fibrilina-1

Como já mencionado a fibrilina-1 é uma proteína importantíssima para o rim em sua estruturação. Foi observado aos 6 meses que os animais do grupo MFS apresentaram uma imunomarcacão significativamente menor quando comparados com os animais dos grupos WT e MFS^{Trat}. Interessantemente, os animais do grupo MFS^{Trat} mostraram uma imunomarcacão significativamente maior quando comparados tanto com os animais do grupo WT, quanto com os animais do grupo MFS.

Esse resultado sugere que a dismorfologia da síndrome de Marfan persiste até o tempo avaliado nesse estudo. Além disso, indicou que a terapia com Losartan aumenta a imunomarcacão tanto no parênquima, como nas células, cronicamente.

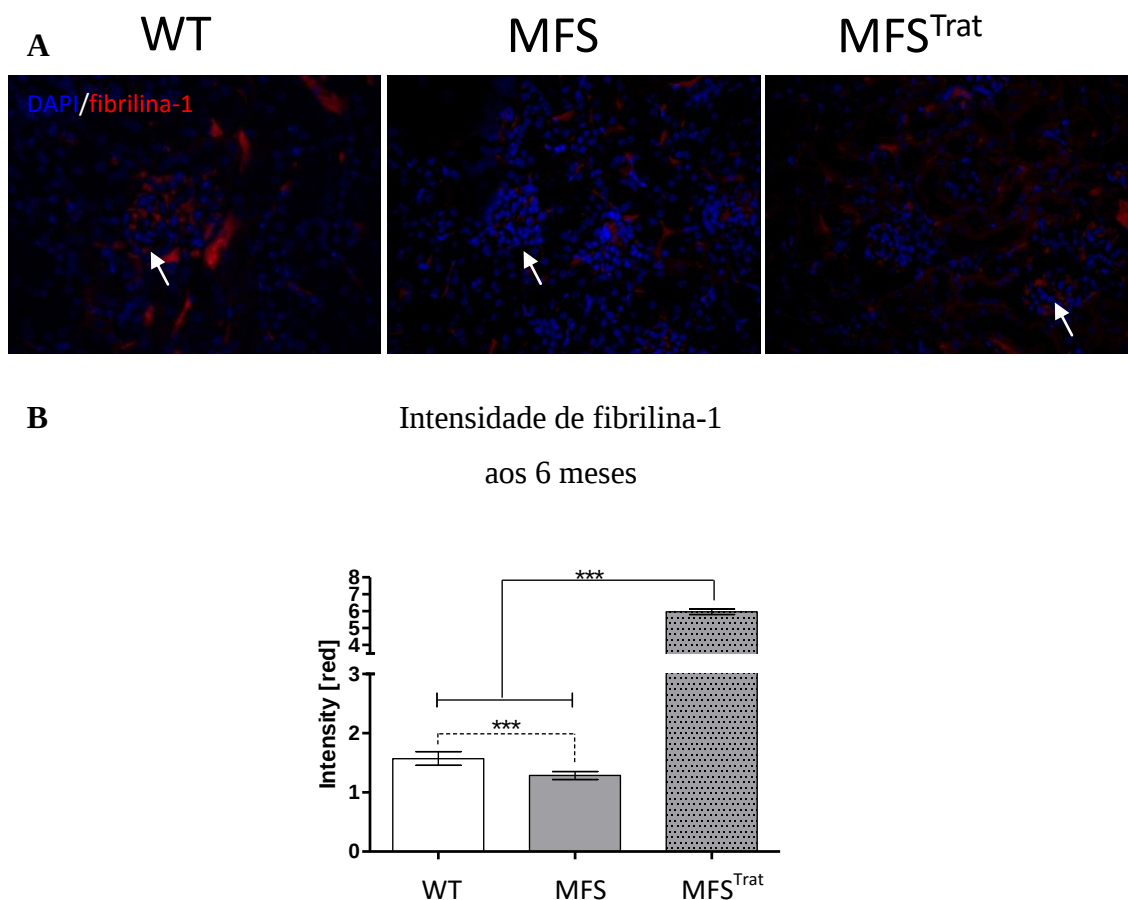


Figura 42. Fibrilina-1 e o tecido renal 6 meses. Em “A” são microfotografias representativas da imunomarcção de fibrilina-1 distribuída no parênquima renal com uma maior intensidade no glomérulo (seta branca). Em “B” é um gráfico que apresenta a intensidade do vermelho. No grupo MFS observou-se que sua intensidade é significativamente menor quando comparado com os grupos WT e MFS^{Trat}. Por outro lado, o grupo MFS^{Trat} apresentou uma imunomarcção significativamente maior quando comparado com grupo MFS e com o grupo WT. Barra 10µm. *** p<0,0001.

4.6.3.1.2 Metaloproteinase-9.

Ao analisar MMP-9, observou-se que os animais do grupo WT apresentaram uma imunomarcção significativamente menor quando comparados com os animais do grupo MFS e MFS^{Trat}. Por outros lado, observou-se que os animais do grupo MFS^{Trat} mostraram uma imunomarcção significativamente maior quando comparados com os animais do grupo WT e MFS. Esse resultado sugere que os animais pertencentes aos grupos MFS e MFS^{Trat} apresentaram ao longo do tempo um aumento da MMP-9, o que possivelmente pode resultar em uma maior degradação das fibras elásticas.

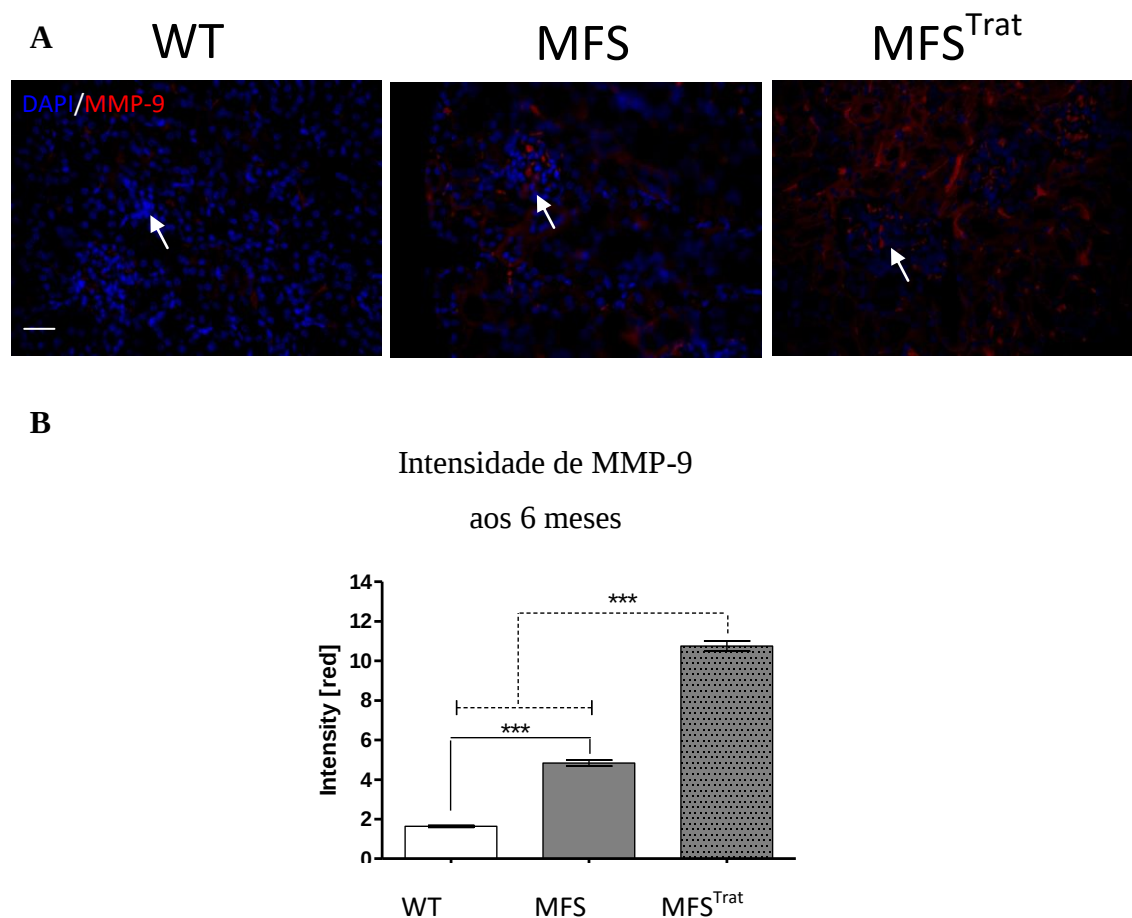


Figura 43. MMP-9 e o tecido renal 6 meses. Em “A” são microfotografias representativas da imunomarcacão de MMP-9 distribuída no parênquima renal com uma maior intensidade no glomérulo (seta branca) nos grupos WT, MFS e MFS^{Trat}. Em “B” é um gráfico que apresenta a intensidade do vermelho. O grupo MFS apresentou uma imunomarcacão significativamente maior quando comparado com o grupo WT. O grupo MFS^{Trat} apresentou uma imunomarcacão significativamente maior quando comparado com os grupos WT e MFS. Barra 10 m. *** p<0,0001.

4.6.2.3.3 Fibronectina

A fibronectina   uma microfibrila de suma importância para a forma o das fibras elásticas e está presente no parênquima renal. Interessantemente, os animais do grupo WT apresentaram uma imunomarcacão significativamente maior quando comparados com os animais MFS e MFS^{Trat}. Além disso, observou-se que os animais do grupo MFS^{Trat} tiveram sua imunomarcacão significativamente maior que os animais do grupo MFS. Esses resultados sugerem que os animais do grupo MFS apresentam uma possível dismorfologia em diferentes microfibrilas. Contudo, ao tratar os animais com Losartan, observou-se uma recupera o fenotípica da imunomarcacão da fibronectina, embora ainda seja significativamente menor que nos animais do grupo WT.

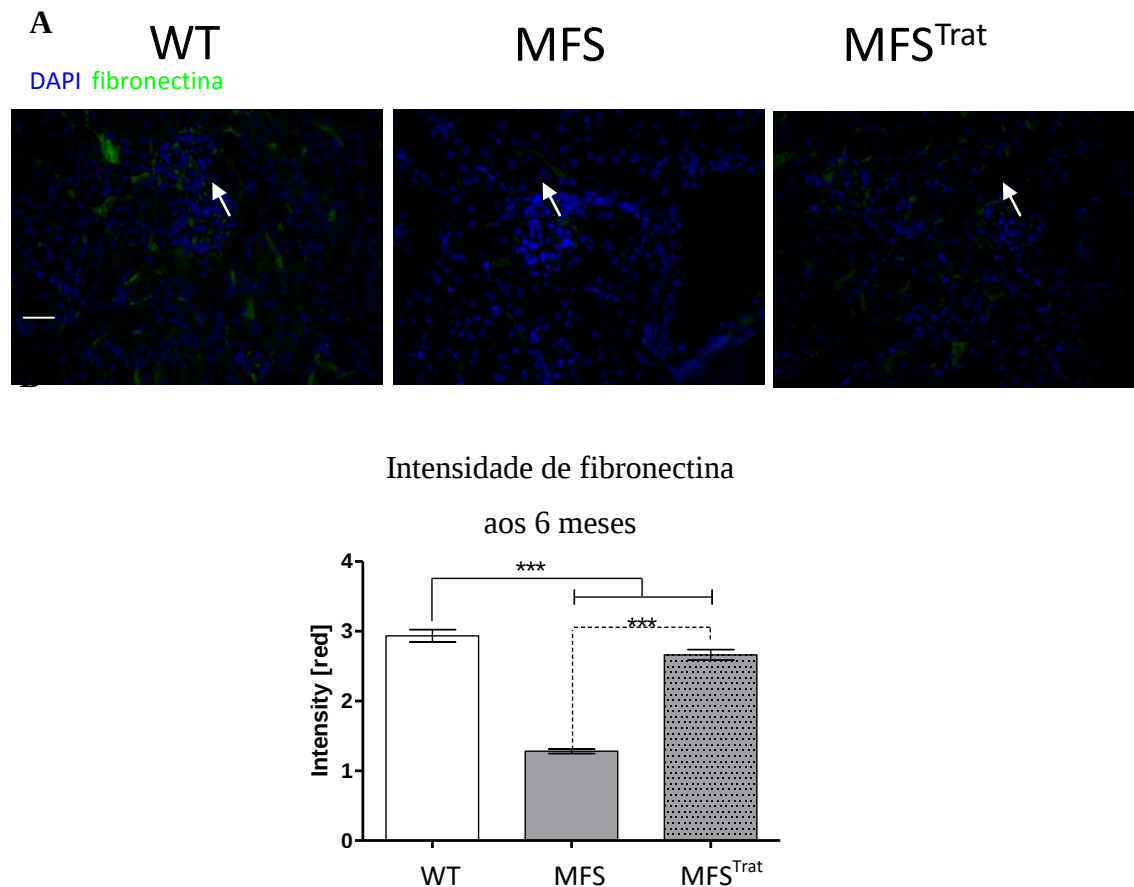


Figura 44. Fibronectina e o tecido renal 6 meses. Em “A” são microfotografias representativas da imunomarcação de fibronectina no parênquima renal nos grupos WT, MFS MFS^{Trat}. Foi observada a presença de fibronectina nos glomérulos de todos os grupos (seta branca). Em “B” é um gráfico que apresenta a intensidade do verde. No grupo MFS foi observada uma intensidade de verde significativamente menor quando comparado com os grupos WT e MFS^{Trat}. Já o grupo MFS^{Trat} apresentou uma imunomarcação significativamente maior quando comparado com grupo MF

4.6.2.3.4 α -actina de músculo liso

Foi observado que a imunomarcação α -actina de músculo liso nos animais do grupo MFS foi significativamente maior quando comparada com os animais do grupo WT, sugerindo que os animais com síndrome de Marfan necessitam de um remodelamento de componentes ativos no parênquima renal.

Além disso, foi observado que os animais MFS^{Trat} apresentaram uma imunomarcação da α -actina de músculo liso significativamente maior quando comparada com o grupo WT e MFS, sugerindo que a cronicidade da terapia pode ativar diferentes mecanismos celulares na tentativa de recuperação fenotípica.

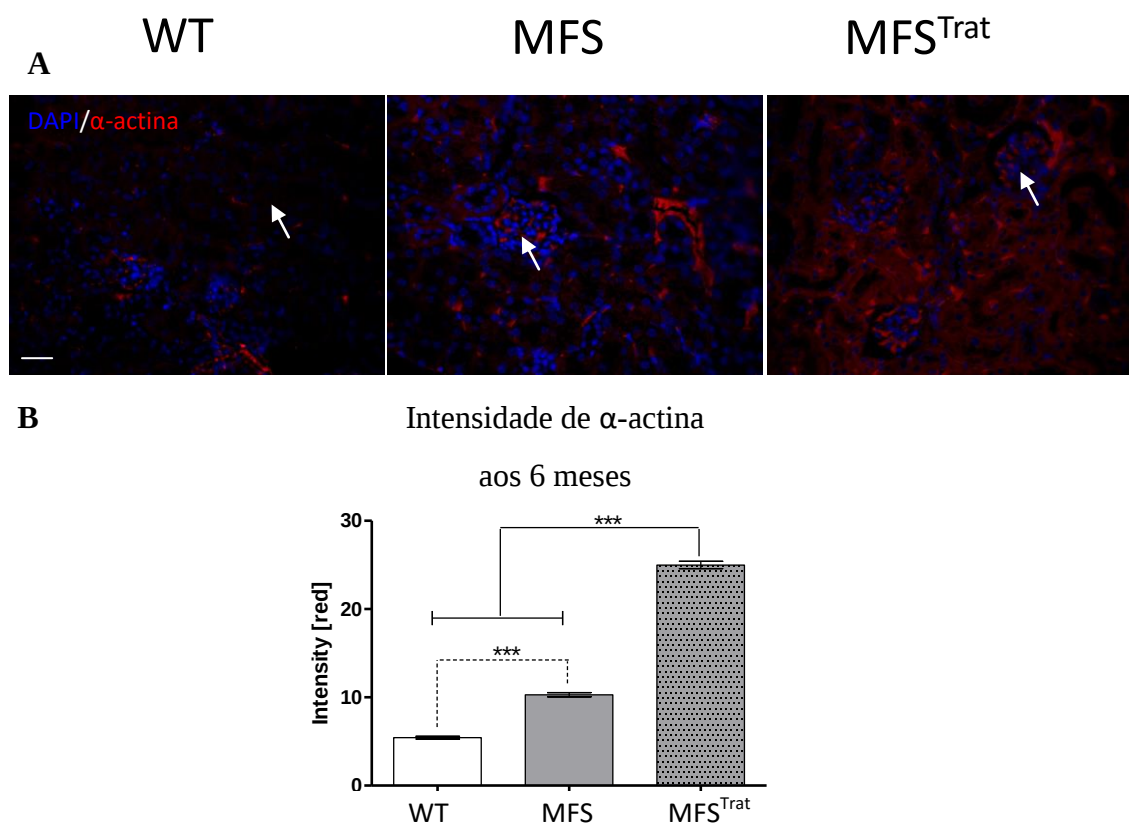


Figura 45. α -actina e o tecido renal 6 meses. Em “A” são microfotografias representativas da imunomarcagem de α -actina no parênquima renal nos grupos WT, MFS MFS^{Trat}. Foi observada a presença de α -actina nos glomérulos de todos os grupos (seta branca). Em “B” é um gráfico que apresenta a intensidade do vermelho. No grupo MFS foi observada uma intensidade de vermelho significativamente maior quando comparado com o grupo WT e significativamente menor quando comparado MFS^{Trat}. Já o grupo MFS^{Trat} apresentou uma imunomarcagem significativamente maior quando comparado com os grupos WT e MFS. Barra 10 μ m. *** $p < 0,0001$.

5. DISCUSSÃO

5.1 Discussão

A MFS (MFS) é uma doença genética autossômica dominante com penetrância completa, que apresenta mais de 2900 diferentes mutações no gene *FBN1*, o que pode resultar em um fenótipo extremamente variável (SOUZA et al. 2017; FRANKEN et al. 2014). Contudo, é comum encontrar alterações no sistema esquelético, no olho e no aparelho cardiovascular (PEPE et al. 2016; PYERITZ, 2018).

De aspecto holístico, a doença MFS apresenta classicamente dois tipos de mutação: Haploinsuficiência e dominante negativa. A haploinsuficiência é uma redução da produção da fibrilina-1 e está associada a fenótipos esqueléticos e com uma menor frequência a fenótipo ocular, assim como a ectopia de lente (FAIVRE et al. 2007; FRANKEN et al. 2014; FRANKEN et al. 2015). Por outro lado, a mutação de dominância negativa ocorre quando a mutação provoca alteração na função ou na montagem da proteína, e na MFS está associada a um aumento da incidência de ectopia de lentes, aneurismas, prolapso mitral, fenótipo esquelético e cardíaco grave (FAIVRE et al. 2007; FRANKEN et al. 2014; FRANKEN et al. 2015).

Notou-se em nosso estudo que o modelo $mg\Delta^{lpn}$ mostrou uma redução significativa do alelo selvagem do gene *Fbn1* e a presença da expressão do gene da *Fbn1* mutante, tornando-se assim um modelo animal de dominância negativa e, por esse motivo, pode resultar em um fenótipo sistêmico mais grave, o que pode contribuir com a compreensão da fisiopatologia do animal.

Além disso, mutações no gene *Fbn1* estão associadas a uma regulação positiva do fator de crescimento transformador Beta (TGF- β), por ambas as proteínas terem uma atratividade físico-química em condições fisiológicas. A mutação causa uma perda da atratividade de ambas as proteínas e, por essa razão, a citocina TGF- β promove remodelamentos teciduais na matriz extracelular (MEC) que são cruciais na fisiopatologia da MFS (NEPTUNE et al 2003; PEPE et al. 2016; SOUZA et al. 2017). Foi observado em estudos pregressos que a terapia de losartan apresentava um efeito de neutralização do TGF- β e um antagonismo do receptor da angiotensina tipo 1, o que promovia em camundongos com MFS uma restauração dos componentes estruturais da MEC (NEPTUNE et al. 2003; HABASHI et al. 2006; MILEWICZ, RAMIREZ, 2019).

Interessantemente, a terapia com losartan em nosso estudo não atenuou a expressão do alelo mutante, tendo ainda uma maior expressão aos 3 meses. Esse

resultado indica que a terapia não desempenha função ao nível de expressão gênica, embora se saiba da sua influência ao nível protéico, o que resulta numa atenuação fenotípica tanto naqueles que apresentam mutações do tipo dominante negativa quanto naqueles do tipo de haploinsuficiência (FRANKEN et al. 2015). Embora, essa atenuação seja mais significativa em modelos animais do que em pacientes (PEPE et al. 2016; MILEWICZ, RAMIREZ, 2019).

Classicamente, a MFS apresenta alterações fenotípicas no olho, no aparelho cardiovascular e no sistema esquelético. O sistema esquelético apresenta funções cruciais para o organismo, como: Sustentação, proteção e formação de arcabouço. Notavelmente, foi observado que os animais sindrômicos deste estudo ($mg\Delta^{lpn}$), independentemente da terapia com losartan, apresentaram um defeito da coluna vertebral somente na região torácica, caracterizado como uma lordose acentuada, sendo significativamente maior quando comparado com os animais WT.

O defeito da coluna neste estudo foi calculado pelo KI, o qual é uma razão entre o comprimento de uma linha reta da última vértebra cervical até a sexta vértebra lombar e o comprimento de uma linha perpendicular a esta, da borda dorsal da vértebra no ponto de maior curvatura até a primeira linha. A gravidade da lordose é inversamente proporcional ao valor de KI, ou seja, quanto menor é o valor de “Kyphosis index”, maior é a curvatura de lordose (LAWS, HOEY, 2004).

Esse defeito da coluna vertebral é presente em outros modelos da MFS, sendo uma característica para definir o defeito esquelético nos animais (PEREIRA et al. 1999; SAKAI et al. 2016; LI et al. 2017), embora tenha outros estudos que apresentaram diferentes aspectos de avaliação do sistema esquelético em modelos experimentais como o apresentado por WALJI et al. 2016. As curvaturas acentuadas na coluna vertebral também são uma característica presente na clínica da MFS, embora tenha se observado também a presença de alterações no tórax (*pectus carinatum* e *pectus excavatum*), hiper mobilidade articular, dolichostomegalia e deformidade da face (malar hipoplásico, micrognatia e retrognatia) (BITTEMAN, SPONSELLER, 2017; DIETZ, 2017; PYERITZ, 2018).

Em nosso estudo, a lordose acentuada foi encontrada apenas na região do tórax o que nos remeteu à hipótese de que o processo ventilatório (de expansão e retração do tórax) poderia contribuir com o defeito. BEYER et al. (2014) e BEYER et al. (2016) observaram que na expansão do tórax no processo ventilatório a coluna vertebral exerce

um vetor de força frontal, o qual empurra coluna torácica em direção ao osso esterno. Associado a isso, sugerimos que a deformidade da coluna vertebral só seria possível se o ligamento longitudinal anterior apresentasse uma frouxidão ligamentar. ZHANG et al. (1995) e GIUSTI, PEPE (2016) mostraram a presença de fibras elásticas em tendões e em ligamentos, os quais fornecem elasticidade para o tecido. Além disso, os trabalhos mostraram que mutações nos genes *Fbn1* ou *Fbn2* exercem um controle negativo nos ligamentos resultando numa frouxidão e numa perda de suporte estrutural nos ligamentos.

Sugerimos que a combinação dos eventos descritos acima pode contribuir para o surgimento da lordose acentuada na região do tórax. Contudo, notou-se que os animais tratados não apresentaram nenhuma atenuação fenotípica, corroborando os achados de NISTALA et al. (2010), que expuseram o efeito benéfico do losartan apenas no fenótipo vascular, não tendo efeito no fenótipo ósseo.

Interessantemente, o defeito da coluna vertebral na região torácica pode resultar em compressões em diferentes órgãos que se situam no interior do tórax, como a aorta e o esôfago. SOUZA et al. (2019) e KORNEVA et al. (2019) mostraram que a compressão da coluna torácica sobre a aorta torácica gerou aneurisma, por turbilhonar o fluxo sanguíneo pontualmente. Para ROBLEDO et al. (2012), o defeito da coluna comprimia o esôfago posteriormente gerando uma morbidade denominada de mega-esôfago. A compressão da coluna vertebral sobre o esôfago poderia perturbar o processo de peristalse esofágica, culminando no mega-esôfago (ROBLEDO et al. 2012). Esse fato também foi observado em cachorros com lordose acentuada (SACHELL, McLEOD, 1981).

Embora seja descrito que a MFS acomete diferentes sistemas, a principal causa de óbito é a morbidade vascular (PEPE et al. 2016; PYERITZ, 2018). As artérias são vasos sanguíneos que apresentam em sua constituição fibras elásticas que se dispõem em lamelas concêntricas nas diferentes camadas (SOUZA et al. 2017; GREWAL et al. 2018). Especificamente na aorta e em seus grandes ramos, a quantidade desse componente é maior quando comparado com as artérias de resistência. Por esta razão, mutações em genes que codificam proteínas estruturais podem desempenhar um papel patológico na aorta (SOUZA et al. 2017; GREWAL et al. 2018; RAMIREZ et al. 2018).

Notavelmente, a mutação do gene *FBN1* na MFS resulta em alterações nas fibras elásticas e, por essa razão, uma das características marcantes da doença é a ruptura das

fibras elásticas na aorta. Observamos em nosso estudo que as aortas do grupo MFS apresentam intensas fragmentações das fibras elásticas tanto aos 3 meses quanto aos 6 meses. Embora este estudo não tenha explorado outros componentes constituintes da MEC, pregressamente, SOUZA et al. (2019) mostraram que: o modelo $mg\Delta^{lpn}$ tinha fibras elásticas com espessura reduzida quando comparado aos animais selvagens, maior presença de fibras de colágeno do tipo I e maior desprendimento das fibrilas interlamelares, não havendo diferença entre os animais com e sem a presença de aneurisma e dissecação.

Por outro lado, GYURICZA et al. (2020), apresentaram um índice de integridade de fibras elásticas capaz de separar os animais com e sem aneurismas e dissecação. Ao utilizar esse índice, foi observado que a taxa de integridade das fibras elásticas nos animais do grupo MFS foi significativamente menor, tanto aos 3 meses quanto aos 6 meses, quando comparado com os animais selvagens. A redução da integridade das fibras elásticas é uma das principais características da MFS presente tanto na clínica quanto em modelos animais experimentais da doença (PEREIRA et al. 1997; PEREIRA et al. 1999; CHUNG et al. 2007; LIMA et al. 2010; LÓPES-GUIMET et al. 2017; GREWAL et al. 2018).

Além da função estrutural que a fibrilina-1 fornece ao tecido, observa-se uma função bioquímica, a qual tem como finalidade controlar a biodisponibilização da citocina $TGF\beta$ na MEC. Uma vez alterada, a fibrilina-1 promove um aumento significativo da citocina na MEC, resultando em um remodelamento tecidual (CHUNG et al. 2007; RAMIREZ et al. 2018). Interessantemente, o aumento de $TGF\beta$ está associado com o aumento da atividade do receptor I da angiotensina II. Este receptor também está associado aos remodelamentos matriciais da parede da aorta, os quais são inibidos pela ação do fármaco losartan, sendo muito eficiente na atenuação fenotípica em modelos experimentais e em alguns casos na clínica (HABASHI et al. 2006; NISTALA et al. 2010; LOEYS, 2015; PEPE et al. 2016; RAMIREZ et al. 2018). Em nossos resultados foi observado que a terapia com losartan atenuou a fragmentação das fibras elásticas tanto aos 3 meses quanto aos 6 meses, porém continuou existindo uma maior taxa de fragmentação quando comparado aos animais do grupo WT. Esses achados nos conduziram à hipótese de que poderia haver outros fatores que influenciam a persistência do fenótipo vascular, independentemente da terapia, além do desequilíbrio estrutural e bioquímico da fibrilina-1.

A fragmentação das fibras elásticas está associada à formação de aneurismas e dissecção de aorta na MFS (PEPE et al. 2016). Interessantemente, somado ao distúrbio estrutural, a formação de aneurisma e a dissecção de aorta estão associadas à alteração do fluxo sanguíneo visto tanto em pacientes com MFS quanto naqueles idiopáticos (JOHANSEN, 1982; BÜRK et al. 2012; GUALA et al. 2019).

Em nossos resultados foram observados que os animais do grupo MFS apresentaram o fluxo sanguíneo reduzido quando comparado ao grupo WT, tanto aos 3 meses quanto aos 6 meses, corroborando os achados de SOUZA et al. (2019) e GUALA et al. (2019).

É importante ressaltar que esses animais do grupo MFS apresentaram defeito na coluna vertebral na região torácica. Assim, levantamos a hipótese de que a compressão extrínseca da parede posterior da aorta pela coluna deformada pode resultar no redirecionamento do fluxo sanguíneo para a parede lateral da aorta, deformando sua forma redonda original. Essa relação entre a coluna vertebral e a aorta tortuosa está associada à formação de aneurismas e dissecção da aorta, conforme relatado em pacientes com MFS (FRANKEN et al. 2015). Por sua vez, essa dismorfologia pode levar a um fluxo sanguíneo turbulento e sua força de cisalhamento pode desencadear lesões na parede aórtica.

Corroborando os nossos achados, outros também apontaram a coexistência da tortuosidade da aorta e de aneurismas ou dilatações em modelo animal de experimentação e em pacientes com MFS, e outros correlacionaram a alta pressão e tensão de cisalhamento na aorta com um padrão de fluxo vórtice / hélice aberrante (QUERZOLI et al. 2014; GEIGER et al. 2017; KORNEVA et al. 2019).

Observamos em nossos achados que os animais tratados com losartan apresentaram um fluxo significativamente menor que os animais do grupo WT tanto aos 3 meses quanto aos 6 meses e que os animais do grupo MFS aos 3 meses, indicando seu potencial para atenuação fenotípica na MFS. Esse resultado pode ser consequência da ação específica do losartan, que tem como alvo principal as células da musculatura lisa e do endotélio, provocando a redução da vasoconstrição, o que reduz a resistência vascular e, por esse motivo, é muito utilizado em terapias anti-hipertensivas. (XU et al. 2009; PEPE et al. 2016).

De fato, fomos capazes de mostrar alterações na curva espectral do fluxo sanguíneo no grupo MFS tanto aos 3 meses quanto aos 6 meses. Opostamente,

observou-se que a terapia não apresentou figuras atípicas na curva espectral, além de ter apresentado picos sistólicos menores, indicando que a terapia teve efeito em atenuar o efeito do fluxo sanguíneo nos animais MFS. Sabidamente, nota-se em outros estudos o efeito benéfico do losartan em modelos experimentais da MFS, quando se avalia os remodelamentos matriciais (HABASHI et al. 2004; XU et al. 2009; LEE et al. 2016). No nosso estudo ficou evidenciado que a terapia com losartan atenuou a fragmentação das fibras elásticas e o fluxo sanguíneo.

Embora a aorta apresente essas dismorfologias citadas, tanto na esfera morfológica quanto na esfera de dinâmica de fluxo sanguíneo, sua função é conduzir o fluxo sanguíneo do coração para o corpo. Por causa dessa relação, tanto o coração quanto a aorta podem exercer influência um sobre o outro.

Ao investigar o fenótipo cardíaco, encontramos nitidamente dois fenótipos distintos no grupo MFS aos 3 e 6 meses. Aos 3 meses foi identificado um aumento significativo da área total do coração no grupo MFS, quando comparado com os animais do grupo WT. Além disso, foi observado um aumento das espessuras dos ventrículos direito e esquerdo dos animais do grupo MFS. Essas características nos remetem a hipótese de um remodelamento cardíaco, semelhante a uma hipertrofia excêntrica, uma vez que GALLO et al. (2019) descreveram que o aumento do volume sanguíneo nas câmaras conduzem a esse efeito patológico. Embora não tenhamos observado o aumento do fluxo sanguíneo medido na aorta desses animais, sugerimos que, com o defeito esquelético proeminente, e somado aos distúrbios na aorta, a preservação do mesmo volume de fluxo sanguíneo pode resultar nessa sobrecarga de volume, e então formar essa hipertrofia excêntrica. Essa característica é vista tanto em pacientes como no modelo mgR/mgR aos 3 meses (KIOTSEKOGLOU et al. 2008; RADKE et al. 2014; COOK et al. 2014).

Opostamente aos 3 meses, os animais do grupo MFS aos 6 meses não apresentaram alterações no tamanho total do coração, apesar de continuarem a mostrar um aumento das espessuras dos ventrículos direito e esquerdo, indicando um processo de hipertrofia concêntrica, o qual está associado ao aumento de sobrecarga cardíaca (GALLO et al. 2019). Esse fenótipo foi observado tanto no modelo C1039G, quanto no modelo mg Δ^{lpn} e em pacientes com MFS (ALPENDURADA et al. 2010; CAMPENS et al. 2015; LEE et al. 2016; TAE et al. 2016; ARUNAMATA et al. 2018; SOUZA et al. 2019).

Por outro lado, observou-se que, ao tratar os animais do grupo MFS com losartan, foi notada uma atenuação fenotípica, principalmente na espessura do ventrículo esquerdo, a qual foi significativamente menor quando comparada com WT e MFS. Esses resultados podem ser decorrentes de uma série de eventos desencadeados pelo efeito do losartan na inibição da deterioração da MEC e na redução da pressão arterial, da sístole e da diástole do ventrículo esquerdo, como visto em pacientes da MFS (RADKE et al. 2014; LACRO et al. 2014; HARTOG et al. 2016; GRANATA et al. 2017; TIERNEY et al. 2018) e em pacientes não sindrômicos (SHIMADA et al. 2013; MHATRE et al. 2018). Sugerimos que a terapia de losartan, ao reduzir a dinâmica circulatória do coração, o faz não necessitar de um processo adaptativo de hipertrofia, o que, consequentemente, atenua o fenótipo.

Acredita-se que o efeito da hipertrofia cardíaca seja um resultante secundário, associado a um defeito da válvula mitral, o qual resulta em um refluxo sanguíneo, o que por sua vez inicia o processo de remodelamento cardíaco hipertrofiando-o (PEPE et al. 2016; GALLO et al. 2019). MATT et al. (2008) mostraram que a terapia de losartan atenua os efeitos da válvula mitral em camundongos, reduzindo os efeitos do remodelamento cardíaco. Sugere-se então que esse efeito pode ter ocorrido no modelo $mg\Delta^{lpn}$, embora nós não tenhamos avaliado a válvula mitral. Acreditamos nessa hipótese, pois a curva espectral do fluxo sanguíneo desses animais não apresentou figuras aberrantes e indicava uma restauração da função cardíaca.

Por outro lado, COOK et al. (2014), mostraram que os pacientes com ou sem alteração na válvula mitral desenvolvem alterações ventriculares e sugere que o defeito da fibrilina-1 pode ser responsável por esse fenótipo, uma vez que a proteína está interligada ao citoesqueleto dos cardiomiócitos dando suporte e auxiliando na sinalização mecânica do movimento cardíaco. Em nosso resultado foi observado uma redução significativa da fibrilina-1 no grupo MFS nos dois períodos analisados (3 e 6 meses) e, por esse motivo, acreditamos que esse mecanismo também pode estar envolvido, pois tanto o ventrículo direito quanto o esquerdo apresentaram redução da expressão de fibrilina-1 e desenvolveram alterações ventriculares.

Como já mencionado, o desequilíbrio da proteína fibrilina-1 regula a ativação da citocina $TGF\beta$, que em pacientes e nos modelos de experimentação está altamente ativa no tecido, causando remodelamento tecidual (NEPTUNE et al. 2003; SOUZA et al. 2017; MILEWICZ, RAMIREZ, 2019). Além disso, observa-se que essa ativação do

TGF β pode promover duas via de sinalização celular: A primeira é a ativação da sinalização Smad (HABASHI et al. 2006; PEPE et al. 2016; ROUF et al. 2017) e a segunda é a ativação da sinalização de ERK1 ou 2 (ROSEMARY et al. 2012; ROMANIELLOA et al. 2014; ROUF et al. 2017). Interessantemente, a ativação da via de sinalização celular ERK está envolvida nos processos adaptativos cardíacos. Quando super expressada está envolvida no processo de hipertrofia concêntrica e quando reduzida está envolvida no processo de hipertrofia excêntrica (GALLO et al. 2019).

Sugerimos em nosso estudo que, ao longo da vida do modelo mg Δ^{lpn} , podem existir estímulos e sinalizações diferentes atuando nos tecidos, o que pode modular o fenótipo. Embora a sinalização ERK não tenha sido objeto de estudo, o desequilíbrio dessa sinalização pode resultar em uma ativação excessiva da MMP-2 e MMP-9 (NAGASAWA et al. 2013; ROMANIELLOA et al. 2014). Além disso, a própria sinalização de TGF β tem a capacidade de exacerbar a ativação da MMP-2 e MMP-9 (CHUNG et al. 2007) e, por esse motivo, optamos por analisar a MMP-9 e encontramos uma ativação significativamente maior nos animais do grupo MFS quanto comparado com o grupo WT. Por ser uma enzima, a MMP-9 tem função de degradar fibras elásticas, resultando em uma progressiva deterioração das fibras elásticas, o que pode fazer o fenótipo cardíaco piorar.

Paralelamente, BALDWIN et al. (2013) descreveram que na formação das fibras elásticas, além da interação da fibrilina-1 e da elastina, é necessário outras microfibrilas. Uma delas é a fibronectina, que é essencial na formação das fibras elásticas e pode desempenhar um mecanismo compensatório na MFS. Observou-se em nossos resultados que a fibronectina apresentou uma imunomarcagem significativamente maior aos 3 meses no grupo MFS, corroborando a hipótese do mecanismo compensatório, uma vez que temos uma redução significativa da fibrilina-1, principal componente de fibras elásticas (BALDWIN et al. 2013; BEENE et al. 2013). Dado o fato da fibronectina ser co-localizada com a fibrilina-1, sugerimos que a alta atividade e a cronicidade de MMP-9 pode reduzir a imunomarcagem de fibrilina1, e a fibronectina pode exercer sua função estrutural. (NATAATMADJA et al. 2003; SABATIER et al. 2009; SABATIER et al. 2013; BALDWIN et al. 2013; PEZZOLI et al. 2018).

Na MFS, o losartan além de ter o efeito de reduzir a pressão sanguínea (LACRO et al. 2014; HARTOG et al. 2016; TIERNEY et al. 2018), tem efeito sobre a atividade de TGF β , atenuando os fenótipos principalmente em modelos experimentais

(HABASHI et al. 2006; YANG et al. 2009; PEPE et al. 2016). Foi observado que o tratamento no grupo MFS apresentou diferentes comportamentos ao longo do período analisado.

Aos 3 meses foi observado que a expressão de fibrilina-1 foi significativamente menor quando comparada com os animais do grupo WT e MFS, sugerindo que nesse período de análise a terapia não influenciou na expressão de fibrilina-1. Por outro lado, a terapia reduziu significativamente a expressão de MMP-9, o que sugere que a degradação enzimática das fibras elásticas pode ser atenuada. Acreditamos que a terapia, ao bloquear a expressão de TGF β , pode inibir as sinalizações de Smad e ERK (HABASHI et al. 2006; PEPE et al. 2016; ROUF et al. 2017). Classicamente, ambas as vias de sinalização tem a capacidade de aumentar a sinalização de MMP-2 e MMP-9 (GALLO et al. 2019) e, por esse motivo, observa-se uma degradação das fibras elásticas. Por outro lado, ao tratar com losartan, essa degradação é reduzida, atenuando o fenótipo na MFS. Embora esse mecanismo tenha sido descrito em experimentação *in vitro* e em diferentes tecidos, acreditamos que isso pode estar acontecendo também no coração (CHUNG et al. 2007; YANG et al. 2009; GRANATA et al. 2017).

Já aos 6 meses, foi observado um fenótipo oposto ao de 3 meses, uma expressão significativamente maior de fibrilina-1 no tecido cardíaco, o que sugere que cronicamente a terapia estimula a produção de fibrilina-1 no tecido, assim como observado em outros tecidos (LEE et al. 2016). Por outro lado, a terapia causou uma atenuação da expressão da MMP-9, sendo significativamente menor quando comparado com grupo MFS, porém significativamente maior que o grupo WT, sugerindo que o bloqueio da sinalização de TGF- β pode ser temporário, além de observarmos uma degradação menor das fibras elásticas quando comparado com os animais do grupo MFS.

Curiosamente, tanto os animais de 3 e 6 meses do grupo MFS^{Trat} apresentaram uma imunomarcção de fibronectina significativamente maior quando comparados com os grupos WT e MFS. Sugerimos que no tecido cardíaco a fibronectina pode desempenhar um papel de compensação estrutural no tecido, como visto nos ligamentos da lente dos animais mgR/mgR (BEENE et al. 2013). É descrito que a fibronectina é co-localizada com a fibrilina-1 na mesma superfície celular (ZEYER et al. 2018), além de apresentar um importante papel na formação das microfibrilas de fibrilina-1 (BALDWIN et al. 2013). Além disso, FISHER et al. (2001) indicaram em seu estudo *in*

vitro que o losartan não interfere na expressão de fibronectina. Esses trabalhos nos conduzem à hipótese de um processo de adaptação tecidual, embora necessite de um aprofundamento maior desse estudo que será realizado em um futuro próximo.

Além disso, encontramos em nosso estudo um aumento significativo do ventrículo direito nos animais do grupo MFS, em ambos os períodos analisados quando comparados com o grupo WT, o que pode ser consequência de um processo de resistência na artéria pulmonar como descrito por McLUNE e PEACOCK (2009), NAEIJE (2013) e BHATNAGAR et al. (2018). Embora os animais do grupo MFS^{Trat} não tenham apresentado diferença significativa entre os grupos de MFS e WT aos 3 meses, opostamente aos 6 meses o ventrículo direito foi significativamente maior quando comparado com os grupos WT e MFS. Esse resultado indica um possível distúrbio com o pulmão.

Nitidamente, é observado nos animais do grupo MFS um aumento significativo da área alveolar, formando grandes espaços alveolares. Embora as alterações pulmonares não sejam consideradas como fenótipo principal da doença, observa-se uma série de relato de casos de alargamento alveolar apical resultando em enfisema (DINWIDDIE, SONNAPPA 2005; KOLONICS-FARKAS et al. 2009; DYHDALO, FARVER, 2011), além de ser uma característica presente em diferentes modelos experimentais da síndrome de Marfan (NEPTUNE et al. 2004; LIMA et al. 2010; FERNANDES et al. 2016; URIARTE et al. 2016; LEE et al. 2016).

Na fisiopatologia da síndrome de Marfan, a cronicidade do enfisema pode resultar em pneumotórax espontâneo (DINWIDDIE, SONNAPPA 2005; DYHDALO, FARVER, 2011). Embora esse achado seja visto em pacientes, não encontramos essa morbidade nos animais deste estudo, podendo indicar uma adaptação da lesão.

O pulmão é um órgão de extrema importância no processo de ventilação e oxigenação das células sanguíneas. O processo de ventilação tem a característica física de expansão do parênquima pulmonar. A expansividade só é possível, pois o parênquima pulmonar apresenta fibras elásticas, as quais geram complacência e recuo elástico no pulmão (BURGSTALLER et al. 2017). A redução da fibrilina-1 no parênquima pulmonar é associada à formação de alargamento alveolar na síndrome de Marfan, como descrito por ROBBESON et al. (2008). Em nosso estudo foi observado que a proteína fibrilina-1 teve uma redução significativa nos animais do grupo MFS em relação aos animais do grupo WT, tanto aos 3 meses quanto aos 6 meses. Sugerimos

que a redução da fibrilina-1 no parênquima pulmonar diminui a capacidade elástica no pulmão, além de romper os septos alveolares, fazendo-o mais rígido. A redução elástica do pulmão, somada à expansão mecânica do processo ventilatório e à dinâmica aerífera dos alvéolos no grupo MFS, pode promover no parênquima uma dilatação alveolar constante.

O alargamento dos alvéolos altera a expansão pleural em modelos da síndrome de Marfan, necessitando de força ventilatória mais positiva quando comparada com os animais do grupo WT, como descrito por PALMA et al. (2015). A dinâmica ventilatória envolve um conjunto de estruturas que garante que o ar atmosférico permeie e entre nos alvéolos para oxigenar as células sanguíneas, dependendo constantemente da contração diafragmática, que resulta em mudanças cíclicas na pressão pleural, a qual é negativa e no processo de inspiração tende a se igualar com a pressão atmosférica (ZIELINSKA-KRAWCZYK et al. 2018). Sugerimos que o grupo MFS pode apresentar uma dificuldade ventilatória em razão da expansão alveolar, necessitando de uma maior força no processo, o qual pode, conseqüentemente, aumentar a pressão parenquimatosa, causando uma resistência vascular. Uma vez presente a resistência vascular, o coração tenta promover a homeostasia, aumentando a força para manter a mesma intensidade sanguínea para o pulmão. Contudo, o aumento de força no ventrículo direito gera uma hipertrofia, o que pode resultar em morbidade patológica, como visto em nossos resultados.

O tratamento com Losartan no grupo MFS^{Trat}, por outro lado, atenua o alargamento apenas aos 3 meses, indicando que a terapia tem um efeito limitado no fenótipo pulmonar, o que corrobora os achados de LEE et al. (2016), resultado que indica que a terapia tem um efeito limitado no fenótipo pulmonar. Contudo, ao se avaliar a imuno-localização da fibrilina-1, observa-se que ao longo do período de análise, a imuno-localização foi significativamente maior no grupo MFS^{Trat} quando comparado com os grupos WT e MFS aos 6 meses. PODOWSKI et al. (2012) apresentam que o losartan recupera as estruturas da parede alveolar e LEE et al. (2016) mostram que a terapia atenua a degradação da MEC.

Interessantemente, aos 3 meses, observa-se que o ventrículo direito do grupo MFS^{Trat} não tem diferença significativa quando comparado com os grupos WT e MFS, indicando uma atenuação fenotípica de ambos sistemas (pulmonar e cardíaco). Contudo, aos 6 meses, observou-se que o espessamento do ventrículo direito do grupo MFS^{Trat} foi

significativamente maior quando comparado com os grupo WT e MFS, embora a parede do ventrículo esquerdo tenha sido significativamente menor quando comparada com ambos os grupos. Portanto, sugere-se que o losartan tem efeito no eixo da circulação sistêmica e um efeito limitado no eixo da circulação pulmonar.

Além disso, sabe-se que a degradação das fibras elásticas pode ser decorrente das ações da MMP2 e da MMP9, as quais estão envolvidas tanto no remodelamento tecidual (degradando fibras elásticas, colágeno denaturado e membrana basal), quanto na regulação de mediadores inflamatórios e fatores de crescimento. Ademais, CRAIG et al. (2015) mostram que a MMP2 e a MMP9 apresentam um papel ambíguo em respostas anti-fibróticas e fibróticas.

Interessantemente, a MMP2 e a MMP9 são enzimas e participam de diversos processos no desenvolvimento pulmonar, inclusive na formação dos alvéolos (HENDRIX, KHERADNAND, 2017). Particularmente, a enzima MMP-9 é relatada em outras doenças enfisematosas, como na hipertensão pulmonar, na doença pulmonar obstrutiva crônica (em pacientes fumantes) e na fibrose pulmonar idiopática.

Em nosso estudo, observou-se que aos 3 meses não foi encontrada diferença significativa entre os animais dos grupos WT e MFS, o que poderia sugerir uma atenuação na degradação das fibras elásticas, contudo a imunolocalização da fibrilina-1 no grupo MFS foi significativamente menor quando comparada com o grupo WT, sugerindo uma redução das fibras elásticas. Acreditamos que talvez a degradação das fibras elásticas seja decorrente de ação de outras enzimas como a MMP-2, a qual também tem a função de degradar fibras elásticas, semelhantemente à MMP-9 (CHUNG et al. 2007 e CRAIG et al. 2015).

Por outro lado, aos 6 meses, observou-se que o grupo MFS mostrou uma imunolocalização da MMP-9 significativamente maior quando comparada com grupo WT, resultado semelhante aos estudos de hipertensão pulmonar, de doença pulmonar obstrutiva crônica (em pacientes fumantes) e de fibrose pulmonar idiopática (KHERANDNAND et al. 2017; HENDRIX, KHERADNAND, 2017; GHOSH et al. 2019). HENDRIX e KHERADNAND (2017) descrevem que, por mais que a MMP-9 esteja relacionada com a destruição alveolar, ela não é parâmetro para definir a gravidade dos processos enfisematosos, indicando que pode existir uma resposta auto-reativa envolvendo células Th1 e Th17 no processo de destruição da parede alveolar (KHERANDNAND et al. 2017; HENDRIX, KHERADNAND, 2017).

Já o grupo MFS^{Trat} mostrou respostas antagônicas ao longo do tempo. Aos 3 meses apresentou uma redução significativa da imunolocalização da MMP-9 quando comparado aos grupos WT e MFS, corroborando os achados de GUO et al. (2014) e WANG et al. (2015), apesar desses estudos terem avaliado a resposta de inibição de MMP-9 com menos de 1 mês de experimento. Por outro lado, é observado em outros tecidos que o losartan promove um efeito de inibição na atividade de MMP-9 aos 3 meses de avaliação (HABASHI et al. 2006; NISTALA et al. 2010). Opostamente, aos 6 meses, o grupo MFS^{Trat} apresentou uma expressão de MMP-9 significativamente maior quando comparada com os grupos WT e MFS, indicando que o efeito terapêutico ocorre apenas aos 3 meses, além de apresentar uma alta atividade enzimática aos 6 meses, o que pode ser consequência da proteína mutante fibrilina-1.

Além das funções citadas da MMP-9, van DOREN (2015) e CRAIG et al. (2015), indicam que a MMP-2 e a MMP-9 interagem com as fibras elásticas por meio de influência da fibronectina no tecido pulmonar. Curiosamente, tanto aos 3 meses quanto aos 6 meses, os animais do grupo MFS apresentaram uma imuno-localização da fibronectina significativamente maior quando comparados com o grupo WT. Sugerimos que essa imuno-localização possa ser decorrente de um mecanismo de remodelamento, o qual foi descrito por ROMAN et al. (2004), que indica a importância da fibronectina na fibroproliferação no tecido pulmonar, principalmente na parede alveolar após as injúrias da doença pulmonar obstrutiva crônica.

Ademais, o grupo MFS^{Trat} apresentou uma imuno-localização de fibronectina significativamente maior quando comparado com os grupos WT e MFS, tanto aos 3 meses quanto aos 6 meses, resultado oposto ao encontrado na literatura, o qual apresenta uma redução da fibronectina nos grupos tratados com losartan, embora os achados tenham sido observados em outros órgãos (rim e aorta) (REHMAN et al. 2012; MAQUIGUSSA et al. 2018). Desta forma, sugerimos que a terapia com losartan pode apresentar diferentes modulações de acordo com o órgão analisado.

No pulmão, a fibronectina é importantíssima para organogênese dos alvéolos e responsável por interagir tanto com as fibras de colágeno quanto com a fibrilina-1 (PLUMB et al. 1987; ROMAN, 1997; ROMAN et al. 2004; SABATIER et al. 2013; HUBMACHER et al. 2014), além de estar envolvida no remodelamento alveolar em processos enfisematosos e na doença pulmonar obstrutiva crônica em nível leve/moderado (ROMAN et al. 2004; BIDAN et al. 2015). Sugerimos que a contínua

lesão alveolar presente na síndrome de Marfan estimula o processo de remodelamento, independentemente do tratamento com losartan.

O processo de remodelamento no pulmão muitas vezes está associado ao aumento dos filamentos de actina nos fibroblastos, transformando-os em miofibroblastos e auxiliando na reparação das injúrias teciduais (ZHANG et al. 1996; BOGATKEVICH et al. 2003; LAM et al. 2019).

Notamos em nosso estudo que os animais do grupo MFS apresentaram diferentes respostas ao longo do período analisado. Aos 3 meses os animais tiveram uma imunolocalização de α -actina significativamente reduzida quando comparada com os animais do grupo WT. Embora os trabalhos da literatura mostrem que o remodelamento está associado ao aumento da expressão de α -actina (BOGATKEVICH et al. 2003; KHADANGI, BOSSÉ, 2019; LAM et al. 2019), observou-se uma série de casos de pacientes que apresentam mutações no gene ACTA2, as quais resultam em defeitos vasculares e pulmonares, caracterizados por enfisema, redução na diferenciação das células de músculo liso e hipertensão pulmonar (MILEWICZ et al. 2010; YUAN, 2015; ZHOU et al. 2017; CHEN et al. 2019), fenótipo semelhante ao encontrado em nossos resultados.

Embora os mecanismos intrínsecos da influência da α -actina no fenótipo pulmonar sejam desconhecidos, CHAN et al. (2016) sugerem que mutações no gene ACTA1 fazem com que os monômeros de actina tornem-se rígidos e não suportem a ligação com a miosina, resultando em uma perda de função contrátil. Para o pulmão, as células contráteis têm uma função crucial no processo ventilatório, auxiliando na biomecânica ativa e no tônus muscular (gera resistência no fluxo de ar e reduz o lúmen aerífero) (LAM et al. 2019; LAN et al. 2019).

Sugerimos que a redução da α -actina no grupo MFS pode estar relacionada com a redução de diferenciação das células da musculatura lisa, o que pode induzir a redução contrátil do parênquima alveolar, deixando-o mais suscetível à dinâmica ventilatória passiva, a qual é resultante da MEC. Por outro lado, a MEC no grupo MFS apresentou-se alterada aos 3 meses e, por essa razão, acreditamos que tal fato possa favorecer a um processo enfisematoso.

Opostamente, aos 6 meses, o grupo MFS apresentou uma imunolocalização da α -actina significativamente maior que o grupo WT. O aumento desse componente no parênquima pulmonar está associado a diferentes processos de remodelamento tecidual,

desde proliferação celular até a produção de fibras de colágeno I (ZHANG et al. 1996; OLDMIXON et al. 2001; LAN et al. 2014; BIDAN et al. 2015; LAM et al. 2019). Sugerimos que a cronicidade das lesões da MEC no grupo MFS pode reduzir drasticamente seus componentes fibrilares elásticos e não elásticos, promovendo um aumento da biomecânica ativa. Contudo, o excesso da contração dos miofibroblastos promove a ruptura dos septos alveolares, aumenta a força e a rigidez nas estruturas pulmonares e, por essa razão, está envolvido no processo de hipertensão pulmonar (LAN et al. 2014; BIDAN et al. 2015; CALVIER et al. 2017), morbidade a qual sugerimos ocorrer no modelo $mg\Delta^{lpn}$.

Além disso, sugerimos que outros processos podem estar acontecendo paralelamente no pulmão do grupo MFS, contribuindo com a fisiopatologia das morbidades encontradas. Interessantemente, o aumento da α -actina no pulmão está envolvido em diversos eventos patológicos, os quais envolvem o aumento da expressão de TGF β ou do sistema de renina-angiotensina (ZHANG et al 1996; LANG et al. 2010; BOGATKEVICH et al. 2013; CALVIER et al. 2017; CHEN et al. 2018).

Ambas as sinalizações podem ser influenciadas pela terapêutica de Losartan, como descrito por HABASHI et al. (2011) e PEPE et al. (2016). Em nosso resultado observou-se que, independente do período analisado, a terapia de Losartan no grupo MFS^{Trat} mostrou uma imunolocalização da α -actina significativamente reduzida quando comparada com o grupo MFS, corroborando os achados de LONG et al (2007) e CHOU et al. (2012), embora esses estudos não tenham sido direcionados em pacientes ou modelo animal da síndrome de Marfan.

A redução da α -actina no parênquima pulmonar está associada à atenuação da atividade dos miofibroblastos, à redução das fibras de colágeno e ao processo de fibrose pulmonar (LONG et al. 2007; LANG et al. 2010; CHOU et al. 2011). Baseado nesse potencial terapêutico, sugerimos que a terapia de Losartan pode estar atenuando o processo de fibroplasia no pulmão do modelo experimental estudado, sendo mais evidenciado aos 3 meses, uma vez que foi observada uma atenuação da área dos alvéolos do grupo MFS^{Trat}.

Notoriamente, observa-se uma interligação entre os órgãos coração, pulmão e aorta, a qual foi capaz de influenciar uns aos outros por uma malha complexa de diferentes adaptações na fisiopatologia da MFS. Além desse eixo descrito (coração-pulmão-aorta), nota-se que o rim tem a capacidade de influenciar a fisiologia pulmonar,

a cardíaca e a hemodinâmica, principalmente nas funções de regular o equilíbrio da água e do sódio (no controle da pressão arterial) e no tamponamento pulmonar. (PALM, NORDQUIST, 2011; WADEI, TEXTOR, 2012; HUSAIN-SYED et al. 2016).

Em processos patológicos, tanto cronicamente quanto agudamente, o rim tem um papel importantíssimo na fisiopatologia das doenças pulmonares (hipertensão pulmonar e doença pulmonar obstrutiva crônica) e cardiovasculares (resistência vascular, hipertensão e hipertrofia dos ventrículos direito e esquerdo) (CROWLEY et al. 2006; GAITA et al. 2012; BASU, WHEELER, 2012; HUSAIN-SYED et al. 2016; VISCONTI et al. 2016; SALLECK, JOHN, 2017; KUMAR et al. 2019).

Contudo, o rim é um órgão pouco explorado na MFS, apesar de ter uma série de casos que mostram alterações como: Glomerulosclerose segmentar e focal, cistos e policistos renais, glomerulonefrite segmentar e focal, mudança glomerular, irregularidade da membrana basal, alterações nas estruturas vasculares, depósito fibrilar denso no parênquima renal e no glomérulo, expansão mesangial, fibrose intersticial, dilatação cística na região medular e doença renal crônica associada com hipertensão (DI MATTEO et al. 1965; SCHOENEMAN et al. 1984; BIERMANN et al. 1992; SBAR et al. 1996; BOSEMAN et al. 2006; CHOW et al. 2007; GUPTA et al. 2010; TAKAHASHI et al. 2011; RICCIO et al. 2013; PETER et al. 2014; AL-HAGGAR et al. 2017; PATERAKIS et al. 2019).

Em nossos resultados observamos que no grupo MFS, tanto aos 3 meses quanto aos 6 meses, houve uma redução significativa do glomérulo quando comparado com os grupos WT e MFS^{Trat}. Embora esse achado seja diferente de alguns casos encontrados em pacientes com MFS, eles corroboram os achados vistos em outros modelos experimentais da doença (SBAR et al. 1995; HARTNER et al. 2004; BOSEMAN et al. 2008; AL-HAGGAR et al. 2017).

Possivelmente, as alterações renais descritas na MFS e a hipoplasia glomerular podem ser resultantes da redução das fibras elásticas no tecido renal, uma vez que as estruturas glomerulares, vasculares e peritubulares são constituídas de fibrilina1, a qual foi referida como proteína principal para a estruturação das regiões citadas (SBAR et al. 1996; STERTZEL et al. 2000; TAKAHASHI et al. 2011; AL-HAGGAR et al. 2017).

A diferença fenotípica dos achados glomerulares entre os modelos animais da MFS e os pacientes pode envolver uma malha complexa de interações celulares e matriciais. AL-HAGGAR et al. (2017) sugerem que animais mgR/mgR (modelo animal

da MFS) não apresentaram o mesmo fenótipo que os pacientes devido a uma redução da fibrilina-1 do tipo selvagem. No entanto, neste estudo utilizou-se o modelo $mg\Delta^{lpn}$, o qual é um modelo dominante negativo e também não apresentou glomerulonefrite ou glomerulosclerose como identificado em alguns pacientes da síndrome Marfan, mas apresentou a hipoplasia glomerular (GUPTA et al 2010; AL-HAGGAR et al. 2017). Esse fato nos leva à hipótese de que outros fatores estão envolvidos nas doenças glomerulares (glomerulonefrite ou glomerulosclerose) em pacientes da MFS.

Ao tratar os animais com losartan, observou-se que o fenótipo renal dos animais do grupo MFS^{Trat} apresentaram comportamentos distintos ao longo do período analisado. Aos 3 meses, o tamanho glomerular foi significativamente maior quando comparado com o grupo MFS, mas foi significativamente menor que os animais do grupo WT. Opostamente, aos 6 meses, o tamanho do glomérulo do grupo MFS^{Trat} foi significativamente menor quando comparado com o grupo WT e não tiveram diferença estatística quando comparado com grupo MFS. Novamente, esse resultado mostra o efeito limitado na recuperação estrutural da terapia de losartan, sendo mais evidenciado aos 3 meses. Embora outros estudos indiquem que o tratamento com losartan melhora fenótipo em outros órgãos, no rim a terapia tem sido mostrada com efeito benéfico de atenuar fibrose renal, lesões glomerulares e uma recuperação na função tubular (HE et al. 2014; KATSIKI et al. 2018).

A terapia de losartan tem como princípio o bloqueio da sinalização da Ang II, a qual tem função crucial nos processos de comunicação autócrina e parácrina no rim, os quais estão intimamente interligados com a MEC (XU et al. 2009). A proteína fibrilina-1 no parênquima renal está relacionada com a parte estrutural do rim, e embora não saibamos precisamente qual o efeito da mutação, sugerimos que a mutação pode resultar numa perda estrutural das estruturas renais (STERTZEL et al. 2000; HARTNER, et al. 2004; BONNANS et al. 2014). Interessantemente, a terapia como losartan neste estudo mostrou um crescente depósito de fibrilina-1 no parênquima renal. Aos 3 meses, a imunomarcção da fibrilina-1 no grupo MFS^{Trat} foi significativamente maior que os animais do grupo MFS, porém significativamente menor que o grupo WT. Já aos 6 meses, foi observado que o grupo MFS^{Trat} apresentou a imunomarcção da fibrilina-1 significativamente maior que os animais WT e MFS. Esse resultado sugere que a terapia promove uma recuperação dos componentes da MEC e aumenta o depósito de fibrilina-1, como visto nos trabalhos de HABASHI et al. (2011), HE et al. (2014), LEE et al.

(2016), KATSIKI et al. (2018) e PICOLO et al. (2019). Esse resultado indica que a hipoplasia glomerular não é resultante do defeito da fibrilina-1, podendo ser consequência de um conjunto de interações de outras proteínas na MEC.

No tecido glomerular e peritubular POLLAK et al. (2014) mostraram uma composição de diferentes interações de proteínas, incluindo colágeno tipo IV, fibronectina e proteoglicanos. Especificamente no rim, a fibronectina apresenta um papel importantíssimo na organização da MEC e no movimento celular (SCHENA, PERTOSA, 1988; PENG et al. 2019).

Em nosso estudo foi observado que tanto os animais do grupo MFS e MFS^{Trat} apresentaram uma imunomarcacão de fibronectina significativamente reduzida quando comparada com o grupo WT. Sugerimos que a reduçao da fibronectina nos grupos MFS e MFS^{Trat} pode ser decorrente de uma perda estrutural das microfibrilas. Conhece-se que a fibronectina interage diretamente com a fibrilina-1 principalmente na formaçao de fibras elásticas (BALDWIN et al. 2013; SABATIER et al. 2013; HUBMACHER et al. 2014). Uma vez presente a atenuaçao da fibrilina-1, acreditamos que de algum modo sua interaçao com a fibronectina pode ser reduzida e, conseqüentemente, pode haver reduçao de sua distribuicão no parênquima renal.

Contudo, o grupo MFS^{Trat} apresentou uma imunomarcacão de fibronectina significativamente maior quando comparado com o grupo MFS tanto aos 3 meses quanto aos 6 meses, sugerindo que a terapia tem um efeito benéfico na tentativa de recuperar as estruturas microfibrilares no parênquima renal. Além disso, sugerimos que, pelo fato da terapia de losartan bloquear a sinalizaçao de TGF- β , o seu bloqueio pode atenuar as açoes de MMP-2 e MMP-9, reduzindo a degradaçao dos componentes microfibrilares (HABASHI et al. 2006; XU et al. 2009; HABASHI et al 2011; PEPE et al. 2016; RAMIREZ et al. 2018).

A MMP-9 no tecido renal tem funçao crucial principalmente no desenvolvimento do órgão e nas interações da MEC com as células (ARNOULD et al. 2009). Ao avaliar a MMP-9 nesse estudo, foi observado que os animais do grupo MFS apresentaram uma imunomarcacão significativamente maior quando comparado com o grupo WT, tanto aos 3 meses quanto aos 6 meses. Esse resultado indica que o modelo mg Δ^{lpn} tem uma cronicidade da ativaçao das MMP-9, o que pode estar associado com a constante degradaçao das fibras elásticas. Essa característica já foi observada em outros órgãos da MFS e acredita-se que essa ativaçao seja decorrente da influencia do TGF- β ,

tanto em pacientes quanto em modelos animais da MFS. Interessantemente, é observado que a ativação das MMP-9 no grupo MFS foi vista em diferentes órgãos, o que nos conduz a sugerir o efeito generalizado do desequilíbrio entre as microfibrilas e o TGF- β na MFS. (ISHII, ASUWA 2000; CHUNG et al. 2007; XIONG et al. 2008; STOLOT-ARKIL et al. 2012; ÀGG et al. 2014; HOUGHTON, 2015; TROILO et al. 2016; DALE et al. 2017).

Contudo, o grupo MFS^{Trat} apresentou uma imunomarcção das MMP-9 de diferente perfil aos 3 meses e aos 6 meses. Aos 3 meses foi observado uma redução significativa da imunomarcção das MMP-9 quando comparado com o grupo MFS e não apresentou diferença estatística quando comparado com o grupo WT, sugerindo o efeito benéfico da terapia de losartan sobre o efeito das MMP-9. PEPE et al. (2016) descreveram que a terapia de losartan tem a capacidade de bloquear a sinalização de TGF- β e por sua vez reduzir os efeitos do remodelamento tecidual promovido pela MMP-2 e MMP-9 (YANG et al. 2009).

Por outro lado, aos 6 meses, o grupo MFS^{Trat} apresentou uma imunomarcção da MMP-9 significativamente maior quando comparado com os grupo MFS e WT. Esse resultado sugere um efeito limitado da terapia de losartan. FU et al. (2012) mostraram que o losartan promove um aumento significativo de expressão de MMP-9 para atenuar o remodelamento matricial em animais com fibrose renal. Entretanto, WANG et al. (2019) indicam em seu estudo que o aumento da MMP-9 no parênquima renal está associado a processos pró-fibróticos. Contudo, como já mencionado, CRAIG et al. (2015) mostraram o efeito ambíguo da MMP-9 nos processo fibróticos e antifibróticos.

Conhece-se que a função principal da MMP-9 é degradar fibras elásticas (CHUNG et al. 2007). Contudo, nesse estudo observou-se que a imunomarcção da fibrilina-1 aos 6 meses do grupo MFS^{Trat} foi significativamente maior quando comparada com os grupos WT e MFS. Interessantemente, nesse mesmo período, foi evidenciado um aumento significativo da MMP-9 quando comparado com o grupo MFS e WT. Sugerimos que a alta atividade de MMP-9 pode estar sendo direcionada para outros componentes fibrilares como colágeno denaturado, na tentativa de evitar um possível processo fibrótico renal (FU et al. 2012; CRAIG et al. 2015).

O declínio das fibras elásticas no parênquima renal e a excessiva atividade de MMP-9 sugere uma lesão progressiva no tecido, que pode estimular um remodelamento tecidual e até mesmo a fibrose do órgão (DÉSOGÈRE et al. 2019). Interessantemente, a

fibrose renal está associada ao aumento de α -actina nos fibroblastos, tanto no glomérulo quanto entre os tubos contorcidos (GELEILETE et al. 2000; SUN et al. 2016; BI-CHENG et al. 2018).

Embora aos 3 meses tenha sido observado que os animais do grupo MFS apresentaram uma imunomarcção de α -actina significativamente menor que os animais do grupo WT, sugere-se que a lesão presente aos 3 meses não esta associada a um processo fibrótico, podendo estar associada a outras alterações parenquimatosas que serão exploradas em um futuro próximo.

Por outro lado, aos 6 meses, observa-se uma imunomarcção de α -actina significativamente maior quando comparada com o grupo WT. Essa constatação é indicativo de um processo de fibrose no rim, corroborando os achados de XIAO et al. (2018), CHEN et al. (2019) e HE et al. (2019). Contudo, esse estudo não avaliou as fibras de colágeno para certificar a presença desse processo fibrótico.

Além disso, é observado que o acúmulo de α -actina nos fibroblastos no parênquima renal é estimulado pela sinalização de TGF β (SUN et al. 2016; BI-CHENG et al. 2018). Sugerimos que a cronicidade da lesão das fibras elásticas presente na MFS pode estimular o aumento da expressão de α -actina nos fibroblastos, sem necessariamente estar associado ao processo de fibrose renal como descrito por outros autores (SUN et al. 2016; BI-CHENG et al. 2018; XIAO et al. 2018; CHEN et al. 2019; HE et al. 2019).

Como já mencionado, a terapia de Losartan tem a capacidade de bloquear a sinalização de TGF β (PEPE et al. 2016). Aos 3 meses observou-se que tanto a expressão de MMP-9 quanto a expressão de α -actina no grupo MFS^{Trat} foi significativamente menor quando comparado com grupo MFS. Esse resultado sugere que a terapia tem efeito sobre a sinalização de TGF β , pois ambas as proteínas são ativadas e estimuladas pela atividade excessiva de TGF β (CHUNG et al. 2007; SUN et al. 2016; BI-CHENG et al. 2018; XIAO et al. 2018; CHEN et al. 2019; HE et al. 2019).

Por outro lado, aos 6 meses, observou-se uma imunomarcção de α -actina significativamente maior no grupo MFS^{Trat} quando comparada com os grupo WT e MFS. Novamente, sugere-se que a terapia com losartan tem poder limitado para atenuar os desequilíbrios bioquímicos da matriz extracelular do rim. Além disso, sugerimos que a cronicidade da terapia pode desempenhar um efeito de remodelamento tecidual, uma vez que a α -actina está associada com esse processo (BI-CHENG et al. 2018).

Nesse estudo foi evidenciado que o modelo $mg\Delta^{lpn}$ apresentou os fenótipos clássicos da doença com alterações vasculares e esqueléticas. Além disso, os resultados nos indicaram uma complexidade da doença, a qual envolve diferentes órgãos na fisiopatologia da síndrome de Marfan.

Observou-se que o defeito da coluna torácica tem a capacidade de mudar o trajeto da aorta, criando uma possível resistência vascular e alterando a dinâmica do fluxo sanguíneo. Uma vez alterado, o fluxo sanguíneo na aorta sobrecarrega o coração, hipertrofiando principalmente o ventrículo esquerdo.

Concomitantemente, evidenciou-se no pulmão alterações típicas enfisematosas, as quais estão relacionadas com a resistência vascular, principalmente dos grandes vasos pulmonares. Contudo, essa característica patológica no pulmão resulta em uma sobrecarga cardíaca no ventrículo direito, hipertrofiando-o.

Além das alterações do eixo central do sistema circulatório, conhece-se a influência do rim nos processos de adaptação dos fluídos sanguíneos e no tônus vascular. Notoriamente, observou-se no grupo MFS que o glomérulo, o polo vascular e o espaço urinário eram significativamente menores, indicando uma possível resistência vascular, a qual pode contribuir na resistência do fluxo aórtico.

Esse conjunto de alterações descritas indica um sistema com alta resistência vascular, o qual pode contribuir com a piora do fenótipo aórtico ou até mesmo no surgimento de aneurismas e dissecções.

Por outro lado, a terapia com losartan mostrou uma efetividade na atenuação fenotípica somente aos 3 meses. Os resultados mostraram uma área alveolar e a espessura do ventrículo esquerdo significativamente menor, além do aumento do glomérulo e suas estruturas quando comparado com o grupo MFS, sugerindo uma recuperação do quadro sistêmico no modelo $mg\Delta^{lpn}$.

Sugerimos que as alterações presentes nos diferentes órgãos podem ser decorrentes de um processo adaptativo da modificação dos componentes da matriz extracelular, uma vez que se observou uma redução significativa da proteína fibrilina-1 no coração, pulmão e rim, tanto aos 3 meses quanto aos 6 meses. Além disso, notou-se que os animais do grupo MFS, tanto aos 3 meses quanto aos 6 meses, apresentaram um aumento significativo da imunomarcagem da enzima MMP-9 no coração, pulmão e rim. A enzima MMP-9 tem como principal função a degradação das fibras elásticas e está

ativada nos processo de remodelamento tecidual, resultando na piora do fenótipo nos diferentes tecidos analisados.

Interessantemente, com a terapia de losartan observou-se um aumento significativo da fibronectina no grupo MFS^{Trat} no coração, pulmão e rim, tanto aos 3 meses quanto aos 6 meses, o que nos levar a sugerir que a terapia pode promover uma substituição de componente microfibrilar, uma vez que a fibronectina também tem papel estrutural nos órgãos citados. Especificamente aos 3 meses, notou-se que a terapia com losartan teve o poder de reduzir a imunomarcação de MMP-9 no pulmão, coração e rim e aos 6 meses aumentar a imunomarcação de fibrilina-1.

Embora notoriamente tenha sido observado de forma sistêmica alterações nas proteínas fibrilina-1 e MMP-9, notou-se que o remodelamento tecidual foi órgão dependente, além de ter diferentes respostas ao longo do tempo, características as quais impulsionarão novos estudos futuros.

6. CONCLUSÕES

6.1 Conclusões

1. Avaliar o fenótipo clássico do modelo $mg\Delta^{lpn}$ e a influência da terapêutica do Losartan® aos 3 meses e 6 meses.

O modelo $mg\Delta^{lpn}$ apresentou a expressão do mRNA mutante do gene *Fbn1*, caracterizando um modelo dominante negativo, além de apresentar as alterações esqueléticas (hiperlordose) e vasculares (fragmentação das fibras elásticas e presença de aneurisma), tanto aos 3 meses quanto aos 6 meses, corroborando os achados já descritos do modelo. A terapêutica de Losartan® não influenciou na expressão do mRNA e na atenuação fenotípica do defeito esquelético, tendo efeito atenuante apenas nos aspectos vasculares, tanto morfológico quanto hemodinâmico.

2. Avaliar o fenótipo cardíaco quanto a sua morfologia e as proteínas envolvidas na formação das microfibrilas no modelo $mg\Delta^{lpn}$ com e sem a terapia com Losartan ® aos 3 meses e 6 meses.

Os animais $mg\Delta^{lpn}$ apresentaram diferentes processos de adaptação cardíaca aos 3 meses e aos 6 meses. Contudo, ambas as idades apresentaram espessamentos dos ventrículos direito e esquerdo. Em relação ao componente microfibrilar, observou-se uma progressiva degradação das microfibrilas no parênquima cardíaco nas duas idades analisadas. Foi observado que a terapia com Losartan ®, tanto aos 3 meses quanto aos 6 meses, tem o poder terapêutico de reduzir a espessura do ventrículo esquerdo. Ademais, promoveu a redução da enzima que degrada as microfibrilas, além de aumentar a expressão de fibronectina. Em suma, a terapia promove atenuação da degradação das microfibrilas no tecido cardíaco.

3. Avaliar o fenótipo pulmonar quanto a sua morfologia e as proteínas envolvidas na formação das microfibrilas no modelo $mg\Delta^{lpn}$ com e sem a terapia com Losartan ® aos 3 meses e 6 meses.

Os animais $mg\Delta^{lpn}$ tanto aos 3 meses quanto aos 6 meses apresentaram um aumento significativo da área alveolar, sugerindo um processo enfisematoso, além da progressiva degradação das microfibrilas da parede alveolar, embora em ambos os períodos seja observado um processo de substituição tecidual por fibras de fibronectinas. Por outro lado, foi observado que a terapia de Losartan® apresentou um efeito atenuante somente aos 3 meses, tanto na diminuição da área alveolar, quanto na degradação das fibras elásticas.

4. Avaliar o fenótipo renal quanto a sua morfologia e as proteínas envolvidas na formação das microfibrilas no modelo $mg\Delta^{lpn}$ com e sem a terapia com Losartan ® aos 3 meses e 6 meses.

Os animais $mg\Delta^{lpn}$ tanto aos 3 meses quanto aos 6 meses apresentaram uma redução das estruturas glomerulares e uma progressiva degradação das microfibrilas no parênquima renal. Por outro lado, foi observado que a terapia de Losartan® apresentou um efeito atenuante somente aos 3 meses, tanto no aumento das estruturas glomerulares, quanto na recuperação da degradação das microfibrilas.

5. Intersectar os achados morfológicos e estruturais dos órgãos que influenciam o sistema circulatório no modelo $mg\Delta^{lpn}$ da síndrome de Marfan aos 3 meses e 6 meses.

Os animais $mg\Delta^{lpn}$ tanto aos 3 meses quanto aos 6 meses apresentaram uma degradação constante das microfibrilas, porém cada órgão apresentou um remodelamento tecidual. Além disso, foi observado que o defeito da coluna vertebral influencia o fenótipo aórtico, comprimindo a aorta e alterando a dinâmica do fluxo sanguíneo. Concomitantemente, foi observado que o pulmão apresenta alterações enfisematosas. As alterações aórticas e pulmonares têm potencial de sobrecarregar o coração, fazendo-o hipertrofiar. Paralelamente, as alterações glomerulares e parenquimatosas do rim podem gerar resistência vascular e esta contribuir com a piora dos fenótipos do eixo cardio-vascular.

7. REFERÊNCIAS

1. ÀGG, B. et al. Possible extracardiac predictors of aortic dissection in Marfan syndrome. *BMC Cardiovasc Disord.*, vol. 14, p. 47. 2014.
2. AL-HAGGAR, M. et al. A novel fibrillin-1 mutation in an egyptian marfan family: A proband showing nephrotic syndrome due to focal segmental glomerulosclerosis. *Saudi J Kidney Dis Transpl.*, vol. 28 n. 1, p. 141-148. 2017.
3. ALPENDURADA, F. et al. Evidence for Marfan cardiomyopathy. *European Journal of Heart Failure.*, vol. 12, p. 1085-1091. 2010.
4. ARNOULD, C. et al. MMP9 limits apoptosis and stimulates branching morphogenesis during kidney development. *J Am Soc Nephrol.*, vol. 20 n.10, p. 2171-2180. 2009.
5. ARUNAMATA, A.A. et al. Utility of serial 12-lead electrocardiograms in children with Marfan syndrome. *Cardiology in the Young.*, vol. 28, p. 1009–1013. 2018.
6. BALDWIN, A. K. et al. Elastic fibres in health and disease. *Expert Rev Mol Med.*, vol. 15, p. e8. 2013.
7. BASU, R.K.; WHEELER, D.S. Kidney-lung cross-talk and acute kidney injury. *Pediatr Nephrol.*, vol. 28 n. 12, p. 2239-2248. 2013.
8. BEENE, L.C. et al. Nonselective Assembly of Fibrillin 1 and Fibrillin 2 in the Rodent Ocular Zonule and in Cultured Cells: Implications for Marfan Syndrome. *IOVS.*, vol. 54 n. 13, p. 8337-8344.2013.
9. BEIGHTON, P. McKusick's heritable disorders of connective tissue. Saint Louis: Mosby-Year Book, 748 p. 1993.
10. BEYER, B. et al. In vivo thorax 3D modelling from costovertebral joint complex kinematics. *Clin Biomech (Bristol, Avon)*, vol. 29 n. 4, p. 434-438. 2014.
11. BEYER, B. et al. Relationship between costovertebral joint kinematics and lung volume in supine humans. *Respir Physiol Neurobiol.*, vol. 232, p. 57-65. 2016.
12. BHATNAGAR, A. et al. Evaluating suspected pulmonary hypertension: A structured approach. *Cleve Clin J Med.*, vol. 85 n. 6, p. 468-480. 2018.
13. BHATT, A.B. et al. Distinct effects of losartan and atenolol on vascular stiffness in Marfan syndrome. *Vasc Med.*, vol. 20 n. 4, p. 317-325. 2015.
14. BI-CHENG, L.Z.; LAN, H.Y.; LV, L.L. Renal Fibrosis: Mechanisms and Therapies. *Advances in Experimental Medicine and Biology (eBook)*, Springer Nature Singapore Pte Ltd. 2019

15. BIDAN, C.M. et al. Airway and Extracellular Matrix Mechanics in COPD. *Front Physiol.*, vol. 6, p. 346. 2015.
16. BIERMANN, C.W. et al. Marfan syndrome and cystic kidneys of the adult type. *Helv Chir Acta.*, vol. 59 n. 3, p. 513-515. 1992.
17. BIERY, N.J. et al. Revised genomic organization of FBN1 and significance for regulated gene expression. *Genomics.*, vol. 56, n. 1, p. 70-77. 1999.
18. BITTEMAN, A.D.; SPONSELER, P.D.; Marfan Syndrome: A Clinical Update. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons.*, vol. 25 n. 9, p. 603-609. 2017.
19. BOGATKEVICH, G.S. et al. Contractile activity and smooth muscle alpha-actin organization in thrombin-induced human lung myofibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*, vol. 285 n. 2, p. 334-343. 2003.
20. BONNANS, C.; CHOU, J.; WERB, Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, vol. 15 n. 12, p. 786-801. 2014.
21. BOSEMAN, A. et al. Marfan syndrome, MPGN, and bacterial endocarditis. *Am J Kidney Dis.*, vol. 51 n. 4, p. 697-701. 2008.
22. BUNTON, T.E. et al. Phenotypic alteration of vascular smooth muscle cells precedes elastolysis in a mouse model of Marfan syndrome. *Circ Res.*, vol. 88 n. 1, p. 37-43. 2001.
23. BURGSTALLER, G. et al. The instructive extracellular matrix of the lung: basic composition and alterations in chronic lung disease. *Eur Respir J.*, vol. 50 n. 1, p. 1601805. 2017.
24. BÜRK, J. et al. Evaluation of 3D blood flow patterns and wall shear stress in the normal and dilated thoracic aorta using flow-sensitive 4D CMR. *J Cardiovasc Magn Reson.*, vol. 14 n. 1, p. 84. 2012.
25. BYERS, P.H. Determination of the molecular basis of Marfan syndrome: a growth industry. *The Journal of Clinical Investigation.*, vol. 114, n. 2, p. 161-163. 2004.
26. CALVIER, L. et al. PPAR γ Links BMP2 and TGF β 1 Pathways in Vascular Smooth Muscle Cells, Regulating Cell Proliferation and Glucose Metabolism. *Cell Metab.*, vol. 25 n. 5, p. 1118-1134. 2017.

27. CAMPENS, L. et al. intrinsic cardiomyopathy in Marfan syndrome: results from in-vivo and ex-vivo studies of the Fbn1C1039G/+ model and longitudinal findings in humans. *Pediatric Research.*, vol 78 n. 3, p. 256-263. 2015.
28. CASSIANO, L.L. et al. Implementation of histopathological techniques and transmission electron microscopy for research of *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine. *IJOEAR.*, vol. 3 n. 4, p. 6-11. 2017
29. CHAN, C. et al. Myopathy-inducing mutation H40Y in ACTA1 hampers actin filament structure and function. *Biochim Biophys Acta.*, vol. 1862 n. 8, p. 1453-1458. 2016.
30. CHEN, C.A. et al. Crosstalk between transforming growth factor- β 1 and endoplasmic reticulum stress regulates alpha-smooth muscle cell actin expression in podocytes. *Life Sci.*, vol. 209, p. 9-14. 2018.
31. CHEN, S.N. et al. Multisystem smooth muscle dysfunction syndrome in a Chinese girl: A case report and review of the literature. *World J Clin Cases.*, vol. 7 n.24, p. 4355-4365. 2019.
32. CHIU, H.H. et al. Epidemiological profile of Marfan syndrome in general population: a national database study. *Mayo Clinic Proceedings.*, vol. 89, n. 14, p. 34-42. 2014
33. CHOU, H.C. et al. Angiotensin II type 1 receptor antagonist attenuates lung fibrosis in hyperoxia-exposed newborn rats. *J Pharmacol Exp Ther.*, vol. 340 n. 1, p. 169-175. 2012.
34. CHOW, K.; Pyeritz, R.E.; Litt, H.I. Abdominal visceral findings in patients with Marfan syndrome. *Genet Med.*, vol. 9 n. 4, p. 208-212. 2007.
35. CHUNG, A.W.Y. et al. Long-term doxycycline is more effective than atenolol to prevent thoracic aortic aneurysm in marfan syndrome through the inhibition of matrix metalloproteinase-2 and -9. *Cir. Res.*, vol. 102 n. 8, p. 73-85. 2008.
36. CHUNG, A.W.Y. et al. Loss of elastic fiber integrity and reduction of vascular smooth muscle contraction resulting from the upregulated activities of matrix metalloproteinase-2 and -9 in the thoracic aortic aneurysm in Marfan syndrome. *Circ. Res.*, vol. 101 n. 5, p. 512-522. 2007.
37. COOK, J.R. et al. Abnormal muscle mechanosignaling triggers cardiomyopathy in mice with Marfan syndrome Registry Consortium. *J Clin Invest.*, vol 124 n. 3, p. 1329-1339. 2014.

38. CORSON, G.M. et al. Fibrillin binds calcium and is coded by cDNAs that reveal a multidomain structure and alternatively spliced exons at the 5-prime end. *Genomics.*, , vol. 17, n. 2, p. 476-484. 1993.
39. CRAGO, E. et al.. Cardiac abnormalities after aneurismal subarachnoid hemorrhage: effects of β -blockers and angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Am J Crit Care.*, vol. 23 n. 1, p. 30-39. 2014.
40. CRAIG, V.J. et al. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets for idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Cell Mol Biol.*, vol. 53 n.5, p.585-600. 2015.
41. CRAWFORD, E.S. et al. Diffuse aneurismal disease (chronic aortic dissection, marfan, and mega aorta syndromes) and multiple aneurysm. *Ann Surg.*, vol. 211 n. 5, p.521-537. 1990.
42. CROSAS-MOLIST, E. et al. Vascular smooth muscle cell phenotypic changes in patients with Marfan syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, vol. 35, n. 4, p. 960-72. 2015.
43. CROWLEY, S.D. et al. Angiotensin II causes hypertension and cardiac hypertrophy through its receptors in the kidney. *Proc Natl Acad Sci.*, vol. 103 n. 47, p. 341-348. 2006.
44. DALE, M. et al. Premature aortic smooth muscle cell differentiation contribute to matrix dysregulation in Marfan Syndrome., *PLoS ONE*, vol. 12 n. 10, p. e0186603. 2017.
45. DEN HARTOG, A. W. et al. The effect of losartan therapy on ventricular function in Marfan patients with haploinsufficient or dominant negative FBN1 mutations. *Neth Heart J.*, vol. 24, p. 675-681. 2016.
46. DÉSOGÈRE, P. et al. Molecular Probes for Imaging Fibrosis and Fibrogenesis. *Chemistry.*, vol. 25 n. 5, p. 1128-1141. 2019.
47. DEVESH, K. et al. Ocular abnormalities and complications in anterior megalophthalmos: a case series. *Eye (Lond).*, vol. 33 n. 5, p. 826-832. 2019.
48. DI MATTEO, J. et al. Renal polycystosis associated with partial Marfan's syndrome with dilatation of the ascending aorta and aortic insufficiency. *Bull Mem Soc Med Hop Paris.*, vol. 116 n. 16, p. 1665-1673. 1965.
49. DIETZ, H.C.; Marfan syndrome. *GeneReviews.*, Copyright ©; University of Washington, Seattle., p. 1-34.2017.

50. DINWIDDIE, R.; SONNAPPA, S. Systemic disease and the lung. *Paediatr Respir Rev.*, vol. 6 n. 3, p. 181-189. 2005.
51. DYHDALO, K.; FARVER, C. Pulmonary histologic changes in Marfan syndrome: a case series and literature review. *Am J Clin Pathol.*, vol. 136 n.6, p.857-867.2011.
52. EMRICH, F.C. et al. Enhanced caspase activity contributes to aortic wall remodeling and early aneurysm development in a murine model of Marfan syndrome. *Arterioscler Tromb Vasc Biol.*, vol. 35 n. 1, p. 146-54 2015.
53. ESFANDIARI, H. et al. Management Strategies of Ocular Abnormalities in Patients with Marfan Syndrome: Current Perspective. *J Ophthalmic Vis Res.*, vol. 19 n. 1, p. 71-77. 2019.
54. ESFANDIARI, H. et al. Management Strategies of Ocular Abnormalities in Patients with Marfan Syndrome: Current Perspective. *J Ophthalmic Vis Res.*, vol. 14 n. 1, p. 71-77. 2019
55. FAIVRE, L. et al. Effect of Mutation Type and Location on Clinical Outcome in 1,013 Proband with Marfan Syndrome or Related Phenotypes and FBN1 Mutations: An International Study. *Am J Hum Genet.*, vol. 81 n. 3, p. 454-466. 2007.
56. FERNANDES, G.R.; MASSIRONI, S.M.; PEREIRA, L.V. Identification of Loci Modulating the Cardiovascular and Skeletal Phenotypes of Marfan Syndrome in Mice. *Sci Rep.*, vol. 6, p. 22426. 2016
57. FISHER, J.W. et al. Differential regulation of thrombospondin-1 and fibronectin by angiotensin II receptor subtypes in cultured endothelial cells. *Cardiovascular Research.*, vol. 51, p. 784-791. 2001.
58. FRANKEN, R. et al. Beneficial Outcome of Losartan Therapy Depends on Type of FBN1 Mutation in Marfan Syndrome. *Circ Cardiovasc Genet.*, vol. 8 n. 2, p. 383:388.2015.
59. FRANKEN, R. et al. Diagnosis and genetics of Marfan syndrome. *Expert opinion on orphan drugs*, vol. 2 n. 10, p. 1049-1062.2014.
60. FRANKEN, R. et al. Increased aortic tortuosity indicates a more severe aortic phenotype in adults with Marfan syndrome. *Int J Cardiol.*, vol. 194, p. 7–12. 2015.

61. FU, W. et al. Losartan alleviates renal fibrosis by down-regulating HIF-1 α and up-regulating MMP-9/TIMP-1 in rats with 5/6 nephrectomy. *Ren Fail.*, vol. 34 n. 10, p. 1297-12304. 2012.
62. GAITA, D.; MIHAESCU, A.; SCHILLER, A. Of heart and kidney: a complicated love story. *Eur J Prev Cardiol.*, vol. 21 n. 7, p. 840-846. 2014.
63. GALLO, S. et al. ERK: A Key Player in the Pathophysiology of Cardiac Hypertrophy. *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20 n. 2164, p. 1-21. 2019.
64. GEHLE, P. et al. Biometric and structural ocular manifestations of Marfan syndrome. *PLoS ONE.*, vol. 12 n.9, p. e0183370. 2017.
65. GEIGER, J. et al. Longitudinal evaluation of aortic hemodynamics in Marfan syndrome: New insights from a 4D flow cardiovascular magnetic resonance multi-year follow-up study. *J Cardiovasc Magn Reson.*, vol. 19 n. 1, p. 33. 2017.
66. GELEILETE, T.J. et al. Alpha-smooth muscle actin and proliferating cell nuclear antigen expression in focal segmental glomerulosclerosis: functional and structural parameters of renal disease progression. *Braz J Med Biol Res.*, vol. 34 n. 8, p. 985-991. 2001.
67. GHOSH, A. et al. Chronic E-Cigarette Use Increases Neutrophil Elastase and Matrix Metalloprotease Levels in the Lung. *Am J Respir Crit Care Med.*, vol. 200 n. 11, p. 1392-1401. 2019.
68. GIUSTI, B.; PEPE, G.; Fibrillins in Tendon. *Front Aging Neurosci.*, vol. 8, p.237.
69. GLARD, Y. et al. Sagittal balance in scoliosis associated with Marfan syndrome: a stereoradiographic three-dimensional analysis. *J Child Orthop.*, vol.2 n. 2, p. 113-118. 2008.
70. GRANATA, A. et al. An iPSC-derived vascular model of Marfan syndrome identifies key mediators of smooth muscle cell death. *Nature Genetics.*, vol. 49 n.1, p. 96-109. 2017.
71. GREWAL, N.; GITTENBERGER-DE GROOT, A.C.; Pathogenesis of aortic wall complications in Marfan syndrome. *Cardiovasc Pathol.*, vol. 33, p. 62-69. 2018.
72. GUALA, G. et al. Decreased rotational flow and circumferential wall shear stress as early markers of descending aorta dilation in Marfan syndrome: a 4D

- flow CMR study A. *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance.*, vol. 21, p. 1-11. 2019
73. GUO, F. et al. Losartan attenuates paraquat-induced pulmonary fibrosis in rats. *Hum Exp Toxicol.*, vol. 34 n. 4, p. 497-505. 2015.
 74. GUPTA, A. et al. Marfan syndrome and focal segmental glomerulosclerosis: a novel association. *Saudi J Kidney Dis Transpl.*, vol. 21 n. 4, p. 754-755. 2010.
 75. GYURICZA, I.G. et al. Is HSPG2 a modifier gene for Marfan syndrome?. *Eur J Hum Genet.*, p. 1-5. 2020.
 76. HABASHI, J.P. et al. AngiotensinII type 2 receptor signaling attenuates aortic aneurysm in mice through ERK antagonism. *Science.*, vol.332 n. 6027, p. 361-365. 2011.
 77. HABASHI, J.P. et al. Losartan, an AT1 Antagonist, Prevents Aortic Aneurysm in a Mouse Model of Marfan Syndrome. *Science.*, vol. 312 n. 5770, p. 117-121. 2006.
 78. HAMILTON, B.A.; YU, B.D. Modifier genes and the plasticity genetic networks in mice. *PLoS Genet.*, vol.8 n. 4, p. 1-7. 2012.
 79. HANDFORD, PA. Fibrillin-1, a calcium binding protein of extracellular matrix. *Biochimica et Biophysica Acta.*, vol.1498, n. 2-3, p. 84-90.2000.
 80. HARTNER, A. et al. Characterization of the renal phenotype in a mouse model of Marfan syndrome. *Amann K.Virchows Arch.*, vol. 445 n. 4, p. 382-388. 2004.
 81. HE, F. et al. Sphingosine kinase 1 inhibition decreases the epithelial-mesenchymal transition and ameliorates renal fibrosis via modulating NF- κ B signaling. *Am J Transl Res.*, vol. 11 n. 9, p. 5879-5887. 2019.
 82. HE, P.; LI, D.; ZHANG, B. Losartan attenuates renal interstitial fibrosis and tubular cell apoptosis in a rat model of obstructive nephropathy. *Mol Med Rep.*, vol. 10 n. 2, p. 638-644. 2014.
 83. HENDRIX, A.Y; KHERADMAND, F. The Role of Matrix Metalloproteinases in Development, Repair, and Destruction of the Lungs. *Prog Mol Biol Transl Sci.*, vol.148, p. 1-29. 2017.
 84. HOUGHTON, A.M. Matrix metalloproteinases in destructive lung disease. *Matrix Biol.*, vol. 44-46, p. 167-174. 2015.

85. HUBMACHER, D. et al. Early fibrillin-1 assembly monitored through a modifiable recombinant cell approach. *Biomacromolecules.*, vol. 15 n.4, p. 1456-1468. 2014.
86. HUSAIN-SYED, F.; SLUTSKY, A.S.; RONCO, C. Lung-Kidney Cross-Talk in the Critically Ill Patient. *Am J Respir Crit Care Med.*, vol. 194 n. 4, p. 402-414. 2016.
87. ISHII, T.; ASUWA, N. Collagen and elastin degradation by matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinase in aortic dissection. *Hum Pathol.*, vol. 31 n. 6, p. 640-646. 2000.
88. JOHANSEN, K.; Aneurysms. *Scientific American.*, p. 110-125. 1982.
89. JONES, W.; RODRIGUEZ, J.; BASSNETT, S.; Targeted deletion of fibrillin-1 in the mouse eye results in ectopia lentis and other ocular phenotypes associated with Marfan syndrome. *Dis Model Mech.*, vol 12 n. 1, p. dmm037283.2019.
90. JUDGE, D.P. et al. Evidence for a critical contribution of haploinsufficiency in the complex pathogenesis of Marfan syndrome. *J Clin Invest.*, vol.114 n. 2, p. 172-181. 2004
91. KAARTINEN, V.; ARBOURTON, D. Fibrillin controls TGF- β activation. *Nature genetics.*, vol. 33, p.331-332. 2003.
92. KATSIKI, N. et al. Fifteen years of LIFE (Losartan Intervention for Endpoint Reduction in Hypertension)-Lessons learned for losartan: An "old dog playing good tricks". *J Clin Hypertens (Greenwich).*, p. 1-7. 2018.
93. KHADANGI, F.; BOSSÉ, Y. Extracellular regulation of airway smooth muscle contraction. *Int J Biochem Cell Biol.*, vol. 112, p. 1-7. 2019.
94. KHERADMAND, F. et al. Cigarette Smoke and DNA Cleavage Promote Lung Inflammation and Emphysema. *Trans Am Clin Climatol Assoc.*, vol.128, p. 222-233. 2017.
95. KIELTY, C.M. Elastic fibres in health and disease. *Expert Reviews in Molecular Medicine.*, vol.8, n.19, p.1-23. 2006.
96. KIELTY, C.M. Fibrillin microfibrils:Structure tensometers of elastic tissue? *Int. J. Exp. Path.*, p. 1-19. 2017.
97. KIELTY, C.M.; SHERRATT, M.J.; SHUTTLEWORTH, C.A. Elastic fibres. *Journal of Cell Science.*, vol. 115, n. Pt 14, p. 2817-2828. 2002.

98. KIOTSEKOGLOU, A. et al. Early impairment of left ventricular long-axis systolic function demonstrated by reduced atrioventricular plane displacement in patients with Marfan syndrome. *European Journal of Echocardiography.*, vol.9, p. 605-6013. 2008.
99. KOLONICS-FARKAS, A.M. et al. Lung Function Changes are More Common in Marfan Patients Who Need Major Thoracic Surgery. *Lung.*, vol. 197 n. 4, p. 465-472. 2019.
100. KORNEVA, A. et al. Absence of LTBP-3 Attenuates the Aneurysmal Phenotype But Not Spinal Effects on the Aorta in Marfan Syndrome. *Biomech Model Mechanobiol.*, vol. 18 n. 1, p. 261–273. 2019.
101. KUMAR, U.; WETTERSTEN, N.; GARIMELLA, P.S. Cardiorenal Syndrome: Pathophysiology. *Cardiol Clin.*, vol. 37 n. 3, p. 251-265. 2019.
102. LACRO, R. V. et al. Atenolol versus Losartan in Children and Young Adults with Marfan's Syndrome. *N Engl J Med.*, vol.371 n. 22, p. 2061-2071. 2014.
103. LAM, M.; LAMANNA, E.; BOURKE, J.E. Regulation of Airway Smooth Muscle Contraction in Health and Disease. *Adv Exp Med Biol.*, vol. 1124, p. 381-422. 2019.
104. LAN, B. et al. Development and maintenance of force and stiffness in airway smooth muscle. *Can J Physiol Pharmacol.*, vol. 93 n. 3, p. 163-169. 2015.
105. LANG, Y.D. et al. The renin-angiotensin system mediates hyperoxia-induced collagen production in human lung fibroblasts. *Free Radic Biol Med.*, vol. 49 n. 1, p. 88-95. 2010.
106. LAWS, N.; HOE, A.; Progression of kyphosis in mdx mice. *J Appl Physiol.*, vol. 97, p. 1970–1977. 2004.
107. LEE, J. J. et al. Losartan Attenuates Degradation of Aorta and Lung Tissue Micromechanics in a Mouse Model of Severe Marfan Syndrome. *Ann Biomed Eng.*, vol. 44 n. 10, p. 2994-3006. 2016.
108. LI, B.; URBAN, J.P.G.; YU, J.; Development of spinal deformities in the tight-skin mouse. *Bone Research.*, vol. 5, p. 16053. 2017
109. LIMA, B.L. et al. A new mouse model for marfan syndrome presents phenotypic variability associated with the genetic background and overall levels of Fbn1 expression. *PLoS One.*, vol. 5 n. 11, p.e14136.

110. LOEYS, B.L. Angiotensin receptor blocker: a panacea for Marfan syndrome and related disorders?. *Drug Discov Today.*, 20 n. 2, p. 262-266. 2015.
111. LONG, X. et al. Losartan inhibited angiotensin induced human lung fibroblast transformation and collagen synthesis. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi.*, vol. 30 n. 4, p. 273-278. 2007.
112. LÓPEZ-GUIMET, J. et al. High-Resolution Morphological Approach to Analyse Elastic Laminae Injuries of the Ascending Aorta in a Murine Model of Marfan Syndrome. *Sci Rep.*, vol. 7 n. 1, p. 1505.2020.
113. MAGNONI, M. et al. Coexistence of multiple and widespread cardiovascular complication in patient with Marfan syndrome. *J of Clinical Ultrasound.*, vol. 41 n. 3, p. 195-198. 2012.
114. MAQUIGUSSA, E. et al. Klotho and PPAR Gamma Activation Mediate the Renoprotective Effect of Losartan in the 5/6 Nephrectomy Model. *Front Physiol.*, vol. 9, p. 1033. 2018.
115. MATT, P. et al. Recent advances in understanding Marfan syndrome: should we now treat surgical patients with losartan?. *J Thorac Cardiovasc Surg.*, vol. 135 n. 2, p. 389-394. 2008.
116. McLURE, L.E.; PEACOCK, A.J. Cardiac magnetic resonance imaging for the assessment of the heart and pulmonary circulation in pulmonary hypertension. *Eur Respir J.*, vol. 33 n. 6, p. 1454-1466. 2009.
117. MEESTER, J.A.N. et al. Differences in manifestations of Marfan syndrome, Ehlers-Danlos syndrome, and Loeys-Dietz syndrome. *Ann Cardiothorac Surg.* vol. 6, n. 6, p. 582-594. 2017
118. MILEWICZ, D.M. et al. De Novo ACTA2 Mutation Causes a Novel Syndrome of Multisystemic Smooth Muscle Dysfunction. *Am J Med Genet.*, vol. 152A n. 10, p. 2437-2443. 2010.
119. MILEWICZ, D.M.; RAMIREZ, F.; Therapies for Thoracic Aortic Aneurysms and Acute Aortic Dissections Old Controversies and New Opportunities. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, vol. 39 n. 2, p. 126-136. 2019.
120. NAEIJE, R. Physiology of the pulmonary circulation and the right heart. *Curr Hypertens Rep.*, vol. 15 n. 6, p. 623-631. 2013.

121. NAGASAWA, A. et al. Important role of the angiotensin II pathway in producing matrix metalloproteinase-9 in human thoracic aortic aneurysms. *J Surg Res.*, vol. 183 n. 1, p. 472-477. 2013.
122. NATAATMADJA, M. et al. Abnormal extracellular matrix protein transport associated with increased apoptosis of vascular smooth muscle cells in marfan syndrome and bicuspid aortic valve thoracic aortic aneurysm. *Circulation.*, vol. 108 n. 1, p. II329-334. 2003
123. NEPTUNE, E.R.; et al. Dysregulation of TGF-beta activation contributes to pathogenesis in Marfan syndrome. *Nat Genet.*, vol. 33 n. 3, p.407-411. 2003.
124. NIINAMI, H. et al. Extensive aortic reconstruction for aortic aneurysms in Mafan syndrome. *Ann Thorac Surg.*, vol. 67, p. 1864-1867. 1999.
125. NISTALA, H. et al. Differential effects of alendronate and losartan therapy on osteopenia and aortic aneurysm in mice with severe Marfan syndrome. *Human Molecular Genetics.*, vol. 19, n. 24, p. 4790–4798. 2010.
126. OLDMIXON, E.H. et al. α -Actin: disposition, quantities, and estimated effects on lung recoil and compliance. *American Physiological Society.*, vol. 91 n. 1, p. 459-473. 2001.
127. PALM, F.; NORDQUIST, L. Renal oxidative stress, oxygenation, and hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, vol. 301 n. 5, p. R1229-R1241. 2011.
128. PALMA, R.K. et al. Increased upper airway collapsibility in a mouse model of Marfan syndrome. *Respir Physiol Neurobiol.*, vol. 207, p. 58-60. 2015.
129. PATERAKIS, K. et al. A Giant Tarlov Cyst Presenting with Hydronephrosis in a Patient with Marfan Syndrome: A Case Report and Review of the Literature. *World Neurosurg.*, vol. 126, p. 581-587. 2019.
130. PENG, F. et al. Micheliolide ameliorates renal fibrosis by suppressing the Mtdh/BMP/MAPK pathway. *Lab Invest.*, vol. 99 n. 8, p. 1092-1106. 2019.
131. PEPE, G. et al. Marfan syndrome: Current perspectives. *ApplClin Genet.*, vol. 16, p. 55-65.2016.
132. PEREIRA, L. et al. Pathogenetic sequence for aneurysm revealed in mice underexpressing fibrillin-1. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 96, p. 3819–3823.1999.

133. PEREIRA, L. et al. Targetting of the gene encoding fibrillin-1 recapitulates the vascular aspect of Marfan syndrome. *Nat Genet.* vol.17 n. 2, p. 218-222. 1997.
134. PEREIRA, L. et al. Targetting of the gene encoding fibrillin-1 recapitulates the vascular aspect of Marfan syndrome. *Nat Genet.*, vol. 17 n. 2, p. 218-222.1993.
135. PETER, R. et al. Rare case of obturator hernia in a patient with Marfan's syndrome. *Hernia.*, vol. 18 n. 3, p. 439-442. 2014.
136. PEZZOLI, D. et al. Fibronectin promotes elastin deposition, elasticity and mechanical strength in cellularised collagen-based scaffolds. *Biomaterials.*, vol 180, p. 130-142. 2018.
137. PICCOLO, P. et al. Skin fibroblasts of patients with geleophysic dysplasia due to FBN1 mutations have lysosomal inclusions and losartan improves their microfibril deposition defect. *Mol Genet Genomic Med.*, vol. 7 n. 9, p. e844. 2019.
138. PLUMB, D.J.; Dubaybo, B.A.; Thet, L.A. Changes in lung tissue fibronectin content and synthesis during postnatal lung growth. *Pediatr Pulmonol.*, vol. 3 n.6, p. 413-419. 1987.
139. PODOWSKI, M. et al. Angiotensin receptor blockade attenuates cigarette smoke-induced lung injury and rescues lung architecture in mice. *J Clin Invest.*, vol. 122 n.1, p.229-240. 2012.
140. POLLAK, M.R. et al. The glomerulus: the sphere of influence. *Clin J Am Soc Nephrol.*, vol. 9 n. 8, p. 1461-1469. 2014.
141. PYERITZ, R.E.; Marfan syndrome: improved clinical history results in expanded natural history. *Genetics in Medicine*, vol. 21, p. 1683–1690.2018.
142. QUERZOLI, G. et al. Fluid dynamics of aortic root dilation in Marfan syndrome. *J Biomech.*, vol. 47 n. 12, p. 3120–3128. 2014.
143. RADKE, R.M.; BAUMGARTNER, H. Diagnosis and treatment of marfan syndrome: an update. *Heart.*, vol. 100 n. 17, p. 1382-1391. 2014.
144. RAMIREZ, F.; CAESCU, C.; WONDIMU, E.; GALATIOT, J.; Marfan syndrome; a connective tissue disease at the crossroads of mechanotransduction, TGF β signaling and cell stemnes. *Matrix Biol.*, p. 82–89. 2018.

145. REHMAN, A. et al. Angiotensin type 2 receptor agonist compound 21 reduces vascular injury and myocardial fibrosis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.*, vol. 59 n. 2, p. 291-299. 2012.
146. RICCIO, E. et al. Arterial aneurysms: autosomal dominant polycystic kidney disease, Marfan syndrome or both?. *Clin Exp Nephrol.*, vol. 18 n. 4, p. 672-673. 2014.
147. ROBBESOM, A.A. et al. Aberrant fibrillin-1 expression in early emphysematous human lung: a proposed predisposition for emphysema. *Mod Pathol.*, vol.21 n.3, p. 297-307. 2008.
148. ROBINSON, P.N.; GODFREY, M. The molecular genetics of Marfan syndrome and related microfibrilopathies. *Journal of Medical Genetics.*, vol.37, n.1, p.9-25. 2000.
149. ROBLEDO, R.F. et al. Strain-Specific Hyperkyphosis and Megaesophagus in Add1 Null Mice. *Genesis.*, vol. 50, p. 882–891. 2012.
150. ROMAN, J. et al. Nicotine and fibronectin expression in lung fibroblasts: implications for tobacco-related lung tissue remodeling. *FASEB.*, vol. 18 n.12, p. 1436-1438. 2004.
151. ROMAN, J. Fibronectin and fibronectin receptors in lung development. *Exp Lung Resp.*, vol. 23 n. 2, p. 147-159. 1997.
152. ROMANIELLOA, F. et al. Aortopathy in Marfan syndrome: an update. *Cardiovasc Pathol.*, vol. 23 n. 5, p. 261-266. 2014.
153. ROSEMARY, J.; AKHURST, ; AKIKO, H. Targeting the TGF β signalling pathway in disease. *Nat Rev Drug Discov.*, vol. 11 n. 10, p. 790-811. 2012.
154. ROUF, R. et al. Nonmyocyte ERK1/2 signaling contributes to load-induced cardiomyopathy in Marfan mice. *JCI Insight.*, vol. 2 n.15, p.e91588. 2017.
155. SABATIER, L. et al. Complex contributions of fibronectin to initiation and maturation of microfibrils. *Biochem J.*, vol. 456 n. 2, p. 283-295. 2013.
156. SABATIER, L. et al. Fibrillin Assembly Requires Fibronectin. *Molecular Biology of the Cell.*, vol. 20, p. 846–858. 2009.

157. SAITO, Y. et al. Simultaneous repair of multiple aortic aneurysms: Be courageous in minimally invasive era. *Ann Thorac Surg.*, vol. 97, p. 1051-1053. 2014.
158. SAKAI, L.Y. et al. Purification and partial characterization of fibrillin, a cyteine-rich structural component of connective tissue microfibrils. *The Journal of Biological Chemistry.*, vol. 266, n. 22, p. 14763-14770. 1991.
159. SAKAI, L.Y.; KEENE, D.R.; RENARD, M.; DE BACKER, J.; FBN1: The Disease-Causing Gene for Marfan Syndrome and Other Genetic Disorders. *Gene*, vol. 591, n. 1, p. 279–291. 2016.
160. SALLECK, D.; JOHN, S.; Organ Interactions: Heart and kidney. *Dtsch Med Wochenschr.*, vol. 142 n. 18, p. 1348-1356. 2017.
161. SALLUM, J.M.F.; CHEN, J.; PEREZ, A.B.A. Anormalidades oculares e características genéticas na síndrome de Marfan. *Arq. Braz. Oftalmol.*, vol. 65, p. 623-628. 2002.
162. SATCHELL, P.M.; MCLEOD, J.G.; Megaoesophagus due to acrylamide neuropathy. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry.*, vol. 44, p. 906-913. 1981.
163. SBAR, G.D. et al. Renal disease in Marfan syndrome. *Am J Nephrol.*, vol. 16 n. 4, p. 320-326. 1996.
164. SCHENA, F.P.; PERTOSA, G. Fibronectin and the kidney. *Nephron.*, vol. 48 n. 3, p. 177-182. 1988.
165. SCHOENEMAN, M.J. et al. Marfan syndrome and medullary sponge kidney: case report and speculation on pathogenesis. *Int J Pediatr Nephrol.*, vol. 5 n. 2, p. 103-104. 1984.
166. SENGLE, G. et al. Microenvironmental regulation by fibrillin-1. *PLOS Genetics.*, vol. 8 n. 1, p. e1002425. 2012.
167. SHERRATT, M.J. et al. Fibrillin-rich microfibrils of the extracellular matrix: ultrastructure and assembly. *Micron (Oxford, England)*, vol. 32, n. 2, p. 185-200. 2001.
168. SHIMADA, Y. J. et al. Effects of Losartan on Left Ventricular Hypertrophy and Fibrosis in Patients with Nonobstructive Hypertrophic Cardiomyopathy. *JACC Heart Fail.*, vol. 1 n. 6, p. 480-487. 2013.

169. SOUZA, R. B. et al. Association of thoracic spine deformity and cardiovascular disease in a mouse model for Marfan syndrome. *PLoS ONE*, vol. 14 n. 11, p. e022458. 2019.
170. SOUZA, R. B. et al. Critical analysis of aortic dysmorphism in Marfan Syndrome. *J. Morphol. Sci.*, vol. 34, n. 1, p. 1-6. 2017.
171. STERZEL, R.B. et al. Elastic fiber proteins in the glomerular mesangium in vivo and in cell culture. *Kidney Int.*, vol. 58 n. 4, p. 1588-1602. 2000.
172. STUART, A.G.; WILLIAMS, A. Marfan's syndrome and the heart. *Arch Dis Child.*, vol. 92 n. 4, p. 351-356. 2007.
173. SUN, K.H. et al. Translational Research in Acute Lung Injury and Pulmonary Fibrosis α -Smooth muscle actin is an inconsistent marker of fibroblasts responsible for force-dependent TGF β activation or collagen production across multiple models of organ fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*, vol. 310 n. 9, p. L824-L836. 2016.
174. SYYONG, H.T. et al. Dysfunction of endothelial and smooth muscle cells in small arteries of mouse model of Marfan syndrome. *Br J Pharmacol.*, vol. 158, p.1597-1608.2009.
175. TAE, H. J. et al. Cardiac remodeling in the mouse model of Marfan syndrome develops into two distinctive phenotypes *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, vol. 310, p.290–299. 2016.
176. TAKAHASHI, K. et al. Case of Marfan syndrome with microscopic hematuria. *Nihon Jinzo Gakkai Shi.*, vol. 53 n.8, p. 1159-1163.
177. Tierney, E.S.S et al. Influence of Aortic Stiffness on Aortic-Root Growth Rate and Outcome in Patients With the Marfan Syndrome. *Am J Cardiol.*, vol. 121 n. 9, p. 1094-1101. 2018.
178. TROILO, H. et al. Mammalian tolloid proteinases: role in growth factor signalling. *FEBS.*, 590 n. 15, p. 2398-2407. 2016.
179. URIARTE, J. J. et al. Early Impairment of Lung Mechanics in a Murine Model of Marfan Syndrome. *PLos One.*, vol. 11 n.3, p. e0152124.2016.
180. VAN DOREN, S.R. Matrix metalloproteinase interactions with collagen and elastin. *Matrix Biol.*, vol. 0, p. 224-231. 2015.

181. VIRGILIO, C.; CHERRY, K.J.J.; SCHAFF, H.V. Multiple aneurysms and aortic dissection: an unusual manifestation of Marfan syndrome. *Ann Vasc Surg.*, vol.8 n. 4, p. 383-386. 1994
182. VISCONTI, L. et al. Kidney-lung connections in acute and chronic diseases: current perspectives. *J Nephrol.*, vol. 29 n.3, p. 341-348. 2016.
183. WADEI, H.M.; TEXTOR, S.C. The role of the kidney in regulating arterial blood pressure. *Nat Rev Nephrol.*, vol. 8 n. 10, p. 602-609. 2012.
184. WALJI, T.A. et al. Characterization of metabolic health in mouse models of fibrillin-1 perturbation. *Matrix Biol.*, vol.55, p. 63–76.2016.
185. WANG, H. et al. MMP-9-positive neutrophils are essential for establishing profibrotic microenvironment in the obstructed kidney of UUO mice. *Acta Physiol (Oxf).*, vol. 227 n. 2, p. e13317. 2019.
186. WANG, X. M. et al. Effects of angiotensin II intervention on MMP-2, MMP-9, TIMP-1, and collagen expression in rats with pulmonary hypertension. *Genet Mol Res.*, vol. 14 n. 1, p. 1707-1717. 2015.
187. XIAO, Q. et al. Decreased expression of transforming growth factor- β 1 and α -smooth muscle actin contributes to the protection of losartan against chronic renal failure in rats. *Ren Fail.*, vol. 40 n. 1, p. 583-589. 2018.
188. XU, F. et al. Cardiovascular Effects of Losartan and Its Relevant Clinical Application. *Curr Med Chem.*, vol. 16 n.29, p. 3841–3857. 2009.
189. XU, F. et al. Losartan chemistry and its effects via AT1 mechanisms in the kidney. *Curr Med Chem.*, vol. 16 n. 28, p. 3701-3715. 2009.
190. YANG, H. H. C. et al. Long-term effects of losartan on structure and function of the thoracic aorta in a mouse model of Marfan syndrome. *Br J Pharmacol.*, vol. 158 n. 6, p. 1503-1512. 2009.
191. YUAN, S.M. α -Smooth Muscle Actin and ACTA2 Gene Expressions in Vasculopathies. *Braz J Cardiovasc Surg.*, vol. 30 n. 6, p. 644-649. 2015.
192. ZEYER, K.A. et al. The Fibrillin-1 RGD Integrin Binding Site Regulates Gene Expression and Cell Function through microRNAs. *J Mol Biol.*, vol. 431 n. 2, p. 401-421. 2019.
193. ZHANG, H.; HU, W.; RAMIREZ, F.; Developmental Expression of Fibrillin Genes Suggests Heterogeneity of Extracellular Microfibrils. *The Journal of Cell Biology.*, vol. 129 n. 4, p. 1165-1176. 1995.

194. ZHANG, H.Y. et al. Lung fibroblast alpha-smooth muscle actin expression and contractile phenotype in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Pathol.*, vol. 148 n. 2, p. 527-537. 1996.
195. ZHOU, Y.L. et al. Multisystemic smooth muscle dysfunction syndrome in children: a case report and literature review. *Zhonghua Er Ke Za Zhi.*, vol. 55 n. 8, p. 619-623. 2017.
196. ZIELINSKA-KRAWCZYK, M. Pleural manometry-historical background, rationale for use and methods of measurement. *Respir Med.*, vol. 136, p. 21-28. 2018.

8. PUBLICAÇÕES

8.1 Publicações relacionadas à tese

Souza, RB; Cassiano, LL Libbatore, AMA; Tedesco, RC; Koh, IHJ; Martins, AMCRPF; Vretos, C; Alonso, LG. Critical analysis of aortic dysmorphism in Marfan syndrome. 2017. J. Morphol. Sci. 34(1):1-6. (Anexo B)

Souza, RB; Farinha-Arcieri, LE; Catroxo, MHB; Martins, AMCRPF; Tedesco, RC; Alonso, LG; Koh, IHJ; Pereira, LV. Association of thoracic spine deformity and cardiovascular disease in a mouse model for Marfan syndrome. PLoS One; 14:e0224581, 2019. (Anexo C)

Feneck EM, **Souza RB**, Lewis PN, Hayes S, Pereira LV, Meek KM. Developmental abnormalities in the cornea of a mouse model for Marfan syndrome. Exp Eye Res.2020; (194):108001. (Anexo D)

Gyuricza IG, **Souza RB**, Farinha-Arcieri LE, Fernandes GR, Pereira LV. Is HSPG2 a modifier gene for Marfan syndrome?. Eur J Hum Genet. 2020;28(9):1292-1296. (Anexo E)

9. ANEXOS

9.1 Anexo A. Protocolo do Comitê de ética no Uso de Animais do IB aprovado para este trabalho.



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Caracterização do papel do gene *Hspg2* na modulação dos fenótipos, da dinâmica circulatória e da MEC no modelo *mgΔ^{loxPNeo}* na Síndrome de Marfan sob a terapêutica de Losartan”, registrada com o nº 272/2016 (Proc. 16.1.636.41.7), sob a responsabilidade da Profa. Dra. Lygia da Veiga Pereira Carramaschi e com a participação dos colaboradores Gustavo Ribeiro Fernandes (IB/USP), Rodrigo Barbosa de Souza (IB/USP) e Isabela Gerdes Cyuricza (IB/USP), que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, em reunião de 13 de dezembro de 2016.

Vigência da autorização: 13/12/2016 a 12/12/2020

Finalidade: Pesquisa Científica

Espécies/linhagens: camundongos isogênico (*Mus musculus*)/129/sv e B6 e camundongos *Knockout*: *Fbn1KO129/sv*; *Hspg2KO129/sv*; *Fbn1KOB6*; *Hspg2KOB6*

Nº de animais: 180

Peso/Idade: 3 e 6 meses/30g

Sexo: (M+F)

Origem: Biotério de Camundongos do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas - USP

OBS.: Qualquer intercorrência ou alteração do projeto em andamento deverá ser previamente autorizada pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA-IB.


Prof. Dr. Pedro Augusto Carlos Magno Fernandes
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

9.2 Anexo B. I- Publicação relacionada à tese

Review article

<http://dx.doi.org/10.4322/jms.102516>

Critical analysis of aortic dysmorphism in Marfan Syndrome

SOUZA, R. B.¹, CASSIANO, L. L.², LIBERATORE, A. M. A.³,
TEDESCO, R. C.¹, KOH, I. H. J.³, MARTINS, A. M. C. R. P. F.²,
VRETOS, C.⁴ and ALONSO, L. G.¹

¹Departamento de Morfologia e Genética, Escola Paulista de Medicina – EPM, Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, Rua Botucatu, 740, CEP 04023-900, São Paulo, SP, Brasil

²Laboratório Interinstitucional de Sanidade em Aquicultura, Avenida Conselheiro Rodrigues Alves, 1252, CEP 04014-002, São Paulo, SP, Brasil

³Departamento de Cirurgia, Escola Paulista de Medicina – EPM, Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, Rua Pedro de Toledo, 669, 10 andar, CEP 04039-032, São Paulo, SP, Brasil

⁴Universidade Anhembi Morumbi, Rua Dr. Almeida Lima, 1134, CEP 03164-000, São Paulo, SP, Brasil

*E-mail: rodrigo.barbosa72@yahoo.com

Abstract

Introduction: Marfan syndrome (OMIM #154700) was described for the first time in 1896 by Antoine Bernard-Jean Marfan. It is characterized by its autosomal dominant inheritance pattern, affects 1:5000 of those born alive, and involves the gene that codifies the structural protein fibrillin-1. Fibrillin-1 is critical for the formation of the elastic system backbone and for the negative regulation of the cytokine transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1). In the syndrome this fibrillar component causes the degeneration of the fibers of the elastic system, which no longer sequesters matrix TGF- β , causing disorganization of the collagen fibers and vascular smooth muscles. The disease affects mainly the cardiovascular system, cardiovascular problems being the main cause of death. This is because arteries have large amounts of elastic fibers that rupture in an adverse process, causing mainly dissections and aneurisms, which have been better clarified in experimental studies with mice. **Objective:** The objective of this study was to conduct an etiopathogenic and molecular review to describe the advances in the understanding of blood vessel dysmorphism in the syndrome, especially of the aorta. **Materials and Methods:** For this purpose the literature of the last 35 years was extensively reviewed. **Conclusion:** The origin of the aortic dysmorphism in the syndrome stems from a number of events that begin with the mutation of the gene fibrillin-1, causing fragmentation of the aortic elastic fibers. Excess cytokine TGF- β increases the amount of metalloproteinases and of vascular smooth muscle cell apoptosis, leading to matrix remodeling and increasing the susceptibility of the vessel to an aneurysm or dissecting process.

Keywords: Marfan syndrome, arterial wall, morphology, extracellular matrix, aneurysm, dissecting aneurysm.

1 Introduction

Marfan syndrome (OMIM #154700) is an autosomal dominant inheritance condition described in 1896 by the French pediatrician Antoine Bernard-Jean Marfan. The syndrome is linked to the gene fibrillin-1 (*FBNI*) that codifies the protein fibrillin-1 (OMIM #134797), whose *locus* is located at 15q21.1. Mutations of the gene *FBNI* were associated with the disease in 1991. Accurate molecular diagnosis is challenging because of the more than 1500 described mutations. The proteins fibrillin-1 and fibrillin-2 form the backbone of the elastic system for elastin deposition and by extension, of the elastic fibers. Abnormalities of the gene *FBNI* lead to structural changes in the protein fibrillin-1, causing degeneration of the elastic system and disorganization of the collagen fibers and vascular smooth muscle of the aorta. Aortic microfibrils (fibrillin-1 and fibrillin-2) regulate the expression of the transforming growth factor beta (TGF- β) and so mutations of the gene *FBNI* increase the amount of circulating and tissue cytokine, compromising vascular smooth muscle and the integrity of the extracellular matrix.

Since arteries have large amounts of elastic fibers, the cardiovascular system is affected in more than 90% of the patients,

causing mainly aortic dilation, aneurysm, and dissection. Given the challenge of understanding the intrinsic mechanisms of the disease, studies in experimental models in mice have advanced the understanding of the syndrome's pathophysiology and improved the available treatments.

2 Materials and Methods

A systematic search of the literature published between 1980 and 2014 was conducted in the following electronic databases: Web of Science, MedLine, LILACS, Scielo, and Oxford Journals, in addition to a manual search in book chapters, theses, and references of the selected studies in English, Spanish, and Portuguese using the keywords: "síndrome de Marfan" [*Marfan syndrome*], "morfologia" [*morphology*], "matriz extracelular" [*extracellular matrix*], "aneurisma" [*aneurysm*], and "aneurisma dissecante" [*aneurysm, dissecting*].

The exclusion criteria were: repeated studies in the various databases, studies without the keywords in the title, and studies with the keywords in the title but without the subject of interest in the abstract.

9.3 Anexo C. II- Publicação relacionada à tese



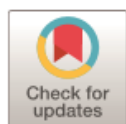
RESEARCH ARTICLE

Association of thoracic spine deformity and cardiovascular disease in a mouse model for Marfan syndrome

Rodrigo Barbosa de Souza¹, Luis Ernesto Farinha-Arcieri¹, Marcia Helena Braga Catroxo², Ana Maria Cristina Rebelo Pinto da Fonseca Martins², Roberto Carlos Tedesco³, Luis Garcia Alonso³, Ivan Hong Jun Koh⁴, Lygia V. Pereira^{1*}

1 University of São Paulo, Department of Genetics and Evolutionary Biology, São Paulo, SP, Brazil, **2** Biologic Institute of São Paulo, Department of Electron Microscopy, São Paulo, SP, Brazil, **3** Federal University of São Paulo, Department of Morphological and Genetics, São Paulo, SP, Brazil, **4** Federal University of São Paulo, Department of Surgery, São Paulo, SP, Brazil

* lpereira@usp.br



Abstract

Aims

Cardiovascular manifestations are a major cause of mortality in Marfan syndrome (MFS). Animal models that mimic the syndrome and its clinical variability are instrumental for understanding the genesis and risk factors for cardiovascular disease in MFS. This study used morphological and ultrastructural analysis to the understanding of the development of cardiovascular phenotypes of the the $mg\Delta^{loxPneo}$ model for MFS.

Methods and results

We studied 6-month-old female mice of the 129/Sv background, 6 wild type (WT) and 24 heterozygous animals from the $mg\Delta^{loxPneo}$ model. Descending thoracic aortic aneurysm and/or dissection (dTAAAD) were identified in 75% of the MFS animals, defining two subgroups: MFS with (MFS⁺) and without (MFS⁻) dTAAAD. Both subgroups showed increased fragmentation of elastic fibers, predominance of type I collagen surrounding the elastic fiber and fragmentation of interlamellar fibers when compared to WT. However, only MFS animals with spine tortuosity developed aortic aneurysm/dissection. The aorta of MFS⁺ animals were more tortuous compared to those of MFS⁻ and WT mice, possibly causing perturbations of the luminal blood flow. This was evidenced by the detection of diminished aorta-blood flow in MFS⁺. Accordingly, only MFS⁺ animals presented a process of concentric cardiac hypertrophy and a significantly decreased ratio of left and right ventricle lumen area.

Conclusions

We show that $mg\Delta^{loxPneo}$ model mimics the vascular disease observed in MFS patients. Furthermore, the study indicates role of thoracic spine deformity in the development of aorta diseases. We suggest that degradation of support structures of the aortic wall; deficiency in the sustenance of the thoracic vertebrae; and their compression over the adjacent aorta

OPEN ACCESS

Citation: de Souza RB, Farinha-Arcieri LE, Catroxo MHB, Martins AMCRP, Tedesco RC, Alonso LG, et al. (2019) Association of thoracic spine deformity and cardiovascular disease in a mouse model for Marfan syndrome. PLoS ONE 14(11): e0224581. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224581>

Editor: Tohru Minamino, Niigata Daigaku, JAPAN

Received: May 26, 2019

Accepted: October 16, 2019

Published: November 14, 2019

Peer Review History: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224581>

Copyright: © 2019 de Souza et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and Supporting Information files.

9.4 Anexo D. III- Publicação relacionada à tese

Experimental Eye Research 194 (2020) 108001



Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Eye Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yexer



Developmental abnormalities in the cornea of a mouse model for Marfan syndrome

Eleanor M. Feneck^a, Rodrigo B. Souza^b, Philip N. Lewis^a, Sally Hayes^a, Lygia V. Pereira^b, Keith M. Meek^{a,*}

^a Structural Biophysics Research Group, School of Optometry and Vision Sciences, Cardiff University, Maindy Road, Cardiff, CF24 4HQ, UK

^b Department of Genetics and Evolutionary Biology, University of São Paulo, Rua do Marão, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Elastic fibres
Marfan syndrome
Fibrillin-1
Cornea
Mouse development
Extracellular matrix

ABSTRACT

Elastic fibres provide tissues with elasticity and flexibility. In the healthy human cornea, elastic fibres are limited to the posterior region of the peripheral stroma, but their specific functional role remains elusive.

Here, we examine the physical and structural characteristics of the cornea during development in the *mgA^{lacPro}* dominant-negative mouse model for Marfan syndrome, in which the physiological extracellular matrix of its elastic-fibre rich tissues is disrupted by the presence of a dysfunctional fibrillin-1 glycoprotein. Optical coherence tomography demonstrated a reduced corneal thickness in the mutant compared to wild type mice from embryonic day 16.5 until adulthood. X-ray scattering and electron microscopy revealed a disruption to both the elastic fibre and collagen fibril ultrastructure in the knockout mice, as well as abnormally low levels of the proteoglycan decorin. It is suggested that these alterations might be a result of increased transforming growth factor beta signalling. To conclude, this study has demonstrated corneal structure and ultrastructure to be altered when fibrillin-1 is disrupted and has provided insights into the role of fibrillin-1 in developing a functional cornea.

1. Introduction

Marfan syndrome is an autosomal dominant connective tissue disease caused by mutations in the *Fbn1* gene that encodes the glycoprotein fibrillin-1, the major structural component of microfibrils. These fibres form a scaffold for elastin deposition during the formation of elastic fibres. Thus, the resultant mutation disrupts elastic fibre assembly and leads to a disorganisation of the extracellular matrix in tissues that are abundant in microfibrils, such as the cardiovascular, skeletal and ocular systems. Focussing on the optical system alone, Marfan syndrome is associated with lens dislocation (ectopia lentis), myopia (Gehle et al., 2017) and the presence of a thinned and flattened cornea (Kornradson and Zetterstrom, 2013; Maumenee, 1981; Sultan et al., 2002).

A precisely organised extracellular matrix is required for the cornea to be strong, transparent and precisely curved, and to enable it to successfully perform its primary functions of protecting the inner

contents of the eye and transmitting and focussing incoming light for optimal vision. As has been demonstrated in numerous studies, disruption to the organisation of the collagen and proteoglycans within the extracellular matrix leads to alterations in the strength (Chakravarti et al., 1998), shape (Quantock et al., 2003) and transparency (Quantock et al., 2001) of the tissue. However, the functional importance of elastic fibres in the cornea is less well understood. Our recent studies have demonstrated species differences in the distribution of corneal elastic fibres, showing them to be localised to the posterior region of the peripheral stroma in the foetal and adult human cornea but existing as an extensive network of fibrillin-rich microfibril bundles throughout the mouse corneal stroma (Feneck et al., 2018; Lewis et al., 2016; Mohammed et al., 2018). Further knowledge has been gained from examination of corneal structure in the fibrillin-1 *mgA^{lacPro}* mouse model for Marfan syndrome, in which the mutant *FBN1* allele creates a truncated fibrillin-1 monomer. As the truncated fibrillin-1 disrupt microfibril formation and structure, there is a surge in TGF- β signalling

Abbreviations: AFS2, Leica automatic freeze substitution system; BSA, Bovine serum albumin; DN, dominant-negative; E, Embryonic day; *Fbn1*^{+/−}, *mgA^{lacPro}* mouse model; FD, Collagen fibril diameter; IIS, Collagen interfibrillar spacing; MFS, Marfan syndrome; OCT, Optical coherence tomography; PBS, Phosphate buffered saline; PFA, paraformaldehyde; SBF-SEM, Serial block face scanning electron microscopy; SAXS, Small-angle X-ray scattering; TEM, transmission electron microscopy; TGF- β , transforming growth factor- β ; WT, Wild type

* Corresponding author.

E-mail address: meekkm@cardiff.ac.uk (K.M. Meek).

<https://doi.org/10.1016/j.yexer.2020.108001>

Received 29 September 2019; Received in revised form 14 February 2020; Accepted 9 March 2020

Available online 13 March 2020

0014-4835/© 2020 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY license

(<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

9.5 Anexo E. IV- Publicação relacionada à tese

European Journal of Human Genetics
<https://doi.org/10.1038/s41431-020-0666-0>



BRIEF COMMUNICATION



Is *HSPG2* a modifier gene for Marfan syndrome?

Isabela Gerdes Gyuricza¹ · Rodrigo Barbosa de Souza¹ · Luis Ernesto Farinha-Arcieri¹ · Gustavo Ribeiro Fernandes¹ · Lygia Veiga Pereira¹

Received: 21 November 2019 / Revised: 17 March 2020 / Accepted: 12 May 2020
 © The Author(s) 2020. This article is published with open access

Abstract

Marfan syndrome (MFS) is a connective tissue disease caused by variants in the *FBNI* gene. Nevertheless, other genes influence the manifestations of the disease, characterized by high clinical variability even within families. We mapped modifier loci for cardiovascular and skeletal manifestations in the $mg\Delta^{loxPneo}$ mouse model for MFS and the syntenic loci in the human genome. Corroborating our findings, one of those loci was identified also as a modifier locus in MFS patients. Here, we investigate the *HSPG2* gene, located in this region, as a candidate modifier gene for MFS. We show a correlation between *Fbn1* and *Hspg2* expression in spinal column and aorta in non-isogenic $mg\Delta^{loxPneo}$ mice. Moreover, we show that mice with severe phenotypes present lower expression of *Hspg2* than those mildly affected. Thus, we propose that *HSPG2* is a strong candidate modifier gene for MFS and its role in modulating disease severity should be investigated in patients.

Introduction

Marfan syndrome (MFS—MIM# 154700) is an autosomal dominant disorder of the connective tissue with high clinical variability both between and within families [1]. It is caused by variants in *FBNI* gene encoding fibrillin-1, the major component of microfibrils [2]. Microfibrils are present in several tissues, which makes MFS a pleiotropic disease affecting mostly the ocular, cardiovascular and musculoskeletal systems [3].

Previous works have suggested that variations in *FBNI* expression caused by polymorphisms in the gene could play a role as modifier of disease severity [4, 5]. However, giving the poor genotype–phenotype correlations and the large intrafamilial clinical variability of the disease, recent works focused on understanding how variants in other genes influence MFS phenotypes [6–8].

The effect of genetic background on phenotypic variability in MFS was demonstrated in mice by our group [9]. We showed that $mg\Delta^{loxPneo}$ mice in the 129/Sv (129) isogenic background presented earlier age of onset of the disease when compared with those in the C57BL/6 (B6) background. Subsequently, we identified loci modulating the phenotypic variability in B6/129 mixed $mg\Delta^{loxPneo}$ mice [8]. One locus on chromosome 4 was associated with variability of the cardiovascular phenotype [8].

One of the candidate genes we identified in this region was *Hspg2*, which encodes perlecan, a heparan-sulfate proteoglycan. Variants in *Hspg2* are associated with Schwartz–Jampel Syndrome (SJS1; MIM# 255800), an autosomal recessive disease characterized by skeletal manifestations. Knockout mice for *Hspg2* presented severe skeletal abnormalities and died around birth due to heart arrest, showing that *Hspg2* plays a role in the formation of the skeletal and cardiac system [10]. Interestingly, in our mapping study the *Hspg2* locus presented an almost suggestive association with the skeletal phenotype, indicating that it may modulate both cardiovascular and skeletal phenotypes of MFS [8].

Biochemical studies show that perlecan is also involved in maintenance of vascular homeostasis by its interaction with several extracellular matrix (ECM) components, including fibrillin-1 [11, 12]. This interaction is essential for positioning fibrillin-1 multimers in the pericellular space and, consequently, for the assembly of microfibrils [12–14].

Given these findings, we propose that *Hspg2* is a strong candidate modifier gene for MFS. Here, we used the MFS

Supplementary information The online version of this article (<https://doi.org/10.1038/s41431-020-0666-0>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Lygia Veiga Pereira
 lpereira@usp.br

¹ National Laboratory for Embryonic Stem Cells (LaNCE), Department of Genetics and Evolutionary Biology, Biosciences Institute, University of São Paulo, São Paulo, SP 05508-900, Brazil