

UNIVERSIDADE SÃO PAULO
INSTITUTO DO CORAÇÃO DA FACULDADE DE MEDICINA

JÚLIA MARTINS FELIPE DE SOUZA

**Modulação da resposta vascular à lesão pela proteína dissulfeto
isomerase-A1**

São Paulo
2026

JÚLIA MARTINS FELIPE DE SOUZA

**Modulação da resposta vascular à lesão pela proteína dissulfeto
isomerase-A1**

Versão Original

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

Programa de Cardiologia
Orientador: Prof. Dr. Francisco Rafael
Martins Laurindo

São Paulo
2026

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Souza, Júlia Martins Felipe de
Modulação da resposta vascular à lesão pela proteína
dissulfeto isomerase-A1 / Júlia Martins Felipe de Souza;
Francisco Rafael Martins Laurindo, orientador. -- São Paulo,
2026.

Tese (Doutorado) -- Programa de Cardiologia. Faculdade
de Medicina da Universidade de São Paulo, 2026.

1.Isomerasas de dissulfetos de proteínas 2.Remodelação
vascular 3.Doenças cardiovasculares 4.Matriz extracelular
5.Modelos animais 6.Organismos geneticamente modificados
7.Histologia 8.Neointima I.Laurindo, Francisco Rafael Martins,
orient. II.Título

USP/FM/DBD-185/26

Responsável: Daniela Amaral Barbosa, CRB-8 7533

Nome: SOUZA, Júlia Martins Felipe de

Título: Modulação da resposta vascular à lesão pela proteína dissulfeto isomerase-A1

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

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.	-----
Instituição.	-----
Julgamento: .	-----

Prof. Dr.	-----
Instituição.	-----
Julgamento: .	-----

Prof. Dr.	-----
Instituição.	-----
Julgamento: .	-----

*Dedico este trabalho a Consuelo Augusta,
quem me ensinou a lutar arduamente pelos
meus objetivos.*

Agradecimentos

Quando criança eu queria ser astrônoma. Não por querer visitar planetas - o medo de sair da Terra me paralisava - mas porque estudar o universo me encantava. Com 12 anos sabia explicar para qualquer um como funcionava o LHC, o maior colisor de hádrons do mundo e o que era o bóson de Higgs. Pena que ninguém da minha idade estava interessado em falar disso. Conforme fui crescendo abandonei a ideia por exigir muitos cálculos e sempre fui ruim nisso. Mas a curiosidade de descobrir fenômenos da natureza persiste. Obrigada mãe, Isaura Martins Felipe. Você como uma pessoa naturalmente curiosa estimulou o meu lado criativo desde sempre, seja acompanhando meu processo de expressão através de desenhos e pinturas, seja buscando cada vez mais conhecimento. “Nunca pare de estudar!”, dizia sempre. Eu também passei muitos anos estudando geologia como um hobby. Eu queria saber cada vez mais sobre placas tectônicas, como o núcleo mantém temperaturas altíssimas constantemente, como é calculada a escala Richter. Meu pai se graduou em Petróleo e Gás quando era adolescente, então passava horas, tardes no telefone conversando sobre geologia. Obrigada pai, Lidovaldo Fátima de Souza. Eu sempre amei e sempre vou amar conversar sobre ciência com você. Você foi como uma faísca que eu precisava para perseguir meus sonhos, custe o que custar.

Minha carreira na pesquisa foi alicerçada por duas grandes cientistas mulheres. Durante a graduação em Medicina Veterinária tive a matéria que considero a mais difícil de todas: farmacologia. Mas foi nela que vi a oportunidade de entrar no ramo da pesquisa. Apesar de ter sofrido para passar, pude ter uma experiência científica que abriu as portas para minha carreira. Obrigada prof^a Giuliana Petri, pela dedicação como professora, por ter me ensinado tudo que sei hoje em dia sobre bem estar de ratos e camundongos, por ter me dado mais uma oportunidade após minha graduação, apenas para me ajudar num projeto externo. Sou muito grata e levo seu exemplo comigo. Logo depois, em Frankfurt no laboratório do prof^o Ralf Brandes, tive uma rica experiência da minha vida pessoal e acadêmica. Obrigada Flávia Rezende Felipe. Tia, colega, amiga. São tantas, tantas coisas a agradecer, a falar, mas vou focar em agradecer por ter dedicado seu tempo mostrando o quão difícil é alcançar grandes feitos, mas os frutos são doces e valem a pena. Foi incrível ver uma cientista tão focada, gentil e acolhedora. Lembro com muito carinho sua forma de transmitir uma ideia, entender as necessidades de cada aluno seu, enxergar suas melhores qualidades e usá-las como combustível. Obrigada por ter me mostrado tantas coisas boas na vida, pelos momentos inesquecíveis com tio João e primo Erick fazendo guerra de bolinha de neve e tomando *glühwein*. Sei que também fez isso por outras pessoas, aliás, por todos que tiveram o privilégio de te conhecer e mostrar coragem. Eu te admiro demais por essa sensibilidade.

Cinco meses podem não ser nada e ao mesmo tempo, tudo. Obrigada, Prof. Ralf Brandes. Foi em seu laboratório que a minha jornada como cientista começou de verdade, um verdadeiro batismo.

A experiência do doutorado muda você como pessoa, e no meu caso mudou a forma como enxergo o mundo. Não de uma forma negativa, mas realista. O InCor e o HC te dão a oportunidade de ser mais humilde quando você anda pela avenida do complexo e precisa desviar de centenas de doentes, familiares perdidos, pessoas pedindo dinheiro, comida, pessoas chorando por luto, pessoas andando e levando consigo o carrinho com cilindro de oxigênio. E dentro do hospital, um grande universo. Na primeira vez que conversei pessoalmente com o Chico, soube de algo que nem sabia ser possível. “Aqui os alunos geralmente vão para o doutorado direto, sem mestrado”. Fui invadida pelo medo de não ser capaz de trabalhar ali. Aceitei a proposta completamente insegura. Pode ser um caminho conhecido para muitos, mas para alguém que se formou em medicina veterinária numa faculdade particular sem centros de pesquisa, era um grande desafio. Poucos veterinários doutores que havia conhecido, entraram no mestrado primeiro, dividiram a vida acadêmica com a clínica, completaram o doutorado perto dos 40 anos. E eu só tinha 25 anos. Já não bastasse esse choque de realidade, não imaginava o que viria pela frente: em 15 dias teríamos o *lockdown* e o mundo ia enfrentar uma pandemia global. Meus primeiros passos como candidata ao doutorado foram à distância, com agenda limitando o número de pessoas no laboratório. Tirava dúvidas por e-mail. Fiz muitos experimentos sem

ninguém ao meu lado. Conversas presenciais eram com máscara, cadeiras distantes uma da outra. Eu estava aprendendo tudo sozinha, o que todos aprenderam conversando lado a lado, compartilhando uma mesa. Por meses a fio, meus colegas eram uma imagem plana na tela do meu computador. Conforme a situação melhorava e mais pessoas eram permitidas no laboratório, senti o alívio que era poder novamente trabalhar no meu projeto com pessoas à minha volta. E jamais vou conseguir descrever a sensação de ver que tudo estava voltando a ser como antes.

Vou agradecer primeiro ao Leonardo por ter me ensinado tudo desde o começo. Foi ele quem me ensinou todas as técnicas, me fez acreditar em mim mesma, reconheceu minhas habilidades. Leo, que honra ter conhecido um gênio como você. Sempre achei incrível suas ideias e raciocínio para soluções.

Agradeço ao Fernando pela ajuda com as lâminas, com os experimentos, com as análises histológicas, por ter confiado em mim desde o começo e permitir que eu fizesse parte do seu trabalho. Obrigada pela companhia, pelas conversas engraçadas com Percília na sala experimental ou então com a Amanda na sala do ecocardiograma.

Agradeço à Lívia, que entrou logo depois de mim durante a pandemia e tem sido minha melhor companhia e amiga desde então. Obrigada por alegrar meus dias, me ensinar a fazer *Western Blot*, dar suporte quando precisava, pelas inúmeras conversas, piadas, cafés, desabafos de dupla via, por deixar a ciência mais divertida e leve.

Agradeço à Tiphany, ou Tiff (esse apelido geralmente é utilizado em gritos) pela ajuda em todos esses anos seja discutindo resultados, tirando fotos no confocal, arrumando minhas figuras do artigo, me dando dicas valiosas.

Obrigada a todos os integrantes e ex-integrantes do laboratório que contribuíram para o meu trabalho, que dedicaram um pouco do seu tempo para me ajudar: Percília, Gabriela, Daniela, Victor, Lucas, Ricardo, Renato, Sara, João, Maria, Leonora, Arruda. Agradeço também às futuras integrantes Mayra e Thamara que conheci há pouco tempo, mas o suficiente para formar uma linda amizade.

Agradeço imensamente ao prof^o Francisco Laurindo pela dedicação em cuidar de todos os aspectos do meu trabalho, me ensinar sobre foco e constância, por ter sempre disponibilidade para me ouvir e conversar, por ser um exemplo de cientista que ama profundamente o que faz.

Não poderia deixar de agradecer ao Luiz Carlos Uchôa Junqueira (que Deus o tenha) por ter inventado a coloração de histologia mais linda, na minha opinião. Durante as longas horas de captura de foto e análise das minhas lâminas, nunca deixei de admirar sua beleza.

Neste longo caminho que na verdade é só o começo, não posso deixar de agradecer aos meus amigos aqui de São Paulo; meus amigos da Ohana que se dividem entre uns por aqui, outros em Santos; Carla que sempre me deu apoio mesmo que de outro continente; meu marido Gustavo.

Isto pode parecer somente uma tese de doutorado, mas não é. É um livro que conta detalhes da minha vida, altos e baixos, lágrimas de tristeza e alegria escondidos atrás dos gráficos, agrupados em páginas com termos científicos.

*“Para quem quer se soltar
Invento o cais
Invento mais que a solidão me dá
Invento Lua nova a clarear
Invento o amor
E sei a dor
De me lançar”*

(Milton Nascimento, Cais)

RESUMO

Souza JMF. Modulação da resposta vascular à lesão pela proteína dissulfeto isomerase-A1 [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade São Paulo; 2026.

O remodelamento vascular expansivo *strictu sensu*, caracterizado pelo aumento do calibre total do vaso, é um processo redox-modulado presente na aterosclerose/restenose. Entretanto, os mecanismos envolvidos no remodelamento ainda não foram completamente elucidados. A proteína dissulfeto isomerase-A1 (PDIA1), uma chaperona redox do retículo endoplasmático e da superfície celular, tem papel importante na mecanoadaptação do músculo liso vascular e no remodelamento de matriz extracelular. A inibição da PDIA1 promove remodelamento constritivo durante reparo vascular pós lesão, que por sua vez é associada pela sua superexpressão após a lesão. Porém, não há estudo que investigue os efeitos fisiológicos da superexpressão desta proteína redox. Neste trabalho, investigamos os efeitos da superexpressão constitutiva da PDIA1 em camundongo transgênico (TgPDIA1) utilizando a técnica de ligadura parcial de carótida como modelo de remodelamento vascular expansivo, associado com fluxo oscilatório e turbulento, como documentado nos experimentos de ultrassonografia com *Doppler*. O grupo TgPDIA1 mostrou aumento significativamente maior no calibre total 14 dias após a ligadura, em conjunto com aumento da área da camada média, neoíntima e área total do vaso, comparado ao camundongo selvagem (*WT*). Estas mudanças foram identificadas na região da carótida proximal ao coração, coincidentemente a região com fluxo mais turbulento. A análise de matriz extracelular mostrou redução de colágeno birrefringente nos vasos TgPDIA1, apesar do aumento de colágeno total detectado por microscopia confocal, uma indicação de maior depósito de colágeno, porém de forma desorganizada. A análise morfológica mostrou fibras de colágeno mais curvas e fibras de elastina mais finas nas artérias ligadas dos camundongos TgPDIA1. Na imunohistoquímica, foi constatado diminuição da marcação de alfa-actina e aumento de vimentina nos vasos TgPDIA1, demonstrando intensa reprogramação celular e do citoesqueleto. Em suma, estes resultados indicam o papel da PDIA1 como mediador no remodelamento vascular expansivo dependente de fluxo, corroborando com evidências apontando esta proteína como regulador de mecanismos envolvidos em doenças vasculares.

Palavras-chave: 1.Isomerases de dissulfetos de proteínas. 2.Remodelação vascular. 3.Doenças cardiovasculares. 4.Matriz extracelular. 5.Modelos animais. 6.Organismos geneticamente modificados. 7.Histologia. 8.Neointima.

ABSTRACT

Souza JMF. Modulation of Vascular Injury Response by Protein Disulfide Isomerase-A1 [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2026.

Vascular strictu sensu expansive remodeling, characterized by increased whole vessel caliber, is involved in atherosclerosis/restenosis and known to be redox-modulated. However, upstream mechanisms of vessel remodeling are unknown. Protein-disulfide isomerase (PDIA1), a redox chaperone from the endoplasmic reticulum and cell surface, supports mechanoadaptation of vascular smooth muscle/extracellular matrix (ECM) binomium. PDIA1 inhibition promotes constrictive remodeling during vascular injury repair, which per se associates with marked PDIA1 overexpression. However, physiological effects of overexpressed PDIA1 in vessel remodeling are unknown. Here we investigate effects of transgenic constitutive PDIA1 overexpression (TgPDIA1) in carotid artery expansive remodeling in a mouse model of partial left carotid artery ligation associated with oscillatory flow, documented in our experiments by ultrasound imaging. TgPDIA1 mice exhibited significantly larger total calibers 14 days after carotid ligation, along with increased medial, neointimal and total wall areas, compared with wild-type mice. These changes were exacerbated in proximal carotid, coincident with more disturbed flow. ECM analysis revealed reduced birefringent collagen in TgPDIA1 arteries, despite increased total collagen content detected by confocal microscopy, indicating enhanced amount but impaired collagen organization. Morphometry disclosed enhanced collagen fiber curvature and reduced elastin fiber thickness in TgPDIA1 ligated arteries. Immunohistochemistry depicted reduced α -smooth muscle actin and increased vimentin in TgPDIA1 vessels, consistent with intensified cellular and cytoskeletal reprogramming. Analogous expansive remodeling occurred in another series of mice subjected to total carotid occlusion. These data support PDIA1 role as mediator of expansive flow-dependent vascular remodeling, composing further evidence implicating PDIA1 as a general regulator of this important disease mechanism.

Keywords: 1.Protein disulfide-isomerases. 2.Vascular remodeling. 3.Cardiovascular diseases. 4.Extracellular matrix. 5.Models, animal. 6.Organisms, genetically modified. 7.Histology. 8.Neointima.

Sumário

1. Introdução.....	1
1.1 Remodelamento Vascular <i>Strictu Sensu</i>	1
1.2 Homeostase redox e seu papel fisiológico.....	2
1.3 A Proteína Dissulfeto Isomerase A-1	2
1.4 Superexpressão da PDIA1	4
2. Objetivos.....	5
2.1 Objetivos específicos:.....	5
3. Métodos.....	6
3.1 Modelo animal de ligadura parcial de carótida.....	6
3.2 Modelo animal de ligadura total de carótida	6
3.3 Análise de fluxo e ecocardiograma.....	6
3.4 Histopatologia	7
3.5 Análise de colágeno por microscopia em luz polarizada.....	7
3.6 Análise de colágeno por microscopia confocal	7
3.7 Morfometria de fibras de colágeno	7
3.8 Morfometria de fibras elásticas.....	7
3.9 Imuno-histoquímica	8
3.10 Análise estatística	8
4. Resultados.....	9
4.1 Efeitos da ligadura parcial da carótida (PCL) na dinâmica do fluxo arterial.....	9
4.2 A superexpressão de PDIA1 causa remodelamento vascular expansivo exacerbado após ligadura parcial da carótida.....	11
4.3 A superexpressão de PDIA1 associa-se à redução de colágeno birrefringente apesar do aumento do conteúdo total de colágeno.....	18
4.4 A superexpressão de PDIA1 associa-se a alterações na arquitetura das fibras de colágeno e elastina	22
4.5 Análise imuno-histoquímica da parede vascular.....	26
4.6 Remodelamento expansivo exacerbado em camundongos TgPDIA1 após oclusão total da artéria carótida	35
5. Discussão	37
6. Conclusão.....	40
Referências	41

1. Introdução

1.1 Remodelamento Vascular *Strictu Sensu*

A história natural das adaptações vasculares (relacionadas à fisiologia ou influenciadas por doença) é permeada pelo remodelamento vascular. Este processo vai além de uma simples reorganização estrutural da parede do vaso (genericamente designado como remodelamento vascular *latu sensu*) e compreende processos cíclicos temporo-espacialmente coordenados que envolvem aumento ou diminuição do diâmetro do vaso e formação da camada neoíntima na aterogênese, restenose pós-angioplastia, complicações da placa de ateroma, angiogênese, formação de aneurisma e outros eventos. Em vasos de condutância, estes processos são designados pelo termo “remodelamento *strictu sensu*”, isto é, mudanças no calibre total do vaso, avaliado pela área da lâmina elástica interna¹. Este é o processo em foco neste trabalho. O aumento do calibre, chamado de remodelamento expansivo ou *outward remodeling*, ocorre sem a formação de placas em resposta ao fluxo perturbado² e pode ser um marcador clínico para ateroma complicado³. Durante a aterogênese, um processo complexo da formação das placas de ateroma, o vaso passa por uma adaptação influenciada pela placa, levando à sua expansão de calibre³. Já o remodelamento constritivo, ou *inward remodeling*, pode ser iniciado após lesão vascular e é o principal mecanismo da restenose pós angioplastia⁴. Tais processos incluem a interação entre as células da parede do vaso com células endoteliais, células de músculo liso vascular (VSMCs), fibroblastos da camada adventícia, células pluripotentes e células inflamatórias. Estas células participam, em conjunto, de eventos transitando entre a “desconstrução” (fragmentação de matriz extracelular, migração, desdiferenciação, morte celular, etc) e “reconstrução” (proliferação, diferenciação, reorganização de matriz, etc). Estes eventos são coordenados pela comunicação intercelular, no entanto a natureza desta troca de informação ainda não é totalmente compreendida. Elucidar estes mecanismos é crucial para entender como o vaso responde a estímulos fisiopatológicos e como estes processos se desenvolvem até atingirem um ponto auto-regulado de homeostase.

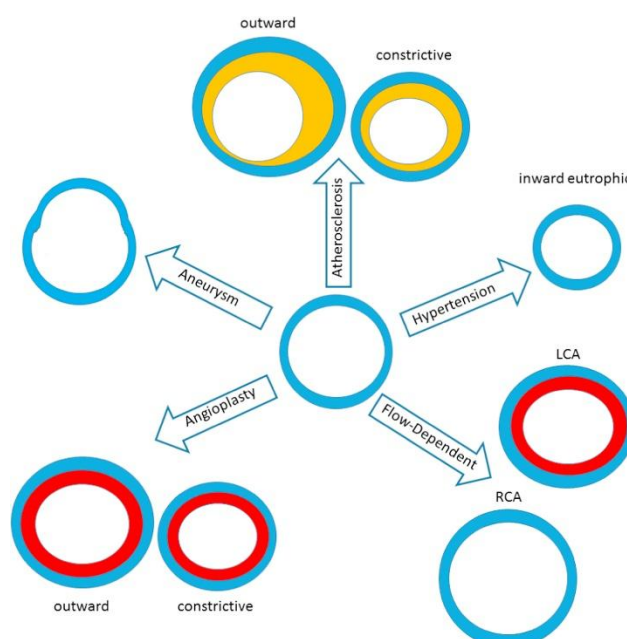


Figura 1. Tipos de remodelamento vascular. Adaptado de Tanaka & Laurindo, 2017.

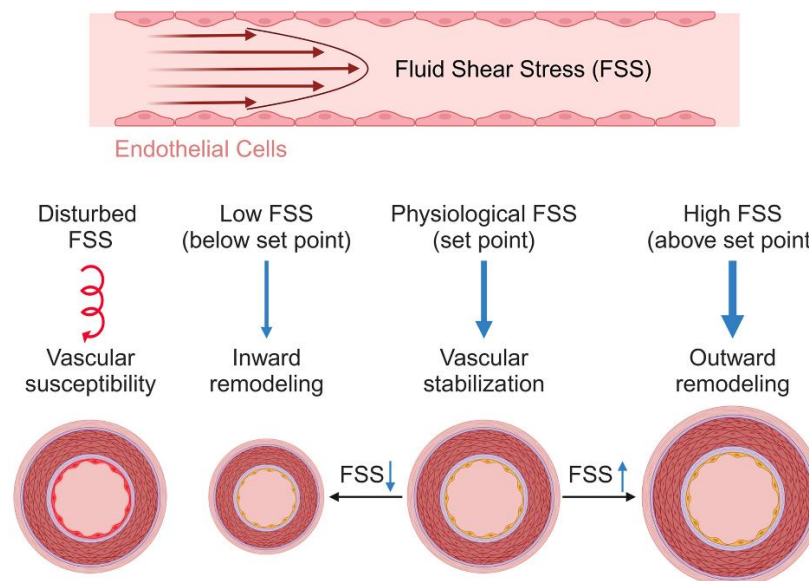


Figura 2. Remodelamento vascular por mudança do padrão de fluxo arterial. Adaptado de Deng et al., 2025.

1.2 Homeostase redox e seu papel fisiológico

Entre os mecanismos integrados na resposta vascular à lesão, a processos redox têm sido o foco de décadas de estudo por terem elucidado questões relacionadas às adaptações do vaso, como revisado anteriormente⁵. Neste contexto, células se comunicam por vias redox, hoje sabidamente um grande papel na resposta vascular⁶. Os efeitos parácrinos de moléculas redox-ativas como óxido nítrico (NO), superóxido, peróxido de hidrogênio foram extensivamente caracterizados no contexto de remodelamento vascular dependente de fluxo^{7,2}. Estudos prévios mostraram que a diminuição da atividade do superóxido dismutase resulta em menor bioatividade de NO e remodelamento constritivo nos estágios finais da reparação vascular⁸. Entretanto, mecanismos envolvidos na comunicação por vias redox intercelulares não foi totalmente esclarecido.

O retículo endoplasmático (RE) foi extensivamente estudado como organela redox ativa que se estende por outros compartimentos subcelulares até o meio extracelular, chamado *redoxoma dependente do RE*, ou *ER-dependent outreach redoxome (ERDOR)*, um contexto elaborado pelo nosso grupo⁹. O estado redox do RE é muito similar ao do meio extracelular e também das concentrações estacionárias de peróxido de hidrogênio¹⁰. Tal potencial de oxidação é determinado por oxidorreduções como Ero1alpha e a família de proteínas dissulfeto isomerase¹¹ (PDI) com a contribuição de enzimas da família NADPH oxidase, especialmente NOX4¹², e glutatona oxidada¹³. Uma característica paradigmática do *ERDOR* é a translocação de oxidorreduções do RE para o meio extracelular como acontece com a PDI, servindo de ponte entre o RE e o meio extracelular redox. *Nossa hipótese neste contexto é que PDIs sejam um elemento integrativo na coordenação do remodelamento vascular.*

1.3 A Proteína Dissulfeto Isomerase A-1

A superfamília das tioredoxinas surgiu de um único ancestral encontrado em organismos unicelulares primitivos e mantém até hoje sequência genética conservada, um fato que

confere sua relevância biológica. Parte integrante desta superfamília são as PDIs, uma família com mais de 21 membros. Seu protótipo, PDIA1 (ou apenas PDI) é uma proteína de 55-kDa contendo dois domínios ditióis *a* e *a'* do tipo CXXC (cisteína-glicina-histidina-cisteína) e dois domínios *b* e *b'* sem ditióis, enriquecidos em hidrofóbicos, atuando na ligação de substratos¹⁴. Além disso, a PDI contém uma sequência (ou motivo) KDEL (lisina-aspartato-glutamato-leucina) no C-terminal atuando como um sinal de recuperação, ou seja, retém a proteína no RE^{15, 16}. Entre diversas funções, a PDI é conhecida por três papéis: Oxidase, formando ou clivando pontes dissulfeto de proteínas; Isomerase, modificando a localização dos sítios onde estas pontes dissulfeto irão se ligar; Chaperona, mudando a conformação da proteína independente de sua atividade oxiredutase ou isomerase¹⁷.

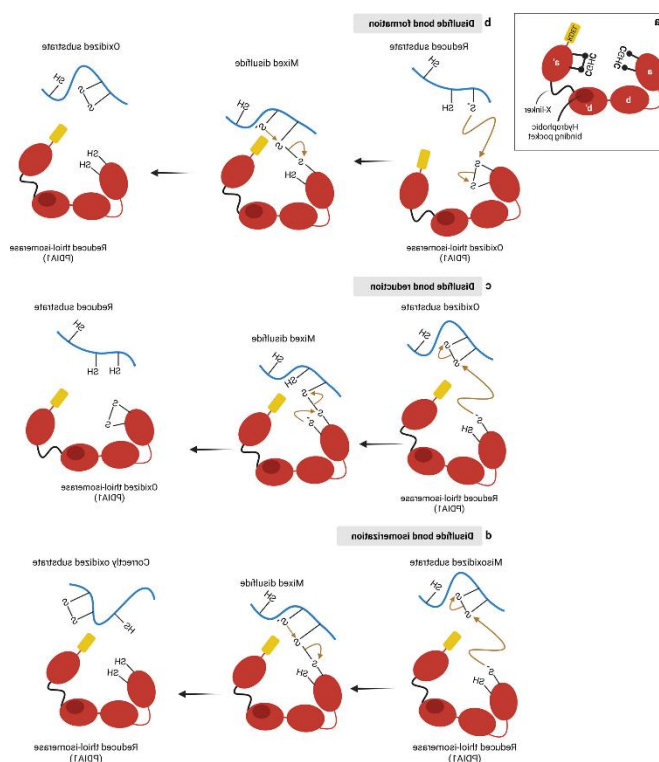


Figura 3. Funções da PDIA1. Adaptado de Oliveira et al., 2026.

Nosso laboratório mostrou previamente que a PDI tem papel fundamental como reguladora de diversos processos envolvidos no remodelamento vascular, como a ativação dependente de fatores de crescimento das Nox NADPH oxidases^{18, 12} e ativação de RhoGTPases, proteínas envolvidas na organização do esqueleto e portanto ativando migração celular¹⁹. expressão gênica e proteica da PDI é correlacionada com a vulnerabilidade de placa de aterosclerose em humanos, que neste contexto demonstra remodelamento expansivo²⁰. O pool extracelular de PDIA1 (secretado e também presente na superfície extracelular, aproximadamente 2% de toda a concentração de PDI na célula) é regulador da mecanoadaptação de VSMCs e da persistência na migração direcional²¹. Adicionalmente, a neutralização da PDI extracelular através de anticorpo embebido em gel perivascular promove remodelamento construtivo em estágios finais da resposta vascular à lesão por hiperdistensão, um indício que a PDI sustenta a expansão vascular neste contexto de remodelamento²². Além disso, a PDI está inserida na organização de matriz extracelular, promovendo alinhamento e maturação das fibras de colágeno, um processo crucial que determina a rigidez vascular e sua integridade estrutural no remodelamento²². Durante a reparação vascular, há uma superexpressão marcante (25x) da PDI. No contexto de sua superexpressão induzida e sustentada em VSMCs, a oscilação na expressão gênica das

NADPH oxidase Nox1 e Nox4 conduzem uma oscilação também no fenótipo dessas células²³. Em suma, entender os efeitos da superexpressão da PDI pode elucidar integralmente seu papel no remodelamento vascular.

1.4 Superexpressão da PDIA1

Apesar destas evidências, o real impacto da superexpressão da PDI no remodelamento vascular *in vivo* ainda não foi totalmente elucidado. Com isso, utilizamos um modelo de camundongo transgênico com superexpressão global constitutiva da PDIA1^{18, 23} para explorar esta questão. O modelo de superexpressão foi criado porque a deleção genética é letal^{24, 25}. O remodelamento vascular ocorre por ligadura parcial de carótida no camundongo normolipidêmico. Embora este modelo seja muito utilizado para estudar aterosclerose, nosso foco está em estudar alterações da parede do vaso causadas por mudança do padrão de fluxo. Esta mudança de fluxo promove alterações na expressão genética de células endoteliais, principalmente genes mecanossensíveis²⁶ e envolvidos na inflamação²⁷. Além do mais, o fluxo perturbado pode ativar parcialmente uma reprogramação endotelial levando a mudanças de fenótipo, adquirindo características de célula mesenquimal e até de célula imune²⁸. Sem dúvida, este modelo gera inflamação de origem mecânica, que leva o vaso a sofrer adaptações²⁹ com efeitos diretos na matriz extracelular^{30, 31}. Ao correlacionar seus efeitos com o papel da PDI na regulação estrutural do vaso em resposta a forças biomecânicas, podemos constatar que há um "paradigma mecanobiológico /redox" de remodelamento vascular proposto por nosso grupo¹.

O foco neste trabalho está na utilização deste modelo para investigar os eventos que ocorrem na resposta vascular à lesão, avaliando seus aspectos morfológicos e moleculares. Compreender a atuação da PDI como moduladora redox no remodelamento vascular deverá amplificar o entendimento de vários mecanismos redox relevantes à fisiopatologia de doenças vasculares.

2. Objetivos

O objetivo deste trabalho é investigar, em um modelo de superexpressão transgênica da PDIA1, o efeito desta chaperona redox no remodelamento vascular.

2.1 Objetivos específicos:

- 1) Validar (nas condições de nosso estudo) o modelo de ligadura parcial de artéria carótida como um estímulo para alteração do padrão de fluxo arterial.
- 2) Avaliar morfometricamente as variáveis descritivas de remodelamento vascular *strictu sensu* nas artérias carótidas ligadas e seus controles, em camundongos transgênicos superexpressando a PDIA1 (TgPDIA1) ou selvagens (WT).
- 3) Investigar o efeito da superexpressão transgênica da PDIA1 na organização da matriz extracelular colágena e elástica.
- 4) Investigar aspectos fenotípicos de VSMCs neste modelo.

3. Métodos

3.1 Modelo animal de ligadura parcial de carótida

Este estudo está de acordo com as normas do Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA nº 1661/2021), utilizando camundongos machos de fundo genético FVB com superexpressão constitutiva global da PDIA1 (TgPDIA1, ou TG)²³ ou selvagem (*wild type*, ou WT). Apenas machos foram utilizados neste estudo para evitar um grande número de grupos experimentais e manter uma padronização. As fêmeas foram utilizadas para outro estudo em andamento. O protocolo de ligadura parcial da carótida foi conduzido segundo Nam *et al.*, 2009³². Machos de 16 semanas de idade, WT e TG, foram anestesiados com isoflurano 5% associado a oxigênio e mantidos em placa de aquecimento. Foi utilizado buprenorfina (0,1mg/kg) via subcutânea como analgesia pré e pós operatório por seu efeito prolongado em camundongos (72h), sendo repetido se necessário. A região ventral do animal teve seus pelos retirados com creme depilatório, desde a região abaixo da mandíbula até final do tórax para garantir o máximo de higiene. A assepsia foi realizada com álcool isopropílico e iodopovidona. Todos os instrumentos e materiais (instrumentos, gaze, pano de campo, luvas estéreis, etc) foram previamente esterilizados. Para realizar a ligadura, pedaços de fio de sutura seda 6-0 foram cortados, postos em placas de cultura (35mm) contendo solução fisiológica estéril para hidratação e evitar que os multifilamentos se soltem, depois expostos à luz UV por 15 minutos. Para exposição da artéria carótida, o pescoço é levemente arqueado com auxílio de gaze. A incisão é realizada na região centro-ventral, levemente à direita. Tireóide e estruturas conjuntivas são delicadamente afastadas, expondo a artéria carótida esquerda, nervo vago e veia jugular. A carótida externa, interna e occipital são ligadas, restando apenas a artéria tireóidea superior (Fig. 4A). Após a cirurgia, o animal é supervisionado em uma caixa limpa com lâmpada aquecedora até recuperar plena consciência. Animais foram eutanasiados após 2 ou 14 dias.

3.2 Modelo animal de ligadura total de carótida

Este modelo foi realizado por Carolina Gonçalves Fernandes, pesquisadora que atuou em nosso laboratório. Camundongos machos FVB³³ de 12 a 16 semanas foram submetidos à oclusão total da carótida como descrito em Kumar *et al.*, 1997³⁴. Animais foram anestesiados com xilazina (10mg/kg) e ketamina (80mg/kg) seguido de isoflurano a 1,5%. Preparativos pré e pós-cirúrgicos são similares ao modelo descrito anteriormente. A carótida comum esquerda foi exposta e ligada utilizando fio de sutura prolene 7-0 logo abaixo da bifurcação. Os animais foram eutanasiados após 3 semanas.

3.3 Análise de fluxo e ecocardiograma

Animais foram submetidos à ultrassonografia com doppler (VEVO 2100, Visual Sonics, Canada) utilizando probe de 35MHZ, providenciados pelo sistema Rede Premium da Faculdade de Medicina da USP (FMUSP). As imagens capturadas e análises foram realizadas segundo recomendações do Comitê de Padronização da Sociedade Americana de Ecocardiografia. Animais foram anestesiados com isoflurano 2%+oxigênio. Foram obtidos dados de fluxo e diâmetro das artérias carótida, braquicefálica e subclávia para normalização dos dados. O diâmetro interno das artérias foi mensurado durante a sístole. Também foram obtidos parâmetros ecocardiográficos do coração para avaliar função e estrutura. Todas as análises foram feitas às cegas.

3.4 Histopatologia

As amostras foram analisadas com ênfase nos parâmetros morfométricos e deposição de colágeno. Após eutanásia, foi feita perfusão sob pressão fisiológica por 3 minutos com solução de PBS e formalina 4%. As carótidas foram dissecadas, separadas do tecido conjuntivo da adventícia, fixadas por 24H na mesma solução a 4°C, incluídas em blocos de parafina. As lâminas histológicas foram feitas com cortes de 3 µm de espessura. Para análise de colágeno, foi utilizada coloração especial Vermelho Picrosirius; para análise morfométrica e visualização de elastina, Verhoeff-Van Gieson. A quantificação foi realizada através do software FIJI (ImageJ)³⁵.

3.5 Análise de colágeno por microscopia em luz polarizada

Lâminas coradas em Picrosirius foram analisadas utilizando microscópio com lente polarizada, uma técnica que permite dividir as fibras de colágeno organizadas de forma mais firme (vermelho ou alta birrefringência) ou solta (verde ou baixa birrefringência)³⁶. Para detecção da camada média do vaso, aumenta-se a exposição de luz; para detecção das fibras da camada adventícia, menos exposição de luz é usada para melhor definição das fibras. O software Fiji/ImageJ foi utilizado para dividir a foto RGB em canais de cor verde e vermelho, para analisar fibras de colágeno das respectivas cores. Para que estas fibras sejam corretamente detectadas, foi utilizado um plug-in de segmentação via Machine Learning (Trainable Weka Segmentation). A deposição de colágeno foi calculada como a área de marcação positiva pela área do vaso selecionada em porcentagem.

3.6 Análise de colágeno por microscopia confocal

Lâminas coradas com Picrosirius também foram analisadas por microscopia confocal utilizando um laser de 546 nm (canal vermelho) e analisadas em paralelo com a autofluorescência das fibras elásticas adquirida em 488 nm (canal verde)^{37,38}. As imagens foram obtidas com objetiva de 40× em um microscópio confocal invertido spinning disk (Zeiss Cell Observer SD). Para análise quantitativa, todas as imagens foram padronizadas e processadas utilizando Fiji/ImageJ. Foi utilizado método de segmentação por threshold (Moments) aplicado ao canal vermelho, e o conteúdo de colágeno foi expresso como porcentagem da área ocupada pelo sinal positivo. Duas regiões de interesse foram analisadas: a parede do vaso, incluindo parte da adventícia, e outra restrita apenas à camada média.

3.7 Morfometria de fibras de colágeno

Fibras individuais de colágeno foram extraídas de imagens da microscopia confocal utilizando o software CT-FIRE39. A largura (width) e a retidão (straightness) das fibras foram as variáveis quantificadas. Para evitar pseudorreplacação devido ao número desigual de fibras por amostra, as fibras foram utilizadas apenas para cálculos estatísticos. Para cada animal e segmento arterial (RCA ou LCA), o valor mediano da largura ou da retidão das fibras foi calculado e utilizado como unidade de análise.

3.8 Morfometria de fibras elásticas

Lâminas coradas com Verhoeff/Van Gieson foram pré-processadas no ImageJ/Fiji para padronização das imagens antes da análise de fibras no CT-FIRE. Todas as imagens foram convertidas para 8 bits, invertidas e submetidas a um limiar fixo de intensidade (190–255), sendo então salvas como arquivos TIFF. A largura e a retidão das fibras de colágeno foram quantificadas utilizando o CT-FIRE. Para evitar pseudorreplacação, os dados ao nível de fibra foram resumidos utilizando o valor mediano por animal e segmento arterial (RCA ou LCA), sendo este utilizado como unidade de análise.

3.9 Imuno-histoquímica

Cortes com espessura de 3 μm foram montados em lâminas para análise imuno-histoquímica. Foi utilizado tampão citrato de sódio para recuperação antigênica induzida por calor. A coloração hematoxilina foi utilizada ou não como contracoloração. A imunomarcagem foi realizada utilizando o método cromogênico com diaminobenzidina (DAB). As imagens foram analisadas no Fiji (ImageJ) utilizando o plugin Colour Deconvolution para isolar a coloração de DAB. Para cada anticorpo, foi utilizado um valor de threshold para segmentação, padronizada para evitar viés de análise. Os seguintes anticorpos e diluições foram utilizados neste trabalho: anticorpo monoclonal de camundongo anti-PDI (RL90) (Invitrogen #MA3-019; diluição 1:100); anticorpo policlonal de coelho anti-PDI (N1N3) (GeneTex #GTX101468; diluição 1:300); anticorpo policlonal de coelho anti-alfa-actina (Abcam #Ab5694; diluição 1:100) e anticorpo policlonal de coelho anti-vimentina (Abcam #137321; diluição 1:500).

3.10 Análise estatística

Todas as análises foram realizadas no GraphPad Prism versão 10.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Para análise de fluxo, morfometria, quantificação de colágeno e resultados de imuno-histoquímica, os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. O teste de normalidade foi utilizado para avaliar distribuição gaussiana (normal). As comparações estatísticas entre os grupos TgPDIA1 e WT foram conduzidas utilizando teste t não pareado ou, quando especificado, ANOVA de duas vias com correção pós-teste de Tukey, ao nível de significância de 5%.

Para análise de fibras de colágeno e elastina, as comparações estatísticas foram realizadas por meio de comparações pareadas planejadas entre genótipos dentro do mesmo segmento arterial e entre segmentos arteriais dentro de cada genótipo. Como as distribuições dos dados não são normais, as comparações foram realizadas utilizando o teste de Mann-Whitney. Os dados são apresentados como mediana e intervalo interquartil (25%), de modo a avaliar especificamente a cauda inferior da distribuição, refletindo a subpopulação de fibras menos retas ou mais finas. Comparações baseadas em percentis foram realizadas utilizando o mesmo cálculo estatístico aplicado aos valores medianos. Todos os números de experimentos relatados representam réplicas biológicas.

4. Resultados

4.1 Efeitos da ligadura parcial da carótida (PCL) na dinâmica do fluxo arterial

Para documentar os efeitos do fluxo perturbado na ligadura parcial da artéria carótida (Fig. 4A), analisamos a velocidade do fluxo por ultrassonografia (Fig. 4B-C). O fluxo sanguíneo na LCA apresentou a esperada redução acentuada após PCL, tanto nas velocidades média quanto de pico do fluxo sanguíneo. A velocidade de pico apresentou valores negativos, indicando padrões consistentes com fluxo bidirecional, particularmente observados na porção proximal da artéria (LCA2), próxima à aorta. Esse cenário é semelhante ao originalmente descrito por Nam et al. (2009)³² corroborando com a ocorrência de fluxo turbulento e oscilatório. Essa redução foi consistentemente observada em todos os camundongos, sem diferenças entre os grupos *WT* e *TgPDIA1*. A artéria carótida direita (RCA) permaneceu inalterada e, portanto, foi utilizada como controle interno. Dados da função cardíaca pelo ecocardiograma também não apresentaram diferenças entre os grupos, indicando que a superexpressão de PDIA1 não altera o impacto hemodinâmico (Fig. 5A-E).

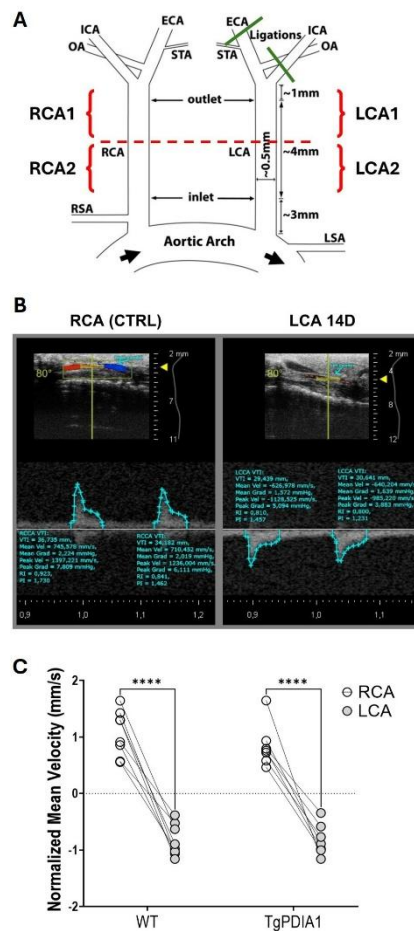


Figura 4. (A) Representação esquemática do modelo de PCL com os ramos ligados e a divisão da artéria carótida em regiões proximal (LCA2) e distal (LCA1), utilizadas para análises histomorfométricas. Adaptado de Nam et al., 2009; (B) Doppler do fluxo sanguíneo nas artérias carótida direita (RCA) e esquerda (LCA) no basal e 14 dias após a ligadura, demonstrando diferença do padrão de fluxo; (C) Quantificação da velocidade média do fluxo demonstrando redução acentuada após PCL. Não foram detectadas diferenças significativas entre os camundongos *WT* e *TgPDIA1*. *WT* N=8; *TG* N=10. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

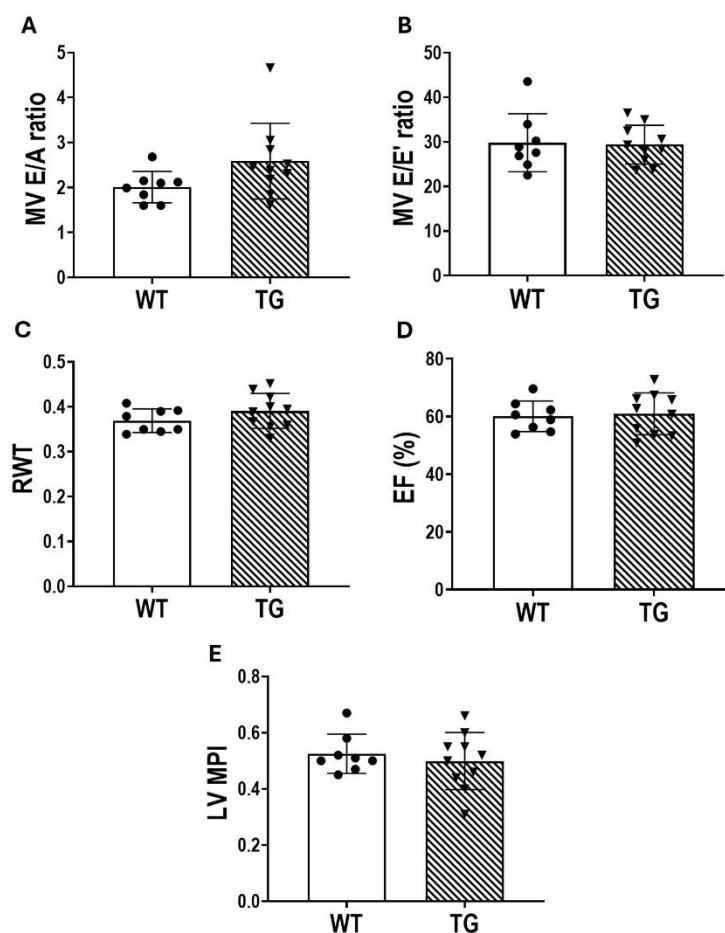


Figura 5. Parâmetros ecocardiográficos demonstrando estrutura e função cardíaca em camundongos TG em comparação aos WT. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos para (D) razão E/A da valva mitral, (E) razão E/E' da valva mitral, (F) espessura relativa da parede (RWT), (G) fração de ejeção (EF) ou (H) índice de massa ventricular esquerda (LVMI). WT N=8; TG N=10.

Considerando a mudança do padrão de fluxo na porção proximal (LCA2) (em comparação à distal LCA1) da artéria carótida ligada, realizamos a análise histomorfométrica em porções separadas denominadas 1 (distal) e 2 (proximal, próxima à aorta) de cada artéria (Fig. 4A). Tanto camundongos WT quanto *TgPDIA1* apresentaram, nas LCAs, aumento do calibre total, das áreas medial, neointimal e luminal 14 dias após PCL, caracterizando remodelamento expansivo (*outward*) neste modelo, com padrões distintos descritos a seguir.

4.2 A superexpressão de PDIA1 causa remodelamento vascular expansivo exacerbado após ligadura parcial da carótida

Para investigar o impacto da superexpressão de PDIA1 no remodelamento vascular, artérias carótidas foram coletadas 2 e 14 dias após a ligadura, com ênfase no tempo de 14 dias, quando o remodelamento estrutural é plenamente evidente. Dois dias após a ligadura, camundongos TgPDIA1 já exibiam aumento da área total do vaso em comparação com camundongos WT, indicando uma leve expansão externa precoce (Fig. 6).

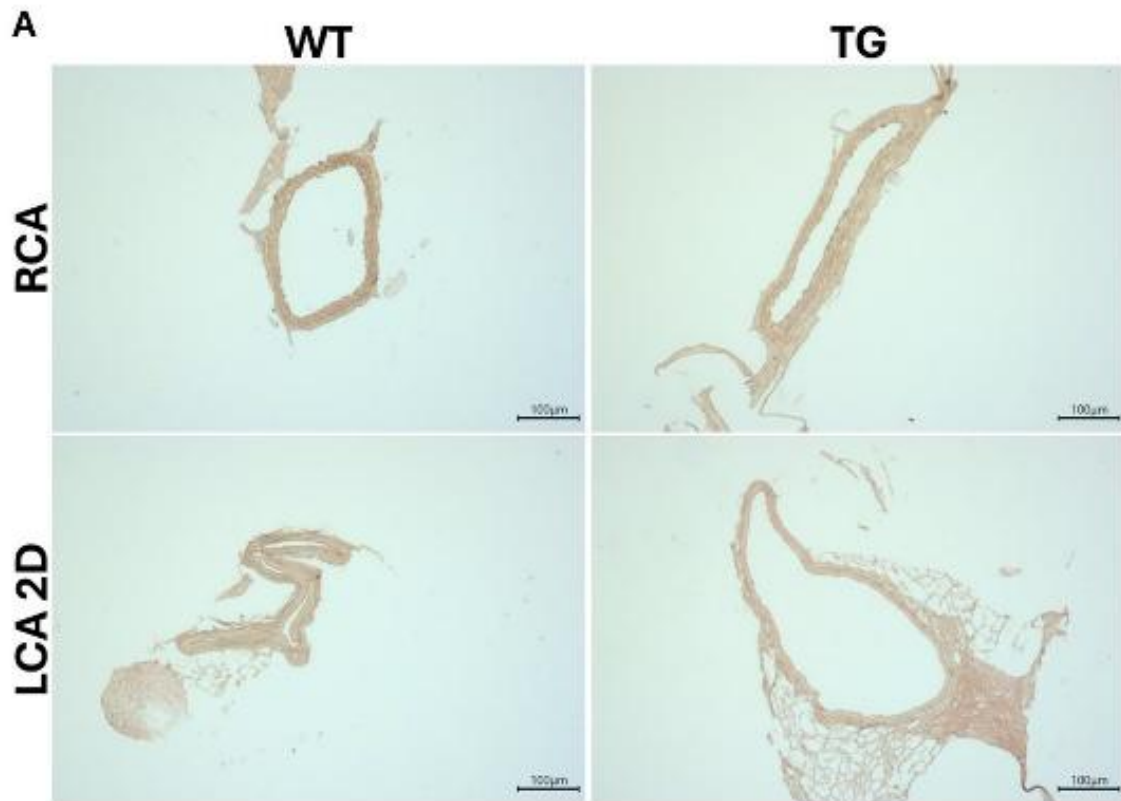


Figura 6.(A) Figura representativa de lâminas coradas com Verhoeff Van-Gieson 2 dias após a ligadura. Aumento de 10X.

Esse efeito foi mais claramente observado no segmento distal LCA1, enquanto o calibre global do segmento LCA2 e a área luminal de ambos os segmentos não atingiram significância estatística (Fig. 7A-F).

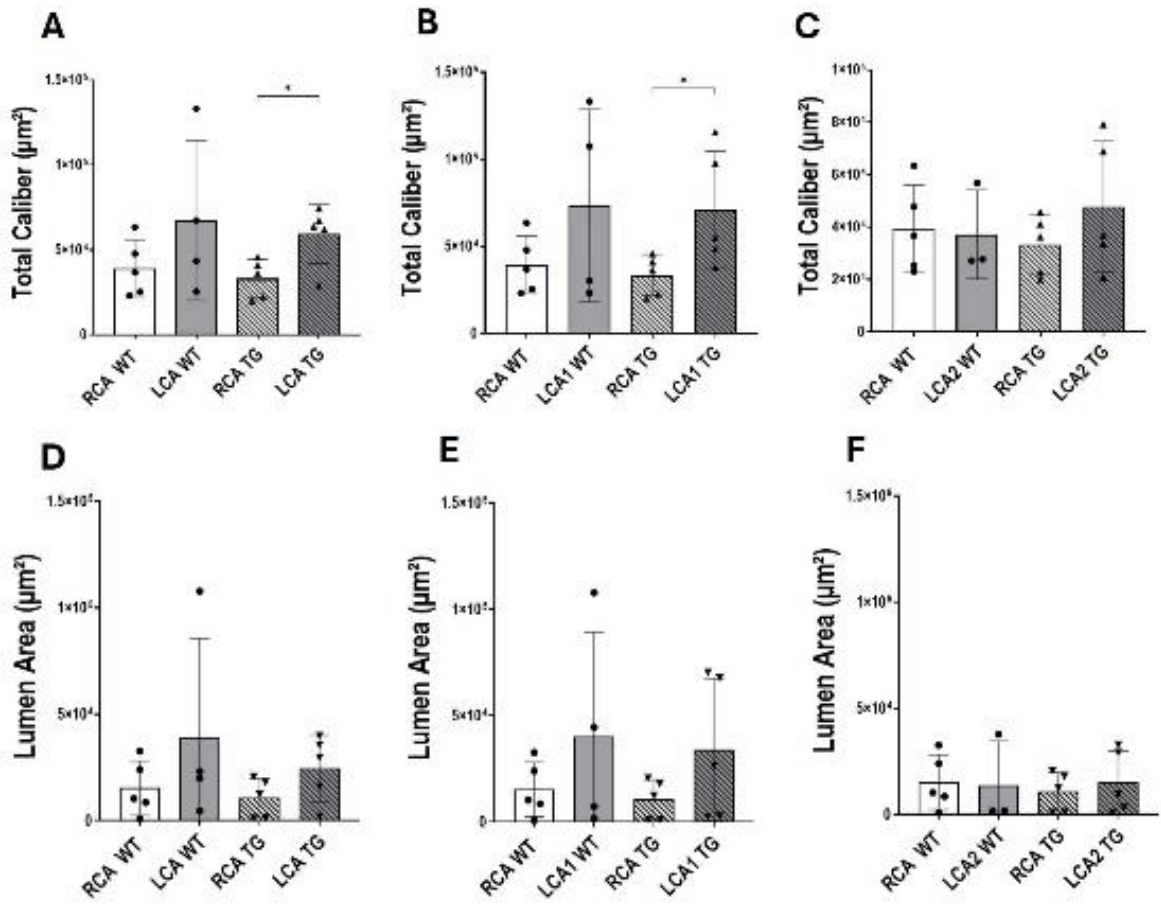


Figura 7. (A-C) Análise morfométrica demonstrando o calibre vascular total em RCA e segmentos LCA combinados (A) e separadamente para LCA1 (B) ou LCA2 (C); (D-F) semelhante aos gráficos A-C, demonstrando a área luminal. Abreviações e símbolos seguem aqueles descritos na legenda da Figura 4A. Cada ponto representa um segmento arterial da RCA ou LCA de um camundongo (média de duplicatas) e reflete réplicas biológicas. WT 2D RCA N=5; WT 2D LCA N=4; TG 2D RCA N=5; TG 2D LCA N=5.

A área medial e área total da parede também apresentaram leve aumento no segmento 1 de camundongos TgPDIA1 nesse tempo inicial (Fig. 8A-F). Não foram detectadas diferenças no índice de tensão da parede entre os genótipos (Fig. 8G-I).

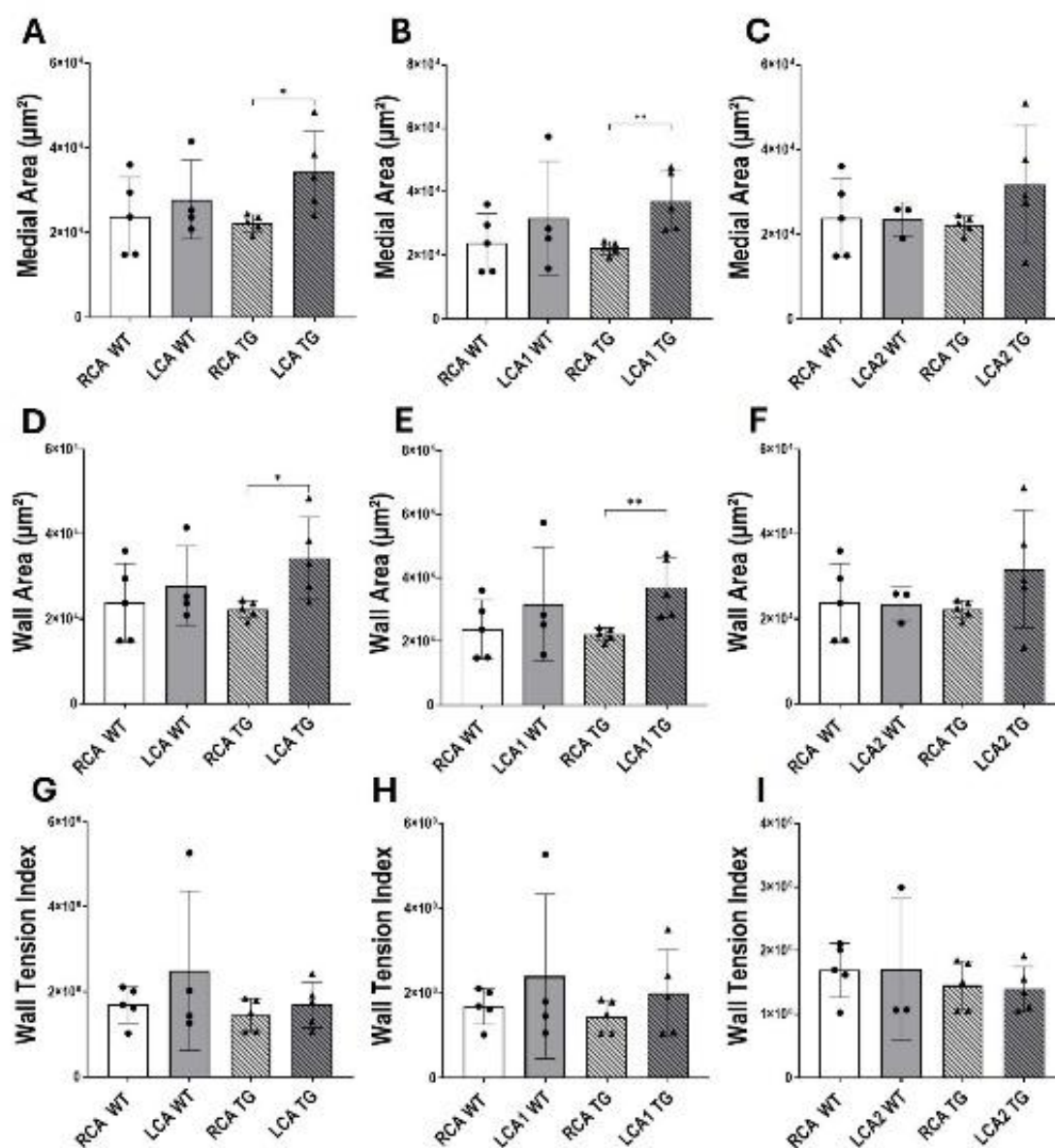


Figura 8. (A-C) Análise morfométrica da área média do vaso (A) e separadamente para LCA1 (B) ou LCA2 (C); (D-F) semelhante aos painéis A-C, demonstrando a área da parede; (G-I) semelhante aos painéis A-C, demonstrando o índice de tensão da parede. WT 2D RCA N=5; WT 2D LCA N=4; TG 2D RCA N=5; TG 2D LCA N=5.

Aos 14 dias após PCL, o remodelamento arterial foi evidente nas carótidas de camundongos WT e *TgPDIA1*, mas com efeito exacerbado no *TgPDIA1* (Fig. 9).

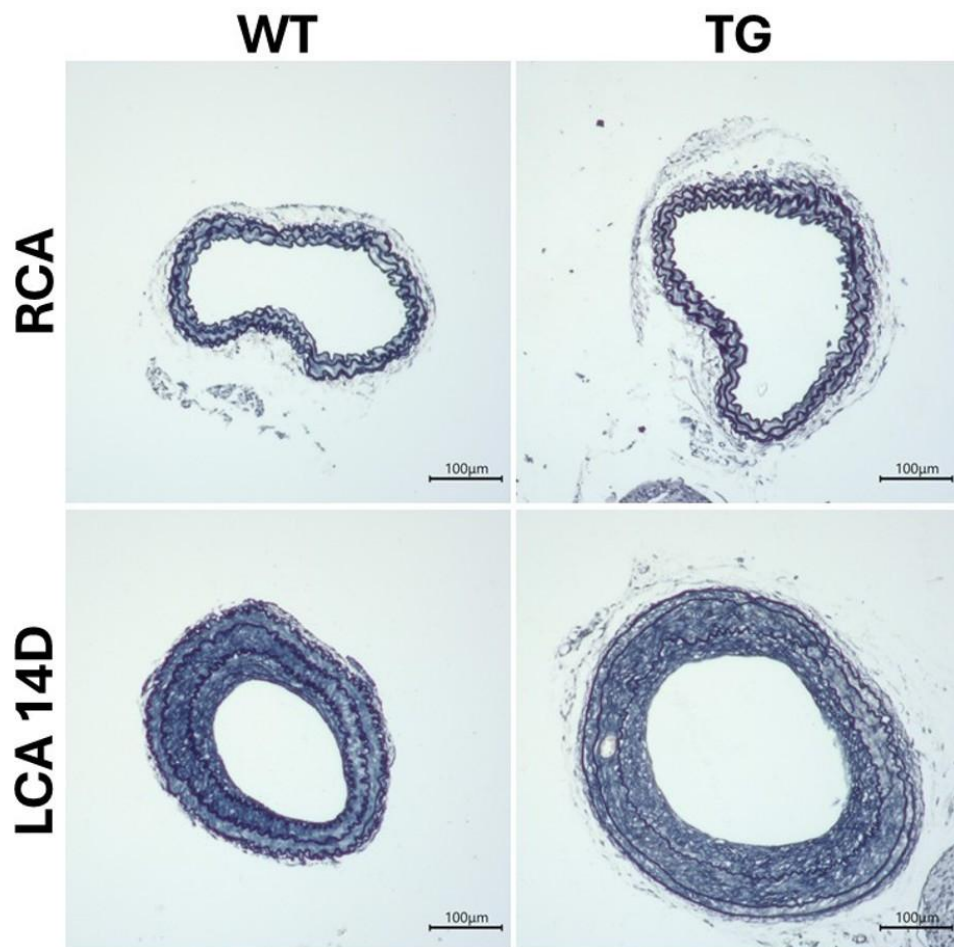


Figura 9. Figura representativa de lâminas coradas com Verhoeff Van-Gieson 14 dias após a ligadura. Aumento de 10X.

Isso foi demonstrado pelo aumento do calibre total do vaso (Fig. 10A-C) em camundongos TgPDIA1 em comparação com WT. A área luminal também apresentou comportamento semelhante, com aumento da área do lúmen no TgPDIA1 em relação a WT (Fig. 10D-F).

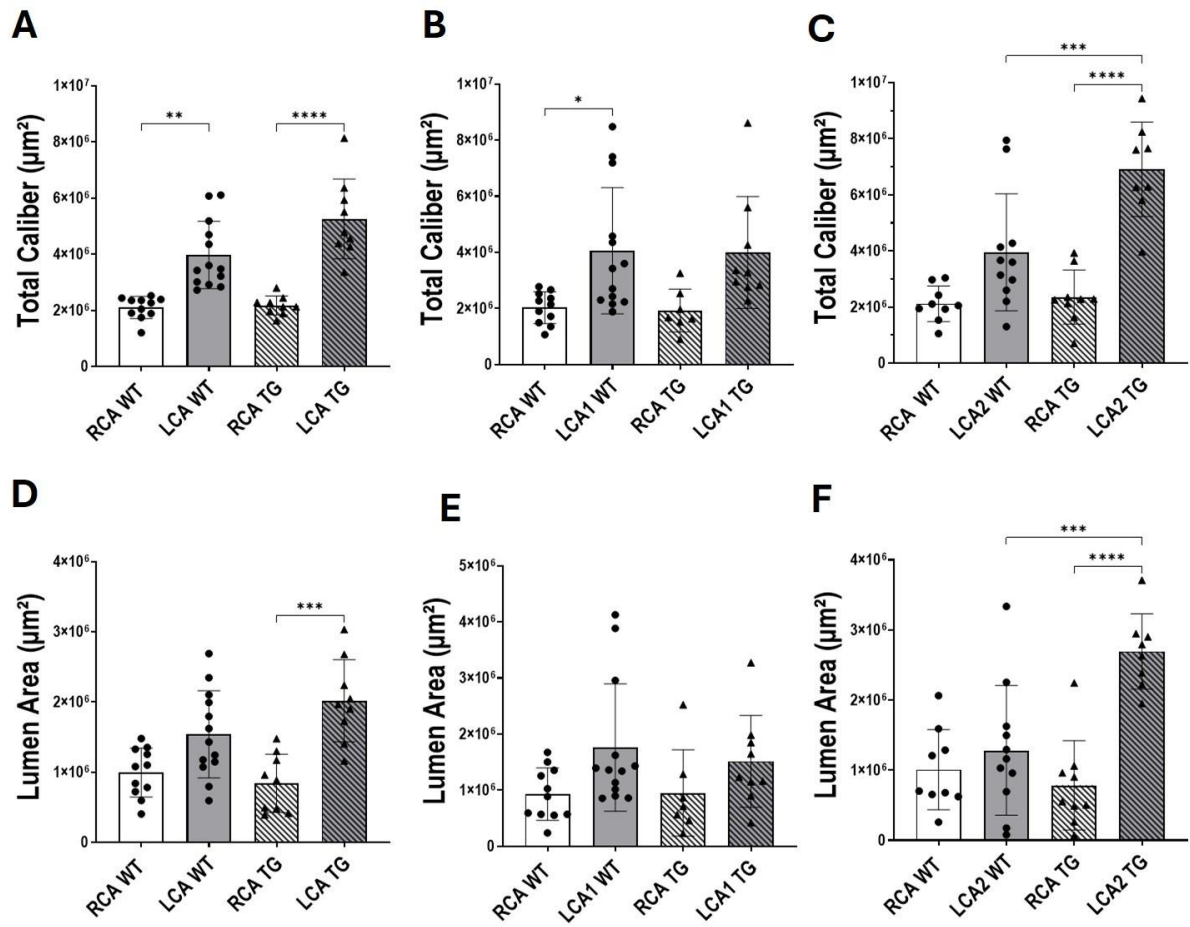


Figura 10. (A-C) Calibre total da LCA em camundongos WT e TG 14 dias após PCL. A análise foi realizada para segmentos proximal (LCA2) e distal (LCA1) combinados (A), ou separadamente para LCA1 (B) ou LCA2 (C); (D-F) semelhante aos painéis A-C, com análise da área luminal. Cada ponto representa o segmento arterial da RCA ou LCA de um camundongo (média de duplicatas). WT RCA N=11; WT LCA N=13; TG RCA N=9; TG LCA N=9.

Paralelamente, a área medial e neointimal também aumentaram significativamente tanto no camundongo WT quanto no *TgPDIA1*, porém de forma mais acentuada no *TgPDIA1*, particularmente no segmento LCA2, mais próximo da aorta (Fig. 11A-F). Enquanto isso, a razão íntima/média foi pouco afetada (Fig. 11G-I).

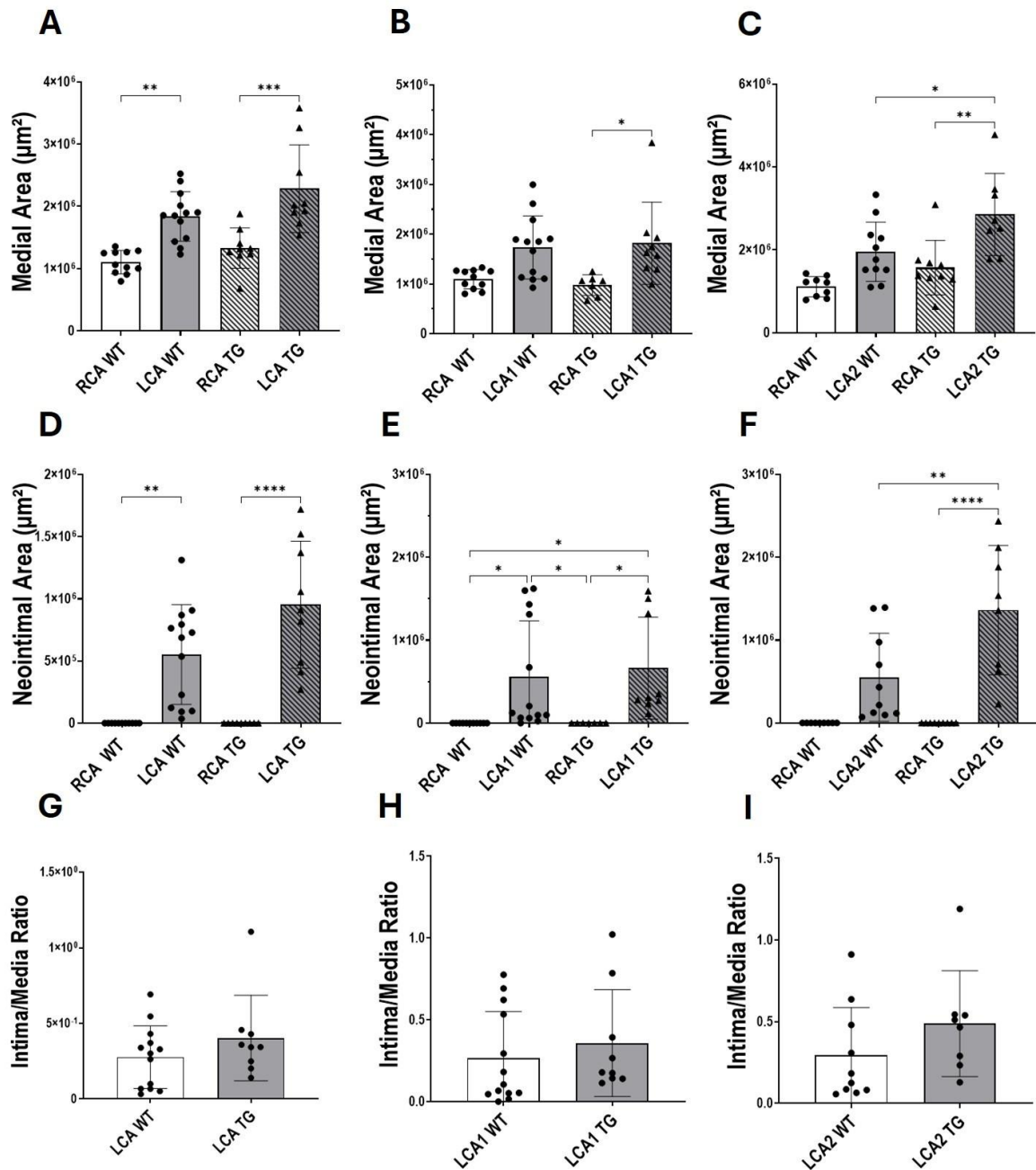


Figura 11. Quantificação da (A-C) área medial e (D-F) área neointimal, 14 dias após PCL.; (G-I) razão íntima/média 14 dias após PCL para segmentos LCA combinados (G) ou separadamente para segmentos LCA1 (H) ou LCA2 (I). Embora as áreas neointimal e medial estejam exacerbadas em camundongos TgPDIA1, a razão íntima/média não foi significativamente afetada. WT RCA N=11; WT LCA N=13; TG RCA N=9; TG LCA N=9.

De forma consistente, a área total da parede (média + íntima) também foi aumentada em camundongos TgPDIA1 em relação a WT (Fig. 12A-C) no segmento LCA2. De modo geral, tais alterações foram menos pronunciadas no segmento LCA1, enquanto a análise combinada dos segmentos 1 + 2 também revelou um remodelamento expansivo exacerbado na carótida TgPDIA1 em comparação à WT (Figs. 10-12). Isso indica remodelamento vascular mais pronunciado na região com mais fluxo turbulento e oscilatório. Importante destacar que, quando a área total do vaso foi normalizada pela área da parede, um índice utilizado como substituto da tensão da parede vascular, não foram observadas diferenças entre camundongos WT e TgPDIA1 (Fig. 12D-F), sugerindo que o remodelamento externo

aumentado nas artérias TgPDIA1 segue um processo regulado, provavelmente semelhante ao dos WT, ou seja, capaz de atingir um ponto de ajuste homeostático de tensão semelhante, apesar de diferentes calibres vasculares e massa de parede.

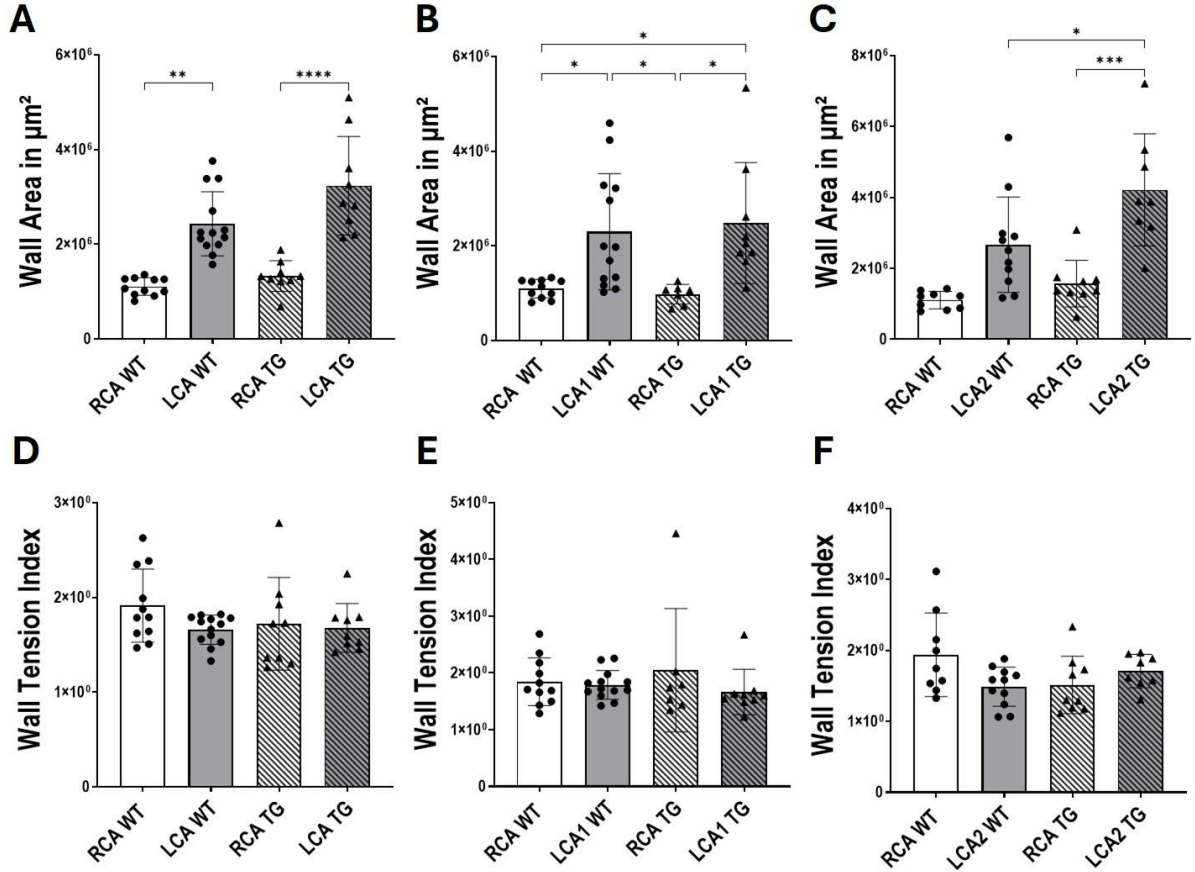


Figura 12. (A–C) Área total da parede (média + íntima) em segmentos LCA1+2 (A), segmento LCA1 (B) e LCA2 (C); (D–F) índice de tensão da parede (área total do vaso normalizada pela área da parede) não mostra diferença entre carótidas de camundongos WT e TG. WT RCA N=11; WT LCA N=13; TG RCA N=9; TG LCA N=9.

Em concordância com essa análise, a normalização da área das artérias ligadas em relação às respectivas artérias contralaterais controle (razão LCA/RCA) confirmou um aumento significativo semelhante no calibre e na área luminal em camundongos *TgPDIA1*, embora a diferença na área medial tenha perdido significância (Fig. 13). Em conjunto, esses dados demonstram que a superexpressão de PDIA1, em comparação com WT, leva a um remodelamento vascular expansivo exacerbado em resposta ao fluxo perturbado, sem evidência de desbalanço global da tensão da parede.

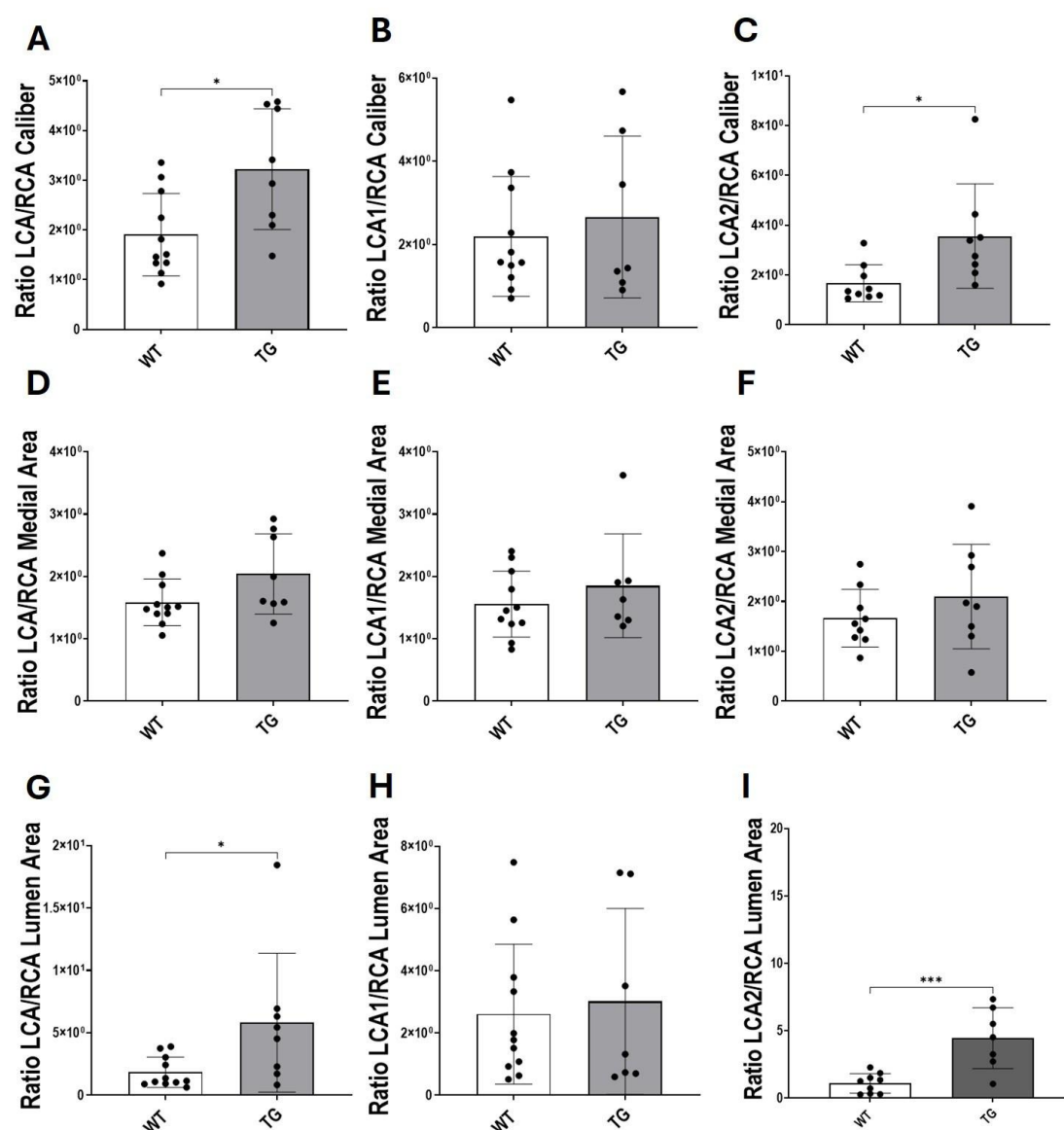


Figura 13. (A-C) Normalização do calibre vascular utilizando a razão LCA/RCA nos seguimentos 1+2 (A) e separadamente para LCA1 (B) ou LCA2 (C); (D-F) semelhante aos painéis A-C, demonstrando razão LCA/RCA da área da camada média; (G-I) semelhante aos painéis A-C, demonstrando a razão LCA/RCA da área do lúmen. WT 2D RCA N=5; WT 2D LCA N=4; TG 2D RCA N=5; TG 2D LCA N=5.

4.3 A superexpressão de PDIA1 associa-se à redução de colágeno birrefringente apesar do aumento do conteúdo total de colágeno

A análise da quantidade e da arquitetura da matriz extracelular (MEC) é essencial para caracterizar o remodelamento vascular. Assim, avaliamos inicialmente a organização das fibras de colágeno utilizando coloração Picrosirius sob luz polarizada³⁶ (Fig. 14). Com essa técnica, as fibras de colágeno exibem propriedades de birrefringência, revelando um espectro de cores que varia do verde (baixa birrefringência) ao amarelo e vermelho (alta birrefringência). Esse espectro varia de acordo com o empacotamento das fibras: verde indica fibras frouxamente organizadas, enquanto vermelho indica fibras densamente empacotadas^{40–42}.

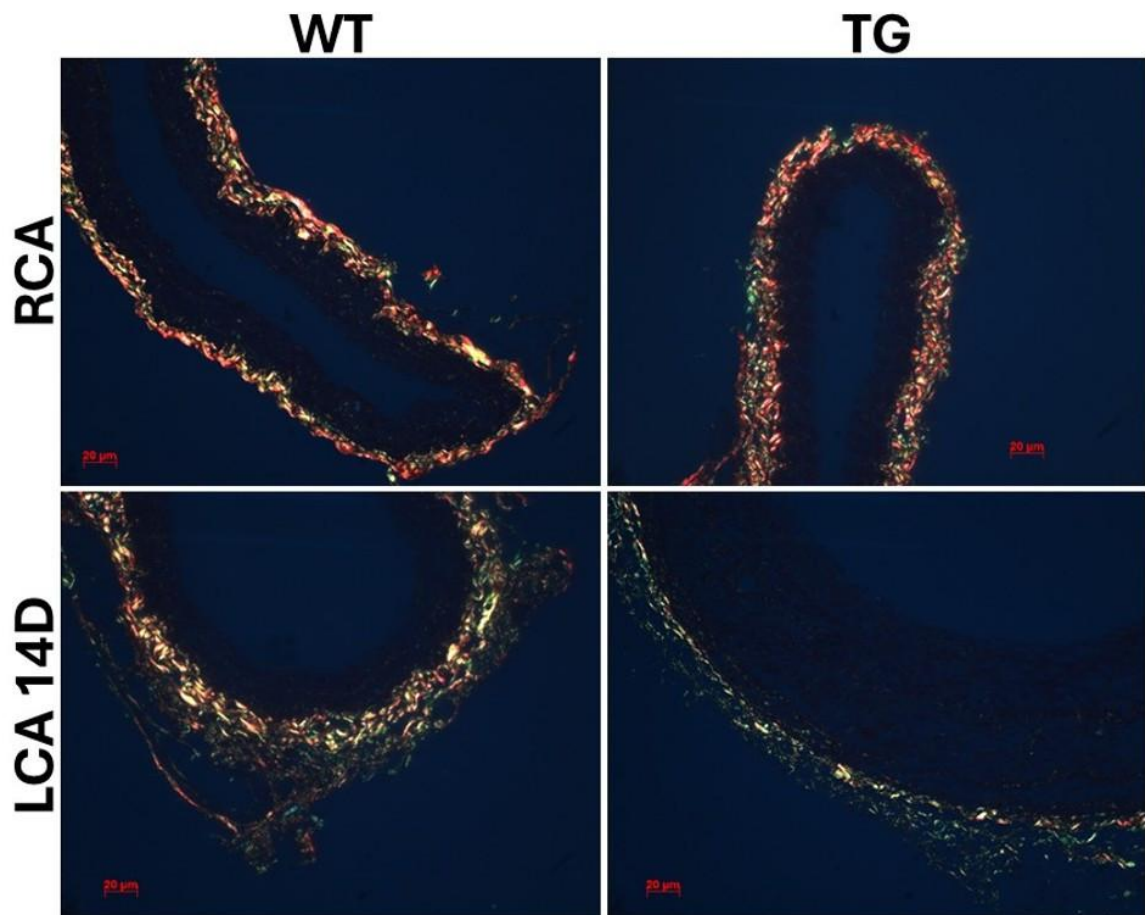


Figura 14. Figura representativa de lâminas coradas com picrosirius sob luz polarizada. Aumento de 40x.

As LCAs ligadas de camundongos TgPDIA1 exibiram redução significativa (aproximadamente 40–60%) no colágeno birrefringente em comparação com camundongos WT na camada adventícia (Fig. 15A-F). Tanto a fração de área de colágeno de baixa birrefringência (verde) (Fig. 15A-C) quanto a de alta birrefringência (vermelho) (Fig. 15D-F) foram significativamente reduzidas em camundongos TgPDIA1 em ambos os segmentos LCA1 e LCA2, com discreta acentuação para o colágeno de baixa birrefringência no segmento LCA2 (Fig. 15C).

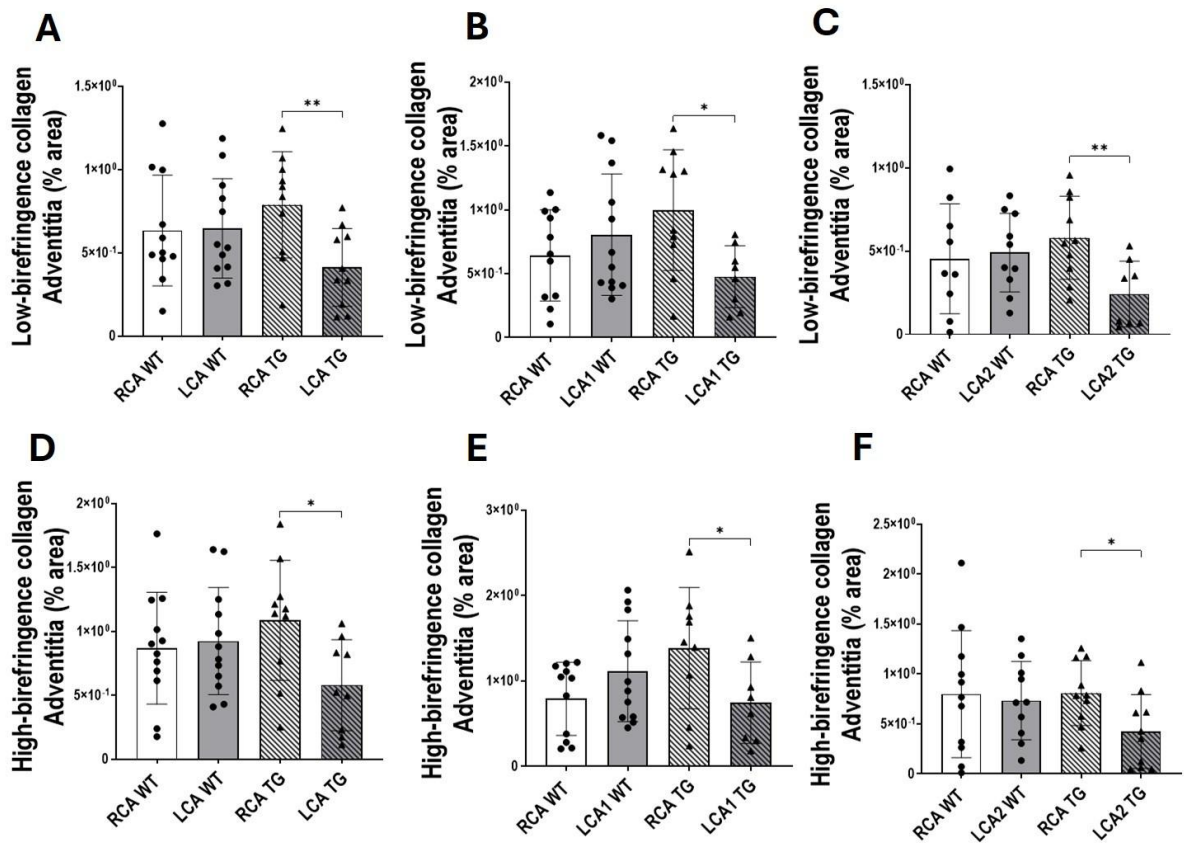


Figura 15. (A-C) Quantificação da fração de área de colágeno de baixa birrefringência (verde) na adventícia em RCA e segmentos LCA1+2 (A) e separadamente para segmentos LCA1 (B) ou LCA2 (C); (D-F) Quantificação da fração de área de colágeno altamente birrefringente (vermelho) na adventícia em RCA e segmentos LCA1+2 (D) e separadamente para segmentos LCA1 (E) ou LCA2 (F). WT RCA N=11; WT LCA N=12; TG RCA N=10; TG LCA N=10.

Em contraste, a birrefringência do colágeno na camada média apresentou valores relativamente menores de forma geral, com diferenças discretas detectadas entre TgPDIA1 e WT (Fig. 16A-F). Esses achados indicam que camundongos TgPDIA1 apresentam organização fibrilar do colágeno prejudicada detectável por esses métodos após PCL.

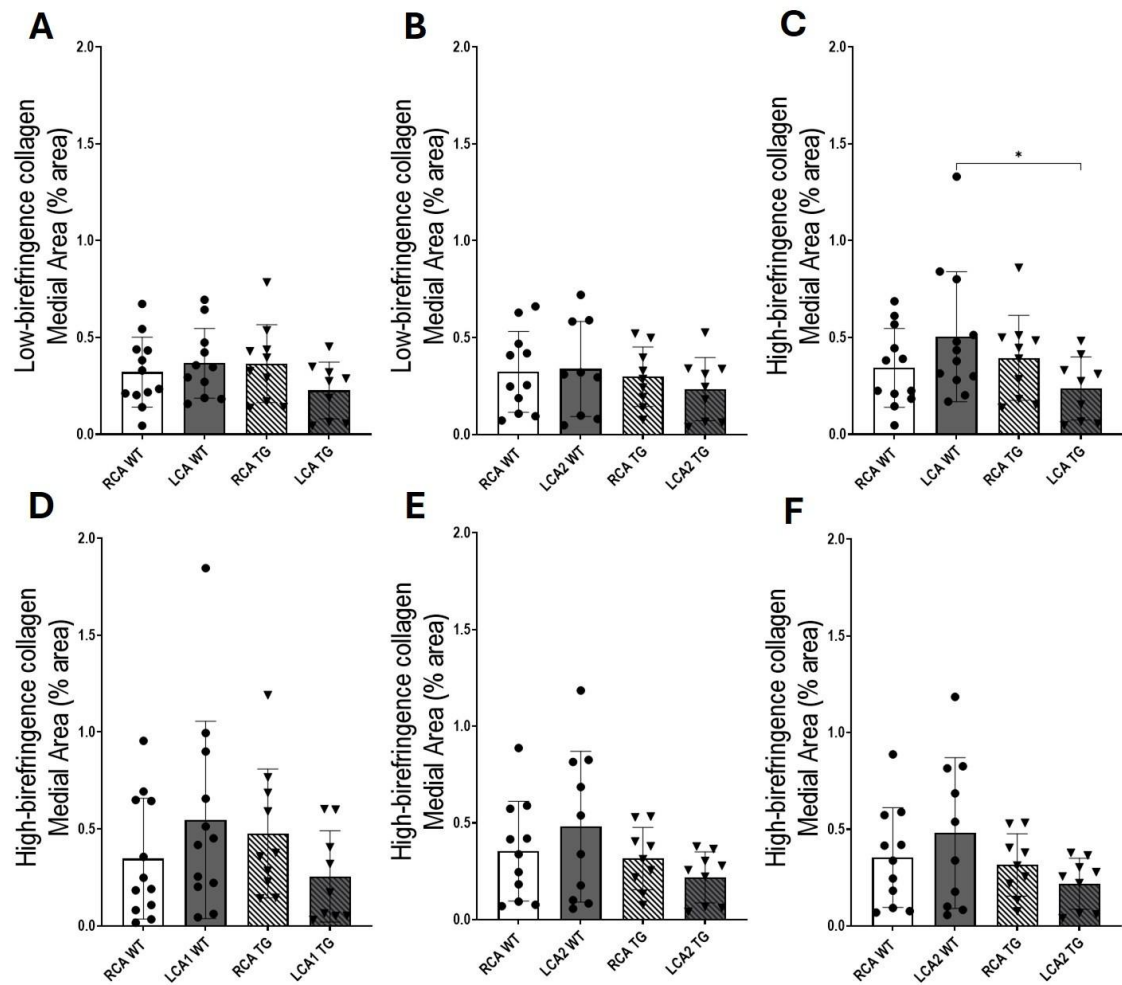


Figura 16. (A-C) Quantificação da fração de área de colágeno de baixa birrefringência (verde) na camada média em RCA e segmentos LCA1+2 (A) e separadamente para LCA1 (B) ou LCA2 (C); (D-F) Quantificação da fração de área de colágeno altamente birrefringente (vermelho) na camada média em RCA e segmentos LCA1+2 (D) e separadamente para LCA1 (E) ou LCA2 (F). WT RCA N=11; WT LCA N=12; TG RCA N=10; TG LCA N=10.

Paralelamente, as mesmas lâminas coradas com Picrosirius foram submetidas à análise de colágeno por microscopia confocal, a qual detecta fibras de colágeno independentemente da birrefringência (ou seja, independentemente de sua organização fibrilar de alto nível) e, portanto, reflete o conteúdo total de colágeno, incluindo fibras menos organizadas e/ou imaturas⁴³. Em contraste com a análise óptica, a análise confocal revelou aumento da área positiva para colágeno nas artérias carótidas ligadas de camundongos TgPDIA1 em comparação com WT (Fig. 17A-D). Essa aparente discrepância indica que, embora o conteúdo total de colágeno esteja aumentado nas artérias TgPDIA1, uma fração substancial não adquire a organização supramolecular necessária para gerar forte birrefringência. Assim, a superexpressão de PDIA1 causa o acúmulo de colágeno acompanhado por prejuízo em sua maturação e/ou organização durante o remodelamento vascular induzido por fluxo.

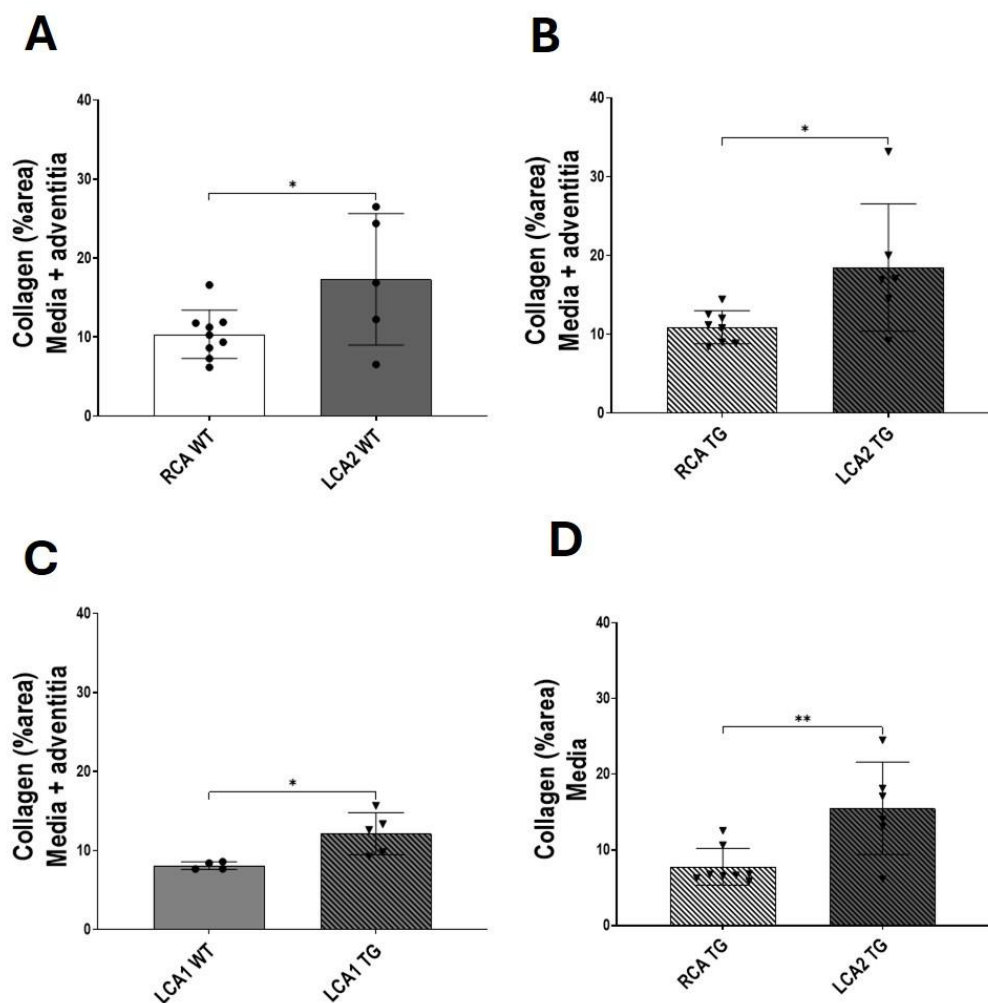


Figura 17. Quantificação da área total de colágeno (coloração por Picrosirius em microscopia confocal) demonstrando aumento da deposição no segmento LCA2 (proximal) como resultado do remodelamento de matriz extracelular em (A) camundongos WT e (B) TgPDIA1; (C) e (D) indicam que a deposição de colágeno tanto na média + adventícia do segmento LCA1 (C) quanto na média do segmento LCA2 (D) foi mais pronunciada em camundongos TgPDIA1. WT RCA N=9; WT LCA N=6; Tg RCA N=8; Tg LCA N=6.

4.4 A superexpressão de PDIA1 associa-se a alterações na arquitetura das fibras de colágeno e elastina

Para compreender como a superexpressão de PDIA1 afeta a arquitetura global da MEC, utilizamos o software CT-FIRE para analisar fibras individuais de colágeno ou elastina. Nas artérias RCA, camundongos TgPDIA1 exibiram apenas diferenças sutis na retidão das fibras de colágeno em comparação com WT (Fig. 18A). No entanto, 14 dias após PCL, artérias ligadas do TgPDIA1 apresentaram aumento da população de fibras curvas (valores próximos de 0) em comparação com WT (Fig. 18B). Essas alterações são consistentes com uma rede de colágeno menos organizada em camundongos TgPDIA1 no contexto do remodelamento vascular induzido por fluxo perturbado.

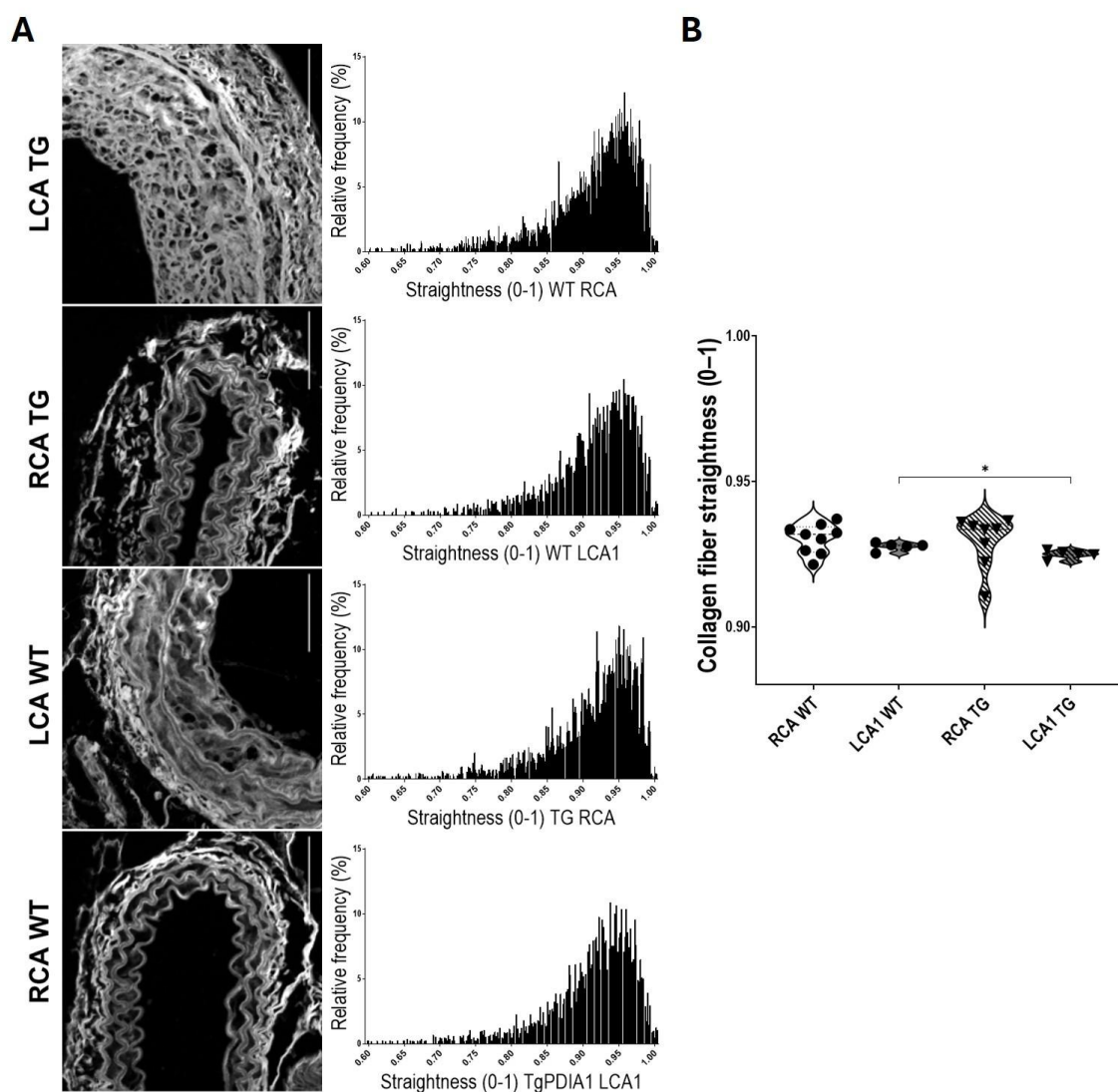


Figura 18. (A) Imagem representativa da análise por microscopia confocal de lâminas coradas com Picrosirius e distribuição de frequência da retidão das fibras de colágeno; (B) Aumento da população de fibras curvas identificadas em segmentos LCA1 após PCL, demonstrando um valor ligeiramente maior no grupo TgPDIA1 em relação a WT. WT RCA N=9; WT LCA N=6; TG RCA N=8; TG LCA N=6.

Em paralelo, a análise das fibras de elastina (Fig. 19A-D) revelou que, em artérias ligadas de camundongos *TgPDIA1*, as fibras de elastina eram significativamente mais finas em comparação com *WT*, conforme refletido por uma menor população de fibras mais largas (Fig. 19E-G). Esse padrão populacional de fibras em camundongos *TgPDIA1* também pode ser observado ao comparar fibras de colágeno de RCA com LCA (Fig. 18). Nenhuma alteração foi observada em camundongos *WT* (Fig. 19E).

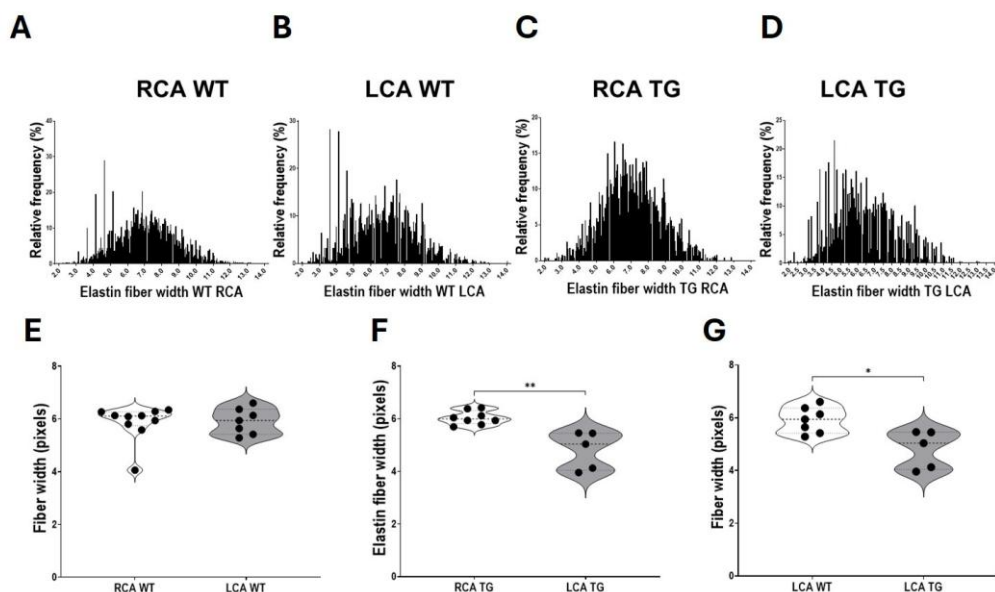


Figura 19. (A-D) Distribuição das fibras de elastina, de acordo com sua largura em pixels de cada segmento, dos grupos WT e TgPDIA1. (E-G) gráficos do tipo violin plot representando a análise da largura das fibras elásticas dos segmentos RCA e LCA de carótidas WT e TgPDIA1 14 dias após PCL. Camundongos WT mantêm o perfil de largura das fibras em LCA após PCL (E), em contraste com carótidas dos camundongos TgPDIA1, que apresentam fibras mais finas em comparação tanto às respectivas RCA (F) quanto aos segmentos LCA dos camundongos WT (G). WT RCA N=10; WT LCA N=5; TG RCA N=8; TG LCA N=5.

Interessantemente, a autofluorescência da elastina em imagens confocais (Fig. 20A) mostrou aumento do conteúdo de elastina em artérias carótidas ligadas de TgPDIA1 (Fig. 20B). Estes dados indicam que a superexpressão de PDIA1 influencia a reorganização da arquitetura estrutural das redes de elastina durante o remodelamento vascular.

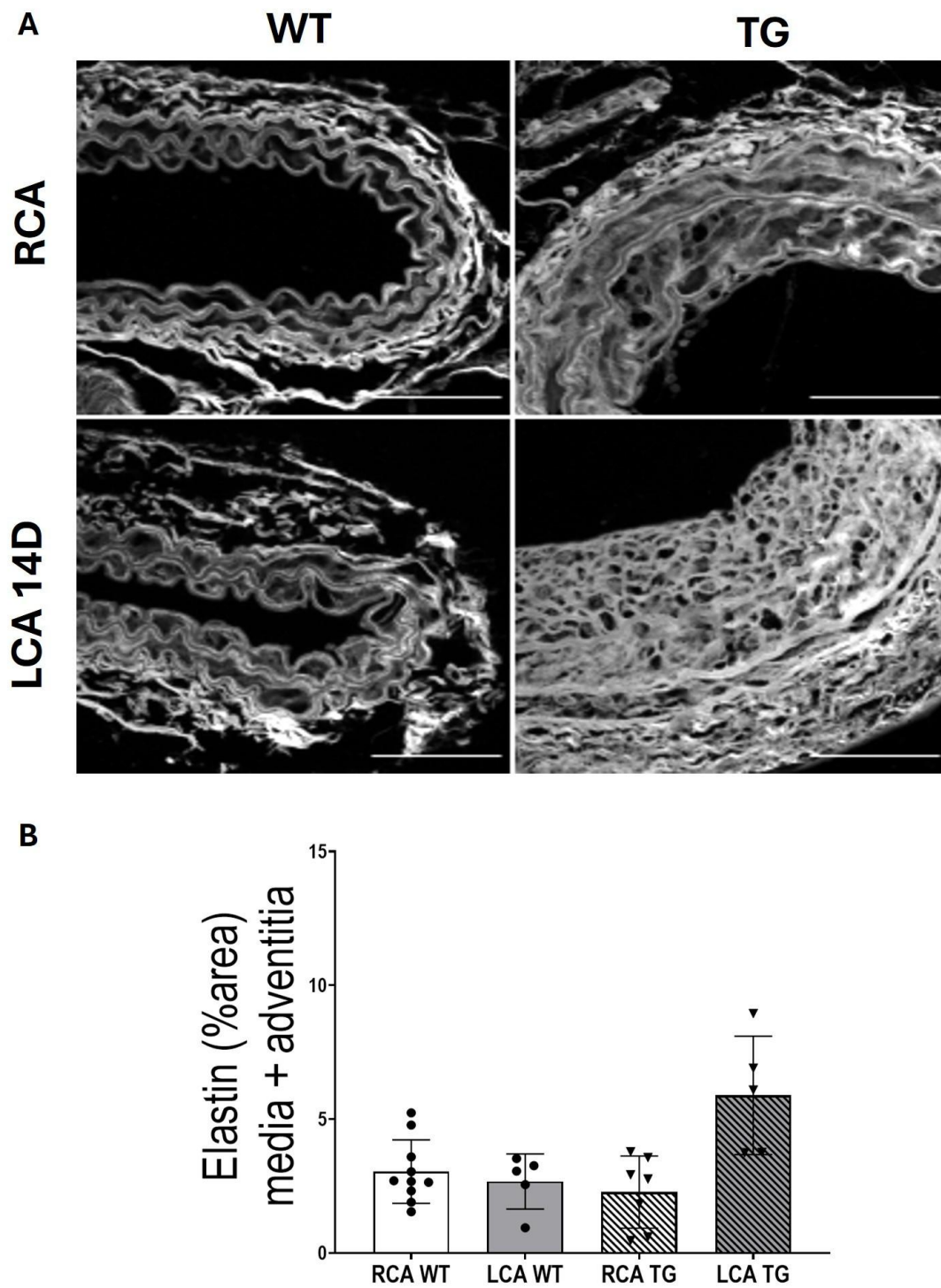
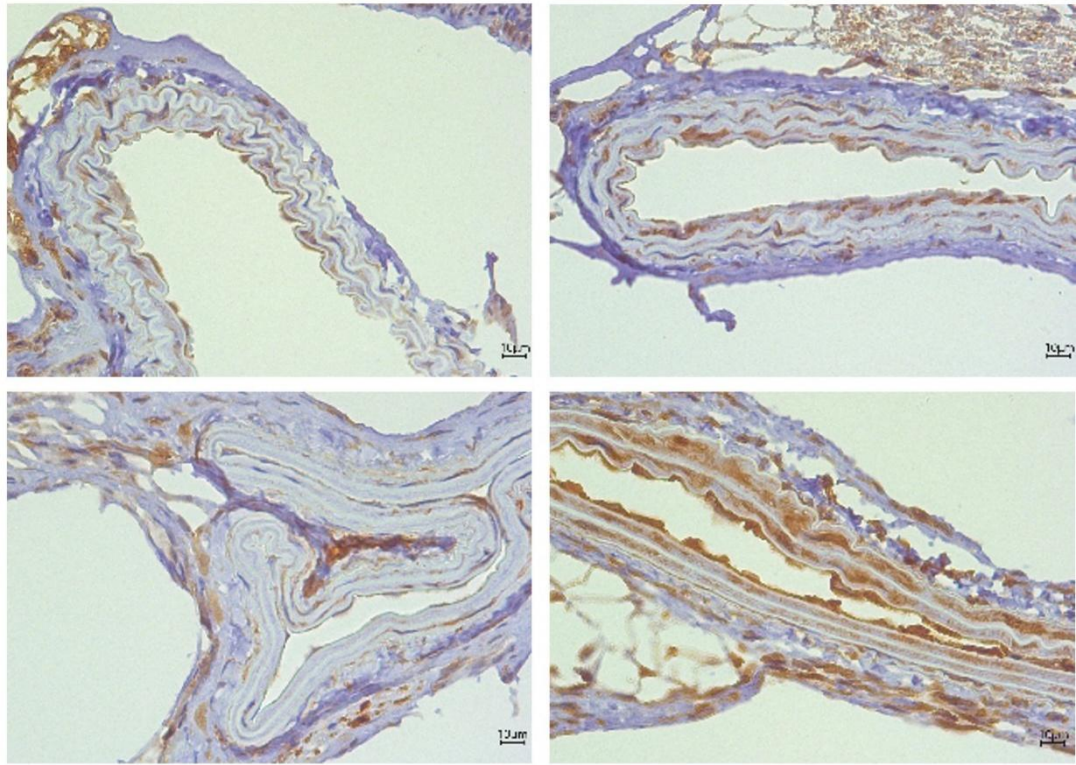


Figura 20. (A) Figura representativa de microscopia confocal demonstrando autofluorescência da elastina 14 dias após PCL em camundongos WT e TgPDIA1; (B) Quantificação, relacionada ao painel A, da área de elastina em segmentos RCA e LCA, demonstrando aumento do sinal nas LCA dos camundongos TgPDIA1 após PCL. WT RCA N=10; WT LCA N=5; TG RCA N=8; TG LCA N=5.

4.5 Análise imuno-histoquímica da parede vascular

Em seguida, avaliamos os efeitos da superexpressão de PDIA1 em características fenotípicas da parede vascular na presença ou ausência de PCL por meio de imuno-histoquímica (Figs. 21-24, 27-28). Artérias ligadas dos camundongos TgPDIA1 e WT não apresentaram diferenças ao investigar a marcação de vimentina 2 dias após PCL (Fig. 21A, B), mas após 14 dias houve aumento significativo na expressão de vimentina, não havendo alterações nas RCAs (Fig. 22A-C), indicando remodelamento da rede de filamentos intermediários. Resultados semelhantes foram observados na camada íntima mais interna de células, a 1,5 μ m de distância do lúmen, composta por células endoteliais e possivelmente outras células mais diretamente expostas aos efeitos do fluxo perturbado. Nessa camada, artérias ligadas de TgPDIA1 também exibiram aumento da expressão de vimentina (Fig. 22C). Isso indica que células endoteliais também estão provavelmente envolvidas na reprogramação fenotípica da parede vascular, como demonstrado recentemente para esse modelo⁴⁴, e esse efeito parece ser estimulado em camundongos TgPDIA1.

A



B

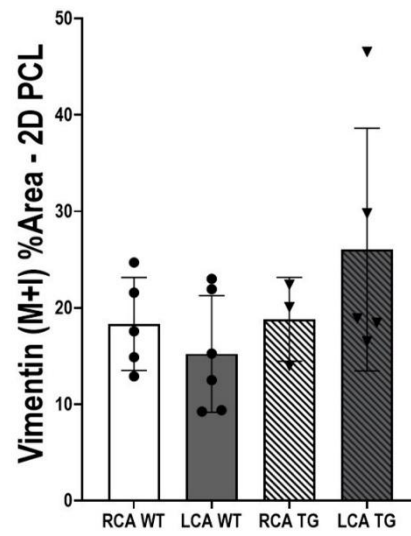


Figura 21. (A) Imunomarcação de vimentina contracorado com hematoxilina 2 dias após ligadura parcial de carótida e (B) quantificação da marcação de vimentina. Imagens com aumento de 40x. WT 2D RCA N=5; WT 2D LCA N=6; TG 2D RCA N=5; TG 2D LCA N=4.

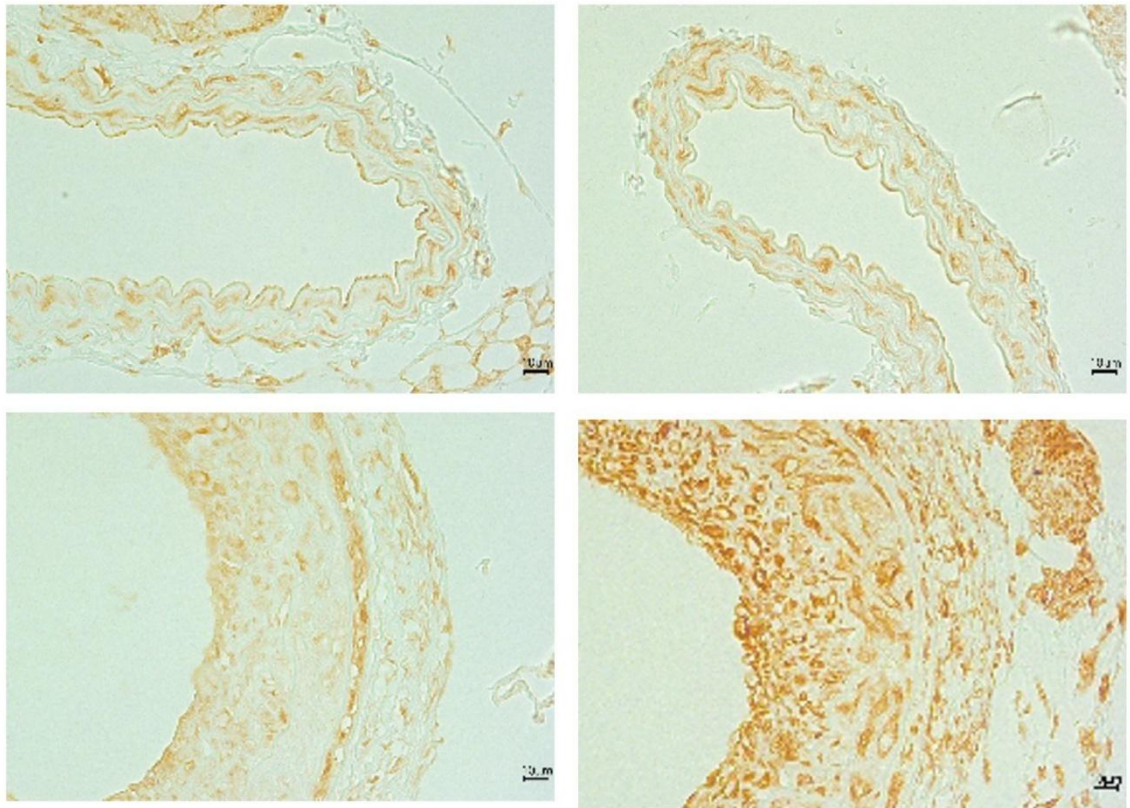
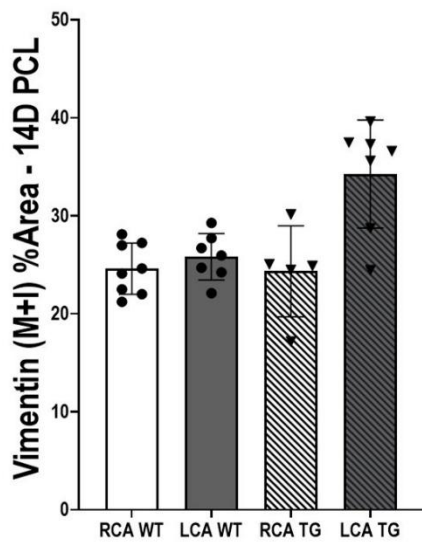
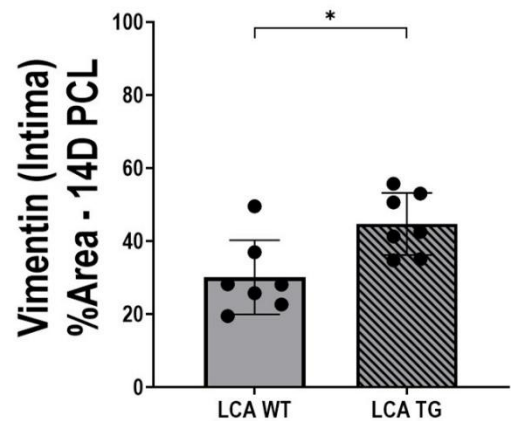
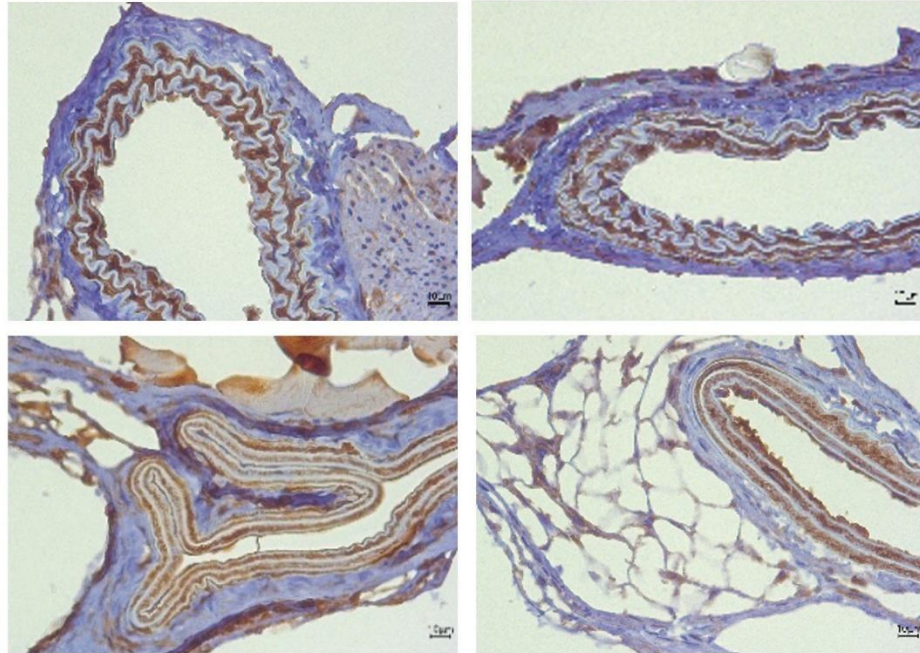
A**B****C**

Figura 22. (A) Imunomarcaco de vimentina sem contra-coloraco 14 dias aps ligadura parcial de cartida; (B) quantificaco da marcaco de vimentina na camada mdia e neotima; (C) quantificaco da marcaco de vimentina na camada tima mais interna (1,5 µm de distncia do lmen). Imagens com aumento de 40x. WT 14D RCA N=8; WT 14D LCA N=7; TG 14D RCA N=5; TG 14D LCA N=7.

A expressão de alfa-actina, que reflete o fenótipo contrátil de células musculares lisas vasculares (VSMC), não foi alterada na RCA de camundongos TgPDIA1, em concordância com dados prévios³³. O mesmo resultado foi observado nos segmentos LCA aos 2 dias pós PCL (Fig. 23A, B).

A



B

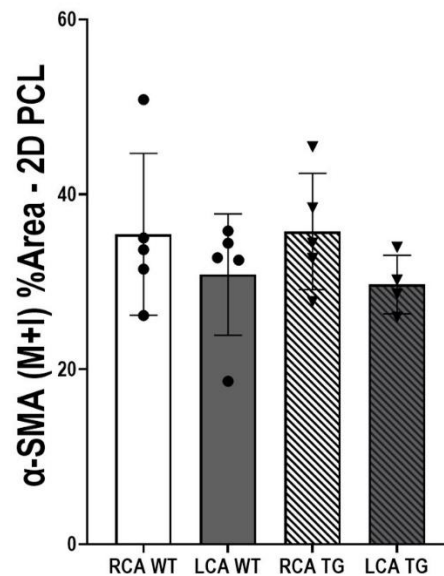
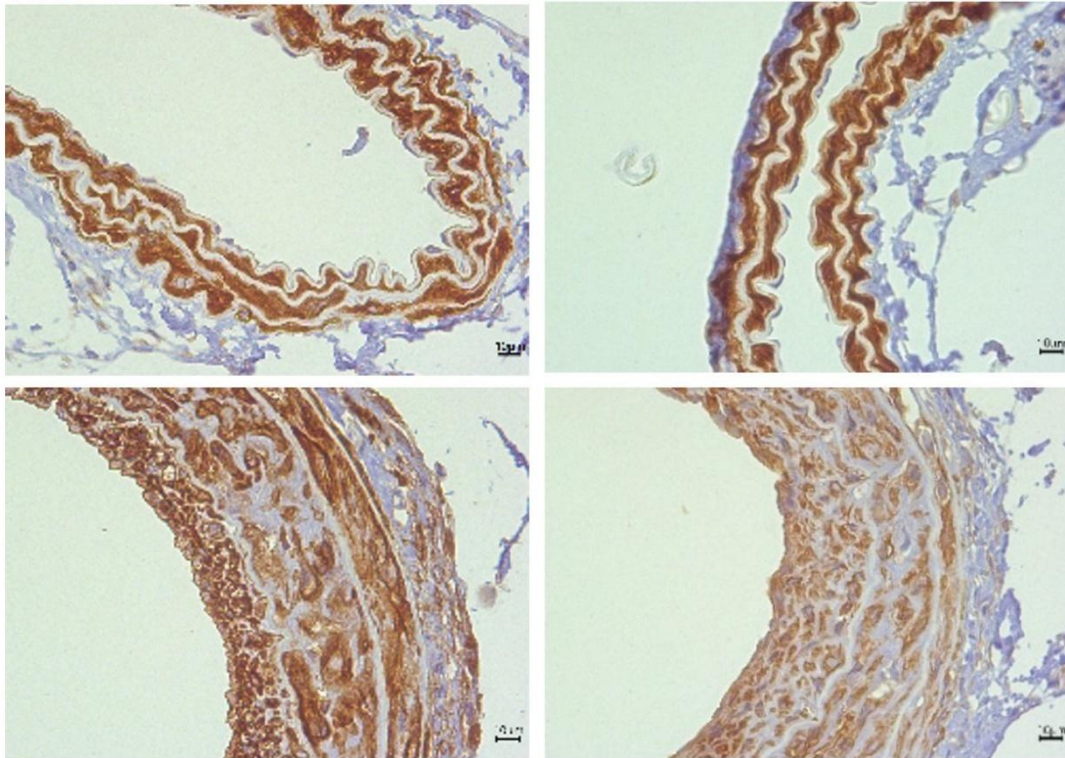


Figura 23. (A) Imunomarcção de alfa-actina contracorado com hematoxilina 2 dias após ligadura parcial de carótida e (B) quantificação da marcação de alfa actina. Imagens com aumento de 40x. WT 2D RCA N=5; WT 2D LCA N=6; TG 2D RCA N=5; TG 2D LCA N=4.

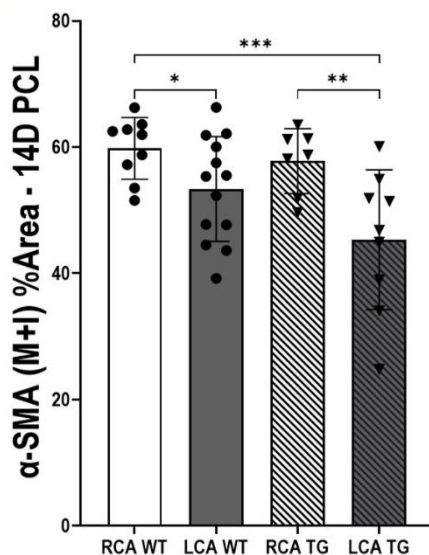
Após 14 dias da ligadura, a expressão de alfa-actina (Fig. 24A) foi levemente reduzida em camundongos WT. Esta redução também foi detectada nos camundongos TgPDIA1, de forma mais intensa (Fig. 24A, B). Assim como foi observado a marcação de vimentina na camada íntima das carótidas ligadas, a marcação de alfa-actina foi analisada nesta região,

apresentando apenas uma leve tendência à diminuição de marcação, sem relevância estatística (Fig. 24C).

A



B



C

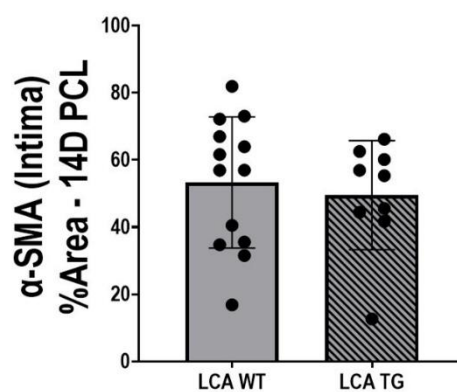


Figura 24. (A) Imunomarcção de alfa-actina com contra-coloração de hematoxilina 14 dias após ligadura parcial de carótida; (B) quantificação da marcação de alfa-actina na camada média e neoíntima; (C) quantificação da marcação de alfa-actina na camada íntima mais interna (1,5 μ m de distância do lúmen). Imagens com aumento de 40x. WT 14D RCA N=8; WT 14D LCA N=7; TG 14D RCA N=5; TG 14D LCA N=7.

A densidade celular na parede vascular foi significativamente reduzida em artérias TgPDIA1 aos 2 dias após PCL, possivelmente devido ao aumento de morte celular (Fig. 25A). Ao analisar os segmentos LCA1 e LCA2 separadamente, este efeito é atenuado (Fig. 25C, D).

Em contraste, aos 14 dias após PCL (Fig. 26A), a densidade celular foi significativamente aumentada nas artérias ligadas dos camundongos TgPDIA1 (Fig. 26B) principalmente no segmento LCA2 (Fig. 26D), consistente com a perda parcial do fenótipo contrátil das VSMCs (Fig. 24B).

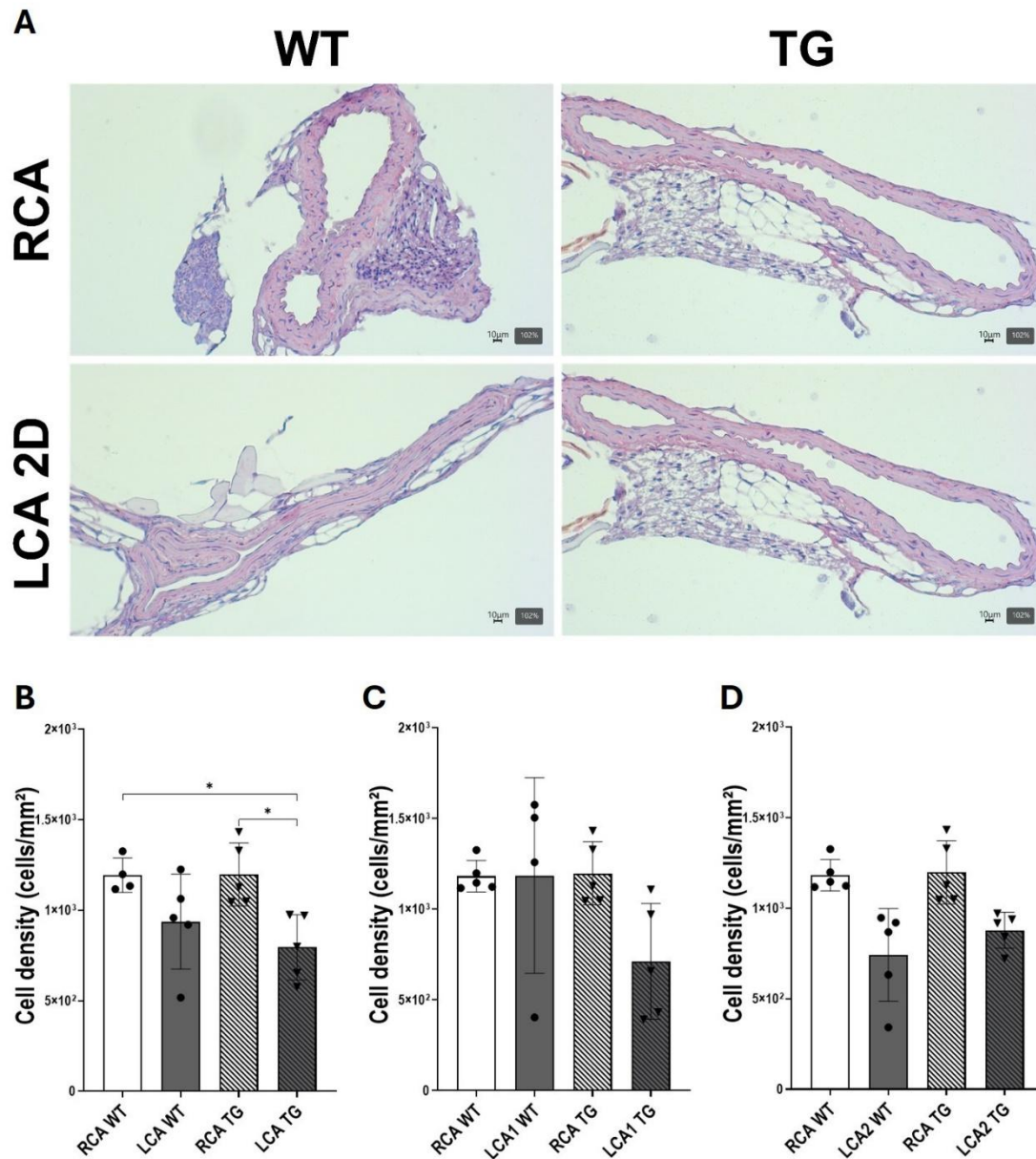


Figura 25. (A) Lâminas coradas com hematoxilina e eosina coletadas 2 dias após PCL; (B) análise morfométrica quantitativa da densidade celular em RCA e segmentos LCA1+2 de camundongos WT ou TgPDIA1; (C-D) Análise da densidade celular separadamente para segmentos LCA1 (C) ou LCA2 (D). WT 2D RCA N=4; WT 2D LCA N=5; TG 2D RCA N=5; TG 2D LCA N=5.

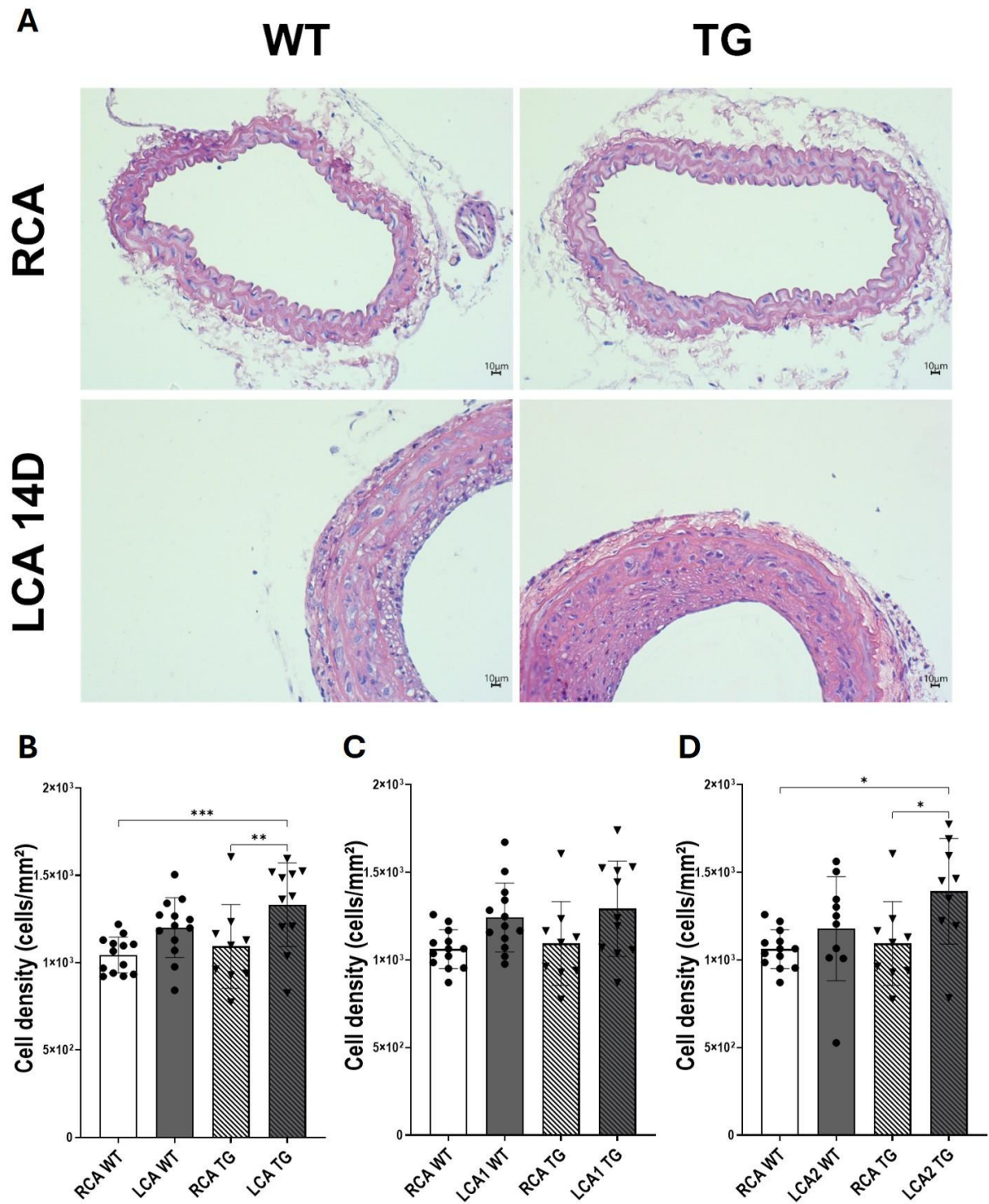
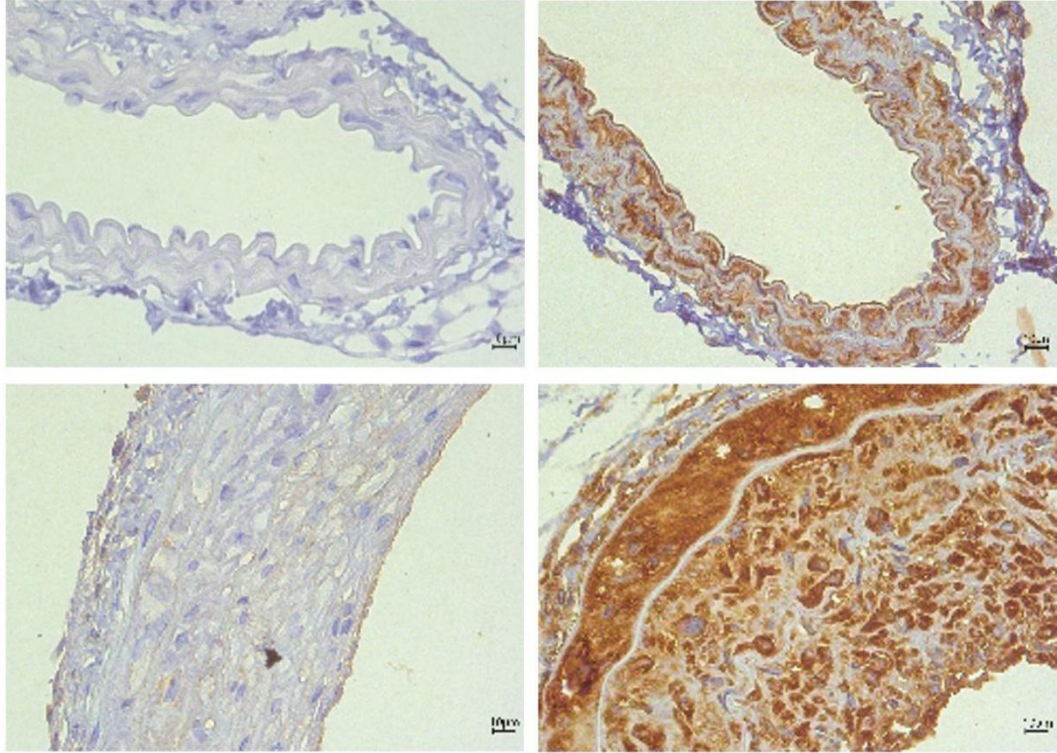


Figura 26. (A) Lâminas coradas com hematoxilina e eosina coletadas 14 dias após PCL; (B) análise morfométrica quantitativa da densidade celular em RCA e segmentos LCA1+2 de camundongos WT ou TgPDIA1; (C-D) Análise da densidade celular separadamente para segmentos LCA1 (C) ou LCA2 (D). WT 14D RCA N=13; WT 14D LCA N=13; TG 14D RCA N=9; TG 14D LCA N=11.

Em camundongos TgPDIA1, a detecção do transgene PDIA1 por meio do anticorpo RL90 (que reage preferencialmente com a PDI de rato transgênica em detrimento da PDIA1 endógena) revelou uma distribuição espacial distinta (Fig. 27A, B), com marcação relativamente mais intensa na região endotelial/peri-luminal (Fig. 27A), em contraste com a

distribuição mais difusa da PDIA1 total (Fig. 28A) detectada por outro anticorpo reativo tanto com PDI de camundongo quanto de rato. Como elucidado em estudos anteriores do nosso grupo, após uma lesão vascular há uma superexpressão da PDIA1 que se estende por todo o vaso, desde a parede até a região íntima próxima ao lúmen (Fig. 28B, C).

A



B

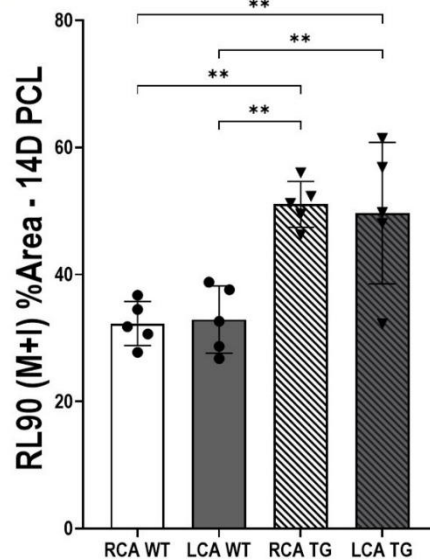
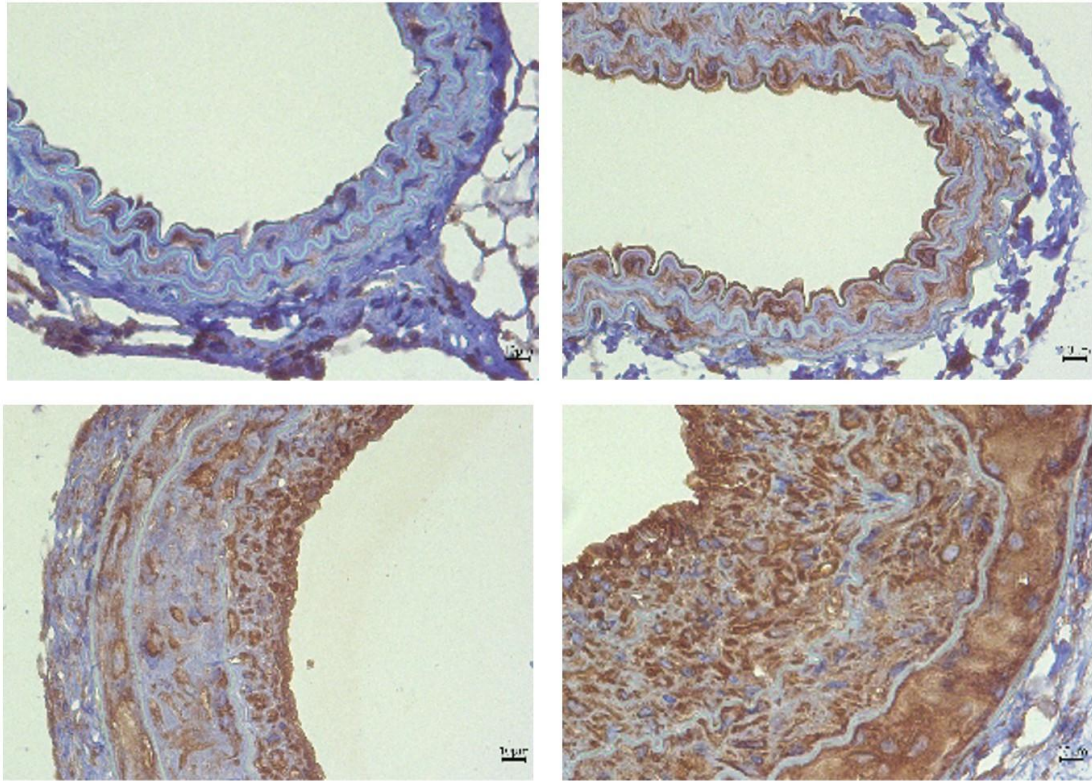
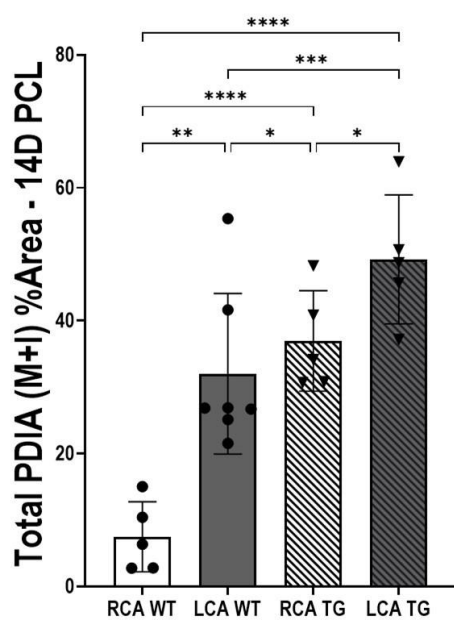


Figura 27. (A) Imunomarcação de RL90 com contra-coloração de hematoxilina 14 dias após ligadura parcial de carótida; (B) quantificação da marcação de RL90 na camada média e íntima/neoíntima. Imagens com aumento de 40x. WT 14D RCA N=8; WT 14D LCA N=7; TG 14D RCA N=5; TG 14D LCA N=7.

A



B



C

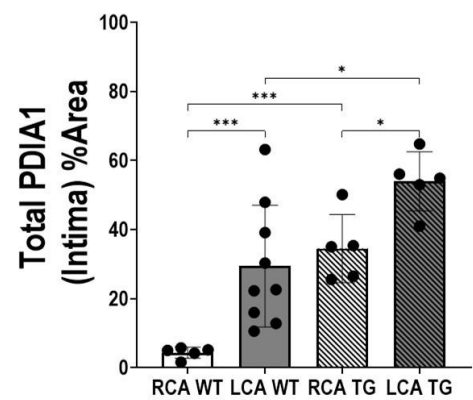


Figura 28. (A) Imunomarcação de PDIA1 total com contra-coloração de hematoxilina 14 dias após ligadura parcial de carótida; (B) quantificação da marcação de PDIA1 total na camada média e íntima/neointima. Imagens com aumento de 40x. WT 14D RCA N=8; WT 14D LCA N=7; TG 14D RCA N=5; TG 14D LCA N=7.

4.6 Remodelamento expansivo exacerbado em camundongos

TgPDIA1 após oclusão total da artéria carótida

Para investigar se a superexpressão de PDIA1 também promoveria remodelamento vascular expansivo em outro modelo envolvendo fluxo sanguíneo perturbado, exploramos o modelo de oclusão total da artéria carótida³⁴, realizado por Carolina Gonçalves Fernandes em nosso laboratório. Neste caso, o padrão de fluxo perturbado consiste em baixo shear stress, e a resposta vascular provavelmente envolve uma carga adicional de ativação plaquetária/trombose além da inflamação conforme observado em nossas amostras histológicas (Fig. 29A). Nossos dados indicaram que, apesar da maior variabilidade das respostas vasculares 3 semanas após oclusão total da carótida em comparação com o modelo de ligadura parcial, camundongos TgPDIA1 também exibiram aumento do calibre total do vaso e da espessura da parede, consistente com remodelamento expansivo (Fig. 29B-D). A área luminal foi difícil de quantificar com precisão devido à alta prevalência de trombose mural, sendo, portanto, excluída da análise.

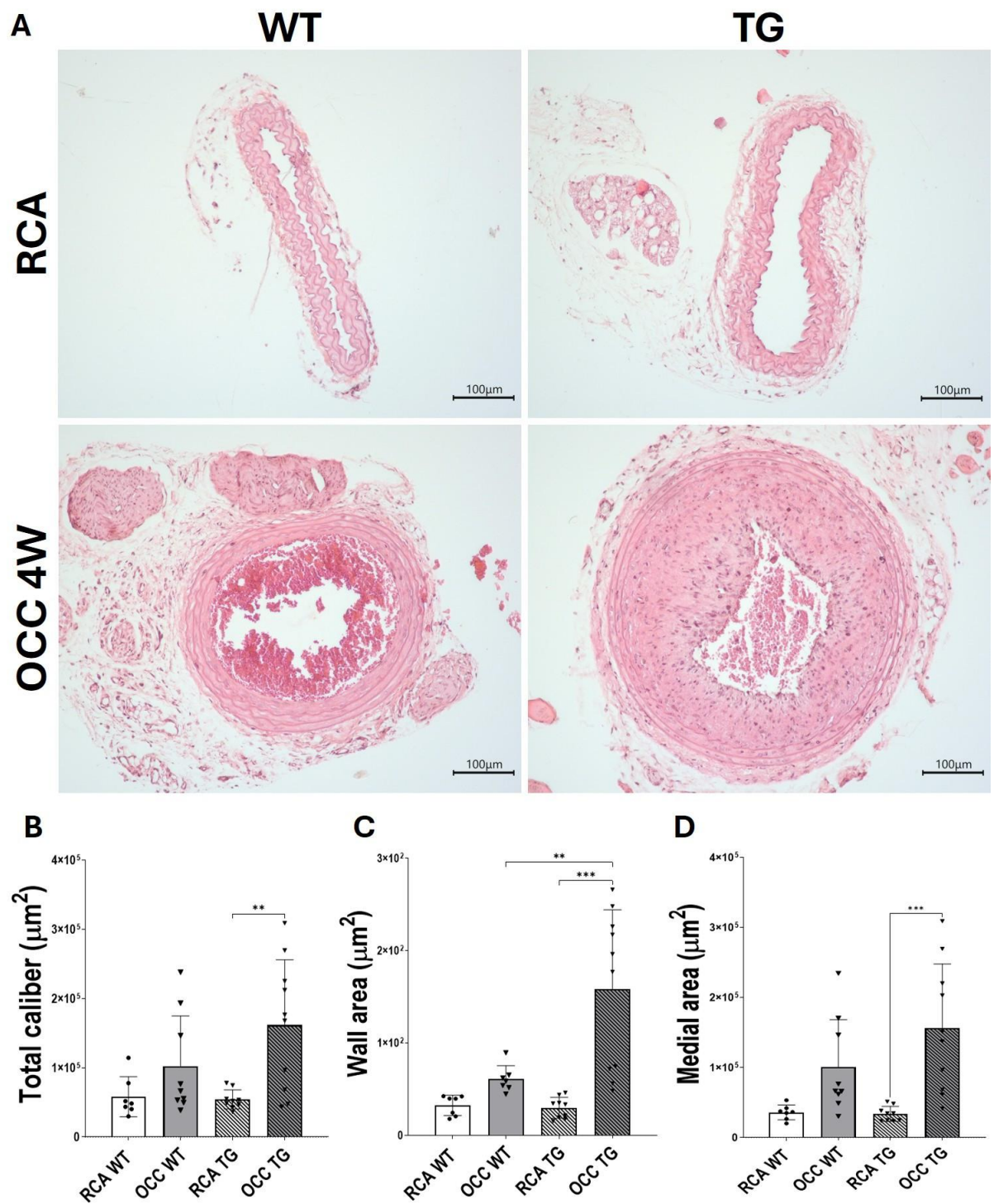


Figura 29. (A) Coloração de hematoxilina e eosina de artérias controle (RCA) e ocluídas (OCC) 3 semanas após a ligadura da LCA em camundongos WT e TG; (B-D) Análise quantitativa do calibre total (B), área da parede (C) e área medial (D) em carótidas RCA e OCC de camundongos WT e TG. WT RCA N=7; WT OCC N=9; TG RCA N=9; TG OCC N=10.

5. Discussão

Nossos resultados demonstram que os camundongos com superexpressão constitutiva global de PDIA1 apresentam remodelamento vascular expansivo acentuado no modelo de ligadura parcial da artéria carótida, com aumento do diâmetro total do vaso, calibre luminal e das áreas medial e neointimal. Tais efeitos foram mais pronunciados no segmento proximal da carótida (LCA2), indicando uma interação sinérgica entre a superexpressão de PDIA1 e o grau de fluxo oscilatório e perturbado, uma vez que o *shear stress* é mais acentuado nessa região. Os efeitos da superexpressão de PDIA1 associam-se a menor organização das fibrilas de colágeno e maior formação de neointima. Ainda assim, esse remodelamento dependente de fluxo aparentemente mantém a homeostase regulatória, visto que a razão entre o calibre total e a área da parede não foi alterada em comparação aos camundongos *WT*. Efeitos análogos da superexpressão transgênica de PDIA1 também foram observados no modelo de oclusão total da artéria carótida. Esses resultados estão em concordância com observações prévias de que o aumento da expressão de PDIA1 sustenta o remodelamento vascular expansivo em modelos de lesão vascular⁴⁵. Uma associação semelhante entre PDIA1 e remodelamento expansivo também é observada em artérias humanas ateroscleróticas^{45,46}. Assim, os dados presentes acrescentam evidências adicionais de que a superexpressão da PDIA1, seja induzida experimentalmente ou decorrente de sinalização celular, é crucial para sustentar uma estrutura vascular expandida, capaz de manter ou até aumentar o lúmen vascular durante o remodelamento.

Uma questão relevante nos efeitos da PDIA1 no remodelamento vascular refere-se ao papel relativo de sua localização extracelular (peri/epicelular) versus total (extra + intracelular). Evidências prévias de nosso grupo indicam que a PDIA1 peri/epicelular desempenha papel no suporte ao remodelamento vascular expansivo durante a fase tardia de reparo após lesão⁴⁵. Além disso, esse *pool* extracelular de PDIA1 está associado ao remodelamento mecanoadaptativo do citoesqueleto de actina, à redução na distribuição de forças e à ativação localizada de RhoGTPases⁴⁷, bem como à modulação redox de grupos tiol na ativação de integrinas^{48,49}. A imunoneutralização da PDIA1 extracelular invalida a persistência da migração de VSMCs dependente de PDGF, mantendo a distância e a velocidade totais, enquanto o silenciamento da expressão total de PDIA1 anula completamente a migração direcional de VSMCs⁵⁰, um mecanismo-chave na formação da neointima. Em paralelo, a PDIA1 intracelular associa-se à regulação da NADPH oxidase Nox⁵¹, disponibilidade de óxido nítrico (NO)⁵², migração endotelial⁵³ e regulação do estresse do retículo endoplasmático⁵⁴. Portanto, é provável que tanto a PDIA1 intra quanto extracelular atuem de forma conjunta na mediação de múltiplos mecanismos subjacentes ao remodelamento vascular expansivo.

O remodelamento vascular é um evento integrativo complexo que envolve todos os tipos celulares da parede vascular e sua interação com a matriz extracelular (MEC)^{1,55}. Tanto a camada endotelial quanto a camada média apresentaram superexpressão aumentada de PDIA1 no presente estudo, corroborando com observações prévias nesse modelo⁵⁶. A mecanotransdução a partir das células endoteliais é crítica para adaptações fenotípicas das VSMCs aos padrões de fluxo⁵⁷. Considerando que o estímulo primário para o remodelamento vascular nesse modelo é a mudança de padrão de fluxo para oscilatório e perturbado, que por sua vez está relacionado principalmente às funções sensoriais e efectoras das células endoteliais^{32,58}, é válido propor que a superexpressão de PDIA1 em células endoteliais seja particularmente cruciais para o remodelamento vascular exacerbado. Paralelamente, a forte superexpressão de PDIA1 em VSMCs durante a fase de reparo vascular^{45,56} parece estar diretamente envolvida no remodelamento, uma vez que a aplicação perivascular de gel contendo anticorpo neutralizante contra PDIA1 promoveu redução do calibre total sem alterações na neointima⁴⁵. Além disso, a PDIA1 plaquetária contribui para a ativação dessas células nos estágios iniciais da resposta vascular¹, amplificando a tromboinflamação¹⁷, particularmente relevante no modelo de oclusão total da

carótida, no qual trombos murais foram frequentemente detectados. Finalmente, células inflamatórias como macrófagos e neutrófilos também expressam PDIA1^{59,60} de forma robusta, e sua superexpressão nesses tipos celulares pode intensificar a inflamação e o remodelamento vascular⁴⁵. Assim, é provável que a PDIA1 é superexpressa não apenas em células endoteliais, mas também em múltiplos tipos celulares, atuando de maneira sinérgica na determinação do ponto de ajuste final da estrutura vascular na fase de reparo. Estudos futuros com deleção induzível e específica por tipo celular de PDIA1 podem contribuir para discriminar o papel de cada tipo celular.

Nossas evidências acerca do ponto de homeostasia na resposta vascular ao fluxo perturbado, sugeridas pelas razões conservadas entre área total do vaso e área da parede, indicam que o remodelamento exacerbado induzido pela superexpressão de PDIA1 preserva a homeostase mecanossensível durante a expansão do vaso, em vez de representar um evento pró-inflamatório desregulado. Isso está de acordo com a hipótese de que a PDIA1 atua como regulador da mecanoadaptação, conforme sugerido em estudos anteriores^{45,50,56}. O mecanismo por trás da identificação do papel destes mecanossensores ainda precisam ser elucidados, mas provavelmente envolvendo o binômio VSMC-MEC⁶¹. A avaliação da morfologia das fibras, como realizada no presente estudo, fornece importantes informações sobre alterações na MEC durante o remodelamento vascular^{62,63}. Camundongos TgPDIA1 apresentaram redução na quantidade de fibrilas de colágeno organizadas após PCL, apesar de aumento na quantidade de fibras (menos organizadas), que exibiram maior curvatura em comparação ao WT. Este resultado sugere que a superexpressão de PDIA1 está associada à deposição do colágeno não organizado, apesar do aumento em sua quantidade. Esse achado complementa evidências prévias de que a expressão de PDIA1 regula a arquitetura do colágeno, possivelmente refletindo reorganização da unidade VSMC-MEC⁶⁴. Esses dados permitem propor um modelo no qual ligações cruzadas exacerbadas de colágeno durante o remodelamento vascular em camundongos TgPDIA1 tendem a promover aumento da tensão vascular, resultando em maiores tensões circunferenciais, radiais e longitudinais da parede. Essa tendência, no entanto, é contrabalançada por espessamento da parede organizado de forma expansiva, o que normaliza o estresse da parede às custas do aumento do calibre global do vaso.

O modelo de ligadura parcial da artéria carótida utilizado neste estudo tem sido extensivamente caracterizado por outros grupos em relação a padrões genômicos e transcriptômicos nos níveis das camadas (neo)íntima ou média/adventícia⁶⁵.

Especificamente, estudos de transcriptoma *single-cell* fornecem importantes *insights* sobre os mecanismos moleculares envolvidos, mostrando que células endoteliais também são submetidas à reprogramação fenotípica substancial e, mesmo na ausência de dieta lipídica, podem transicionar para fenótipos mesenquimais, de VSMC, células imunes e células espumosas⁴⁴. Estas células contribuem para a formação de neointima no modelo de ligadura parcial de carótida⁵⁷, um evento esperado em nosso estudo. De forma consistente, a contribuição das células endoteliais para a formação de neointima no contexto da aterosclerose e reparo após uma lesão vascular (como a restenose pós angioplastia) tem sido cada vez mais documentada⁶⁵. Portanto, a superexpressão de PDIA1 em células endoteliais pode ter contribuído para sua transição fenotípica, adquirindo características das células que compõem a neointima e até mesmo da camada média. A perda de função da PDIA1 induz senescência de células endoteliais por meio de fissão mitocondrial⁶⁶ mediada por Drp53 e prejudica a migração dependente de VEGFR⁵³. O fluxo perturbado no modelo de PCL regula positivamente a PDIA1 via microRNA-204, conectando diretamente o estresse hemodinâmico à expressão de PDIA1 nas camadas íntima e média/adventícia⁵⁶. Outro aspecto da superexpressão de PDIA1 é sua associação com alterações fenotípicas de VSMCs, tanto em células isoladas quanto em camundongos transgênicos³³. Isso também foi demonstrado após modulação por microRNA16 e perda de função de PDIA1 durante o reparo vascular⁴⁵. Como o fenótipo de VSMCs se associa ao remodelamento exacerbado neste modelo ainda requer investigação adicional, mas pode estar relacionado à recapitulação de fenótipos semelhantes ao de células mesenquimais⁶⁷, como demonstrado

previamente em VSMCs da aorta de camundongos com síndrome de Marfan⁶⁸. Estudos futuros utilizando transcriptoma *single-cell* e *lineage tracing* poderão elucidar os mecanismos moleculares precisos e as transições fenotípicas envolvidas na superexpressão de PDIA1. Além da organização da MEC e da modulação fenotípica celular, reorganização do citoesqueleto de actina, particularmente em VSMCs, também constitui um mecanismo importante de remodelamento conforme previamente documentado⁶⁹. O papel da PDIA1 extracelular no ajuste de citoesqueleto de actina em VSMCs já foi demonstrado juntamente com evidências de oxidação da integrina $\beta 1$, conforme previamente revisado¹. Além do mais, em VSMCs isoladas, demonstramos efeitos da PDIA1 de superfície celular em processos mecanoadaptativos associados à reorganização do citoesqueleto de actina⁴⁵. O aumento da expressão de vimentina em camundongos TgPDIA1 após PCL foi um achado relevante neste estudo. A vimentina é reconhecidamente necessária para remodelamento dependente de fluxo⁷⁰, associa-se à montagem de integrina $\beta 1$ em fibroblastos⁷¹, sustenta a adesão de leucócitos durante inflamação⁷² e estabiliza o mRNA de colágeno $\alpha 1$ e $\alpha 2$ em processos fibróticos⁷³. Camundongos *knockout* para vimentina apresentam artérias menos rígidas durante o remodelamento vascular via sinalização Notch^{74,75}. Esses achados são consistentes com o papel significativo dos filamentos intermediários na reorganização da morfoestrutura vascular.

6. Conclusão

De modo geral, nossos dados fornecem evidências adicionais robustas de que a superexpressão de PDIA1 atua como um novo mediador *upstream* (fisiopatologicamente relevante) do remodelamento vascular, um mecanismo fundamental de doença vascular e um possível marcador clinicamente útil de ateromas complexos. Em uma perspectiva ampliada, a PDIA1, e possivelmente outros componentes do redoxoma do retículo endoplasmático, emergem como um maestro conduzindo uma orquestra de sinalizações no remodelamento vascular, provavelmente por meio da coordenação de processos redox¹ e de transições coordenadas envolvendo comunicação intercelular, fenótipo celular, mecanotransdução e arquitetura da matriz extracelular.

Referências

1. Tanaka, L. Y. & Laurindo, F. R. M. Vascular remodeling: A redox-modulated mechanism of vessel caliber regulation. *Free Radic. Biol. Med.* **109**, 11–21 (2017).
2. Langille, B. L. & O'Donnell, F. Reductions in arterial diameter produced by chronic decreases in blood flow are endothelium-dependent. *Science* (1979). **231**, (1986).
3. Glagov, S., Weisenberg, E., Zarins, C. K., Stankunavicius, R. & Kolettis, G. J. Compensatory Enlargement of Human Atherosclerotic Coronary Arteries. *New England Journal of Medicine* **316**, (1987).
4. Ward, M. R., Pasterkamp, G., Yeung, A. C. & Borst, C. Arterial remodeling: Mechanisms and clinical implications. *Circulation* **102**, 1186–1191 (2000).
5. Tanaka, L. Y. & Laurindo, F. R. M. Vascular remodeling: A redox-modulated mechanism of vessel caliber regulation. *Free Radic. Biol. Med.* **109**, 11–21 (2017).
6. Leite, P. F. *et al.* Sustained Decrease in Superoxide Dismutase Activity Underlies Constrictive Remodeling after Balloon Injury in Rabbits. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**, 2197–2202 (2003).
7. Tronc, F. *et al.* Role of NO in flow-induced remodeling of the rabbit common carotid artery. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **16**, (1996).
8. Rudic, R. D. *et al.* Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *Journal of Clinical Investigation* **101**, (1998).
9. Oliveira, P. V. S., De Bessa, T. C. & Laurindo, F. R. M. Endoplasmic Reticulum Redoxome: Protein Folding and Beyond. *Biochemistry* vol. 65 Preprint at <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5c00527> (2026).
10. Margittai, É., Enyedi, B., Csala, M., Geiszt, M. & Bánhegyi, G. Composition of the redox environment of the endoplasmic reticulum and sources of hydrogen peroxide. *Free Radic. Biol. Med.* **83**, (2015).
11. Sevier, C. S. & Kaiser, C. A. Ero1 and redox homeostasis in the endoplasmic reticulum. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* vol. 1783 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2007.12.011> (2008).
12. Janiszewski, M. *et al.* Regulation of NAD(P)H oxidase by associated protein disulfide isomerase in vascular smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 40813–40819 (2005).
13. Townsend, D. M. *et al.* Nitrosative stress-induced S-glutathionylation of protein disulfide isomerase leads to activation of the unfolded protein response. *Cancer Res.* **69**, (2009).
14. Klappa, P., Ruddock, L. W., Darby, N. J. & Freedman, R. B. The b' domain provides the principal peptide-binding site of protein disulfide isomerase but all domains contribute to binding of misfolded proteins. *EMBO Journal* **17**, (1998).
15. Pelham, H. R. B. The retention signal for soluble proteins of the endoplasmic reticulum. *Trends in Biochemical Sciences* vol. 15 Preprint at [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(90\)90303-S](https://doi.org/10.1016/0968-0004(90)90303-S) (1990).
16. Soares Moretti, A. I. & Martins Laurindo, F. R. Protein disulfide isomerases: Redox connections in and out of the endoplasmic reticulum. *Arch. Biochem. Biophys.* **617**, 106–119 (2017).
17. Flaumenhaft, R. & Furie, B. Vascular thiol isomerases. *Blood* **128**, 893–901 (2016).
18. Fernandes, D. C., Manoel, A. H. O., Wosniak, J. & Laurindo, F. R. Protein disulfide isomerase overexpression in vascular smooth muscle cells induces spontaneous preemptive NADPH oxidase activation and Nox1 mRNA expression: Effects of nitrosothiol exposure. *Arch. Biochem. Biophys.* **484**, 197–204 (2009).
19. Pescatore, L. A. *et al.* Protein disulfide isomerase is required for platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell migration, Nox1 NADPH oxidase expression, and RhoGTPase activation. *Journal of Biological Chemistry* vol. 287 29290–29300 Preprint at <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.394551> (2012).
20. Tanaka, L. Y. *et al.* Peri/Epicellular Protein Disulfide Isomerase Sustains Vascular

Lumen Caliber Through an Anticonstrictive Remodeling Effect. *Hypertension* **67**, 613–622 (2016).

21. Tanaka, L. Y., Oliveira, P. V. S. & Laurindo, F. R. M. Peri/Epicellular Thiol Oxidoreductases as Mediators of Extracellular Redox Signaling. *Antioxid. Redox Signal.* **33**, 280–307 (2020).
22. Tanaka, L. Y. *et al.* Peri/Epicellular Protein Disulfide Isomerase Sustains Vascular Lumen Caliber Through an Anticonstrictive Remodeling Effect. *Hypertension* **67**, 613–622 (2016).
23. Fernandes, D. C. *et al.* PDIA1 acts as master organizer of NOX1/NOX4 balance and phenotype response in vascular smooth muscle. *Free Radic. Biol. Med.* <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.11.020> (2020) doi:10.1016/j.freeradbiomed.2020.11.020.
24. Xu, S., Sankar, S. & Neamati, N. Protein disulfide isomerase: A promising target for cancer therapy. *Drug Discovery Today* vol. 19 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2013.10.017> (2014).
25. Jang, I. *et al.* PDIA1/P4HB is required for efficient proinsulin maturation and β cell health in response to diet induced obesity. *Elife* **8**, (2019).
26. Chiu, J. J. & Chien, S. Effects of disturbed flow on vascular endothelium: Pathophysiological basis and clinical perspectives. *Physiological Reviews* vol. 91 Preprint at <https://doi.org/10.1152/physrev.00047.2009> (2011).
27. Albarrán-Juárez, J. *et al.* Piezo1 and Gq/G11 promote endothelial inflammation depending on flow pattern and integrin activation. *Journal of Experimental Medicine* **215**, (2018).
28. Park, C. *et al.* Disturbed flow induces reprogramming of endothelial cells to immune-like and foam cells under hypercholesterolaemia during atherogenesis. *Cardiovasc. Res.* **121**, (2025).
29. Tarbell, J. M., Shi, Z. D., Dunn, J. & Jo, H. Fluid mechanics, arterial disease, and gene expression. *Annu. Rev. Fluid Mech.* **46**, (2014).
30. Tamargo, I. A., Baek, K. I., Kim, Y., Park, C. & Jo, H. Flow-induced reprogramming of endothelial cells in atherosclerosis. *Nature Reviews Cardiology* vol. 20 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41569-023-00883-1> (2023).
31. Kwak, B. R. *et al.* Biomechanical factors in atherosclerosis: Mechanisms and clinical implications. *European Heart Journal* vol. 35 Preprint at <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehu353> (2014).
32. Nam, D. *et al.* Partial carotid ligation is a model of acutely induced disturbed flow, leading to rapid endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **297**, (2009).
33. Fernandes, D. C. *et al.* PDIA1 acts as master organizer of NOX1/NOX4 balance and phenotype response in vascular smooth muscle. *Free Radic. Biol. Med.* <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.11.020> (2020) doi:10.1016/j.freeradbiomed.2020.11.020.
34. Kumar, A. & Lindner, V. Remodeling with neointima formation in the mouse carotid artery after cessation of blood flow. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17**, (1997).
35. Schindelin, J. *et al.* Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* vol. 9 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019> (2012).
36. Junqueira, L. C. U., Bignolas, G. & Brentani, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem. J.* **11**, (1979).
37. Wegner, K. A., Keikhosravi, A., Eliceiri, K. W. & Vezina, C. M. Fluorescence of Picrosirius Red Multiplexed With Immunohistochemistry for the Quantitative Assessment of Collagen in Tissue Sections. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **65**, (2017).
38. Dolber, P. C. & Spach, M. S. Conventional and confocal fluorescence microscopy of collagen fibers in the heart. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **41**, (1993).
39. Bredfeldt, J. S. *et al.* Computational segmentation of collagen fibers from second-harmonic generation images of breast cancer. *J. Biomed. Opt.* **19**, (2014).

40. Rich, L. & Whittaker, P. Collagen and Picrosirius Red Staining : a Polarized Light Assessment of Fibrillar Hue and Spatial Distribution. *Braz J Morphol Sci* **22**, (2005).
41. Spiesz, E. M., Kaminsky, W. & Zysset, P. K. A quantitative collagen fibers orientation assessment using birefringence measurements: Calibration and application to human osteons. *J. Struct. Biol.* **176**, (2011).
42. López De Padilla, C. M. *et al.* Picrosirius Red Staining: Revisiting Its Application to the Qualitative and Quantitative Assessment of Collagen Type I and Type III in Tendon. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **69**, (2021).
43. Lattouf, R. *et al.* Picrosirius Red Staining: A Useful Tool to Appraise Collagen Networks in Normal and Pathological Tissues. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **62**, (2014).
44. Park, C. *et al.* Disturbed flow induces reprogramming of endothelial cells to immune-like and foam cells under hypercholesterolaemia during atherogenesis. *Cardiovasc. Res.* **121**, (2025).
45. Tanaka, L. Y. *et al.* Peri/Epicellular Protein Disulfide Isomerase Sustains Vascular Lumen Caliber Through an Anticonstrictive Remodeling Effect. *Hypertension* **67**, 613–622 (2016).
46. Muller, C. *et al.* Protein disulfide isomerase modification and inhibition contribute to ER stress and apoptosis induced by oxidized low density lipoproteins. *Antioxid. Redox Signal.* **18**, (2013).
47. Pescatore, L. A. *et al.* Protein disulfide isomerase is required for platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell migration, Nox1 NADPH oxidase expression, and RhoGTPase activation. *Journal of Biological Chemistry* vol. 287 29290–29300 Preprint at <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.394551> (2012).
48. Essex, D. W. The role of thiols and disulfides in platelet function. *Antioxidants and Redox Signaling* vol. 6 Preprint at <https://doi.org/10.1089/1523086041361622> (2004).
49. Furie, B. & Flaumenhaft, R. Thiol isomerases in thrombus formation. *Circulation Research* vol. 114 1162–1173 Preprint at <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.301808> (2014).
50. Tanaka, L. Y. *et al.* Peri/epicellular protein disulfide isomerase-A1 acts as an upstream organizer of cytoskeletal mechanoadaptation in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **316**, H566–H579 (2019).
51. Janiszewski, M. *et al.* Regulation of NAD(P)H oxidase by associated protein disulfide isomerase in vascular smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 40813–40819 (2005).
52. Leite, P. F. *et al.* Sustained Decrease in Superoxide Dismutase Activity Underlies Constrictive Remodeling After Balloon Injury in Rabbits. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**, 2197–2202 (2003).
53. Nagarkoti, S. *et al.* Protein disulfide isomerase A1 as a novel redox sensor in VEGFR2 signaling and angiogenesis. *Angiogenesis* **26**, (2023).
54. Eletto, D., Chevet, E., Argon, Y. & Appenzeller-Herzog, C. Redox controls UPR to control redox. *Journal of Cell Science* vol. 127 Preprint at <https://doi.org/10.1242/jcs.153643> (2014).
55. Zhang, L., Zhou, J. & Kong, W. Extracellular matrix in vascular homeostasis and disease. *Nature Reviews Cardiology* vol. 22 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41569-024-01103-0> (2025).
56. Tanaka, L. Y. *et al.* Disturbed flow regulates protein disulfide isomerase A1 expression via microRNA-204. *Front. Physiol.* **15**, (2024).
57. Tamargo, I. A., Baek, K. I., Kim, Y., Park, C. & Jo, H. Flow-induced reprogramming of endothelial cells in atherosclerosis. *Nature Reviews Cardiology* vol. 20 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41569-023-00883-1> (2023).
58. Andueza, A. *et al.* Endothelial Reprogramming by Disturbed Flow Revealed by Single-Cell RNA and Chromatin Accessibility Study. *Cell Rep.* **33**, (2020).
59. Santos, C. X. C., Tanaka, L. Y., Wosniak, J. & Laurindo, F. R. M. Mechanisms and implications of reactive oxygen species generation during the unfolded protein response:

- roles of endoplasmic reticulum oxidoreductases, mitochondrial electron transport, and NADPH oxidase. *Antioxid. Redox Signal.* **11**, 2409–2427 (2009).
60. de A. Paes, A. M. *et al.* Protein disulfide isomerase redox-dependent association with p47phox: evidence for an organizer role in leukocyte NADPH oxidase activation. *J. Leukoc. Biol.* **90**, (2011).
 61. Heusch, G. *et al.* Cardiovascular remodelling in coronary artery disease and heart failure. *The Lancet* vol. 383 Preprint at [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60107-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60107-0) (2014).
 62. Watson, S. R. *et al.* Comparison of Aortic Collagen Fiber Angle Distribution in Mouse Models of Atherosclerosis Using Second-Harmonic Generation (SHG) Microscopy. *Microscopy and Microanalysis* **22**, (2016).
 63. Chow, M. J., Turcotte, R., Lin, C. P. & Zhang, Y. Arterial extracellular matrix: A mechanobiological study of the contributions and interactions of elastin and collagen. *Biophys. J.* **106**, (2014).
 64. Van Varik, B. J. *et al.* Mechanisms of arterial remodeling: Lessons from genetic diseases. *Frontiers in Genetics* vol. 3 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00290> (2012).
 65. Li, F. *et al.* Endothelial cell (EC)-specific Ctgf/Ccn2 expression increases EC reprogramming and atherosclerosis. *Matrix Biology* **136**, (2025).
 66. Kim, Y. M. *et al.* Redox Regulation of Mitochondrial Fission Protein Drp1 by Protein Disulfide Isomerase Limits Endothelial Senescence. *Cell Rep.* **23**, (2018).
 67. Yap, C., Mieremet, A., De Vries, C. J. M., Micha, D. & De Waard, V. Six Shades of Vascular Smooth Muscle Cells Illuminated by KLF4 (Krüppel-Like Factor 4). *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* vol. 41 Preprint at <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.121.316600> (2021).
 68. Nolasco, P. *et al.* Impaired vascular smooth muscle cell force-generating capacity and phenotypic deregulation in Marfan Syndrome mice. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **1866**, 165587 (2020).
 69. Wesselman, J. P. M. & De Mey, J. G. R. Angiotensin and cytoskeletal proteins: Role in vascular remodeling. *Curr. Hypertens. Rep.* **4**, (2002).
 70. Lund, N. *et al.* Vimentin expression influences flow dependent VASP phosphorylation and regulates cell migration and proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **395**, (2010).
 71. Ostrowska-Podhorodecka, Z. & McCulloch, C. A. Vimentin regulates the assembly and function of matrix adhesions. *Wound Repair and Regeneration* **29**, (2021).
 72. Nieminen, M. *et al.* Vimentin function in lymphocyte adhesion and transcellular migration. *Nat. Cell Biol.* **8**, (2006).
 73. Challa, A. A. & Stefanovic, B. A Novel Role of Vimentin Filaments: Binding and Stabilization of Collagen mRNAs. *Mol. Cell. Biol.* **31**, (2011).
 74. van Engeland, N. C. A. *et al.* Vimentin regulates Notch signaling strength and arterial remodeling in response to hemodynamic stress. *Sci. Rep.* **9**, (2019).
 75. Langlois, B. *et al.* Vimentin knockout results in increased expression of sub-endothelial basement membrane components and carotid stiffness in mice. *Sci. Rep.* **7**, (2017).