

CARLA LUANA DINARDO

**Estudo das propriedades mecânicas das células de músculo
liso vascular em situações fisiológicas e patológicas**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências
Programa de Cardiologia
Orientador: Dr. Alexandre da Costa Pereira

**São Paulo
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Dinardo, Carla Luana

Estudo das propriedades mecânicas das células de músculo liso vascular em
situações fisiológicas e patológicas / Carla Luana Dinardo. -- São Paulo, 2015.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Cardiologia.

Orientador: Alexandre da Costa Pereira.

Descritores: 1.Músculo liso 2.Rigidez vascular 3.Citoesqueleto 4.Tabagismo
5.Citoesqueleto de actina 6.Arterias 7.Proteômica

USP/FM/DBD-455/15

Dedicatória

Ao meu querido esposo Fred, *my perfect match*. Você é meu exemplo de ética, profissionalismo e dedicação à Medicina, além de ser uma pessoa incrível. Sem você, esta etapa da minha vida não teria sido cumprida.

À pequena Aurora, amor da minha vida. Após a sua chegada, minha vida virou do avesso e eu percebi que, definitivamente, o avesso era o meu lado certo.

Aos meus pais, Marisa e José Carlos, eternos entusiastas da minha vida acadêmica.

Agradecimientos

Ao meu orientador, Dr. Alexandre da Costa Pereira, pesquisador exemplar e pessoa maravilhosa. Foi um prazer poder trabalhar e aprender com você durante todos esses anos. Você fez de mim pesquisadora e a genialidade do seu trabalho será sempre fonte de inspiração para a minha vida acadêmica.

Ao Prof. Dr. Adriano Mesquita Alencar, do Instituto de Física da USP, pela orientação na parte experimental que representou o âmago desta dissertação.

To Dr. Enhua Zhou, of Harvard School of Public Health, my gratitude for supervising my work at distance. Your help was the cornerstone of this study.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Krieger, pelas enriquecedoras discussões científicas e pela oportunidade de trabalhar no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular (LGCM), referência nacional e internacional em pesquisa.

Ao Prof. Dr. Luís Alberto de Oliveira Dallan, por todo o apoio na etapa de recrutamento dos pacientes.

To Dr. Jeffrey Fredberg, of Harvard School of Public Health, for all the discussions about my project and its results. It was a pleasure to visit your service and learn to think a little more like a physicist.

Ao Instituto do Coração (InCor), pela acolhida e confiança.

Às minhas queridas amigas Júlia Daher Marsiglia e Cinthia Elim, pela
cumplicidade.

Aos colaboradores Gabriela Venturini, Rafael Dariolli, Joaquim Maurício da
Motta Leal Filho, André Ramos Vaquero, André Martelini, Hadassa Campos
Santos e Inaiá Rodrigues Cruz, pela contribuição em etapas fundamentais
deste trabalho.

Aos pesquisadores do LGCM Dra. Andrea Horimoto, Dra. Ayumi Miyakawa,
Dra. Adriana Girardi, Dr. Paulo Caleb e Dra. Miriam Alaniz, e seus
respectivos alunos, por provar que a cooperação entre equipes é a chave
para projetos bem sucedidos.

Ao grupo da genética do LGCM, Rodrigo Dias, Marina Rossi, Nubia Duarte,
Pamela Silva, Aline Morgan, Larissa Testai, Patricia Cajoeiro, Pamela
Malagrino, Patricia Yogi, Paula Fonseca, Paulo Roberto Tomaz, Tamiris Gois,
Théo Gremen, Vytor Hugo Mendes, Bianca Kiers, Diogo Biagi, Juliana
Santos, Kallyandra Padilha, Carol Watanabe, Leiliane Rodrigues, Michelle
Sabrina, Fanny Wulkan, Carolina Capeli, Júlia Amaral, Joceli Spina, Renata
Watanabe, Rafael Alvim, Flávia Credidio e Luz Marina Gómez, pela
cooperação e companheirismo.

Aos funcionários do LGCM, Élide Neri, Maria Junqueira (Maúde), Marcio Chaves, Lúcia Mariano, Ana Maria Piesco, Andrea Souza Lima, Brendo Vieira, Fabio Rocha, Lauro Turaça, Mariliza Rodrigues, Renata Carmona, Rosângela Aragão, Sileide Nemos, Silvana Campos Salles, Marcelly Rosal e Sandra Teixeira, cuja seriedade do trabalho viabilizou a realização deste estudo.

Aos funcionários da pós-graduação do Incor, Neusa Dini, Juliana Lattari Sobrinho, Valdecira Barbosa Ferreira, Mônica Souto da Silva e Tatiane Lago, pelo auxílio em todas as etapas deste doutorado, desde a matrícula até o depósito da tese.

Ao Dr. Alfredo Mendrone Júnior, diretor técnico-científico da Fundação Pró-Sangue, por ter sido sempre amigo e incentivador dos meus projetos.

À Gláucia Pancev, secretária da Divisão de Imuno-hematologia da Fundação Pró-Sangue, pela dedicação e competência na resolução de questões burocráticas que envolveram este doutorado.

Aos meus amigos da Divisão de Imuno-hematologia da Fundação Pró-Sangue, Patrícia Cressoni Sierra, Cyntia Arrais, Francisco Carlos Almeida Gomes, Antonio Gallucci, Silvia Leão Bonifácio, Silvana Navarro, Vitor Medeiros, Marcia Dezan, Marina Conrado e Valéria Brito, pelo incentivo diário.

Ao Dr. Isolmar Schetttert, pelo impulso no início da minha vida profissional.

À Elaine Lagonegro, pelo auxílio na submissão do projeto ao comitê de ética e pesquisa.

Ao Dr. Luiz Bortolotto, Dr. Erasmo Simão e Dra. Ayumi Miyakawa (de novo!), pela importante contribuição na etapa de qualificação desta tese.

A todos os pacientes que consentiram em participar deste estudo, meu respeito e gratidão.

Epígrafe

"This is not the end. It is not even the beginning of the end. But it is, perhaps, the end of the beginning"

Winston Churchill, 1942

Normatização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento de sua publicação:

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

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

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

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**LISTA DE SÍMBOLOS****LISTA DE TABELAS****LISTA DE FIGURAS****RESUMO****ABSTRACT**

1	INTRODUÇÃO.....	01
1.1	Estrutura vascular	02
1.2	Desenvolvimento das células de músculo liso vascular (CMLV) durante a vasculogênese.....	04
1.3	Caracterização dos fenótipos contrátil e secretor das CMLV e definição de modulação fenotípica.....	09
1.4	Heterogeneidade fenotípica das CMLV.....	14
1.5	Mecânica das CMLV.....	16
1.6	Contribuição da mecânica das CMLV para a complacência global dos vasos após a fase de vasculogênese em situações fisiológicas e patológicas.....	21
1.7	Lacunas científicas identificadas.....	29
2	OBJETIVOS.....	30
2.1	Objetivos primários.....	31
2.2	Objetivos secundários.....	31
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
3.1	Desenho do estudo.....	33
3.2	Materiais e Métodos (Fase 1).....	36
3.2.1	Procedimento cirúrgico nos modelos porcinos.....	36
3.2.2	Isolamento e cultivo <i>in vitro</i> das CMLV.....	37
3.2.3	Avaliação de mecânica celular por Citometria Magnético Ótica de Oscilação (<i>Optical Magnetic Twisting Cytometry</i> - OMTC).....	40
3.2.4	Avaliação das fibras de α -actina do citoesqueleto de CMLV por microscopia confocal.....	45
3.2.5	Quantificação das proteínas α -actina de músculo liso e colágeno I por Western Blot.....	46
3.2.6	Análise estatística.....	47

3.3	Materiais e Métodos (Fase 2).....	48
3.3.1	Amostras biológicas estudadas.....	48
3.3.2	Isolamento e cultivo <i>in vitro</i> de CMLV.....	48
3.3.3	Análise de ciclo celular.....	48
3.3.4	Caracterização histológica dos vasos.....	49
3.3.5	Microscopia eletrônica de transmissão.....	50
3.3.6	Técnica da Citometria Magnético Ótica de Oscilação (<i>Optical Magnetic Twisting Cytometry</i> - OMTC).....	51
3.3.7	Protocolo de estiramento cíclico.....	52
3.3.8	Análise da organização de fibras de α -actina e das dimensões de adesões focais das CMLV por microscopia confocal.....	53
3.3.9	Análise de expressão proteica usando cromatografia multidimensional e espectrometria de massas em tandem de alta resolução (<i>Proteômica Shotgun</i>)	55
3.4	Materiais e Métodos (Fase 3).....	58
3.4.1	Casuística.....	58
3.4.2	Crítérios de Inclusão.....	58
3.4.3	Crítérios de Exclusão.....	58
3.4.4	Aspectos éticos.....	59
3.4.5	Coleta de amostras biológicas.....	59
3.4.6	Isolamento e cultivo de CMLV.....	60
3.4.7	Ensaio de Citometria Magnético Ótica de Oscilação (<i>Optical Magnetic Twisting Cytometry</i> - OMTC).....	60
3.4.8	Extração de DNA	61
3.4.9	Determinação da ancestralidade genética.....	62
3.4.10	Análise de prontuário.....	64
3.4.11	Análise Estatística.....	65
4	RESULTADOS.....	66
4.1	Resultados da Fase 1.....	67
4.2	Resultados da Fase 2.....	72
4.2.1	Caracterização estrutural dos vasos.....	72
4.2.2	Análise do alinhamento das fibras de α -actina, da morfometria e	

	das adesões focais (AF) das CMLV de diferentes leitos vasculares.	78
4.2.3	Análise do ciclo celular.....	81
4.2.4	Caracterização mecânica das CMLV das diferentes artérias.....	82
4.2.5	Identificação de possíveis fatores moduladores da mecânica de CMLV.....	84
4.2.6	Comparação da expressão proteica entre CMLV com origem e comportamento mecânico diferentes usando a técnica de proteômica <i>Shotgun</i>	88
4.3	Resultados Fase 3.....	91
5	DISCUSSÃO	99
5.1	Modificações das propriedades mecânicas das CMLV durante cultivo <i>in vitro</i>	100
5.2	Heterogeneidade das propriedades mecânicas e de expressão proteica das CMLV oriundas de leitos arteriais distintos.....	103
5.3	Variabilidade interindividual da mecânica das CMLV e seu enrijecimento em tabagistas e mulheres pós-menopausa.....	111
6	LIMITAÇÕES	116
7	CONCLUSÕES	119
8	ANEXOS	122
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	149

Listas

AF – Adesões Focais

ANOVA – Análise de Variância

AR – Relação maior eixo celular / menor eixo celular

ASW – *American of African Ancestry in SW*

BSA – Bovine Serum Albumin

CAS – Proteína Substrato Associado à Crk

CAPPesq – Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

CC – Coeficiente de Correlação

CCD – Dispositivo de carga acoplado

CEU – *Utah Residents with Northern and Western Ancestry*

CK – Creatino-quinase

CMO – Células progenitoras de medula óssea

CMLV - Células de Músculo Liso Vascular

DAPI – *4'-6-diamino-2-fenilindole*

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EDTA – *Ethylenediaminetetraacetic acid*

EGTA – *Ethylene Glycol tetraacetic acid*

EIK-1 – *ETS-like Transcriptor Factor 1*

FAK – Quinase de adesão focal

GAPDH – *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*

HEPES – *4-(2-Hidroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid*

Herp 1 – *HES-related Repressor Protein 1*

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

IC – Intervalo de Confiança

IQR – Intervalo interquartil

KCl – Cloreto de potássio

KLF4 – *Kruppel-like Factor 4*

LWK – *Luhya in Webuye*

MEC – *Matriz Extracelular*

MET – *Microscopia Eletrônica de Transmissão*

MgCl₂ – *Cloreto de magnésio*

MHC – *Myosin Heavy Chain*

miRNA – *MicroRNA*

MPM – *Metaloproteinases de matriz*

NH₄OH – *Hidróxido de Amônio*

NO – *Óxido Nítrico*

OMTC – *Optical Magnetic Twisting Cytometry*

SM α A – *Smooth Muscle Alpha actin*

SM22 α – *Smooth Muscle 22 α*

SRF – *Serum Response Factor*

TGF β – *Transforming Growth Factor β*

P – *Passagem da cultura celular*

PBS – *Phosphate Buffered Saline*

PDGF – *Platelet-derived Growth Factor*

PI – *Propidium iodide*

PIAS1 – *Protein Inhibitor of Activated Stat 1*

PMSF – *Phenylmethylsulfonyl fluoride*

Pol II – *RNA polymerase II*

Prx1 - *Paired-related homeobox gene-1*

RASM – *Rabbit aortic Smooth Muscle Cells*

RGD – *Sequência Arg-Gly-Asp*

SDS-PAGE – *Eletroforese em gel de poliacrilamida*

SNP – *Single-Nucleotide Polymorphism*

TFA – Ácido trifluoroacético

TSI – *Tuscan in Italia*

VOP – Velocidade de Onda de Pulso

YRI – *Yoruba in Ibadan*

$d^*(\omega)$ – deslocamento do grânulo
eV – Elétron-volt
G – Gauss
G – Rigidez Aparente da Célula (0,75Hz)
G' – Módulo Elástico (0,75Hz)
G'' – Módulo Dissipativo (0,75Hz)
 $g^*(\omega)$ - Rigidez Aparente da Célula
 $g'(\omega)$ – Módulo Elástico
 $g''(\omega)$ – Módulo Dissipativo
Hz – Hertz
M - Molar
m/s – metros por segundo
mg/kg – miligramas por quilo
 $\mu\text{g/mL}$ – microgramas por mililitro
mg/mL – miligramas por mililitro
mm - Milímetros
mM – Milimolar
m/z – Razão massa/carga iônica
 η – Histerese (g''/g')
 $\text{ng}/\mu\text{L}$ – Nanogramas por microlitro
 $T^*(\omega)$ – Torque aplicado
 p - Nível descritivo de probabilidade do teste
Pa/nm – Pascal por nanômetro
r- Coeficiente de correlação
ZG – Escore-Z de G
Z η – Escore-Z de η
< - Menor que

> - Maior que

= - Igual

± - Mais ou menos

Tabela 1	Diferenças estruturais entre as artérias estudadas.....	73
Tabela 2	Principais características clínicas dos pacientes incluídos no estudo.....	93
Tabela 3	Modelo estatístico resultante da análise multivariada utilizada para avaliação do potencial das variáveis clínicas estudadas em modular a viscoelasticidade das CMLV.....	97

- Figura 1** O processo de diferenciação das CMLV é altamente plástico e dependente da integração de múltiplos fatores ambientais. A figura sumariza os múltiplos elementos ambientais que, de forma comprovada ou hipoteticamente, são importantes na diferenciação das CMLV. Ela reforça o conceito de que a modulação ou troca fenotípica é dependente de múltiplos fatores, que atuam determinando o padrão de expressão dos genes de proteínas contráteis de músculo liso. Existem dois fenótipos extremos: secretor (célula representada à esquerda) e contrátil (célula representada à direita), com um espectro de fenótipos intermediários entre eles. As múltiplas setas entre as células ilustram a complexidade de passos na transição entre os fenótipos e são representadas duas vias, ao invés de uma via reversível, para ressaltar que a modulação fenotípica nem sempre segue a mesma via para diferenciação e desdiferenciação. Finalmente, a figura também apresenta a hipótese de que células progenitoras da medula óssea (CMO) sejam capazes de se diferenciar e atuar no processo de reparo vascular. (Adaptado de Owens, GK 1995) (33)..... 11
- Figura 2** Representação da organização das adesões focais. As forças externas são transmitidas da matriz extracelular (principalmente pela fibronectina), via proteínas integrais de membrana α e β -integrina, às proteínas associadas à membrana plasmática (proteína quinase de adesão focal - FAK, paxicilina – Pax, talina e proteína substrato associado à Crk – CAS) e às proteínas ligantes de actina (α -actinina, talina e vinculina), estas últimas conectadas aos filamentos de α -actina. Adaptado de Mofrad, M.R.K. 2006 (58)..... 18
- Figura 3** Representação esquemática de como as proteínas das adesões focais (AF) são reorganizadas em resposta à força mecânica. Nas AF imaturas, existem proteínas sensíveis à

	força (quadrado azul) e responsivas à força (círculo verde) que transmitem os sinais provenientes do meio extracelular ao ambiente intracelular via integrina. Na presença de força mecânica, ocorre o amadurecimento das AF, com acúmulo de proteínas sensíveis à força e responsivas à força positivamente reguladas por esse estímulo (quadrado laranja e círculo amarelo, respectivamente), com associada formação das fibras de tensão de actina. Adaptado de Kuo, J.C. 2013 (60).....	19
Figura 4	Mecanismos associados à fisiopatogenia da rigidez arterial. Dentre os fatores apresentados, destacam-se as modificações da matriz extracelular (MEC), principalmente, levando ao aumento de colágeno na camada média vascular. A participação das CMLV é frequentemente atribuída à redução da biodisponibilidade de NO por disfunção endotelial. O enrijecimento do citoplasma de CMLV é um mecanismo proposto recentemente e descrito em associação à rigidez arterial associada à hipertensão arterial sistêmica e ao envelhecimento. Adaptado de Jia, G 2015 (76).....	25
Figura 5	Desenho da primeira fase do estudo. O objetivo desta fase era estudar o efeito do cultivo <i>in vitro</i> sobre o comportamento mecânico das CMLV. Para tal, as CMLV tiveram suas propriedades viscoelásticas avaliadas quantitativamente ao longo de várias passagens celulares (subcultivos).....	34
Figura 6	Desenho da segunda fase do estudo. Esta fase tinha como objetivo avaliar a existência de heterogeneidade de propriedades mecânicas entre CMLV de diferentes leitos arteriais. Para atingir o objetivo, fragmentos provenientes de sete diferentes leitos arteriais de modelos porcinos foram avaliados quando à composição de MEC e quanto à organização da camada média. As CMLV isoladas das diferentes artérias foram submetidas às seguintes análises:	

	mensuração de rigidez de citoplasma, análise da organização do citoesqueleto, análise de ciclo celular e expressão proteica.....	35
Figura 7	Desenho da terceira fase do estudo. O objetivo desta fase foi avaliar se variáveis clínicas sabidamente associadas à redução de complacência de grandes vasos tinham a capacidade de alterar o comportamento mecânico das CMLV. Para atingir esse objetivo, CMLV isoladas a partir de fragmentos de artéria mamária de pacientes submetidos à cirurgia de revascularização do miocárdio foram avaliadas quanto às suas propriedades mecânicas, sendo correlacionadas com as variáveis clínicas sexo, idade, ancestralidade genética africana, diabetes mellitus e tabagismo.....	36
Figura 8	Técnica de explante primário. As artérias foram abertas e cortadas em pequenos fragmentos, os quais, por sua vez, foram colocados em placas de cultura com meio apropriado. As CMLV foram isoladas a partir dos fragmentos vasculares.....	39
Figura 9	Princípio da técnica de Citometria Magnético Ótica de Oscilação (Optical Magnetic Twisting Cytometry - OMTC). Os grânulos ferromagnéticos ancorados à superfície celular são magnetizados horizontalmente por um sistema de magnetização (setas grandes), de forma que cada grânulo se torna um magneto. A seguir, o campo magnético introduz um torque oscilatório vertical (setas verticais cinzas) que leva os grânulos a girarem e se deslocarem. O movimento dos grânulos é modulado pelas propriedades viscoelásticas do citoplasma subjacente, sendo utilizado para cálculo das variáveis de mecânica celular. M denota a direção do momento magnético da esfera. Adaptado de Fabry, B. 2001 (96).....	41

- Figura 10** CMLV recobertas pelos grânulos ferromagnéticos. **A.** Imagem de microscopia eletrônica de varredura (1000x) de CMLV com grânulos magnéticos aderidos à sua superfície. **B.** Imagem em microscópio ótico das CMLV aderidas em poço de cultura imediatamente antes do início do experimento de OMTC (10x). Arquivo pessoal..... 43
- Figura 11** Imagem do posicionamento dos poços de cultura contendo CMLV recobertas por grânulos magnéticos no experimento de OMTC..... 44
- Figura 12** Modificação da rigidez de CMLV com a progressão das passagens da cultura celular. Observa-se redução progressiva do valor de G com o aumento das passagens: **A-** cultura de CMLV de aorta (coeficiente de correlação = -0,32; $p < 0,001$), **B-** cultura de CMLV de artéria femoral (coeficiente de correlação = -0,3; $p < 0,001$), **C-** cultura de CMLV de artéria renal (coeficiente de correlação = -0,06; $p = 0,34$), **D-** cultura de CMLV de artéria mamária (coeficiente de correlação = -0,37; $p < 0,001$) e **E-** cultura de CMLV de artéria carótida (coeficiente de correlação = -0,42; $p < 0,001$). As colunas representam a mediana de G e as barras, o intervalo de confiança 95%. Todas as correlações foram feitas pelo teste de Spearman..... 68
- Figura 13** Modificação da histerese do citoplasma de CMLV com a progressão das passagens da cultura celular. Observou-se aumento significativo da histerese (η) com a progressão das passagens nas seguintes culturas: **A-** cultura de CMLV de aorta (coeficiente de correlação = 0,45; $p < 0,001$), **D-** cultura de CMLV de artéria mamária (coeficiente de correlação = 0,33; $p < 0,001$) e **E-** cultura de CMLV de artéria carótida (coeficiente de correlação = 0,62; $p < 0,001$). Não foi encontrada correlação significativa entre η e passagem nas culturas de CMLV de artérias femoral (B) e renal (C). As

- colunas representam a mediana de η e as barras, o intervalo de confiança 95%. Todas as correlações foram feitas pelo teste de Spearman..... 69
- Figura 14** Modificações do citoesqueleto de α -actina com a progressão dos subcultivos *in vitro*. Os gráficos mostram a comparação do valor médio de intensidade de sinal por célula (escala de cinza) de CMLV marcadas com faloidina, em diferentes passagens. **A:** Cultura proveniente de artéria renal, **B:** Cultura proveniente de artéria femoral, **C e D:** culturas provenientes de artérias mamárias. Houve diferença estatística das médias em todos os casos ($p < 0,01$). As barras representam o intervalo de confiança 95%. A análise das imagens revela, ainda, que as CMLV se tornaram menores e menos alongadas com o avanço das passagens. Constatou-se diminuição progressiva na quantidade de colágeno tipo I com a progressão das passagens *in vitro*. Esta diferença quantitativa não foi observada no caso da α -actina de músculo liso. Como este resultado foi uma análise exploratória derivada do seguimento de uma cultura de CMLV entre P7 e P13, não foram feitas análises estatísticas (Figura 15)..... 71
- Figura 15** Redução do conteúdo de colágeno tipo I nos extratos celulares de CMLV com a progressão das passagens da cultura. A quantificação foi feita pela técnica de Western Blot e GAPDH como controle. Foi considerado como 100% de conteúdo de colágeno tipo I o apresentado nos extratos de CMLV em passagem 7. Foi uma análise exploratória de uma cultura isolada e, dessa forma, análises estatísticas não foram realizadas..... 72
- Figura 16** Caracterização estrutural de artérias estudadas. **A:** A quantidade de elastina dentro de camada média diminuiu à medida que os vasos se afastaram do coração. A aorta

torácica apresentou a maior quantidade de fibras elásticas, enquanto que a artéria femoral e a artéria renal, as menores quantidades desta fibra. No gráfico, as artérias são apresentadas, em ordem decrescente de distância, a partir do coração. Pontos: média, barras: Intervalo de Confiança de 95%. **B:** A relação espessura/diâmetro interno foi maior nos ramos da aorta abdominal, em comparação com os vasos torácicos. Pontos: média, barras: intervalo de confiança 95%. **C:** Coloração Verhoeff Van-Gieson da artéria femoral e da aorta torácica. A aorta torácica apresentou a maior espessura e maior quantidade de elastina dentro de sua camada média em comparação com todos os outros vasos. Na figura, a artéria femoral e a aorta torácica são comparadas em termos de espessura da camada média (fotos principais) e em termos de percentagem de elastina (fotos menores, em que as fibras elásticas são coradas em roxo escuro).

75

Figura 17 Relação entre MEC e CMLV na camada média das artérias estudadas. **A.** A quantidade de matriz extracelular (MEC) circundando as células de músculo liso vascular (CMLV) foi menor nas artérias distantes do coração (femoral e renal), em comparação com as artérias mamária e aorta torácica. **B.** Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) de todos os vasos analisados, destacando que a artéria femoral e renal apresentam CMLV mais alinhadas e circundadas por menos MEC do que aorta torácica e a artéria mamária.....

76

Figura 18 Análise ultraestrutural da camada média das artérias femoral e aorta. As imagens de microscopia eletrônica de transmissão claramente expõem as diferenças de organização das CMLV e da MEC entre as artérias femoral e aorta torácica. As CMLV da artéria femoral são mais alinhadas e circundadas por menor quantidade de MEC do que as CMLV da aorta torácica, que apresentam morfologia

- mais irregular..... 77
- Figura 19** Comparação das dimensões de adesões focais (AF) entre CMLV de diferentes leitos arteriais por imagens de microscopia eletrônica de transmissão. As CMLV de diferentes origens diferiram significativamente em termos de tamanho das AF (ANOVA one-way, $p < 0,001$). **A.** As CMLV de artéria femoral apresentaram área média de AF significativamente maior do que as CMLV das outras artérias estudadas. Colunas: conversão logarítmica da área de AF. Barras: intervalo de confiança de 95%. Os asteriscos marcam as comparações *post-hoc* das artérias em relação à artéria femoral. **B.** Imagem de MET (2500x) de CMLV de artéria femoral. A seta aponta a estrutura de uma AF. **C.** Imagem de MET (5000x) de CMLV de aorta torácica. A seta aponta a estrutura de uma AF. Os resultados apresentados reforçam que as CMLV da artéria femoral organizam diferentemente o citoesqueleto em relação às CMLV de outras artérias..... 79
- Figura 20** Comparação da forma das CMLV entre diferentes artérias. **A.** As CMLV de artéria femoral apresentaram-se mais alongadas do que as CMLV de outros vasos (exceto artéria coronária). No primeiro gráfico, a variável estudada foi circularidade e, no segundo, AR (maior eixo celular/menor eixo celular). Colunas: Média \pm intervalo de confiança 95%. **B.** Imagens de microscopia confocal de CMLV de artéria femoral e aorta torácica marcadas com faloidina, destacando o citoesqueleto de α -actina. Os resultados apresentados reforçam que as CMLV da artéria femoral organizam diferentemente o citoesqueleto em relação às CMLV de outras artérias..... 80
- Figura 21** Comparação das dimensões de adesões focais (AF) entre CMLV de aorta torácica e de artéria femoral por imagens de microscopia confocal **A.** Comparou-se o tamanho *in vitro* de

AF entre CMLV de artéria femoral e de aorta torácica utilizando imagens com marcação imunofluorescente da proteína vinculina (B e C, vermelho: vinculina, azul: núcleo). Consistente com os resultados obtidos usando imagens de MET, as CMLV de aorta torácica apresentaram AF significativamente menores em comparação com as CMLV de artéria femoral. Colunas: média da área de AF após conversão logarítmica. Barras: intervalo de confiança de 95%.

80

Figura 22 Resultado da análise de ciclo celular das culturas de CMLV das artérias estudadas. A percentagem de células em cada fase do ciclo celular foi homogênea, independentemente do vaso de origem. M1: fase G0-G1, M2: fase S, M3: fase G2, M4: fase sub-G0.....

81

Figura 23 Variação da rigidez das CMLV de acordo com a posição na árvore arterial. Os valores do score-Z da variável G (ZG) para cada artéria são apresentados no primeiro gráfico (**A**) e, no segundo (**B**), são apresentados os valores brutos de G. Em ambos, as artérias estão dispostas na ordem de distância decrescente a partir do coração (femoral, renal, aorta abdominal, carótida, mamária, aorta torácica e coronária), e um aumento da rigidez das CMLV, conforme seu vaso de origem se distancia do coração, pode ser evidenciado ($p < 0,001$). Quando esses dados mecânicos são interpretados em conjunto com os dados anatômicos dos vasos previamente expostos, é evidente que as CMLV de artérias com menos fibras elásticas e menos MEC, em camada média (femoral e renal), são mais rígidas em comparação com as CMLV da aorta torácica. Em ambos os gráficos, os asteriscos marcam as comparações *post-hoc* das artérias em relação à artéria femoral.....

83

Figura 24 Modificação do comportamento mecânico das CMLV após estiramento cíclico. **A.** Depois de 24h de estiramento cíclico

(10%/1Hz), apenas as CMLV da artéria mamária apresentaram-se menos rígidas em relação aos controles. **B.** Após 48h de estiramento cíclico (10%/1Hz), todas as CMLV tornaram-se menos rígidas em relação aos seus controles. Em ambos os gráficos (A e B), os valores de G não podem ser comparados entre os leitos arteriais, visto que as CMLV dos diferentes leitos vasculares foram avaliadas em experimentos diferentes, fato que sabidamente interfere nos resultados do experimento de OMTC. As colunas pretas representam mediana de G das CMLV-controle não estiradas e as colunas cinza, a mediana de G pós-estiramento. As barras representam o intervalo de Confiança 95%..... 87

Figura 25 Persistência das diferenças regionais de rigidez de CMLV após 48h de estiramento cíclico. O gráfico mostra que a rigidez das CMLV das artérias carótida e aorta torácica continua significativamente menor que a apresentada pelas CMLV das artérias renal e femoral mesmo após 48h de estiramento cíclico. Os asteriscos marcam as comparações *post-hoc* das artérias em relação à artéria femoral. Esse achado reforça que a rigidez basal das CMLV varia de acordo com a sua posição na árvore arterial..... 87

Figura 26 Comparação de expressão proteica entre CMLV de aorta e de artéria femoral (proteômica shotgun) **A.** Um total de 1.628 proteínas foram identificadas/quantificadas (232 exclusivamente nas CMLV de aorta e 168, exclusivamente nas CMLV de artéria femoral). **B.** 10 proteínas foram superexpressas nas CMLV de aorta e estavam principalmente relacionadas com a estrutura e a organização do citoesqueleto ($p < 0,05$). **C.** Comparação de expressão proteica entre CMLV da aorta e femoral por função molecular. O tamanho das barras representa a quantidade dessas proteínas (barras laranja: CMLV de aorta, barras azuis: CMLV de artéria femoral). A quantidade de proteínas relacionadas

- com a organização do citoesqueleto expressas pelas CMLV de aorta foi notavelmente superior em relação à expressa pelas CMLV de artéria femoral ($p < 0,05$). Esse resultado é consistente com o comportamento mecânico dicotômico das CMLV desses dois territórios..... 90
- Figura 27** Dispersão da ancestralidade racial da população estudada. Os números na barra da ordenada representam a proporção de contribuição para a ancestralidade racial, variando entre zero e um. O gráfico demonstra que houve predomínio de ancestralidade Europeia (barras cinza-escuro) em relação à ancestralidade Africana (barras cinza de tom intermediário) e Ameríndia (barras cinza-claro)..... 92
- Figura 28** Histogramas representando a distribuição das variáveis mecânicas definidoras da viscoelasticidade das CMLV na população estudada. Os gráficos mostram que a rigidez aparente da célula (Gráfico A, variável Gr), com os seus componentes elástico (Gráfico B, variável G'r) e dissipativo (Gráfico C, variável G''r) exibem distribuição normal na amostra populacional (Kolmogorov-Smirnov: $p=0,2$; $p=0,2$ e $p=0,09$, respectivamente), destacando que existe variabilidade interindividual desse traço biológico..... 95
- Figura 29** Comparação das propriedades mecânicas das CMLV entre mulheres e homens / tabagistas e não tabagistas. **A.** Gráfico exibindo as diferenças entre as variáveis mecânicas de CMLV (Gr, G'r, G''r) de mulheres e homens. As mulheres apresentam maior rigidez aparente de CMLV (Gr) em comparação aos homens, principalmente por aumento do módulo elástico (G'r). **B.** De forma análoga ao observado em mulheres, os tabagistas apresentaram rigidez aparente de CMLV (Gr) maior do que não tabagistas, principalmente por aumento do módulo elástico (G'r). As barras de erro representam o intervalo de confiança 95% e suas dimensões

são compatíveis com análise por poço dos experimentos de OMTC.....	98
---	----

Resumo

Dinardo CL. Estudo das propriedades mecânicas das células de músculo liso vascular em situações fisiológicas e patológicas [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2015.

Introdução: As células do músculo liso vascular (CMLV) são quiescentes nos vasos adultos, com baixa capacidade de migração e de secreção de matriz extracelular, caracterizando fenótipo contrátil. Evidências apontam para a heterogeneidade fenotípica das CMLV ao longo da árvore arterial: há distribuição heterogênea de doenças e de resposta a determinadas drogas nos diferentes vasos, além de variabilidade de expressão dos genes de proteínas contráteis de músculo liso entre eles. O papel das CMLV, em fase adulta, é classicamente descrito como restrito à regulação do tônus de pequenos vasos, sendo insignificante a contribuição da mecânica das CMLV para a complacência das artérias elásticas. Existe a hipótese de que a viscoelasticidade das CMLV contribua para a mecânica final das artérias, sendo o enrijecimento dessas células associado à rigidez arterial. **Objetivo:** Estudar a variabilidade das propriedades mecânicas e de expressão proteica das CMLV, ao longo da árvore arterial, buscando identificar moduladores regionais para esse fenótipo. Avaliar se situações clínicas sabidamente associadas à rigidez arterial (envelhecimento, sexo feminino pós-menopausa, ancestralidade genética africana, diabetes mellitus e tabagismo) cursam com enrijecimento de CMLV. **Métodos:** 1) Estudou-se a composição e a organização da camada média de diferentes artérias. As CMLV desses vasos foram avaliadas quanto à viscoelasticidade de citoplasma (G), por meio do ensaio de Citometria Magnético Ótica de Oscilação e, quanto à expressão proteica global, usando cromatografia multidimensional e espectrometria de massas em tandem de alta resolução (Proteômica Shotgun). Os dados mecânicos obtidos foram correlacionados com as características da matriz extracelular (MEC) dos vasos de origem (porcentagem de elastina e quantidade de MEC). Em paralelo, foi realizado experimento de estiramento cíclico (10%/1Hz) das CMLV das diferentes artérias por 24 e 48h, seguido pela mensuração de rigidez de citoplasma. 2) Foram isoladas as CMLV de fragmentos de artéria mamária de 80 pacientes submetidos à cirurgia de revascularização do miocárdio, células essas que foram avaliadas quanto à viscoelasticidade de citoplasma (G, G' e G''). Elaborou-se modelo estatístico para avaliar se as variáveis clínicas idade, sexo feminino, ancestralidade africana, tabagismo e diabetes mellitus estavam associadas a alterações de mecânica celular. **Resultados:** 1) A viscoelasticidade das CMLV variou significativamente entre as artérias. As CMLV provenientes de artérias distais (artérias femoral e renal) mostraram-se significativamente mais rígidas que as CMLV de aorta torácica ($p < 0,001$). Identificou-se correlação negativa entre rigidez de CMLV e quantidade de MEC / elastina na camada média vascular. O regime de estiramento cíclico por 48h reduziu globalmente a rigidez das CMLV. As CMLV provenientes da aorta torácica expressaram maior quantidade de proteínas relacionadas com a estrutura e a organização do citoesqueleto em relação às CMLV da artéria femoral. 2) Constatou-se variabilidade interindividual de viscoelasticidade de CMLV e associação entre tabagismo e sexo feminino com enrijecimento de CMLV. **Conclusões:** As CMLV são heterogêneas quanto às propriedades mecânicas, à organização do citoesqueleto e à expressão proteica ao longo da árvore arterial, reforçando o conceito de plasticidade fenotípica das CMLV. A mecânica das CMLV é modulada pelas características da MEC e pela tensão circunferencial cíclica aplicada às paredes vasculares pelo fluxo sanguíneo. Mulheres pós-menopausa e tabagistas exibem enrijecimento de CMLV, sendo esse fato um provável contribuinte para a rigidez arterial associada a essas condições e um possível alvo terapêutico a ser avaliado futuramente.

Descritores: Músculo liso, Rigidez vascular, Citoesqueleto, Tabagismo, Citoesqueleto de actina, Artérias, Proteômica

Abstract

Dinardo CL. *Study of the mechanical properties of vascular smooth muscle cells under physiological and pathological situations* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”, 2015.

Rational: Vascular smooth muscle cells (VSMC) lose their ability to migrate and secrete extracellular matrix (ECM) with the end of vascular development, condition known as contractile phenotype and reversible in the presence of vascular injury. There is evidence of heterogeneity of VSMC phenotype along arterial tree, as the distribution of diseases (atherosclerosis) and the response to drugs vary between different vessels, as well as the expression of smooth muscle-contractile protein genes. The role played by VSMC mechanics on determining large arteries' compliance was always considered irrelevant. It has been hypothesized that the VSMC mechanical properties are important for vascular mechanics, especially in the pathological scenario, where VSMC stiffening may be associated with arterial rigidity.

Goals: Study the variation of VSMC mechanics and protein expression along arterial tree, identifying regional modulators of this phenotype. Evaluate if clinical situations associated with arterial rigidity (ageing, post-menopausal women, African ancestry, diabetes mellitus and smoking) concur with VSMC stiffening.

Methods: 1) Different arteries were studied in terms of composition and organization of their media layer. VSMC isolated from these arteries were evaluated regarding cytoplasm viscoelasticity, measured using Optical Magnetic Twisting Cytometry Assay (OMTC), and protein expression, using two-dimensional liquid chromatography and tandem mass spectrometry (Shotgun Proteomics). Mechanical data were correlated with ECM characteristics (percentage of elastin and ECM amount) of the vessels of origin. In parallel, VSMC of different arteries were subjected to cyclic stretching (10%/1Hz) during 24 and 48h, followed by the measurement of their cytoplasm rigidity. 2) VSMC were isolated from fragments of mammary artery of 80 patients subjected to coronary bypass surgery and evaluated regarding their viscoelasticity (G , G' e G''). A statistic model was elaborated to address if the clinical variables age, female sex, African ancestry, smoking and diabetes mellitus were associated with changes of VSMC mechanics.

Results: 1) VSMC viscoelasticity varied significantly amongst the studied arteries. VSMC from heart-distant arteries (femoral and renal arteries) were stiffer than VSMC from thoracic aorta ($p < 0,001$). There was a negative correlation between VSMC rigidity and the amount of ECM / percentage of elastin within the media layer. 48h-cyclic stretching was associated with a global reduction of VSMC rigidity. VSMC of thoracic aorta expressed significantly more proteins associated with cytoskeleton structure and organization than VSMC of femoral artery. 2) There was a significant inter-individual variation of VSMC viscoelasticity. Smoking and female sex were associated with VSMC stiffening.

Conclusion: VSMC mechanics, cytoskeleton organization and protein expression are heterogeneous along arterial tree. VSMC mechanical properties are modulated by ECM characteristics and by regional mechanical forces. This reinforces the concept of phenotypic heterogeneity of VSMC. Post-menopausal women and smokers exhibit stiffer VSMC, representing an important factor for the understanding of the arterial rigidity associated with these conditions and also a possible future therapeutic target.

Descriptors: Smooth muscle, Vascular stiffness, Cytoskeleton, Smoking, Actin cytoskeleton, Arteries, Proteomics

1. Introdução

1.1 Estrutura vascular

A estrutura vascular observada em vertebrados é o resultado final de uma série de adaptações fisiológicas que acompanharam a evolução do sistema circulatório. Quando houve a transição de um sistema circulatório aberto para fechado, os vasos adquiriram propriedades mecânicas que pudessem suportar o fluxo sanguíneo pulsátil (1). Eles passaram a funcionar como grandes reservatórios elásticos, permitindo acomodar o estresse circunferencial aplicado pelo fluxo sanguíneo, durante a sístole cardíaca, bem como o seu recolhimento para situação inicial durante a diástole (1). A estrutura vascular resultante dessa adaptação fisiológica é comum aos invertebrados e vertebrados com sistema circulatório fechado e caracteriza-se por apresentar incremento não linear do módulo elástico em resposta à pressão aplicada em suas paredes, refletindo a composição da matriz extracelular (MEC).

O vaso maduro é composto por três camadas distintas: íntima, média e adventícia (1).

A camada íntima é formada pelas células endoteliais em monocamada e pela área subendotelial, composta por fibrilina, fibras de colágeno e células de músculo liso vascular (CMLV). A função das CMLV na camada íntima não está definida, podendo corresponder apenas ao aprisionamento delas durante o processo de vasculogênese (2). Uma hipótese alternativa é que essas células sejam originárias da camada média, tendo migrado até a camada íntima, ou que correspondam à transdiferenciação das células endoteliais em CMLV (3). As células endoteliais são ligadas à lâmina basal, por sua vez suportada pela lâmina elástica interna, e exercem papel importante no recrutamento de CMLV

para a parede vascular durante a vasculogênese, além de modular o comportamento das referidas células, a partir de diversos estímulos ambientais durante e após o desenvolvimento da árvore arterial (4). O papel da camada íntima para as propriedades mecânicas dos vasos é insignificante (1).

A camada média é composta, essencialmente, por CMLV, elastina e colágeno (1). A elastina se organiza em lâminas fenestradas (lâminas elásticas), entremeadas pelas fibras de colágeno e, caracteristicamente, apresenta baixa resistência ao estiramento (1). O conjunto formado pela lâmina elástica e pelas CMLV adjacentes define uma unidade lamelar, sendo o número de unidades lamelares de um vaso diretamente proporcional às forças mecânicas regionais aplicadas em sua parede pelo fluxo sanguíneo. Sendo assim, o número de unidades lamelares é muito maior em vasos proximais ao coração, que sofrem maior tensão em sua parede do que em vasos distais (5). A principal função da elastina é a transferência do estresse mecânico aplicado pelo fluxo sanguíneo na face luminal da parede vascular, por toda a estrutura do vaso, permitindo a distensão deste durante a sístole (6). Entre as lamelas de elastina existem agrupamentos de colágeno, que não têm orientação preferencial em situações de baixa pressão, mas se alinham conforme a tensão na parede vascular aumenta, evitando a ruptura vascular e viabilizando o recolhimento das paredes para o diâmetro basal na diástole (7, 8).

Em situações de baixas pressões, há maior distensão dos vasos em resposta à pressão aplicada a suas paredes devido à atuação primordial das fibras de elastina da camada média, que oferecem pouca resistência ao estresse pressórico. Conforme há aumento da pressão, as fibras de colágeno, anteriormente quiescentes e sem arranjo definido, são alinhadas a fim de

suportar a tensão passiva da parede e restringir a distensão dos vasos (9). Essa resposta em duas fases dos vasos frente à pressão exercida pelo fluxo sanguíneo define a não linearidade do incremento de seu módulo elástico, garantindo a capacidade de distensão e recolhimento (1, 10).

A camada adventícia é a mais externa da parede vascular e é composta por MEC rica em colágeno produzido por população heterogênea de miofibroblastos (11). A alta proporção de colágeno nessa camada é fator protetor para os vasos, evitando sua ruptura em altas tensões (12). A camada adventícia contém ainda a *vasa vasorum*, responsável pela irrigação das camadas mais externas do vaso, e um reservatório de células progenitoras capazes de diferenciação em CMLV e ocupação da camada média no vaso maduro (1).

1.2 Desenvolvimento das células de músculo liso vascular (CMLV) durante a vasculogênese

Existem dois processos distintos que levam à formação de vasos: vasculogênese e angiogênese. Na vasculogênese, há formação de novos vasos a partir de células precursoras embrionárias, enquanto que, na angiogênese, há a formação de novos vasos a partir de vasos preexistentes via brotamento (13). Na vasculogênese, ocorrem recrutamento e diferenciação de progenitores de CMLV, que exercerão papel biossintético (síntese e secreção de MEC), proliferativo e contrátil no vaso em desenvolvimento (14). Quando os precursores de CMLV recrutados se associam ao endotélio embrionário, há início da produção e da organização da MEC, e a proporção de cada um dos

seus componentes (elastina, colágeno, proteoglicanas e glicoproteínas adesivas) refletirá, no vaso maduro, as propriedades físicas esperadas para cada segmento vascular (15).

Durante a vasculogênese, os precursores de CMLV passam por processo de desenvolvimento até atingir o fenótipo diferenciado, presente no vaso completamente formado (14). Existem diversos marcadores moleculares desse processo de diferenciação, dentre os quais se destaca o grupo de proteínas contráteis de músculo liso, composto por: α -actina de músculo liso (*Smooth Muscle Alpha Actin* – SM α A), isoformas de cadeia pesada de miosina 1 e 2 (*Myosin Heavy Chain* 1 e 2- MHC1 e 2), calponina h1, proteína de músculo liso 22 α (*Smooth Muscle* 22 α - SM22 α), caldesmon e smoothelina (14). Tais proteínas são usadas para a identificação dos precursores das CMLV durante os diversos estágios da formação vascular. A α -actina é o marcador de maior relevância, visto que responde por 40% do total de proteínas das CMLV e é expressa em fases bem iniciais da vasculogênese (16). As outras proteínas marcadoras (MHC 1 e 2, calponina, SM22 α e smoothelina) são expressas em fases mais tardias do desenvolvimento vascular (17, 18).

Diversos fatores influenciam o processo de vasculogênese apontados como determinantes da heterogeneidade estrutural apresentada pelos vasos sanguíneos maduros. Como as CMLV orquestram e efetuam a secreção e depósito de MEC durante o desenvolvimento vascular, a principal ação desses fatores é a modulação do comportamento dessas células, sendo os mais importantes: origem embrionária das CMLV, fatores hemodinâmicos e composição da MEC.

- **Origem embrionária da CMLV**

Existem duas principais origens das CMLV: a crista neural, cujas células progenitoras dão origem às CMLV das artérias localizadas à saída do coração (arco aórtico) e o mesoderma, que dará origem aos demais vasos (19). Existem diferenças fenotípicas marcantes entre CMLV originárias de cada uma dessas regiões, fator, muitas vezes, apontado como essencial para justificar as diferenças estruturais apresentadas pelos vasos maduros (1). Quando as células da crista neural são lesadas ou removidas na fase inicial de desenvolvimento de aves, elas são substituídas por células originárias do mesoderma nas paredes vasculares, as quais produzem MEC de forma anormal e desordenada (20). O padrão de expressão gênica das CMLV provenientes da crista neural difere do apresentado pelas células derivadas do mesoderma, as quais expressam dez vezes mais α -actina e tropoelastina do que as derivadas de crista neural (21). A resposta das CMLV ao fator de transformação de crescimento β (*Transforming Growth Factor β* - TGF β) também difere conforme a sua origem embrionária: células derivadas da crista neural aumentam a síntese de DNA após a exposição TGF β , enquanto que as células derivadas do mesoderma têm seu crescimento inibido por esse mediador (19).

- **Fatores hemodinâmicos**

Ainda que a rede vascular primária seja formada na ausência de fluxo sanguíneo e pressão, todos os eventos subsequentes que determinam a

formação dos vasos com múltiplas camadas ocorrem na presença desses dois fatores hemodinâmicos (14). Durante a evolução do processo de vasculogênese, tanto o desenvolvimento da MEC quanto a diferenciação das CMLV estão correlacionadas com o aumento na pressão de pulso na circulação embrionária (22, 23). Além de a pressão e o fluxo sanguíneo determinarem o diâmetro e a espessura dos vasos em formação (24), modificações nessas variáveis hemodinâmicas podem resultar em alterações estruturais dos vasos durante a vida adulta, principalmente redução do diâmetro após diminuição do fluxo sanguíneo ou aumento da espessura vascular com o aumento da pressão transmural (25, 26).

- **Matriz extracelular (MEC)**

A capacidade das CMLV de diferentes segmentos vasculares em produzir componentes da MEC é variável: CMLV provenientes da aorta torácica produzem, em cultura, mais elastina do que aquelas provenientes da aorta abdominal (27). Isso se reflete nas diferenças interarteriais de composição da MEC dos vasos, sendo que quanto maior a proporção de elastina na camada média, maior a complacência da parede vascular (1).

Durante a vasculogênese, os diversos componentes da MEC são secretados pelas CMLV e dispostos na camada média até ser atingida a organização observada nos vasos maduros. Mudanças na MEC, ainda na fase de vasculogênese, podem afetar a expressão gênica, a adesão e a migração das próprias CMLV (28). Ratos knockout para o gene da integrina morrem, pouco após o nascimento, por doença arterial obstrutiva decorrente de

proliferação subendotelial e reorganização de CMLV, sugerindo que a integrina exerce papel importante na inibição da proliferação e migração das CMLV, mantendo íntegra a estrutura vascular (28). De forma semelhante, existem, na MEC, moléculas da família das proteoglicanas que atuam mediando citocinas e fatores de crescimento no vaso em formação, modulando também a proliferação dos precursores de CMLV (29).

Após o término da vasculogênese, o conceito mais aceito é que as CMLV permaneçam em estado quiescente e contrátil na camada média dos vasos formados (30). Por estado contrátil, entende-se que as CMLV apresentem baixa capacidade de proliferação e migração, além de expressão plena das proteínas contráteis de músculo liso (30). Em situações fisiológicas, no vaso maduro, as CMLV mantêm o tônus contrátil e regulam a pressão sanguínea nos vasos de resistência, redistribuindo o fluxo sanguíneo gerado pelo coração (31). Em grandes vasos elásticos, por outro lado, o papel atribuído a essas células para a mecânica vascular era, até recentemente, considerado irrelevante. Em situações de injúria vascular, as CMLV podem modificar o seu fenótipo e voltar a apresentar capacidade de migração, proliferação e secreção de MEC, evento importante para a fisiopatogenia de muitas doenças vasculares (1). Essa plasticidade fenotípica das CMLV é denominada modulação fenotípica.

1.3 Caracterização dos fenótipos contrátil e secretor das CMLV e definição de modulação fenotípica

Durante a fase de vasculogênese, as CMLV apresentam alta capacidade proliferativa, migratória e secretória, sendo, eventualmente, chamadas de fibroblasto-símiles (32). Após a fase de desenvolvimento vascular, as CMLV maduras passam a ter função contrátil e adaptam sua maquinaria intracelular para cumprir essa função, de forma que a taxa de proliferação celular e de síntese de MEC é muito baixa e há maior expressão de proteínas relacionadas ao processo de contração (33). Quando há injúria vascular, ocorre um processo de troca de fenótipos ou modulação fenotípica das CMLV. Elas voltam a apresentar taxa de proliferação elevada, bem como capacidade migratória e de secreção proteica aumentada (30). A modulação fenotípica define a plasticidade das CMLV, visto que, mesmo diferenciadas, elas mantêm a capacidade de voltar a apresentar o fenótipo secretor, presente em fase de desenvolvimento vascular (33).

O processo de modulação fenotípica tem papel importante na fisiopatogenia da aterosclerose, em que as CMLV têm participação complexa e dependente, em fases iniciais, de um fenótipo mais secretor e migratório (34, 35). A modulação fenotípica também já foi associada à fisiopatogenia da hipertensão arterial sistêmica e da rigidez arterial associada ao envelhecimento (31). Ainda que a modulação fenotípica de CMLV seja a melhor justificativa para a presença de células fenotipicamente distintas das comumente presentes na camada média dos vasos em situações de injúria vascular, existem hipóteses alternativas que consideram a permanência de um grupo de CMLV

com fenótipo secretor nos vasos maduros (36) ou a participação de células circulantes derivadas da medula óssea no processo de reparo vascular (37).

O fenótipo apresentado pelas CMLV em situações patológicas é o resultado final da integração de múltiplos estímulos ambientais (Figura 1). Esses estímulos modulam o padrão de expressão do grupo de proteínas contráteis de músculo liso (α -actina de músculo liso, miosina de cadeia pesada isoformas 1 e 2, proteína de músculo liso 22 α , calponina, smoothelina e caldesmon) de forma a atender cada situação patológica particular (30). A expressão dos genes que codificam esse grupo de proteínas é fundamental no processo de modulação fenotípica e altamente dependente de caixas CArG (sequências de DNA CC[A/T]₆GG) localizadas nas regiões promotoras dos genes codificadores, que têm como fator de ligação os homodímeros do fator de resposta ao soro (*Serum Response Factor* - *SRF*) e o cofator miocardina (38).

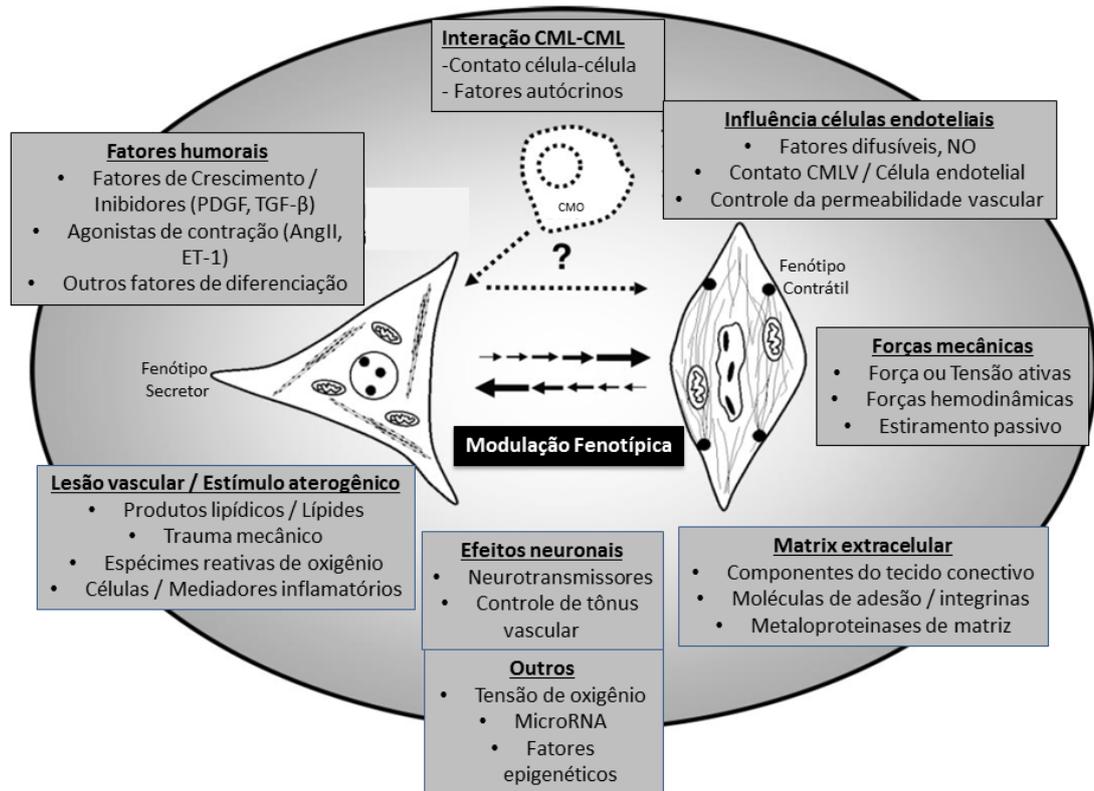


Figura 1. O processo de diferenciação das CMLV é altamente plástico e dependente da integração de múltiplos fatores ambientais. A figura sumariza os múltiplos elementos ambientais que, de forma comprovada ou hipoteticamente, são importantes na diferenciação das CMLV. Ela reforça o conceito de que a modulação ou troca fenotípica é dependente de múltiplos fatores, que atuam determinando o padrão de expressão dos genes de proteínas contráteis de músculo liso. Existem dois fenótipos extremos: secretor (célula representada à esquerda) e contrátil (célula representada à direita), com um espectro de fenótipos intermediários entre eles. As múltiplas setas entre as células ilustram a complexidade de passos na transição entre os fenótipos e são representadas duas vias, ao invés de uma via reversível, para ressaltar que a modulação fenotípica nem sempre segue a mesma via para diferenciação e desdiferenciação. Finalmente, a figura também apresenta a hipótese de que células progenitoras da medula óssea (CMO) sejam capazes de se diferenciar e atuar no processo de reparo vascular. (Adaptado de Owens, GK 1995) (33).

A miocardina viabiliza a ligação do SRF às caixas CA₁G, culminando com o recrutamento da RNA polimerase II (Pol II) e com a expressão dos genes em questão. Existem fatores que cooperam para a interação miocardina – SRF- CA₁G, destacando-se o Prx1 (*Paired-related homeobox gene-1*) e os

complexos formados pela interação entre a proteína PIAS1 (*Protein Inhibitor of Activated Stat 1*) com os fatores básicos hélice-alça-hélice. Existem também fatores que reprimem essa interação, como o KLF4 (*Kruppel-like Factor 4*), o EIK-1 (*ETS-like Transcriptor Factor 1*) e o Herp1 (*HES-related Repressor Protein 1*). É justamente a combinação desses fatores pró-expressão e anti-expressão que determina o fenótipo das CMLV em cada situação (30).

É importante ressaltar que o próprio status organizacional do citoesqueleto é capaz de modificar a expressão dos genes de proteínas contráteis de músculo liso (33). Existem fatores de transcrição relacionados à miocardina que são sequestrados no citoplasma pela actina monomérica globular (G-actina) e liberados quando há polimerização da actina (F-actina), sendo, então, translocados ao núcleo onde, ao se associar ao SRF, levam à expressão dos genes de proteínas contráteis de músculo liso. Isso denota que o SRF também funciona como sensor de polimerização da actina e como regulador da organização do citoesqueleto (39).

Existem múltiplos elementos capazes de modular o fenótipo das CMLV, cuja ação final principal envolve a modificação da expressão das proteínas contráteis de músculo liso. Dentre esses moduladores, merecem destaque:

- *Platelet-derived growth factor (PDGF)* e *Transforming growth factor β (TGF β)*: são considerados elementos-chaves na modulação fenotípica (40). O PDGF regula negativamente a expressão dos genes de proteínas contráteis de músculo liso (principalmente α -actina e SM-MHC) (41), estimulando a proliferação e a migração das CMLV (42). O TGF β , por sua vez, regula positivamente os genes de proteínas contráteis de músculo liso (43);

- Metaloproteinases de matriz (MPM): são endopeptidases produzidas pela CMLV e por macrófagos, envolvidos no processo de remodelamento vascular. Nas situações em que há aumento das MPM, há, paralelamente, aumento da capacidade migratória das CMLV (44);
- Vias de sinalização *Notch* e *Wnt* controlam a diferenciação das CMLV e a modulação do seu fenótipo frente a diferentes estímulos ambientais por meio da influência positiva ou negativa sobre fatores de transcrição que determinam a expressão gênica das CMLV (31);
- MicroRNAs (miRNAs): Os miRNAs miR145 e miR143 regulam uma série de moduladores da dinâmica do citoesqueleto, sendo sua transcrição modulada pelo SRF e pela miocardina. Na ausência desses miRNAs específicos, há desarranjo das fibras de actina e redução da capacidade migratória das CMLV. Como consequência, os vasos formados são dilatados e não há formação de neointima em situações de injúria vascular (45);
- Fatores epigenéticos: recentemente, foi demonstrado que o fator de transcrição SRF e seu cofator miocardina são incapazes de se ligar às regiões promotoras de genes de proteínas contráteis de músculo liso, na presença de restrições espaciais associadas à estrutura da cromatina, principalmente devido à hiperacetilação de histonas (46).

As apresentações das CMLV como absolutamente proliferativas sintéticas (fenótipo secretor) ou como completamente quiescentes e contráteis (fenótipo contrátil) são hoje reconhecidas como duas pontas de um espectro de fenótipos intermediários, visto que os fenômenos de diferenciação e proliferação celular não são mutuamente excludentes (30, 47). Isso leva à heterogeneidade fenotípica das CMLV.

1.4 Heterogeneidade fenotípica das CMLV

A função primária das CML em animais vertebrados maduros é a contração (38). Visando ao desempenho dessa função, as CML diferenciadas expressam um repertório de proteínas de citoesqueleto cuja interação garante à célula a habilidade de manter sua forma e contrair quando houver estímulo (38). Entretanto, as CML desempenham papéis diferentes conforme o órgão a que pertencem (intestino, vasos, bexiga, vias aéreas), tanto na fase de desenvolvimento quanto após a maturação, e estão sujeitas a estímulos ambientais diferentes em cada um desses sítios (38). Há, portanto, grande heterogeneidade fenotípica dentro do grupo da CML, confirmando que as funções exercidas por essas células em cada um dos órgãos em que elas estão presentes extrapolam em muito a contração celular.

No caso específico dos vasos sanguíneos, existem evidências de que as CMLV também não sejam fenotipicamente homogêneas em toda a extensão da árvore vascular (38). A mais importante delas diz respeito à existência de heterogeneidade de distribuição de algumas doenças vasculares, sendo a aterosclerose a de maior relevância. Enquanto algumas regiões são resistentes

ao desenvolvimento de placas de ateroma, como a artéria mamária interna, outras têm predileção para acometimento da doença, como as artérias coronárias, as carótidas e a aorta abdominal (48). Também é relevante a variabilidade de sensibilidade da árvore vascular a drogas como o sildenafil, cujos alvos são os vasos sanguíneos do sistema reprodutivo masculino, sem efeito clínico significativo em vasos como as coronárias (49).

Estudos fisiológicos avaliaram as diferenças de expressão dos genes de proteínas contráteis de músculo liso entre os diversos leitos vasculares. Já foram observadas diferenças na regulação da expressão dos genes SM22 α e CRP1 entre leitos arteriais e venosos (50, 51), bem como diferenças de expressão do gene SM-MHC entre diferentes leitos arteriais (52). No último caso, o elemento CArG intrônico mostrou-se imprescindível para a expressão de gene SM-MHC em grandes artérias elásticas, mas dispensável em outros leitos, como o da artéria renal (52).

Ainda não foi elucidado se a heterogeneidade fenotípica regional das CMLV é definida pela origem embrionária ou modulada por estímulos ambientais como forças mecânicas, interação célula-matriz e exposição a estímulos vasoativos e neuronais, que variam ao longo da árvore vascular (38). Já foi demonstrado que CMLV com fenótipos opostos (secretor versus contrátil), quando cultivadas *in vitro*, mantêm sua disparidade de expressão gênica e comportamento proliferativo, mesmo após implante *in vivo*, sugerindo pouca influência ambiental na determinação dessas variáveis (53).

Entretanto, variáveis ambientais como estresse de cisalhamento e estiramento cíclico sabidamente alteram o fenótipo e a expressão gênica das CMLV. Tanto o estresse de cisalhamento quanto o estiramento cíclico

modulam a expressão de genes de proteínas contráteis de músculo liso (54, 55) e o último interfere na capacidade proliferativa das CMLV (56) e na síntese de MEC (57).

São conhecidas as diferenças de expressão gênica regionais das CMLV. No entanto, as alterações fenotípicas significativas resultantes dessa heterogeneidade de expressão dos genes de proteínas contráteis de músculo liso ainda não foram propriamente demonstradas. Como alterações fenotípicas entendem-se modificações na capacidade migratória, no grau de proliferação e na organização do citoesqueleto celular, a última refletindo a mecânica das CMLV.

1.5 Mecânica das CMLV

O termo mecânica celular engloba as propriedades da célula que dependem, direta ou indiretamente, do citoesqueleto e da interação dele com o meio extracelular. Destacam-se, nesse grupo, as propriedades de manutenção de forma celular, migração, contração e mecanotransdução. Os principais componentes do citoesqueleto celular são os filamentos de actina, os filamentos intermediários, os microtúbulos e as diversas proteínas de *cross-link* desses filamentos, cuja organização garante a reologia da célula (58).

In vivo, as forças são transmitidas às células via MEC. As chamadas proteínas integrais de membrana fazem uma ponte estrutural transmembrana entre o citoesqueleto e a MEC, sendo a integrina a de maior relevância por compor as chamadas adesões focais celulares (AF). As AF são organelas de adesão dependentes de integrina que conectam fisicamente o citoesqueleto à

MEC por meio de um complexo macromolecular associado à membrana celular. As AF são estruturas dinâmicas formadas por centenas de diferentes moléculas, incluindo proteínas estruturais, quinases e fosfatases. A composição das AF varia conforme o estímulo presente, sendo ele externo ou interno à célula e, como consequência, as proteínas localizadas na AF variam em quantidade e em localização, conforme essas adesões se formam, expandem ou desaparecem (59, 60).

A estrutura das AF é organizada em três camadas principais: camada de sinalização da integrina, camada regulatória da actina e camada de transdução de força. As proteínas paxilina e quinase de adesão focal (FAK) se localizam na porção citoplasmática da integrina, mais ou menos a 30nm de distância da membrana plasmática, na camada de sinalização da integrina. As proteínas associadas à actina (zixina, VASP e α -actinina), por sua vez, se localizam cerca de 50nm abaixo da membrana plasmática, na camada regulatória de actina. A talina é uma proteína grande que se liga tanto à integrina quanto à actina, não pertencendo a uma camada específica das AF. A vinculina, no momento da formação da AF, é recrutada para a região próxima à membrana plasmática, sendo redistribuída para a mesma região da porção final da talina, na chamada camada de transdução de força, conforme a AF se torna estável (59). A Figura 2 mostra, de forma simplificada, a organização de uma AF.

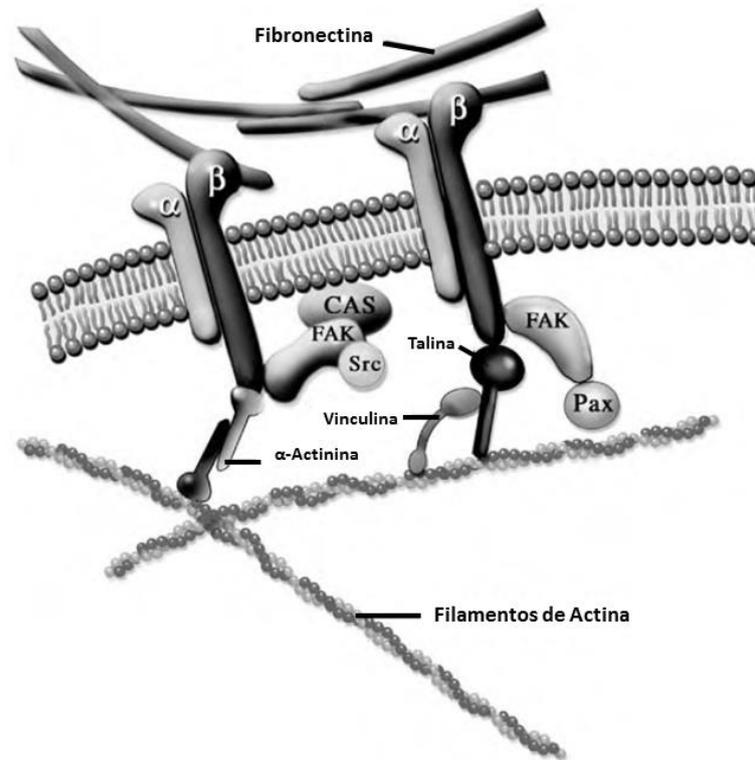


Figura 2. Representação da organização das adesões focais. As forças externas são transmitidas da matriz extracelular (principalmente pela fibronectina), via proteínas integrais de membrana α e β -integrina, às proteínas associadas à membrana plasmática (proteína quinase de adesão focal - FAK, paxilina - Pax, talina e proteína substrato associado à Crk - CAS) e às proteínas ligantes de actina (α -actinina, talina e vinculina), estas últimas conectadas aos filamentos de α -actina. (Adaptado de Mofrad, M.R.K. 2006) (58).

Após a sua formação, as AF podem ser fugazes, como no caso das AF formadas nas projeções citoplasmáticas de uma célula em migração, desaparecendo pouco tempo depois de sua organização, ou podem maturar, ficando estáveis e aumentando de tamanho, sendo isso associado à polimerização dos filamentos de actina, com formação das fibras de tensão, e à atividade da miosina II (58). Sabe-se que a maturação das AF é deflagrada por estímulos mecânicos extracelulares (aplicação de força à superfície celular),

situação em que ocorre aumento de proteínas reguladas positivamente por força nas AF com subsequente estímulo à organização das fibras de tensão de actina no citoplasma celular (Figura 3) (60).

As AF são essenciais para a organização do citoesqueleto e para a geração de força pela célula. O citoesqueleto de actina é o principal alvo de reorganização pelas AF, sendo ele responsável pela maior parte das propriedades estruturais da célula, incluindo manutenção de forma, contração e migração (60).

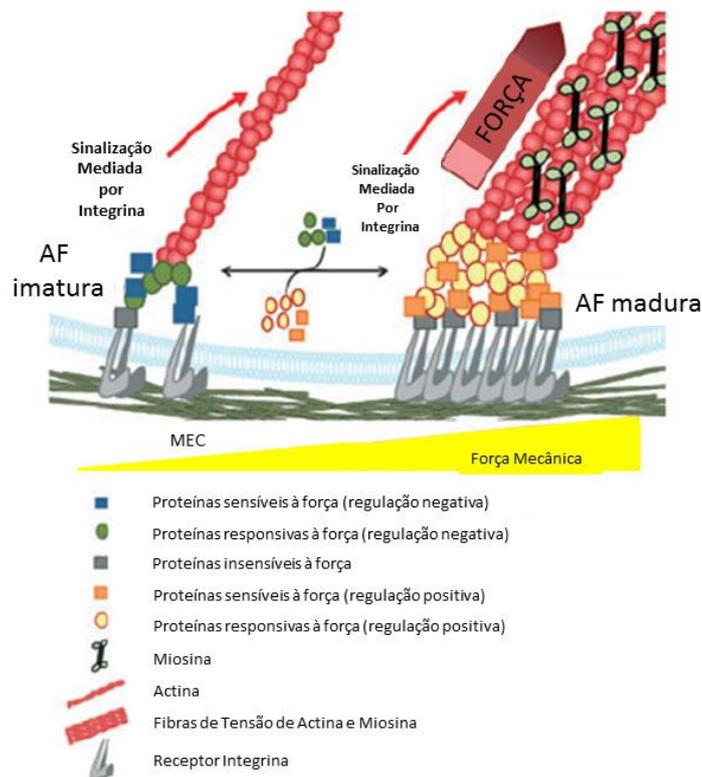


Figura 3. Representação esquemática de como as proteínas das adesões focais (AF) são reorganizadas em resposta à força mecânica. Nas AF imaturas, existem proteínas sensíveis à força (quadrado azul) e respondidas à força (círculo verde) que transmitem os sinais provenientes do meio extracelular ao ambiente intracelular via integrina. Na presença de força mecânica, ocorre o amadurecimento das AF, com acúmulo de proteínas sensíveis à força e respondidas à força positivamente reguladas por esse estímulo (quadrado laranja e círculo amarelo, respectivamente), com associada formação das fibras de tensão de actina. (Adaptado de Kuo, J.C. 2013) (60).

Os filamentos de actina são formados pela polimerização da actina monomérica globular (G-actina) em filamentos torcidos (F-actina). Esses filamentos se alongam e encurtam, continuamente, processo esse regulado por muitos fatores, incluindo a concentração iônica do citoplasma e a ação de proteínas capazes de modificar os filamentos de F-actina (61). A partir desses filamentos, pode ser formada uma rede tridimensional retículo-símile composta por fibras de tensão mediante a atuação de proteínas ligadoras de actina, sendo os principais exemplos a α -actinina, a fimbrina e a filamina (58). A actina responde por cerca de 20% de todo o conteúdo proteico celular e é a principal componente estrutural da célula, sendo a rigidez de citoplasma majoritariamente secundária à organização de seus filamentos (61).

Além dos filamentos de actina, as outras estruturas proteicas que compõem a rede estrutural do citoesqueleto são os microtúbulos e os filamentos intermediários. Os microtúbulos são importantes constituintes do citoesqueleto celular, participando principalmente da formação de cílios e flagelos, além de terem papel fundamental na divisão celular. Eles correspondem a cilindros ocos formados a partir da polimerização das proteínas tubulina α e β , apresentando alta rigidez. À semelhança dos filamentos de actina, os microtúbulos são estruturas dinâmicas, sofrendo polimerização e despolimerização rápidas. Os filamentos intermediários são os componentes mais estáveis do citoesqueleto, pois pouco se modificam após a sua formação. Eles conferem estabilidade e resistência às células e tecidos (58).

A modulação fenotípica das CMLV depende da expressão dos genes de proteínas contráteis de músculo liso, que atuam na organização

tridimensional do citoesqueleto de actina (33). Dessa forma, o status organizacional desse citoesqueleto reflete o fenótipo apresentado pelas CMLV, em um determinado cenário fisiológico ou patológico, o que é fundamental para a execução das funções de migração e de contração celular, propriedades definidoras dos polos fenotípicos secretor e contrátil, respectivamente.

1.6 Contribuição da mecânica das CMLV para a complacência global dos vasos após a fase de vasculogênese em situações fisiológicas e patológicas

Após a vasculogênese, o fenótipo apresentado pelas CMLV é primordialmente contrátil (30). Nos vasos de resistência, as CMLV participam ativamente na regulação do fluxo sanguíneo aos tecidos e na regulação da pressão arterial, atuando na modificação do diâmetro vascular, mediada por agonistas ou antagonistas de contração (62). Essa função regulatória depende de modificações na organização do citoesqueleto das CMLV, além de alterações na capacidade de adesão delas à MEC (principalmente colágeno I e fibronectina) (62). Em vasos elásticos, o conceito mais aceito, até muito recentemente na literatura, era o de que a MEC, mais especificamente, elastina e colágeno, respondiam integralmente pela complacência vascular (1). A contribuição das CMLV para as propriedades estáticas dos grandes vasos era considerada insignificante, sendo sugerido que a sua eliminação não comprometeria a mecânica vascular (1). Existem, entretanto, evidências de que a estrutura organizacional e a capacidade de geração de força do citoesqueleto de CMLV podem contribuir para a mecânica dos vasos elásticos, tanto em situações fisiológicas quanto em situações patológicas (63, 64).

Alterações hereditárias de proteínas estruturais do citoesqueleto das CMLV já foram associadas a modificações significativas nas propriedades mecânicas dos grandes vasos elásticos. Nesse contexto, foi constatado que animais com mutações específicas no gene da cadeia pesada da miosina (MYH11) apresentam CMLV com redução da capacidade de geração de força e, em paralelo, redução da contratilidade da aorta, sem alterações concomitantes na MEC (65). Essas células apresentam, ainda, redução da expressão de genes de proteínas contráteis de músculo liso e maior taxa de formação de neointima, após estímulos específicos, sugerindo troca fenotípica (65). Corroborando esses achados, 14% dos aneurismas de aorta torácica hereditários são devidos a mutações do tipo *missense* no gene codificador da α -actina de músculo liso, que respondem por alterações na estrutura do citoesqueleto, especialmente na polimerização da α -actina, levando à redução na capacidade de contração celular (63).

Recentemente, foi sugerida a participação da mecânica das CMLV nas propriedades físicas globais dos vasos em situações patológicas de enrijecimento arterial associado à hipertensão e ao envelhecimento. O primeiro estudo evidenciando essa associação foi publicado por Qiu H. et al, em 2010, em que foi demonstrado que o enrijecimento senil da aorta de macacos era acompanhado pelo enrijecimento das CMLV desse mesmo vaso, sem alterações concomitantes na MEC (64). Esse achado foi reforçado por estudo que avaliou CMLV de ratos espontaneamente hipertensos e de ratos normais, sendo constatada maior rigidez citoplasmática das CMLV na situação de hipertensão. Nesse mesmo estudo, observou-se que a lesão do citoesqueleto

de CMLV causava redução do tônus vascular em modelos de arcos de aorta (66).

O estudo mais recente que reforça as evidências de que a mecânica das CMLV exerce papel significativo no enrijecimento vascular associado à hipertensão e ao envelhecimento foi publicado por Sehgel NL et al (66). Nesse estudo, foi avaliada a rigidez de citoplasma das CMLV e a sua adesão à fibronectina da MEC em ratos espontaneamente hipertensos jovens e senis, com rigidez de aorta torácica. Ficou demonstrado que as CMLV são mais rígidas e mais adesivas à MEC, na situação de hipertensão, sem alterações de colágeno e elastina vascular, e que as duas alterações na mecânica celular se agravam com o envelhecimento (66)(62). Essas evidências levantam a hipótese de uma possível participação significativa da mecânica de CMLV na rigidez arterial.

A rigidez arterial é fator de risco independente para morbidade e mortalidade cardiovascular (67, 68). Na prática clínica, o diagnóstico de rigidez arterial é frequentemente feito pelo método não invasivo de medida da velocidade de onda de pulso (VOP), que reflete a rigidez da aorta. Sabe-se que um aumento de 1m/s da VOP aórtica corresponde a um aumento de 14% em eventos cardiovasculares (infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral, revascularização do miocárdio e síndromes aórticas), 15% em mortalidade cardiovascular e 15% em mortalidade por todas as causas, após correção para idade, sexo e fatores de risco cardiovascular (67).

Existem algumas justificativas para a associação entre rigidez arterial e morbidade cardiovascular. A primeira delas é que os vasos elásticos rígidos aumentam a pós-carga cardíaca, levando à sobrecarga de ventrículo esquerdo

e prejuízo à perfusão miocárdica. Além disso, o enrijecimento vascular se associa à intensificação da hipertensão arterial (67). Em nível molecular, já foi demonstrado que os vasos rígidos apresentam maior taxa de captação de colesterol, de disfunção endotelial e de transmigração de leucócitos, justificando uma maior propensão à formação de placas ateroscleróticas (69).

A rigidez arterial está associada a diversos fatores de risco cardiovascular, como tabagismo (70), diabetes mellitus (71, 72), hipercolesterolemia (71) e hipertensão arterial sistêmica; às condições clínicas de insuficiência cardíaca congestiva e insuficiência renal crônica dialítica (73-75), e a algumas situações fisiológicas, como raça preta, sexo feminino pós-menopausa e envelhecimento (67). A Figura 4 expõe os principais mecanismos associados à fisiopatogenia da rigidez arterial, destacando-se as modificações da MEC, com acúmulo de colágeno e fibrose da camada média vascular. O enrijecimento do citoplasma de CMLV, descrito em associação à rigidez arterial associada à hipertensão arterial sistêmica e ao envelhecimento em modelos animais, ainda não foi estudado em outras situações fisiológicas e patológicas associadas à redução de complacência vascular.

Diversos fatores foram associados, de forma independente, à redução de complacência de grandes vasos elásticos:

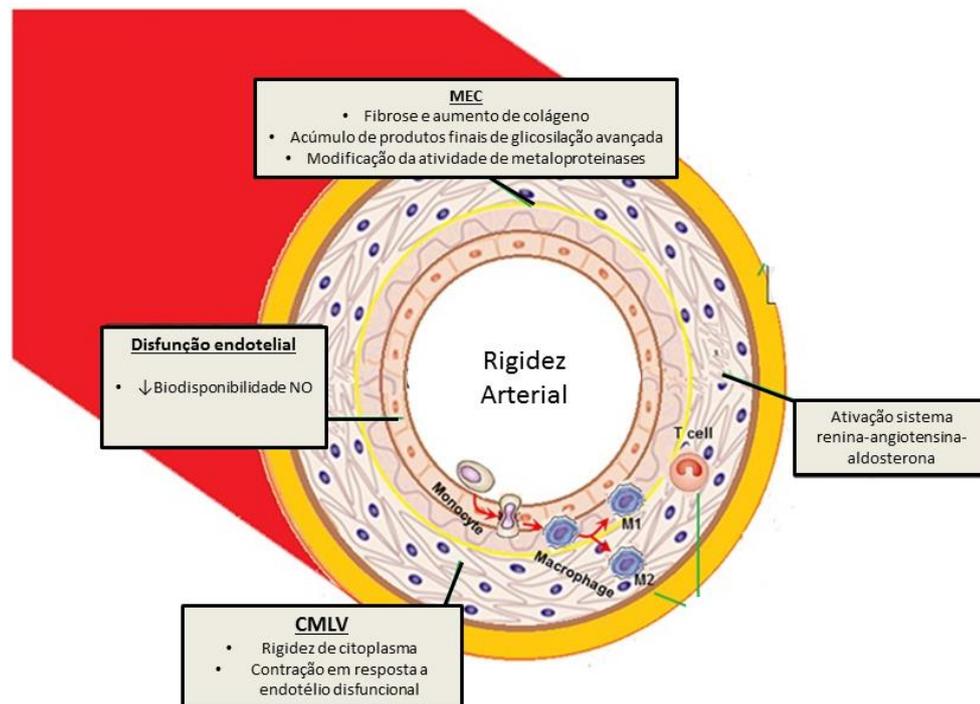


Figura 4. Mecanismos associados à fisiopatogenia da rigidez arterial. Dentre os fatores apresentados, destacam-se as modificações da matriz extracelular (MEC), principalmente, levando ao aumento de colágeno na camada média vascular. A participação das CMLV é frequentemente atribuída à redução da biodisponibilidade de NO por disfunção endotelial. O enrijecimento do citoplasma de CMLV é um mecanismo proposto recentemente e descrito em associação à rigidez arterial associada à hipertensão arterial sistêmica e ao envelhecimento. (Adaptado de Jia, G 2015) (76)

• Envelhecimento

Na rigidez arterial senil, as modificações na MEC e o enrijecimento de CMLV contribuem para o aumento da rigidez vascular. Com o avanço da idade, há aumento progressivo na quantidade de colágeno e redução relativa da elastina na camada média vascular(77). Há também aumento de rigidez de citoplasma e hipertrofia das CMLV (31). O enrijecimento das CMLV, nesse

caso, se deve ao processo de senescência celular, que cursa com redução de plasticidade e de capacidade de reprogramação dessas células (31).

- **Sexo feminino pós-menopausa**

A rigidez arterial tem comportamento distinto entre mulheres e homens. Antes da menopausa, as mulheres têm menor VOP e menor pressão de pulso em relação aos homens saudáveis, mas já se mostram mais sensíveis aos fatores de risco favoráveis para enrijecimento arterial (78). Após a menopausa, as mulheres apresentam maior pressão de pulso e maior VOP do que os homens (79), achado esse hipoteticamente associado a diferenças intergênero na estrutura da aorta, apesar de a literatura carecer de estudos que avaliem essas diferenças (78).

- **Ancestralidade racial**

A ancestralidade racial individual está associada à estrutura e à funcionalidade de vasos, tanto da macrovasculatura quanto da microvasculatura (80). Indivíduos de raça preta¹ apresentam artérias com menor capacidade de dilatação a estímulos vasodilatatórios e maior capacidade de contração a estímulos agonistas de CMLV (81-83), além de maior rigidez arterial proximal em relação a indivíduos brancos (80, 84). Existe a hipótese de que o aumento da atividade de enzima creatino-quinase (CK) nas CMLV responda por parte das alterações encontradas (85).

¹ Nomenclatura em concordância com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE).

- **Diabetes Mellitus**

Nos pacientes com diabetes mellitus, o desenvolvimento de rigidez arterial está relacionada ao avanço da idade, à presença de hipertensão arterial sistêmica, à duração do quadro de resistência à insulina e à insulinoterapia (86). Na camada média dos vasos, há aumento do conteúdo e das ligações transversais de colágeno na MEC (87) e acúmulo de produtos finais de glicosilação avançada (88). As CMLV apresentam maiores concentrações de espécies reativas de oxigênio e são menos responsivas ao estímulo vasodilatatório mediado por óxido nítrico (NO) (89). Existe, ainda, ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona, sendo que a angiotensina II e a aldosterona atuam modulando a rigidez arterial pelo aumento da atividade da enzima oxidase de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), levando à redução da disponibilidade de NO, que é estímulo vasodilatatório às CMLV (76).

- **Hipertensão Arterial Sistêmica**

A hipertensão arterial, até recentemente, era vista como causa de rigidez de grandes vasos elásticos. A hipótese mais aceita era a de que a elevação da pressão arterial, particularmente da pressão de pulso (diferença entre pressão sistólica e pressão diastólica), causaria aumento no estresse pulsátil aplicado à parede da aorta, acelerando a degradação da elastina da camada média desse vaso (90). Entretanto, existem evidências de que a

rigidez da aorta precede o aumento na pressão de pulso, estando associada com o aparecimento de hipertensão e com a progressão dos níveis pressóricos (91, 92). No cenário experimental, a hipertensão arterial está associada à rigidez de grandes vasos e ao enrijecimento citoplasmático das CMLV (66).

- **Tabagismo**

O tabagismo está associado à redução de complacência de vasos de grande e médio calibre, causando aumento da VOP tanto agudamente, após exposição à fumaça do tabaco, quanto cronicamente, em pacientes tabagistas ativos ou passivos (70, 93). Dentre os fatores aventados para justificar essa alteração da mecânica vascular, destaca-se a redução da disponibilidade de NO, por alteração de expressão e atividade da enzima NO sintase endotelial, levando à disfunção vasomotora (94). Já foi demonstrado que a rigidez de grandes vasos pode estar presente na ausência de qualquer modificação estrutural da parede arterial (93) e que a cessação da exposição melhora os índices de VOP, porém sem retorno aos valores basais (94).

Existe variabilidade interindividual de rigidez de grandes vasos entre indivíduos de mesma idade e entre diferentes cortes histológicos de um mesmo indivíduo, sugerindo modulação genética desse traço biológico, além da atuação dos fatores ambientais (87). Não há, entretanto, demonstração de variabilidade interindividual de mecânica das CMLV, fator que possivelmente poderia contribuir para esse cenário.

1.7 Lacunas científicas identificadas

No vaso adulto, as CMLV apresentam fenótipo contrátil, com alta expressão de genes de proteínas contráteis de músculo liso, baixas taxas de proliferação celular e de secreção de MEC. Entretanto, existe variabilidade de expressão gênica entre CMLV de diferentes territórios vasculares, sugerindo que o fenótipo apresentado por essas células seja heterogêneo ao longo da árvore arterial e modulado por fatores regionais. As propriedades mecânicas das CMLV estão diretamente envolvidas com a expressão dos genes de proteínas contráteis de músculo liso, configurando elemento importante para a determinação do fenótipo dessas células. Não há estudos que avaliam a existência de variabilidade da mecânica das CMLV entre os diferentes leitos arteriais, e também se desconhecem os moduladores regionais desse traço biológico.

A associação entre enrijecimento de CMLV e desenvolvimento de rigidez arterial foi proposta, muito recentemente, em literatura, tendo sido apresentada para as situações de hipertensão arterial e rigidez arterial senil, apenas em modelos animais. É possível que outras condições clínicas e demográficas associadas à rigidez arterial possam cursar com enrijecimento de CMLV. A constatação de que a rigidez de CMLV é um fator significativo para a fisiopatologia da rigidez arterial tem uma importância clínica relevante, visto que representa um potencial alvo terapêutico.

Existe variabilidade interindividual de complacência vascular. Entretanto, nunca foi avaliado se as propriedades mecânicas das CMLV

apresentam esse mesmo tipo de variabilidade, comportando-se como um traço biológico.

2. Objetivos

2.1 Objetivos gerais

- Estudar as propriedades mecânicas das CMLV em situações fisiológicas, ao longo da árvore arterial, e em situações patológicas sabidamente associadas à rigidez arterial.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a modificação progressiva das propriedades mecânicas das CMLV, durante o cultivo *in vitro*, visando determinar as melhores condições experimentais para o estudo da mecânica celular de forma a permitir a extrapolação dos resultados obtidos para o cenário vascular.
- Avaliar a existência de variabilidade das propriedades mecânicas e de organização do citoesqueleto entre CMLV de diferentes leitos arteriais, correlacionando as variações identificadas com o ambiente da túnica média dos vasos de origem.
- Identificar possíveis fatores moduladores regionais das propriedades mecânicas das CMLV.
- Identificar se existe variabilidade interindividual da viscoelasticidade das CMLV.
- Avaliar se as variáveis clínicas idade, sexo, ancestralidade genética africana, tabagismo e diabetes mellitus associam-se ao enrijecimento de CMLV.

3. Materiais e Métodos

3.1 Desenho do estudo

O estudo foi dividido em três fases:

✓ **Estudo do comportamento mecânico das CMLV *in vitro* (Fase 1)**

CMLV isoladas a partir de diferentes artérias tiveram suas propriedades viscoelásticas quantificadas ao longo de várias passagens celulares (subcultivos). Figura 5.

✓ **Avaliação da variabilidade das propriedades mecânicas das CMLV provenientes de diferentes leitos arteriais (Fase 2)**

Fragmentos vasculares provenientes de sete diferentes leitos arteriais de modelos porcos foram avaliados quanto à composição de MEC e quanto à organização e ultraestrutura das CMLV na camada média. As CMLV isoladas dessas diferentes artérias foram submetidas às seguintes análises: mensuração de rigidez de citoplasma, análise da organização do citoesqueleto, análise de ciclo celular e expressão proteica. Figura 6.

✓ **Avaliação da capacidade de variáveis clínicas associadas à rigidez arterial de modular a mecânica das CMLV (Fase 3)**

CMLV isoladas a partir de fragmentos de artéria mamária de pacientes submetidos à cirurgia de revascularização do miocárdio foram avaliadas quanto às suas propriedades mecânicas, sendo correlacionadas com as

variáveis: sexo, idade, ancestralidade genética africana, diabetes mellitus e tabagismo. Figura 7.

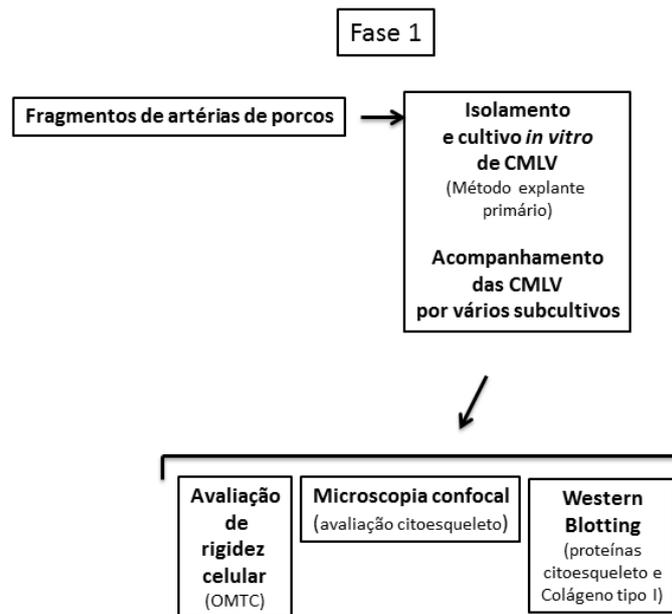


Figura 5: Desenho da primeira fase do estudo. O objetivo desta fase era estudar o efeito do cultivo *in vitro* sobre o comportamento mecânico das CMLV. Para tal, as CMLV tiveram suas propriedades viscoelásticas avaliadas quantitativamente ao longo de várias passagens celulares (subcultivos).

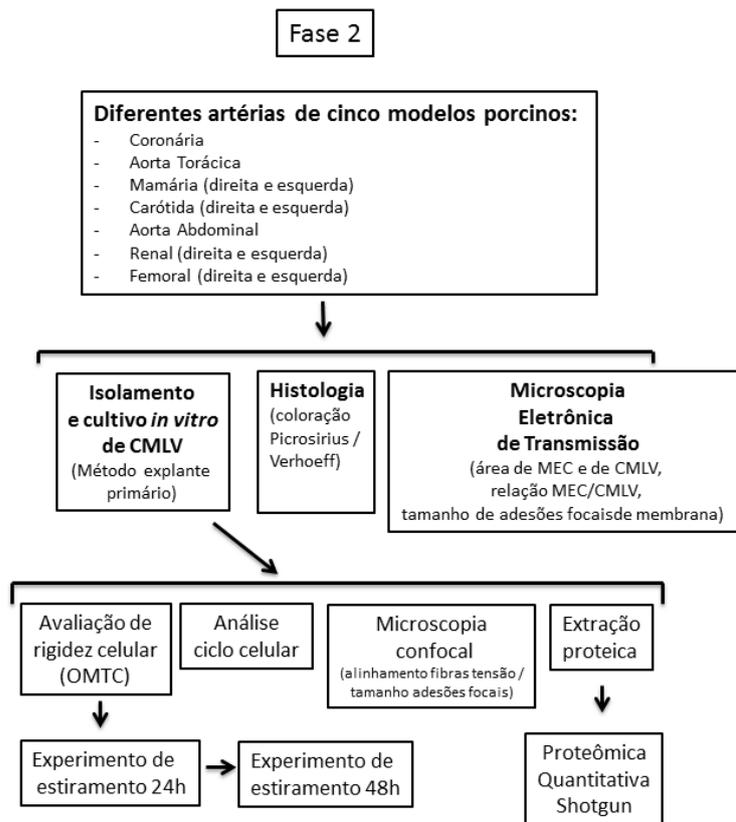


Figura 6: Desenho da segunda fase do estudo. Esta fase tinha como objetivo avaliar a existência de heterogeneidade de propriedades mecânicas entre CMLV de diferentes leitos arteriais. Para atingir o objetivo, fragmentos provenientes de sete diferentes leitos arteriais de modelos porcinos foram avaliados quando à composição de MEC e quanto à organização da camada média. As CMLV isoladas das diferentes artérias foram submetidas às seguintes análises: mensuração de rigidez de citoplasma, análise da organização do citoesqueleto, análise de ciclo celular e expressão proteica.

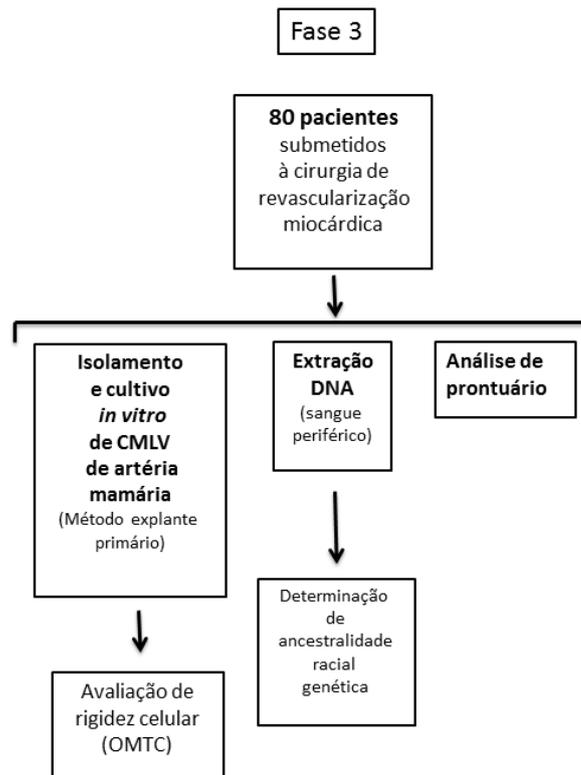


Figura 7: Desenho da terceira fase do estudo. O objetivo desta fase foi avaliar se variáveis clínicas sabidamente associadas à redução de complacência de grandes vasos tinham a capacidade de alterar o comportamento mecânico das CMLV. Para atingir o objetivo, CMLV isoladas a partir de fragmentos de artéria mamária de pacientes submetidos à cirurgia de revascularização do miocárdio foram avaliadas quanto às suas propriedades mecânicas, sendo correlacionadas com as variáveis clínicas sexo, idade, ancestralidade genética africana, diabetes mellitus e tabagismo.

3.2 Materiais e Métodos (Fase 1)

3.2.1 Procedimento cirúrgico nos modelos porcinos

Fragmentos de artérias aorta (torácica e abdominal), femoral, renal, mamária e carótida foram coletados de cinco porcos *Sus scrofa domesticus*,

linhagem MS60 EMBRAPA (Granja RG, Suzano – SP), todos de mesma idade (quatro meses), sexo (fêmeas) e peso (entre 15 e 20 kg). Os animais foram pré-anestesiados com cloridrato de cetamina (10mg/kg) e midazolam (0,4mg/kg), sendo submetidos à intubação orotraqueal antes do início do ato cirúrgico. A anestesia foi iniciada com tiopental sódico (10mg/kg) e mantida com isoflurano em ventilador durante todo o procedimento. Uma dose única de 10.000 UI de heparina não fracionada foi administrada no início da cirurgia. Realizou-se antissepsia das regiões de interesse com solução degermante alcoólica e não alcoólica. Todas as cirurgias foram realizadas pelo mesmo cirurgião vascular. Depois que os segmentos vasculares tinham sido extraídos, os animais, ainda anestesiados, foram sacrificados com uma dose alta de cloreto de potássio (30 mL). O procedimento foi realizado de acordo com o previsto pelo comitê de ética local (CAPPesq - Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP).

3.2.2 Isolamento e cultivo *in vitro* das CMLV

As CMLV foram isoladas por meio da técnica de explante primário (Figura 8). Primeiramente, os lúmens dos vasos foram abertos e um pequeno estresse físico foi aplicado de forma a remover a camada de células endoteliais. Em seguida, os vasos foram cortados em pequenos fragmentos (4mm x 4mm), que foram colocados em uma placa plástica contendo seis poços de cultura previamente recobertos com gelatina cutânea porcina 3% (Sigma Aldrich®, catálogo G9136). Aos poços contendo os fragmentos vasculares, foi acrescentado 1mL do meio de cultura DMEM (Dulbecco's

Modified Eagle Medium) com alta concentração de glicose (Gibco®, catálogo 12100-046), suplementado com 20% de soro fetal bovino inativado (Gibco®, catálogo 160000-044), 100 unidades/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco®, catálogo 15140-122). Esse meio de cultura foi trocado a cada dois dias. Quando as CMLV isoladas passaram a revestir os poços, elas foram tripsinizadas e replaqueadas em garrafas de cultura do tipo T25, sendo isso considerado a primeira passagem da cultura ou o primeiro subcultivo. A partir desse ponto, a expansão celular foi feita na proporção 1:2 e a troca de meio, três vezes por semana. A cada expansão havia aumento sequencial no número da passagem da cultura. As CMLV isoladas foram marcadas para α -actina de músculo liso (Santa Cruz Biotechnology, sc-53142, 1:400) e miosina de músculo liso e esquelético (Sigma Aldrich, M7648, 1:400) e caracterizadas usando microscopia confocal (positividade superior a 95%).

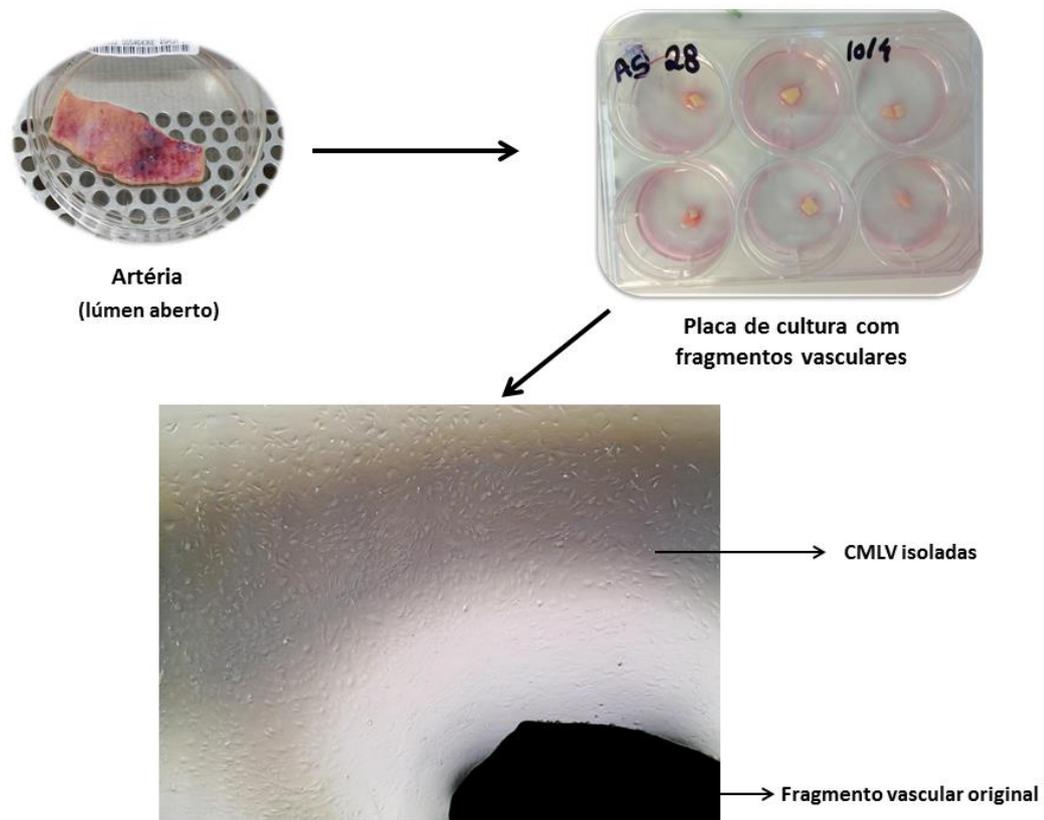


Figura 8. Técnica de explante primário. As artérias foram abertas e cortadas em pequenos fragmentos, os quais, por sua vez, foram colocados em placas de cultura com meio apropriado. As CMLV foram isoladas a partir dos fragmentos vasculares.

Nessa primeira fase do estudo, foram selecionadas cinco culturas *in vitro* de CMLV (originárias de vasos distintos) para serem mantidas, por longo período de tempo, e avaliadas quanto à viscoelasticidade de suas células, usando o ensaio de OMTC, em diferentes subcultivos (passagens). As cinco culturas escolhidas e o número das passagens analisadas foram: aorta (passagens 4, 5 e 7), femoral (passagens 4, 8, 10 e 11), renal (passagens 4, 5, 6 e 7), mamária (passagens 4, 5, 6 e 8) e carótida (passagens 4, 5, 8, 10 e 11).

3.2.3 Avaliação de mecânica celular por Citometria Magnético Ótica de Oscilação (*Optical Magnetic Twisting Cytometry* - OMTC)

A técnica de OMTC foi validada pelos grupos Fabry B. et al e Fredberg J.J. et al (95, 96). Trata-se de uma ferramenta para medir a viscoelasticidade celular em que um torque magnético sinusoidal é aplicado sobre grânulos ferromagnéticos intrinsecamente ligados ao citoesqueleto celular. Esses grânulos são recobertos pelo peptídeo RGD, que se liga à integrina de membrana, a qual, por sua vez, é ligada à α -actina do citoplasma (95). A movimentação dos grânulos com o campo magnético oscilatório é registrada e quantificada, sendo a tradução da viscoelasticidade do citoplasma subjacente (Figura 9). Uma das grandes vantagens da técnica de OMTC é que ela permite a avaliação mecânica das células quando elas estão aderidas ao substrato, mantendo a organização do citoesqueleto. A maior parte das outras técnicas disponíveis avalia as células em suspensão e, portanto, com as fibras de α -actina desorganizadas. A técnica de OMTC foi realizada em quatro etapas: preparo dos grânulos ferromagnéticos, preparo das CMLV para o experimento, ensaio propriamente dito e análise dos resultados.

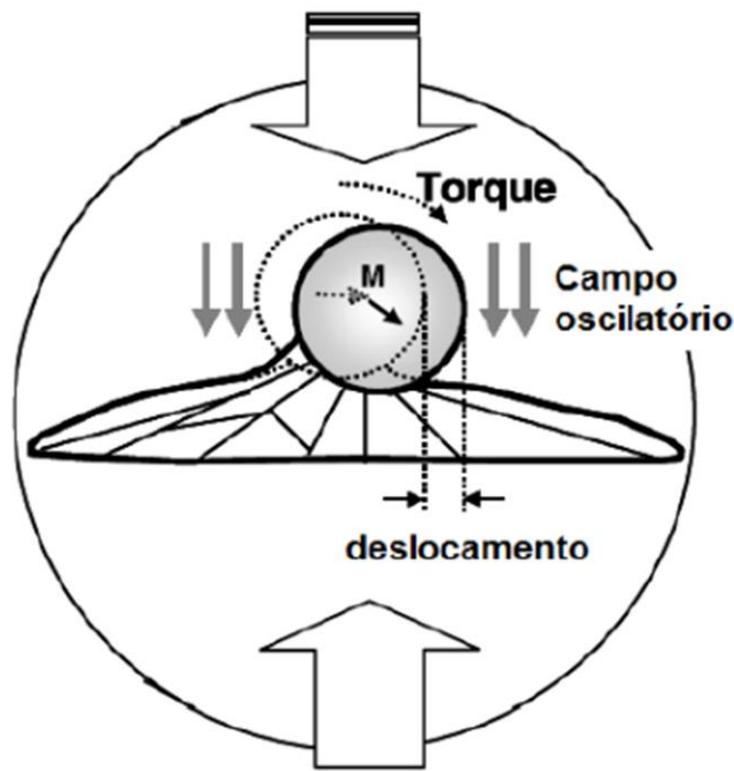


Figura 9. Princípio da técnica de Citometria Magnético Ótica de Oscilação (Optical Magnetic Twisting Cytometry - OMTTC). Os grânulos ferromagnéticos ancorados à superfície celular são magnetizados horizontalmente por um sistema de magnetização (setas grandes), de forma que cada grânulo se torna um magneto. A seguir, o campo magnético introduz um torque oscilatório vertical (setas verticais cinzas) que leva os grânulos a girarem e se deslocarem. O movimento dos grânulos é modulado pelas propriedades viscoelásticas do citoplasma subjacente, sendo utilizado para cálculo das variáveis de mecânica celular. M denota a direção do momento magnético da esfera. (Adaptado de Fabry, B. 2001) (96).

- **Preparação dos grânulos ferromagnéticos**

Os grânulos ferromagnéticos utilizados neste estudo foram fabricados pela Escola de Saúde Pública de Harvard (Boston, EUA). Eles apresentavam 4,5 μm de diâmetro e encontravam-se suspensos em solução de etanol em tubos de Eppendorf. Foram realizados cinco ciclos de centrifugação e lavagem do conteúdo dos tubos com solução tampão de *Phosphate Buffered Saline* (PBS) estéril. Após a última centrifugação, os grânulos foram suspensos em

solução tampão de carbonato estéril, apresentando uma concentração final de 1mg/mL. O peptídeo sintético contendo a sequência Arg-Gly-Asp (RGD) foi, então, acrescentado aos tubos para revestir a superfície dos grânulos. Até o momento de sua utilização, os tubos contendo os grânulos ferromagnéticos foram mantidos em rotação contínua, em temperatura entre 4 e 6°C.

- **Preparo das CMLV para o experimento de OMTC**

As CMLV foram desprendidas das garrafas de cultura por tripsinização, quantificadas em câmara de Neubauer e plaqueadas em concentração de 1×10^4 células por poço nas placas de cultura específicas para a técnica de OMTC (Corning®, catálogo 9102). Os poços tinham sido previamente recobertos por gelatina cutânea porcina 3% (Sigma Aldrich®, catálogo G9136). Doze horas após o plaqueamento, a confluência das CMLV nos poços foi avaliada e, se superior a 95%, realizou-se troca do meio de cultura DMEM com 20% de soro fetal bovino por DMEM sem acréscimo desse soro. As CMLV foram mantidas em incubadora a 37°C por 24h em carência de soro. Após esse período, os grânulos ferromagnéticos foram adicionados às CMLV em uma concentração de 10µg por poço e elas permaneceram incubadas a 37°C por 20 minutos. Ao final desse período, as CMLV foram lavadas uma vez com meio de cultura DMEM sem soro fetal, com o objetivo de remover os grânulos frouxamente ligados à superfície celular. A Figura 10 mostra as CMLV recobertas pelos grânulos ferromagnéticos imediatamente antes do início das medidas mecânicas.

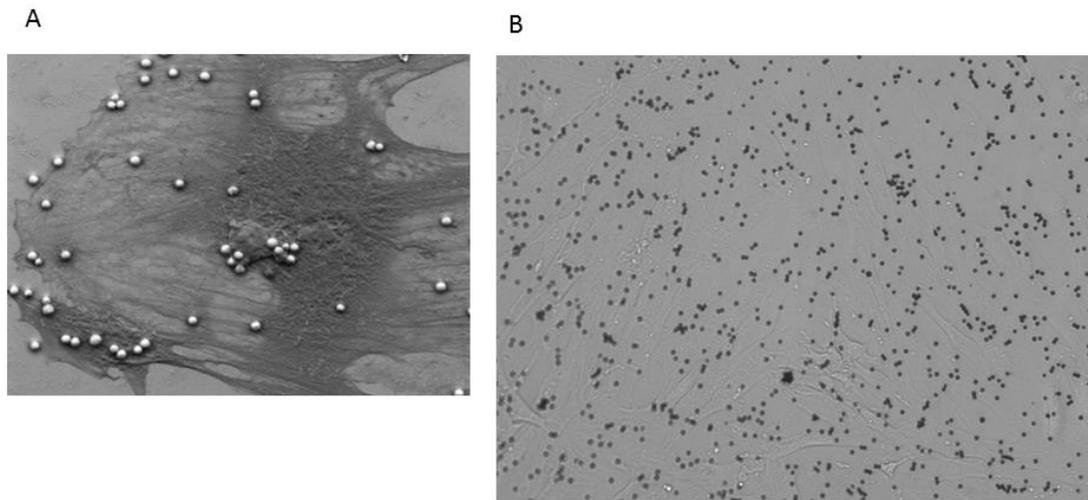


Figura 10. CMLV recobertas pelos grânulos ferromagnéticos. A. Imagem de microscopia eletrônica de varredura (1000x) de CMLV com grânulos magnéticos aderidos à sua superfície. B. Imagem em microscópio ótico das CMLV aderidas em poço de cultura imediatamente antes do início do experimento de OMTC (10x). (Arquivo pessoal).

- **Técnica da Citometria Magnético Ótica de Oscilação (*Optical Magnetic Twisting Cytometry - OMTC*)**

Os poços contendo as CMLV recobertas por grânulos magnéticos foram posicionados, individualmente, no centro de uma placa circundada por bobinas de magnetização, em microscópio invertido (Leica DMI-4000), com câmera de vídeo com dispositivo de carga acoplado (câmera CCD) (Figura 11). Os ensaios foram controlados por computador usando o software desenvolvido pelo Laboratório de Microreologia e Fisiologia Molecular do Instituto de Física da USP e as imagens foram adquiridas em aumento de 10x. Os grânulos foram, inicialmente, magnetizados horizontalmente com 9.000 G, de forma que cada grânulo se tornou um pequeno magneto. Em seguida, aplicou-se um campo magnético vertical mais fraco (90 G) e oscilando a 0,75Hz, causando

rotação e movimentação forçada dos grânulos. Esse deslocamento em decorrência da oscilação do campo magnético foi registrado pela câmera CCD.

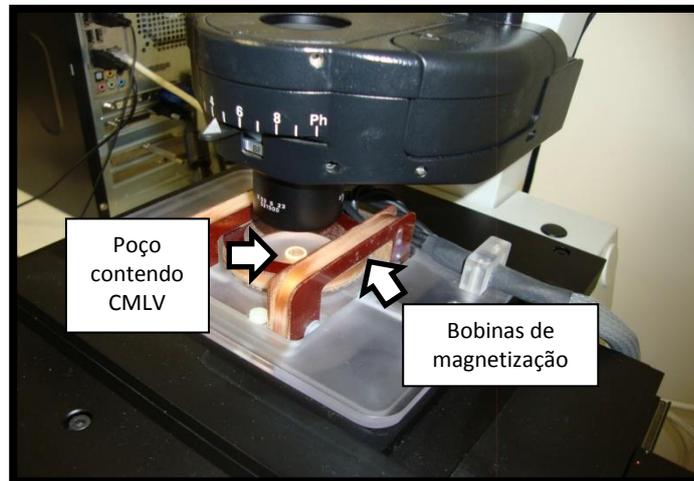


Figura 11. Imagem do posicionamento dos poços de cultura contendo CMLV recobertas por grânulos magnéticos no experimento de OMTC.

A razão entre a Transformada de Fourier do torque específico aplicado ($T^*(\omega)$) e o deslocamento do grânulo ($d^*(\omega)$) definiu a rigidez aparente da célula, $g^*(\omega)$, cuja unidade de medida é Pa/nm.

$$g^*(\omega) = g'(\omega) + ig''(\omega) = T^*(\omega)/d^*(\omega)$$

Desse valor derivaram o módulo elástico g' , o módulo dissipativo g'' e a histerese η (g''/g'). A rigidez aparente $g^*(\omega)$ foi convertida no módulo de cisalhamento G^* , após levar em consideração a forma e a espessura das células, bem como o grau de penetração dos grânulos, baseando-se em simulações prévias (97). $|G^*|$ na frequência de 0,75Hz foi definido com G .

- **Análise dos resultados**

Cada experimento de OMTC dava origem a um documento de texto em que constavam as posições dos grânulos identificados, no eixo x e y, em todas as imagens analisadas em intervalos de tempo pré-programados. Esse documento foi analisado em software Matlab® usando programa específico desenvolvido pelo grupo de pesquisa do Dr. Jeffrey Fredberg, da Escola de Saúde Pública da Universidade de Harvard, e adaptado às condições experimentais do nosso grupo. As variáveis resultantes dessa análise (G , G' , G'' e η) refletiam a viscoelasticidade das CMLV do poço avaliado. Alternativamente, foi usado outro programa desenvolvido pelo grupo do Laboratório de Microreologia e Fisiologia Molecular do Instituto de Física da USP, em que o resultado de G , G' , G'' e η era dado por grânulo avaliado. Neste estudo, optou-se por realizar a análise por poço.

3.2.4 Avaliação das fibras de α -actina do citoesqueleto de CMLV por microscopia confocal

Foram selecionadas CMLV provenientes de quatro culturas celulares em diferentes passagens (subcultivos) para a realização dessa técnica: renal (passagens 9 e 12), femoral (passagens 6, 8 e 9), mamária (uma cultura foi analisada em passagens 7 e 10 e a outra, em passagens 9 e 12).

Para o protocolo de imunofluorescência, as CMLV foram cultivadas em lamínulas de vidro previamente recobertas com gelatina porcina 3% (Sigma

Aldrich®, catálogo G9136). Dois dias após o plaqueamento em lamínulas, as CMLV foram fixadas com paraformaldeído 4% por 60 minutos em temperatura de 4°C. Em seguida, as CMLV foram permeabilizadas durante 30 minutos com 0,1% de Nonidet-40 PBS (Sigma Aldrich®), bloqueadas durante a noite com albumina de soro bovino 1% (BSA, Sigma Aldrich®, código A9418) e incubadas por 3 horas com o reagente faloidina previamente conjugado com Alexa (AlexaFluor 488 Phalloidin®, Invitrogen, 1:400). A faloidina é um peptídeo bicíclico que marca seletivamente a F-actina, com baixa taxa de marcação inespecífica. A aquisição das imagens foi feita usando microscópio confocal LSM 510 META. Houve normalização usando lâminas sem marcação (brancas) e a magnificação escolhida foi de 20x. As imagens foram analisadas por meio do programa ImageJ®. Avaliou-se a intensidade de sinal por região de interesse, que, no caso, era a área celular. A variável obtida foi expressa em escala de cinza.

3.2.5 Quantificação das proteínas α -actina de músculo liso e colágeno I por Western Blot

Foi realizada a quantificação de α -actina e colágeno I em uma mesma cultura de CMLV em sete subcultivos (de 7 a 13). As placas de cultura selecionadas foram lavadas duas vezes com PBS e, a seguir, adicionou-se 100 μ L de tampão de extração de proteínas (1% TRITON X-100, 1mM EGTA, 1mM EDTA, 5mM KCl, 2mM MgCl₂, 25mM HEPES) suplementado com PMSF (Sigma Aldrich®), inibidor de fosfatase 1 e 2 (Sigma Aldrich®) e inibidor total de

protease (Sigma Aldrich®). Esse tampão foi usado para romper as células e permitir a extração proteica. As amostras obtidas (5 e 15 µg) foram submetidas à separação proteica por técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE. Após a eletroforese, as proteínas foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare®). A membrana foi incubada em solução tampão bloqueadora e, depois, foram acrescentados os anticorpos contra colágeno tipo I (Santa Cruz Biotechnology, catálogo #sc8784) e α -actina de célula de músculo liso (Santa Cruz Biotechnology, catálogo #sc-53142). A detecção foi feita usando reagentes quimioluminescentes enriquecidos (GE Healthcare®) e a análise densitométrica foi realizada usando o programa ImageJ®. Os níveis de proteína GAPDH (Abcam, catálogo ab22555) foram usados para normalizar os resultados.

3.2.6 Análise estatística

As variáveis mecânicas G e η foram correlacionadas com o número de subcultivos (passagens) *in vitro* para cada uma das culturas avaliadas. A correlação foi feita pelo teste de correlação de Spearman, sendo considerado como estatisticamente significativo um p valor inferior a 0,01. As células de mesma cultura e passagens distintas foram comparadas entre si quanto à intensidade de sinal por célula, variável resultante da análise das imagens de imunofluorescência marcadas com faloidina, usando o teste t-Student (se duas amostras) ou ANOVA one-way (mais de duas amostras). Foi considerado como estatisticamente significativo um p valor inferior a 0,01.

3.3 Materiais e Métodos (Fase 2)

3.3.1 Amostras biológicas estudadas

Fragmentos das artérias aorta (abdominal e torácica), femoral, renal, mamária, carótida e coronária foram obtidos de modelos porcinos operados de acordo com o descrito no item 3.2.1. De cada um dos cinco animais operados, ao menos um fragmento de cada lateralidade dos leitos arteriais escolhidos foi coletado. Os vasos foram utilizados para três fins: isolamento de CMLV, marcação imuno-histoquímica de proteínas da MEC e análise da camada média por microscopia eletrônica de transmissão.

3.3.2 Isolamento e cultivo *in vitro* de CMLV

Os fragmentos dos vasos foram usados para isolamento das CMLV por meio da técnica de explante primário, descrita no item 3.2.2. A fim de limitar o impacto da permanência das CMLV *in vitro* sobre a mecânica celular (98), o ensaio de OMTC, os experimentos de estiramento cíclico e os experimentos de imunofluorescência foram realizados com CMLV em até quinta passagem.

3.3.3 Análise de ciclo celular

As CMLV foram plaqueadas em garrafas de cultura do tipo T75 e cultivadas até atingir confluência entre 90 e 100%. A seguir, as CMLV foram

submetidas à tripsinização, centrifugação (5 minutos, 1699 x g, 4°C) e suspensão em PBS. As CMLV em suspensão foram contadas em câmara de Neubauer e 1×10^5 células foram lavadas duas vezes com PBS a 4°C. Ao final da última lavagem, o sobrenadante foi descartado e o precipitado, fixado com 1mL de etanol 70%, a 4°C, durante o período de uma noite. Após esse período, as células foram centrifugadas durante 5 minutos a 4°C (4.248 x g) e lavadas duas vezes com PBS. Na última lavagem, o sobrenadante foi desprezado e as células foram suspensas em 500 µL de solução para coloração de DNA (20 µg/mL de PI, 100µg/ml de RNase A em PBS e 0,1% de Triton-X) durante 30 minutos, a 37°C. O material com DNA foi analisado utilizando o equipamento FACSCalibur Flow Cytometer (BD®). A população de células em cada fase do ciclo celular foi determinada utilizando o software CellQuest Pro (BD®).

3.3.4 Caracterização histológica dos vasos

Os cortes histológicos de todas as artérias, preservados em parafina, foram corados com Verhoeff Van-Gieson (ElasticStain Kit, Sigma Aldrich®, número de catálogo HT25A) e com RedPicro-sirius (Sigma Aldrich®, código P6744). Os cortes foram primeiramente desparafinados e hidratados. Em seguida, foi realizada a seguinte sequência de procedimentos: coloração com solução de Verhoeff, durante 1 hora; lavagem (duas vezes); diferenciação em 2% de cloreto férrico (1 - 3 minutos); lavagem com água da torneira; tratamento com tiosulfato de sódio a 5%, durante 1 minuto; lavagem, durante 5 minutos; contraste em solução de Van Gieson, durante 3 minutos; desidratação com álcool a 95% e imersão em xileno (3 minutos / duas vezes). No protocolo de

coloração Picro-sirius, os cortes desparafinados e hidratados foram corados com RedPicro-sirius, por uma hora, lavados em água acidificada (duas vezes), desidratados em etanol 100% (três vezes) e imersos em xileno.

O material corado foi analisado por meio do software LeicaQwin®. Foi calculada a porcentagem de fibras elásticas (marcação Verhoeff) e de fibras de colágeno (marcação Picro-sirius) na túnica média de cada artéria estudada. Também foram avaliados os dados anatômicos de diâmetro interno do lúmen e de espessura da camada média. O nome da artéria não foi revelado para o pesquisador durante a etapa de quantificação. Em vez disso, um código numérico foi atribuído a cada corte.

Os leitos arteriais foram comparados estatisticamente em termos de percentagem de elastina na camada média, percentagem de colágeno na camada média, diâmetro interno, espessura da camada média e relação espessura camada média / diâmetro interno usando o teste ANOVA one way. Um valor de p inferior a 0,05 foi considerado significativo.

3.3.5 Microscopia eletrônica de transmissão

Os fragmentos de artéria destinados à microscopia eletrônica de transmissão foram preservados em solução de Karnovsky modificada imediatamente após sua retirada dos modelos animais. As amostras foram processadas de acordo com a metodologia descrita por Watanabe e Yamada (99). As imagens foram adquiridas utilizando equipamento Jeol -1010, no Instituto de Ciências Biomédicas III - USP.

As imagens obtidas foram analisada por meio do software ImageJ® por dois pesquisadores em momentos distintos. Calculou-se a área ocupada por matriz extracelular (MEC) na camada média vascular, a área ocupada por CMLV nessa mesma camada e a razão entre essas duas áreas. O tamanho das adesões focais de membrana das CMLV também foi mensurado.

Os segmentos arteriais foram comparados entre si em termos das variáveis mensuradas usando o teste ANOVA one-way, sendo p valor inferior a 0,05 considerado significativo. Os dados referentes ao tamanho das adesões focais sofreram conversão logarítmica antes da análise estatística, de forma a alcançar distribuição normal.

3.3.6 Técnica da Citometria Magnético Ótica de Oscilação (Optical Magnetic Twisting Cytometry - OMTC)

O experimento de OMTC foi realizado conforme descrito no item 3.2.3.

Nessa terceira fase, em todos os experimentos, o agonista contrátil histamina (250 μ M) ou o antagonista contrátil isoproterenol (250 μ M) foram adicionados aos poços, 30 segundos após o início da magnetização. De forma a poder avaliar o efeito dessas drogas sobre as CMLV, o deslocamento dos grânulos foi registrado por tempo total de 5 minutos.

As CMLV de diferentes artérias foram comparadas em termos de G e η . Levando-se em consideração uma variabilidade aleatória das variáveis mecânicas entre os animais, optou-se por calcular o score-Z das variáveis G e

η (ZG e $Z\eta$, respectivamente) e utilizá-lo nas análises estatísticas. O escore-Z foi calculado para todos os experimentos de cada animal com a fórmula:

$$ZG = (\text{escore bruto } G - \text{média } G) / \text{desvio-padrão}$$

$$Z\eta = (\text{escore bruto } \eta - \text{média } \eta) / \text{desvio-padrão}$$

Esse procedimento foi repetido para os cinco animais. Os valores de ZG e $Z\eta$ das CMLV de diferentes artérias foram comparados entre si com o teste de Kruskal - Wallis, sendo p valor inferior a 0,05 considerado significativo. As análises *post-hoc* foram realizadas por meio do teste de Mann-Whitney com correção de Bonferroni. A correlação entre as variáveis mecânicas do ensaio OMTC e as obtidas a partir da análise histológica vascular foi feita utilizando o teste de correlação de Spearman, sendo p valor inferior a 0,05 considerado significativo. Todas as análises estatísticas foram feitas por meio do software IBM SPSS®, 18ª versão.

3.3.7 Protocolo de estiramento cíclico

As CMLV das artérias estudadas foram ciclicamente estiradas usando o sistema FlexcellFX- 4000® (Flexcell International®). Esse sistema aplica tração biaxial homogênea sobre as células cultivadas em membranas de borracha de silicone (100) e é apropriado para simular o estiramento fisiológico imposto pelo fluxo de sangue às paredes da maioria das artérias (101). Para o experimento, $0,2 \times 10^5$ CMLV em quinta passagem foram plaqueadas nos poços da placa de cultura Bioflex® previamente revestidos com gelatina

cutânea porcina 10% (Sigma Aldrich®, número de catálogo G9136). Após atingir 90 – 100% de confluência, as CMLV foram privadas de soro por 24h e, a seguir, submetidas a estiramento de 10% de intensidade a 1Hz, durante 24h e 48h. Em todos os experimentos, CMLV-controle não submetidas aos ciclos de estiramento foram avaliadas. Essas células foram plaqueadas por meio do mesmo protocolo descrito anteriormente, sendo mantidas na mesma incubadora que as CMLV em estiramento. Ao final dos ciclos de estiramento, as CMLV foram submetidas à tripsinização e preparadas para os experimentos de OMTC, como descrito anteriormente, no item 3.2.3. As CMLV-controle foram comparadas com as CMLV estiradas em termos de rigidez de citoplasma (variável G) com o teste de Mann-Whitney, sendo p valor inferior a 0,05 considerado significativo.

3.3.8 Análise da organização de fibras de α -actina e das dimensões de adesões focais das CMLV por microscopia confocal

As CMLV de todos os leitos arteriais, em quarta passagem, foram cultivadas sobre lamínulas de vidro recobertas com gelatina porcina 3%. Após 48h do plaqueamento, as CMLV foram fixadas com paraformaldeído a 4% (Sigma Aldrich®, número de catálogo 158127) durante 60 minutos, permeabilizadas durante 30 minutos com 0,1% de Nonidet-40 PBS (Sigma Aldrich®), bloqueadas durante a noite com 1% de albumina de soro bovino (BSA, Sigma Aldrich®, código A9418) diluídas em PBS, incubadas por 3h com faloidina conjugada com Alexa (AlexaFluor 488 Phalloidin, Invitrogen®, 1:400) ou por 12h com o anticorpo primário anti-vinculina (Sigma Aldrich®, número de

catálogo V9131, 1:200), neste último caso seguido de 2 horas de incubação com o anticorpo antirrato secundário (Invitrogen®, AlexaFluor 555® de cabra anti-IgG de rato, 1:500). O núcleo celular foi marcado com solução 4'-6-diamidino-2-fenilindole – DAPI 1:300 (Sigma Aldrich®, código D9532), que foi adicionado ao meio de montagem das lâminas. As imagens fluorescentes foram adquiridas utilizando o microscópio confocal LSM 510 META Zeiss, da rede usuária Premium da Faculdade de Medicina da USP. As imagens de confocal foram adquiridas por um técnico de laboratório, que conhecia os vasos de origem das células, mas os arquivos foram identificados por numeração sequencial, de forma que a análise foi feita de forma cega.

O programa ImageJ® e seu aplicativo OrientationJ® foram utilizados para analisar as imagens coradas com faloidina quanto à orientação de fibras de α -actina. O resultado dessa análise foi expresso em termos de porcentagem de coerência: quanto maior o alinhamento das fibras no citoplasma celular, maior era a coerência. A morfologia das CMLV também foi avaliada usando software ImageJ®. Foram escolhidas, para essa análise, as seguintes variáveis: relação maior eixo celular / menor eixo celular (AR) e circularidade. A última variável foi calculada usando a fórmula $4\pi \times (\text{área} / \text{perímetro}^2)$, sendo o resultado igual a um (valor máximo possível) representativo de um círculo perfeito e a aproximação do resultado em direção ao zero, associado ao alongamento da forma celular. Finalmente, o tamanho de adesões focais foi calculado por meio das imagens com marcação para vinculina. A análise foi realizada usando a função de análise de partículas do programa ImageJ®.

As CMLV de diferentes artérias foram comparadas em termos de orientação de fibras de α -actina (coerência) e forma celular (AR e circularidade)

utilizando o ANOVA one-way, sendo um valor de p inferior a 0,05 considerado significativo. As CMLV das artérias femoral e aorta torácica foram comparadas em termos de tamanho de adesões focais pelo teste t-Student, sendo considerado significativo p valor inferior a 0,05.

3.3.9 Análise de expressão proteica usando cromatografia multidimensional e espectrometria de massas em tandem de alta resolução (Proteômica *Shotgun*)

- **Extração Proteica**

Extraíram-se proteínas de cinco placas de cultura contendo 1×10^6 CMLV de aorta e seis placas contendo 1×10^6 CMLV de artéria femoral com o uso de 100 μ L de tampão de extração proteica associado à lise mecânica. Os extratos proteicos foram centrifugados a 16.000 x g durante 15 min a 4°C. O sobrenadante foi quantificado em triplicata, usando o ensaio de proteína de Bradford (BioRad®, catálogo # 500-0201), de acordo com as especificações do fabricante.

- **Digestão Proteica**

A digestão das proteínas foi realizada de acordo com protocolo de Camargo et al (102), com algumas modificações. Primeiramente, 50 μ g de proteína total foram diluídos em 50 mM de bicarbonato de amônio para um volume final de 60 μ L. As amostras de proteína foram desnaturadas com 0,2% (peso/volume) RapiGest SF, durante 15 min a 80°C, reduzidas com 2,5 μ L de

ditiotretol (100 mM) a 60°C durante 30 min, alquiladas com 2,5µL de iodoacetamida (300mM) à temperatura ambiente e submetidas à digestão enzimática com tripsina por uma noite a 37°C, sendo, nessa etapa, utilizada relação enzima: proteína de 1:100 (peso/peso). Em seguida, 10µl de ácido trifluoroacético 5% foi adicionado à mistura de digestão para hidrolisar o RapiGest, e as amostras foram incubadas a 37°C durante 90 min. A solução de peptídeo tríptico foi, então, centrifugada a 16.000 x g, durante 30 min, a 6°C, e o pH do sobrenadante foi ajustado para 9,8 com 5µl de NH₄OH (1M). Adicionou-se, então, 21µL do padrão interno (álcool desidrogenase de levedura - P00330 no 1pmol/µL) à solução.

- **Cromatografia líquida bidimensional / Espectrometria de massas**

A separação dos peptídeos foi realizada por meio de cromatografia bidimensional líquida de alta eficiência (HPLC- 2D) utilizando fase reversa em ambas as dimensões. A separação foi conseguida utilizando pH 9,8 na primeira dimensão e pH 2,6 na segunda dimensão. A separação em pH 9,8 foi realizada no modo *off-line* no sistema Acquity UPLC® I-Class, equipado com detector de arranjos de fotodiodo (Waters®, Manchester, Reino Unido), usando colunas Gemini NX 3µm (50 x 2mm). Oito frações de 0,5min cada foram resgatadas e automaticamente evaporadas. O sedimento final foi suspenso em 50µL de ácido trifluoroacético 0,1% em solução de acetonitrila 5%. Cada fração foi injetada em segunda dimensão cromatográfica por meio do sistema nanoACQUITY (Waters®). As amostras foram primeiro presas em colunas

Symmetry C18 5 μ m (180 x 20 mm) (Waters®) com 0,1% de TFA em solução de acetonitrila 3%. Em seguida, os peptídeos foram eluídos em colunas analíticas HSS T3 1,8 μ m (75 μ m x 15 centímetros) (Waters®) utilizando como fase móvel A: água com 0,1% de ácido fórmico e B: 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila.

A espectrometria de massa foi realizada no equipamento Synapt Q-TOF MS equipado com uma fonte de ionização NanoLockSpray (Waters®, Manchester, Reino Unido). Para todas as medições, o espectrômetro de massa foi operado em modo V, com um poder de resolução típico de pelo menos 12.500. Houve alternância entre energias de colisão baixas (3 eV) e altas (15-50 eV) e o gás utilizado foi o argônio. Os experimentos foram conduzidos em faixa de massas de 50 a 2000 m/z.

- **Identificação de proteínas e análise de banco de dados**

A identificação de proteínas foi realizada no Global Server v.2.5 (PLGS) com banco de dados do UniProtKB humano. A máxima perda de sítios de clivagens na hidrólise por tripsina foi de 1. Foram consideradas modificações fixas a carbamilação de cisteína e como modificações variáveis, a oxidação da metionina.

- **Análise estatística**

Os dados foram analisados pelo teste t- Student e *fold change* para avaliar as diferenças com significância estatística entre as células aórticas e

femorais ($p < 0,05$ e fold change $> 1,5$). As análises foram feitas usando MetaCore versão 6.14 (<http://portal.genego.com>).

3.4 Materiais e Métodos (Fase 3)

3.4.1 Casuística

Pacientes com diagnóstico de insuficiência coronariana crônica a serem submetidos à cirurgia de revascularização do miocárdio.

3.4.2 Critérios de Inclusão

Pacientes internados no Instituto do Coração (InCor) HCFMUSP, com diagnóstico de insuficiência coronariana crônica em programação de revascularização do miocárdio na mesma internação.

3.4.3 Critérios de Exclusão

Foram excluídos os pacientes que apresentavam alguns dos seguintes critérios:

- Raça autodeclarada amarela;
- Insuficiência renal crônica em terapia de substituição renal;
- Índice de Massa Corpórea (IMC) acima de 30.

3.4.4 Aspectos éticos

Todos os pacientes foram orientados quanto aos objetivos do estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq – HCFMUSP número 0272 /11).

3.4.5 Coleta de amostras biológicas

Uma amostra de sangue periférico e um fragmento de artéria mamária foram obtidos de todos os pacientes incluídos no estudo. As amostras de sangue foram coletadas em tubos a vácuo contendo EDTA (4 mL), sendo armazenadas em temperatura de $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ até a extração de ácido desoxirribonucleico (DNA) (item 3.4.6). Os fragmentos de artéria mamária utilizados no estudo foram enviados ao laboratório somente após a saída do paciente da sala operatória, sendo o transporte realizado em recipiente estéril contendo solução fisiológica a 0,9%. Esses recipientes eram armazenados em temperatura de $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$, por período máximo de 6h, até o início da técnica de explante primário (item 3.4.5). Em média, os fragmentos de artéria mamária apresentavam 1 cm de comprimento.

3.4.6 Isolamento e cultivo de CMLV

As CMLV foram isoladas com a técnica do explante primário e mantidas em cultivo conforme descrito no item 3.2.1. Todas as peças foram cuidadosamente inspecionadas após a abertura do lúmen vascular, visando à identificação de placas de ateroma. Caso essas placas fossem identificadas, a amostra era desprezada e o indivíduo, excluído do estudo.

3.4.7 Ensaio de Citometria Magnético Ótica de Oscilação (*Optical Magnetic Twisting Cytometry - OMTC*)

O experimento de OMTC foi realizado com CMLV provenientes de culturas celulares em segundo subcultivo, conforme descrito no item 3.2.2. Para cada paciente incluído no estudo, seis replicatas biológicas foram avaliadas pelo ensaio de OMTC. Os valores de mediana de G , G' e G'' obtidos a partir dos resultados de todas as replicatas foram utilizados para as análises estatísticas, representando o valor dessas variáveis para aquele indivíduo. O número de replicatas que foram realizadas para cada paciente foi definido em validação interna, antes do início do protocolo, e esteve associado a um coeficiente de variação inferior a 5%.

Um ou mais poços contendo CMLV de linhagem imortalizada e originárias de aortas de coelhos (*Rabbit Aortic Smooth Muscle Cells – RASM*) foram testados em paralelo às CMLV de todos os pacientes incluídos no estudo quando da realização do ensaio de OMTC. Caso fosse detectada uma variação

superior a 15% nos resultados de G dessas células, o resultado das CMLV do paciente avaliado nesse mesmo experimento era invalidado. O objetivo deste protocolo era minimizar possíveis vieses relacionados à interferência de fatores ambientais nos experimentos de OMTC. Considerando que a RASM é uma linhagem celular imortalizada, não estão previstas oscilações de seu comportamento biológico na ausência de modificações das condições de cultivo. Ainda, visando reduzir variabilidade ambiental nos experimentos de OMTC, os poços contendo as CMLV foram acondicionados sempre na mesma prateleira da incubadora, antes do início das medidas mecânicas, e todos os testes foram realizados pelo mesmo indivíduo.

3.4.8 Extração de DNA

A extração de DNA foi feita utilizando-se o Mini Kit DNA de sangue QIAamp® (QIAGEN®, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. Em um tubo de lise, foram pipetados 20µL de Protease QIAGEN® e, a seguir, 200µL da amostra de sangue e 200µL do tampão de lise. Após homogeneização do conteúdo em agitador de bancada, o tubo foi incubado a 56°C por 10 minutos. Centrifugou-se o tubo por 5 segundos, em velocidade máxima e, em seguida, acrescentou-se 200µL de etanol. Após novo ciclo de homogeneização e centrifugação, o conteúdo do tubo foi transferido para a coluna Mini QIAamp®, que foi centrifugada a 6.000 x g por 1 minuto. Após a centrifugação, o tubo coletor da coluna foi removido e substituído por outro tubo

limpo. A coluna foi aberta para acréscimo de 500µL do Tampão de Lavagem 1, sendo, a seguir, centrifugada a 6.000 x g por 1 minuto. O tubo coletor da coluna foi novamente removido e substituído por outro limpo. A coluna foi aberta para acréscimo de 500µL do Tampão de Lavagem 2, sendo, a seguir, centrifugada a 6.000 x g por 1 minuto. Ao final dessa centrifugação, houve nova troca do tubo coletor da coluna, que foi, então, centrifugada a 20.000 x g por 3 minutos. A coluna foi, a seguir, colocada sobre um tubo de eluição e 100µL de Tampão de Eluição foram pipetados no centro de sua membrana. Após incubação em temperatura ambiente por 1 minuto, a coluna foi centrifugada a 6.000 x g por 1 minuto. O conteúdo presente no tubo de eluição, ao final dessa centrifugação, correspondeu ao DNA eluído.

O DNA foi quantificado por meio do equipamento NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific, EUA) e diluído para a concentração de 50 ng/µL para a genotipagem. Só foram aceitas amostras que apresentaram razão A260 / A280 superior a 1,7.

3.4.9 Determinação da ancestralidade genética

A genotipagem foi realizada com o ensaio Affymetrix GeneChip Human Mapping SNP Array® por serviço de genotipagem da empresa Affymetrix (San Diego, CA, USA).

A avaliação da ancestralidade genômica foi realizada usando o software Admixture, que é uma ferramenta de informática desenvolvida para estimar as chances máximas de ancestralidades individuais, com bases de

dados contendo genótipos de polimorfismos multilocus. Como a contribuição de diferentes genomas ancestrais para a população brasileira já foi descrita pelo nosso grupo anteriormente (103), optou-se por uma abordagem supervisionada para a determinação de ancestralidade genética. Assumiu-se o número de populações de referência ancestral para as análises como sendo três: ameríndia, africana e europeia ($k=3$). A análise foi realizada usando todos os 101.348 polimorfismos autossômicos da população estudada e das populações de referência. Foram escolhidas como populações de referência ancestral:

- a) Para ameríndios: Pima e Maya do Projeto de Diversidade Genômica Humana (Human Genome Diversity Project - HGDP) (104);
- b) Para africanos: YRI (*Yoruba in Ibadan* - Yoruba em Ibadan, Nigéria), LWK (*Luhya in Webuye* - Luhya em Webuye, Kenia) e ASW (*Americans of African Ancestry in SW* - Americanos de Ancestralidade Africana em SW, EUA) do projeto HapMap (105);
- c) Para europeus: CEU (*Utah Residents with Northern and Western European ancestry* - Residentes de Utah com Ancestralidade de Norte e Oeste Europeu) e TSI (*Tuscan in Italia* - Toscanos na Itália), também do projeto HapMap (105).

O resultado de ancestralidade genética foi expresso pela proporção de contribuição de cada uma das referências ancestrais (africana, europeia e ameríndia) para a definição racial de cada indivíduo. Essas proporções tinham valor entre zero e um.

3.4.10 Análise de prontuário

Os dados clínicos de todos os pacientes foram obtidos por meio de análise do prontuário eletrônico. Quando o prontuário do paciente não estava disponível eletronicamente, os dados clínicos foram consultados em prontuário físico.

Para todas as variáveis clínicas registradas (hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus, tabagismo, dislipidemia, etilismo, obesidade, acidente vascular cerebral, infarto agudo do miocárdio, doença arterial periférica, insuficiência renal crônica, hipotireoidismo, doença pulmonar obstrutiva crônica, neoplasia, menopausa, transplante de órgãos, disfunção valvar mitral ou aórtica, insuficiência cardíaca congestiva, angina estável, angina instável), considerou-se que o paciente apresentava o diagnóstico se ele constasse nas evoluções clínicas ou no resumo de alta da internação. Quando constava em prontuário que o paciente não apresentava algum dos diagnósticos de interesse (“nega diabetes”, por exemplo), essa informação era adicionada à tabela estatística. Nos casos em que a negativa não estava registrada em prontuário, os pacientes eram contatados por telefone para esclarecimento. Se, ainda assim, não houvesse confirmação do diagnóstico, a informação não era adicionada à tabela estatística e o dado era interpretado como ausente.

3.4.11 Análise Estatística

Inicialmente, foi feita a correção das variáveis G , G' e G'' para o viés decorrente do uso de diferentes lotes de grânulos magnéticos pelo método de regressão linear. Os resíduos não normalizados resultantes dessa regressão foram denominados Gr , $G'r$, $G''r$ e usados para as análises estatísticas do trabalho. Procedeu-se à avaliação do padrão de distribuição das variáveis pelo teste Kolmogorov-Smirnov, sendo um p valor superior a 0,05 associado à distribuição normal.

As análises univariadas foram realizadas com o teste t-Student para as variáveis categóricas (diabetes mellitus, tabagismo, sexo, hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia, etilismo, acidente vascular cerebral, insuficiência renal crônica, hipotireoidismo, doença pulmonar obstrutiva crônica, neoplasias, insuficiência cardíaca) e o teste de correlação de Pearson para as variáveis numéricas contínuas (idade, ancestralidade racial africana). Foi considerado como estatisticamente significativo um p valor inferior a 0,05.

A análise multivariada foi realizada por meio de regressão linear múltipla. Foram consideradas como variáveis dependentes Gr , $G'r$, $G''r$ e como variáveis independentes aquelas de interesse para o estudo (idade, sexo, ancestralidade africana, diabetes mellitus e tabagismo), independentemente do p valor obtido na análise univariada, e as variáveis clínicas cuja análise univariada resultou em p valor inferior a 0,2. Foi considerado como estatisticamente significativo p valor inferior a 0,05. Todos os testes estatísticos foram realizados com o programa IBM SPSS, 18ª versão.

4. Resultados

4.1 Resultados da Fase 1

Foram realizados os seguintes experimentos de OMTC na primeira fase do estudo: 29, com cultura de CMLV de artéria renal; 25, com cultura de CMLV de aorta; 20, com cultura de CMLV de artéria femoral; 32, com cultura de CMLV de artéria mamária e 18, com cultura de CMLV de artéria carótida.

Observou-se redução progressiva do tempo decorrido entre o plaqueamento das CMLV, em determinada passagem, e o alcance de confluência, exigindo novo subcultivo (progressão para nova passagem) conforme aumento no tempo total de permanência *in vitro* das CMLV. A média de tempo, calculada em dias, em que as CMLV permaneceram em uma determinada passagem foi a seguinte: $11 \pm 2,53$ dias em passagem 5 (P5), $6,6 \pm 0,54$ dias em passagem 6 (P6) e $4,6 \pm 2,2$ dias em passagem 7 (P7). Isso denota que há aumento nas taxas de proliferação das CMLV com a progressão dos subcultivos *in vitro*.

Em todas as culturas acompanhadas, com exceção da proveniente da artéria renal, houve redução progressiva do valor de G com as passagens, significando redução na rigidez de citoplasma das CMLV avaliadas. Encontrou-se correlação negativa entre o valor de G e as passagens, expressa por um coeficiente de correlação (CC) de: -0,32 para a cultura proveniente da aorta ($p < 0,001$), -0,3 para a cultura proveniente da femoral ($p < 0,001$), -0,06 para a cultura proveniente da renal ($p = 0,34$), -0,37 para a cultura proveniente da mamária ($p < 0,001$) e -0,42 para a cultura proveniente da carótida ($p < 0,001$, Figura 12). Em relação à histerese η , correlação positiva e estatisticamente

significativa com a variável passagem foi encontrada nas seguintes culturas: aorta (CC 0,45, $p < 0,001$), mamária (CC 0,33, $p < 0,001$) e carótida (CC 0,62, $p < 0,001$) (Figura 13). Não foi encontrada correlação significativa entre η e a passagem para as culturas de artéria femoral e renal ($p = 0,31$ e $0,1$, respectivamente).

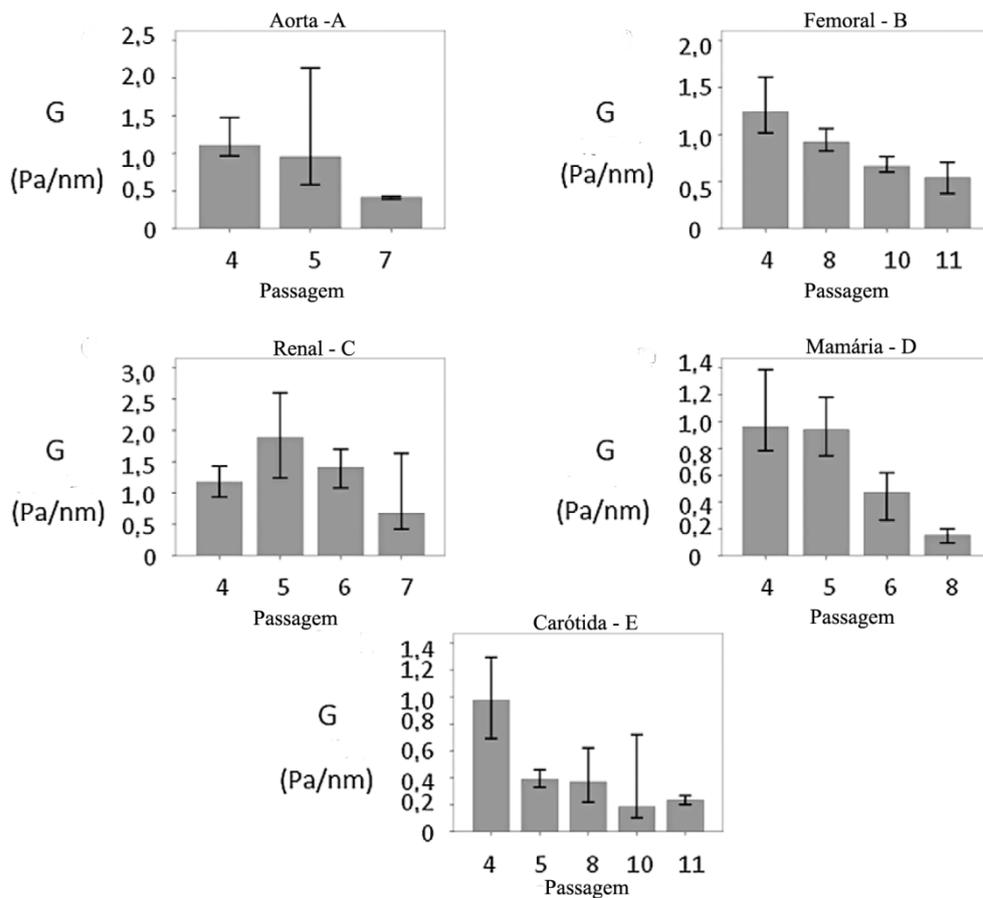


Figura 12. Modificação da rigidez de CMLV com a progressão das passagens da cultura celular. Observa-se redução progressiva do valor de G com o aumento das passagens: A- cultura de CMLV de aorta (coeficiente de correlação = -0,32; $p < 0,001$), B- cultura de CMLV de artéria femoral (coeficiente de correlação = -0,3; $p < 0,001$), C- cultura de CMLV de artéria renal (coeficiente de correlação = -0,06; $p = 0,34$), D- cultura de CMLV de artéria mamária (coeficiente de correlação = -0,37; $p < 0,001$) e E- cultura de CMLV de artéria carótida (coeficiente de correlação = -0,42; $p < 0,001$). As colunas representam a mediana de G e as barras, o intervalo de confiança 95%. Todas as correlações foram feitas pelo teste de Spearman.

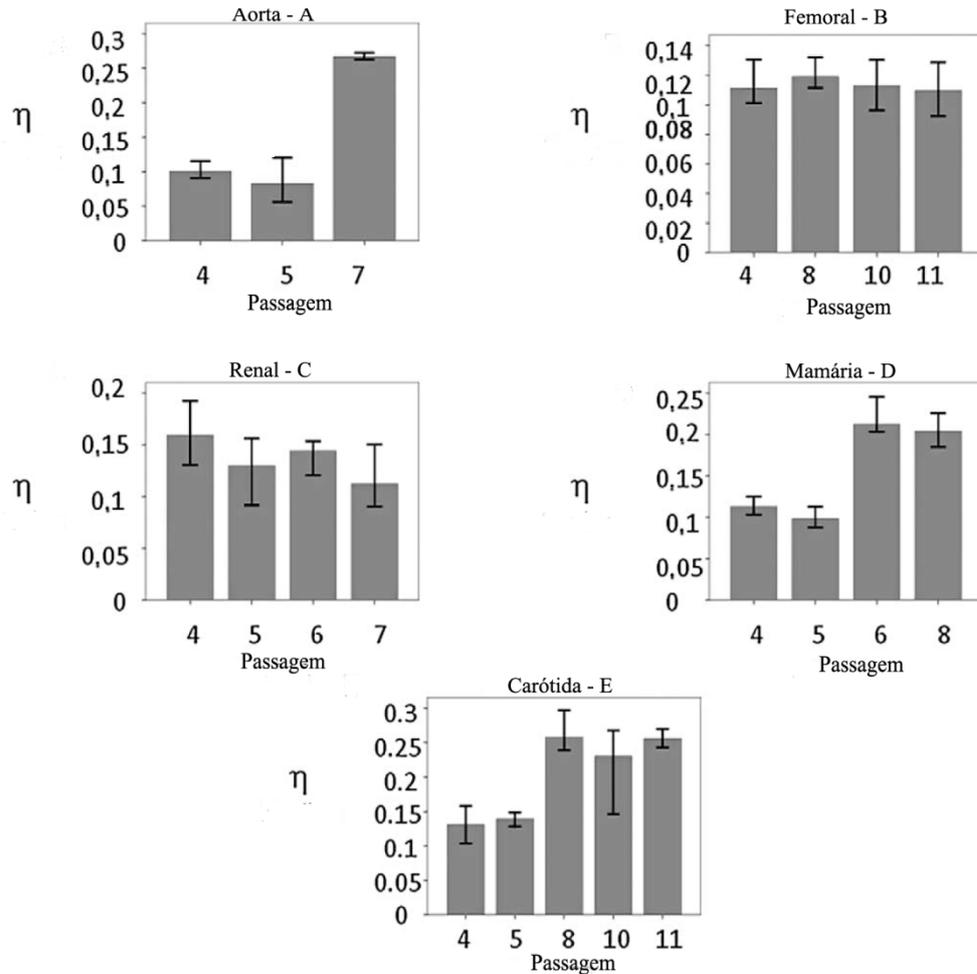


Figura 13. Modificação da histerese do citoplasma de CMLV com a progressão das passagens da cultura celular. Observou-se aumento significativo da histerese (η) com a progressão das passagens nas seguintes culturas: A- cultura de CMLV de aorta (coeficiente de correlação = 0,45; $p < 0,001$), D- cultura de CMLV de artéria mamária (coeficiente de correlação = 0,33; $p < 0,001$) e E- cultura de CMLV de artéria carótida (coeficiente de correlação = 0,62; $p < 0,001$). Não foi encontrada correlação significativa entre η e passagem nas culturas de CMLV de artérias femoral (B) e renal (C). As colunas representam a mediana de η e as barras, o intervalo de confiança 95%. Todas as correlações foram feitas pelo teste de Spearman.

Com relação à organização do citoesqueleto de α -actina, foi encontrada redução estatisticamente significativa da intensidade de sinal por célula (expressa em escala de cinza) nas CMLV marcadas com faloidina com o avanço do tempo de cultivo *in vitro*. As CMLV de artéria renal em P9 tiveram

média de intensidade de sinal $113,77 \pm 32,9$ e, em P12, $60,43 \pm 25,38$ ($p < 0,01$). As CMLV de artéria femoral em P6 tiveram média de intensidade de sinal $146,43 \pm 35,36$; em P8, $59,87 \pm 35,36$; e em P9, $92,17 \pm 39,26$ ($p < 0,01$). Finalmente, as CMLV de artéria mamária apresentaram, em P7, média de intensidade de sinal $72,54 \pm 18,27$ e, P10, $51,10 \pm 21,66$ ($p < 0,01$) (Figura 14). A intensidade de sinal em imagens de microscopia confocal não traduz adequadamente a quantidade de proteínas presentes no citoplasma. Entretanto, a redução de sinal observada demonstra que houve mudanças no citoesqueleto de actina com as passagens, quer por redução na quantidade dessa proteína, quer por alterações na organização espacial das fibras de tensão, que podem ter ficado mais dispersas no citoplasma. A análise das imagens obtidas mostra, ainda, que as CMLV se tornaram progressivamente menores e menos alongadas com o avanço da permanência *in vitro*, o que também reflete indiretamente a organização do citoesqueleto (Figura 14).

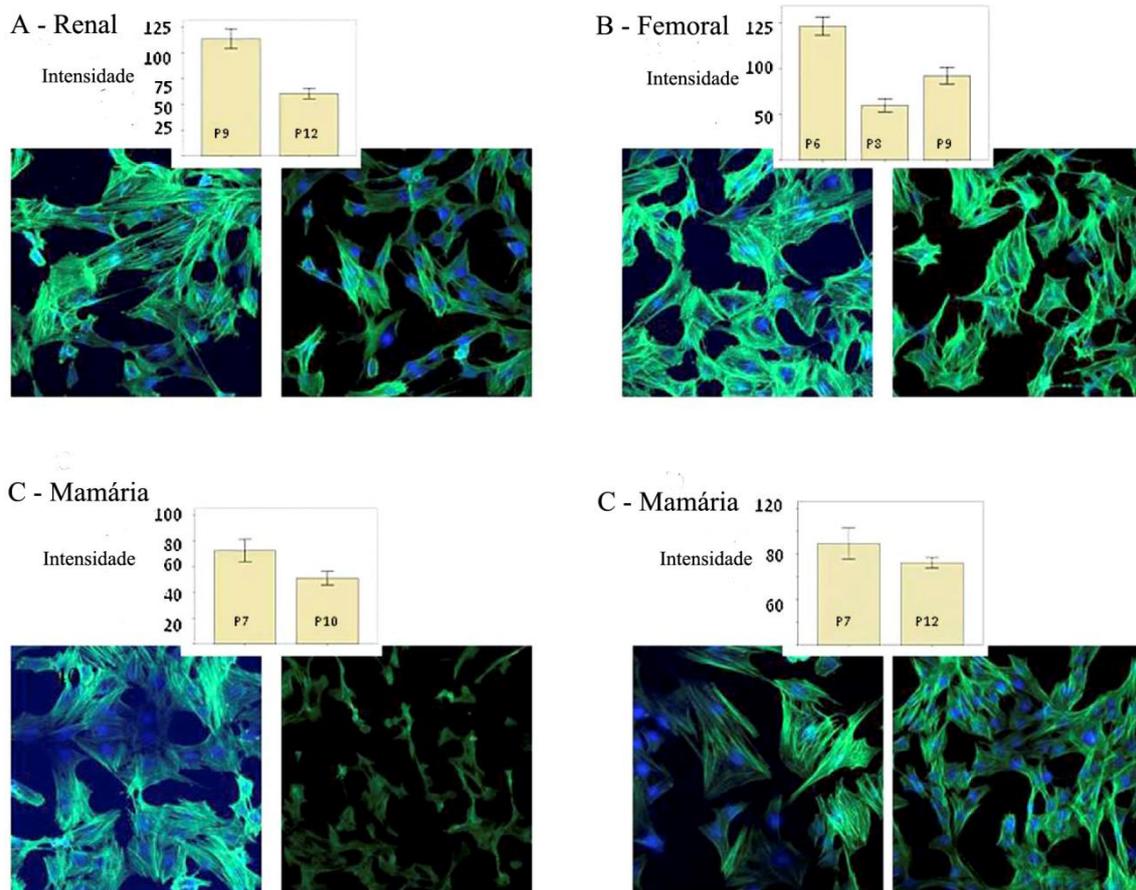


Figura 14. Modificações do citoesqueleto de α -actina com a progressão dos subcultivos *in vitro*. Os gráficos mostram a comparação do valor médio de intensidade de sinal por célula (escala de cinza) de CMLV marcadas com faloidina, em diferentes passagens. A: Cultura proveniente de artéria renal, B: Cultura proveniente de artéria femoral, C e D: culturas provenientes de artérias mamárias. Houve diferença estatística das médias em todos os casos ($p < 0,01$). As barras representam o intervalo de confiança 95%. A análise das imagens revela, ainda, que as CMLV se tornaram menores e menos alongadas com o avanço das passagens.

Constatou-se diminuição progressiva na quantidade de colágeno tipo I com a progressão das passagens *in vitro*. Essa diferença quantitativa não foi observada no caso da α -actina de músculo liso. Como esse resultado foi uma análise exploratória derivada do seguimento de uma cultura de CMLV entre P7 e P13, não foram feitas análises estatísticas (Figura 15).

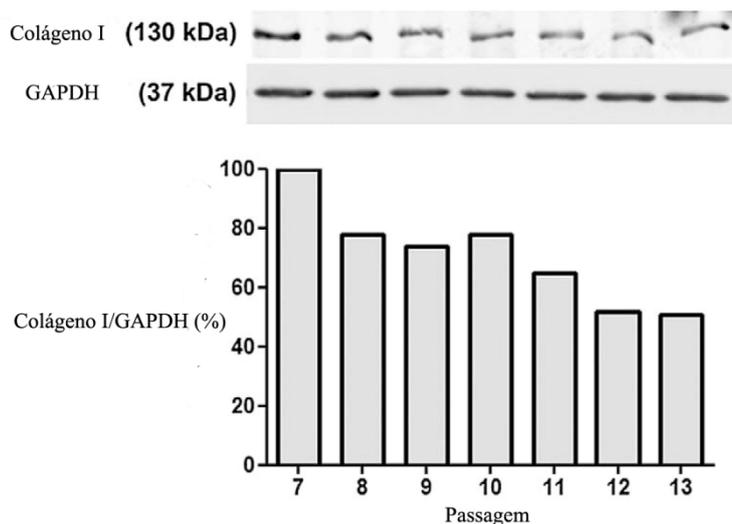


Figura 15. Redução do conteúdo de colágeno tipo I nos extratos celulares de CMLV com a progressão das passagens da cultura. A quantificação foi feita pela técnica de Western Blot e GAPDH como controle. Foi considerado como 100% de conteúdo de colágeno tipo I o apresentado nos extratos de CMLV em passagem 7. Foi uma análise exploratória de uma cultura isolada e, dessa forma, análises estatísticas não foram realizadas.

4.2 Resultados da Fase 2

4.2.1 Caracterização estrutural dos vasos

Os vasos estudados (coronária, aorta torácica, mamária, carótida, aorta abdominal, renal e femoral) diferiram em termos de espessura da camada média ($p < 0,001$), diâmetro interno do lúmen ($p < 0,001$), relação espessura da camada média / diâmetro interno ($p < 0,001$), percentual de elastina ($p < 0,001$) e percentagem de colágeno ($p = 0,02$), ambos medidos dentro da camada média (Figura 16). Os dados descritivos brutos estão disponíveis na Tabela 1.

Tabela 1- Diferenças estruturais entre as artérias estudadas

	Femoral	Renal	Aorta Abdominal	Carótida	Mamária	Aorta Torácica	Coronária
Espessura camada média, μm	324 \pm 21	207 \pm 39	318 \pm 16	270 \pm 42	142 \pm 21	1.242 \pm 56	94 \pm 10
Diâmetro Interno, μm	1.645 \pm 12	944 \pm 134	4.500 \pm 500	1.896 \pm 340	1.924 \pm 244	12.876 \pm 251	1.284 \pm 90
Espessura / Diâmetro Interno	0,2 \pm 0,01	0,22 \pm 0,04	0,071 \pm 0,01	0,149 \pm 0,04	0,076 \pm 0,02	0,096 \pm 0,002	0,074 \pm 0,01
Colágeno, %	12,78 \pm 6,57	24,17 \pm 5,63	12,76 \pm 3,82	22,34 \pm 8,45	14,7 \pm 3,5	18,13 \pm 3,9	19,23 \pm 9,9
Elastina, %	14,3 \pm 2,9	9,2 \pm 3,5	12,2 \pm 4,5	17,4 \pm 5,3	43,1 \pm 7,7	56 \pm 2,8	3,2 \pm 1
MEC/CMLV	0,44 \pm 0,09	0,31 \pm 0,09	0,62 \pm 0,2	0,53 \pm 0,22	1,18 \pm 0,35	1,4 \pm 0,27	0,83 \pm 0,3

Os dados são apresentados como média \pm desvio-padrão

O conteúdo de elastina diminuiu significativamente à medida que os vasos se distanciavam do coração, condizente com observações anteriores (106), e a aorta torácica exibiu a percentagem mais elevada de fibras elásticas (Figura 16, letras A e C). A relação espessura/diâmetro interno foi significativamente maior nos ramos da aorta abdominal (artérias femoral e renal), em comparação com a própria aorta abdominal e os vasos torácicos (aorta torácica, mamária e coronária) ($p < 0,001$) (Figura 16, letra B). As diferenças encontradas entre os vasos no diâmetro interno e na espessura da média, isoladamente, foram atribuídas às dimensões superiores da aorta torácica. Embora a percentagem de colágeno tenha sido diferente entre os vasos, um padrão para essa variação não foi identificado.

A proporção de matriz extracelular (MEC) dentro da camada média de diferentes artérias foi calculada usando imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) e expressa como a razão entre a área de MEC / área de CMLV (MEC/CMLV). A aorta torácica apresentou a maior quantidade de MEC

circundando as CMLV, seguida pela artéria mamária (Figura 17, letra A). A aorta torácica e a artéria mamária apresentaram relação MEC/CMLV aproximadamente duas vezes maior do que a maior relação MEC/CMLV das artérias infradiafragmáticas (aorta abdominal, renal e femoral) ($p < 0,001$, Figura 17, letra A). Além da maior quantidade de MEC, a aorta torácica e a artéria mamária também exibiram CMLV menos alinhadas em comparação com as artérias femoral e renal (Figura 17, letra B, Figura 18).

Os resultados obtidos com relação à estrutura das artérias foram consistentes com os dados anteriores da literatura, que mostram predomínio de elastina na aorta torácica e diminuição significativa dela nas artérias extratorácicas, acompanhados por um aumento tanto do módulo elástico como da velocidade da onda de pulso dos vasos (107). Além disso, os diâmetros vasculares encontrados são proporcionais aos descritos para os humanos (108). Considerando-se as diferenças marcantes quanto à distância do coração e à composição da MEC, entre a aorta torácica e artéria femoral, esses leitos foram escolhidos para ser avaliados isoladamente em algumas de nossas análises.

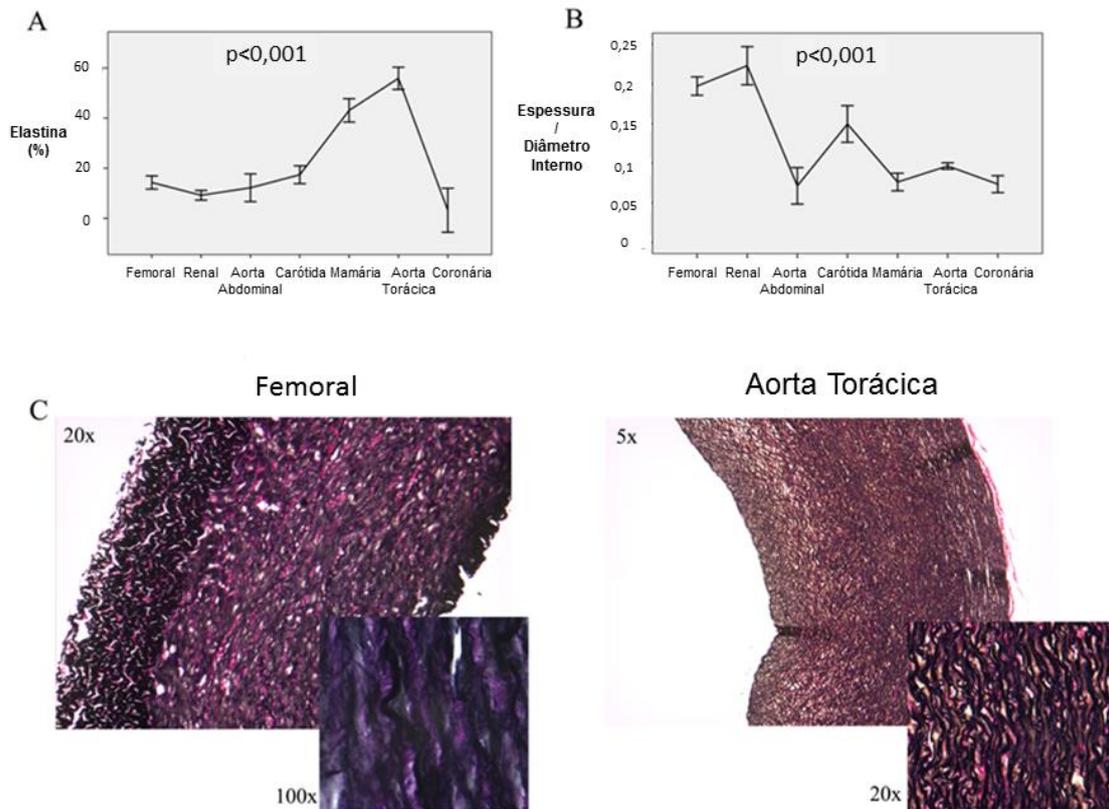


Figura 16. Caracterização estrutural de artérias estudadas. A: A quantidade de elastina dentro de camada média diminuiu à medida que os vasos se afastaram do coração. A aorta torácica apresentou a maior quantidade de fibras elásticas, enquanto que a artéria femoral e a artéria renal, as menores quantidades desta fibra. No gráfico, as artérias são apresentadas, em ordem decrescente de distância, a partir do coração. Pontos: média, barras: Intervalo de Confiança de 95%. B: A relação espessura/diâmetro interno foi maior nos ramos da aorta abdominal, em comparação com os vasos torácicos. Pontos: média, barras: intervalo de confiança 95%. C: Coloração Verhoeff Van-Gieson da artéria femoral e da aorta torácica. A aorta torácica apresentou a maior espessura e maior quantidade de elastina dentro de sua camada média em comparação com todos os outros vasos. Na figura, a artéria femoral e a aorta torácica são comparadas em termos de espessura da camada média (fotos principais) e em termos de percentagem de elastina (fotos menores, em que as fibras elásticas são coradas em roxo escuro).

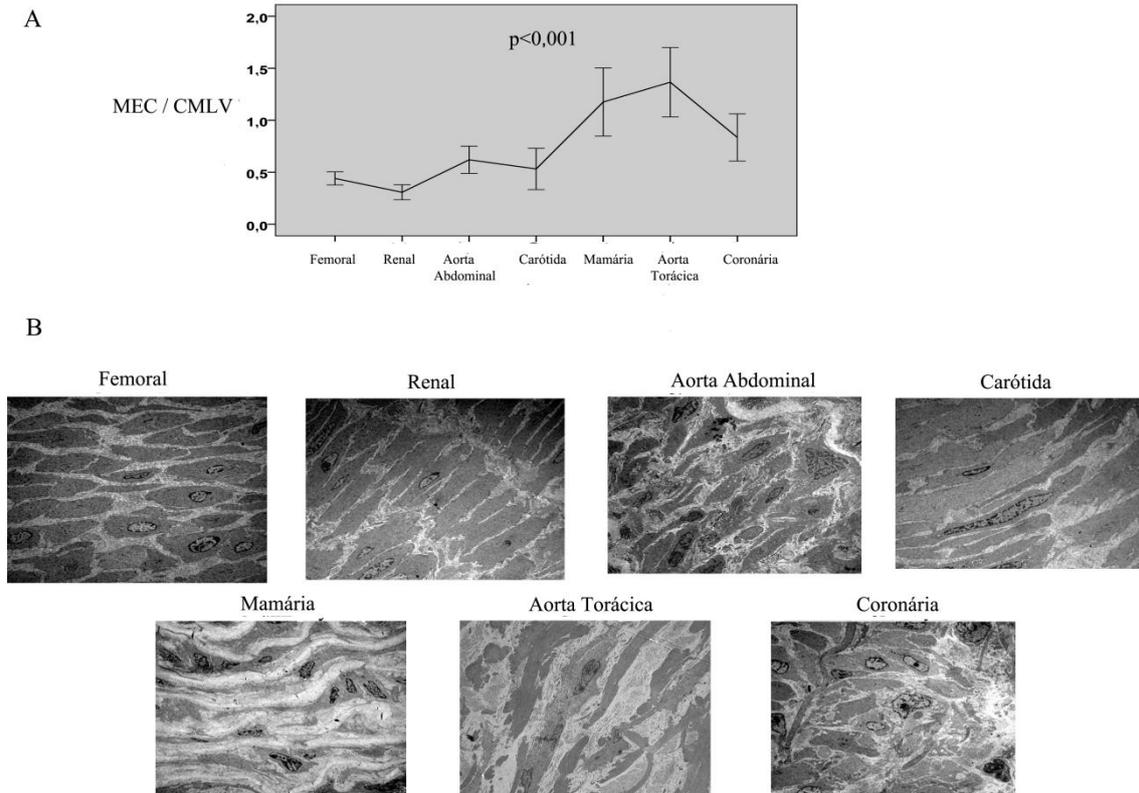
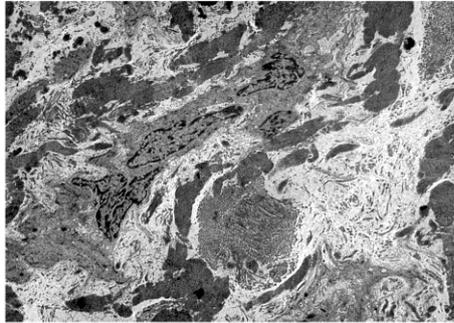


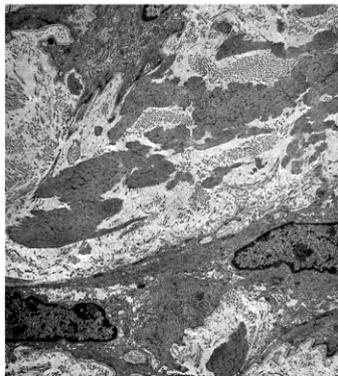
Figura 17. Relação entre MEC e CMLV na camada média das artérias estudadas. A. A quantidade de matriz extracelular (MEC) circundando as células de músculo liso vascular (CMLV) foi menor nas artérias distantes do coração (femoral e renal), em comparação com as artérias mamária e aorta torácica. B. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) de todos os vasos analisados, destacando que a artéria femoral e a renal apresentam CMLV mais alinhadas e circundadas por menos MEC do que a aorta torácica e a artéria mamária.

Aorta Torácica

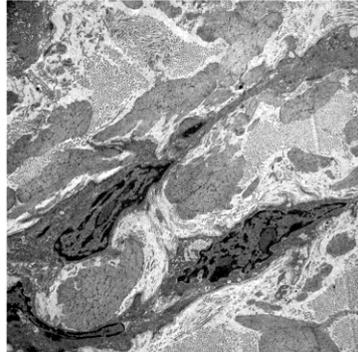
2500 x Microscopia Eletrônica de Transmissão



5000 x Microscopia Eletrônica de Transmissão

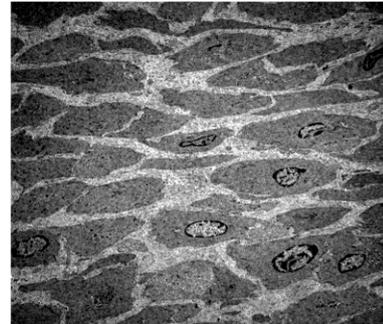


5000 x Microscopia Eletrônica de Transmissão

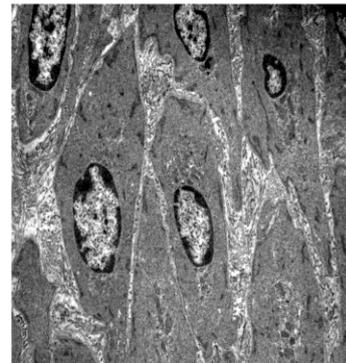


Femoral

2500 x Microscopia Eletrônica de Transmissão



5000 x Microscopia Eletrônica de Transmissão



5000 x Microscopia Eletrônica de Transmissão

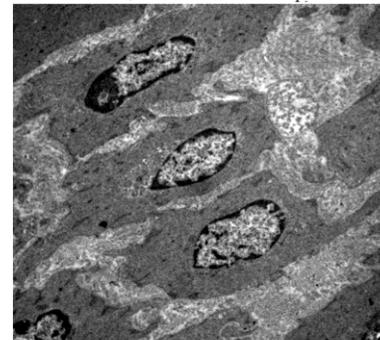


Figura 18. Análise ultraestrutural da camada média das artérias femoral e aorta. As imagens de microscopia eletrônica de transmissão claramente expõem as diferenças de organização das CMLV e da MEC entre a artéria femoral e a aorta torácica. As CMLV da artéria femoral são mais alinhadas e circundadas por menor quantidade de MEC do que as CMLV da aorta torácica, que apresentam morfologia mais irregular.

4.2.2 Análise do alinhamento das fibras de α -actina, da morfometria e das adesões focais (AF) das CMLV de diferentes leitos vasculares

As AF ancoram os filamentos de α -actina à membrana plasmática, influenciando o remodelamento do citoesqueleto e sua articulação com a MEC. Maiores dimensões de AF estão associadas ao enrijecimento das CMLV (54, 109, 110). Considerando-se a importância das AF na organização do citoesqueleto de α -actina, optou-se por avaliar essas estruturas nas imagens de MET das CMLV, antes de mensurar as propriedades mecânicas dessas células.

A análise ultraestrutural da camada média vascular permitiu visualizar as CMLV em um cenário similar àquele presente *in vivo*, especialmente em termos da sua relação com a MEC. O tamanho médio das AF diferiu significativamente entre as CMLV conforme o território de origem ($p < 0,001$), sendo que a artéria femoral apresentou as maiores AF, e a aorta torácica, as menores (Figura 19, letras A, B e C). A fim de avaliar se essa diferença em relação à área das AF persistia no ambiente *in vitro*, imagens de imunofluorescência de CMLV marcadas para a proteína vinculina foram analisadas e a extensão de sua marcação junto à membrana plasmática, calculada. Os resultados foram consistentes: CMLV da aorta torácica apresentaram AF significativamente menores em comparação às CMLV da artéria femoral (Figura 21, letras A e B). Considerando que maiores AF estão associadas com maior rigidez celular, esse achado destaca que as CMLV da femoral podem ter um comportamento mecânico final diferente das CMLV de

outras artérias, especialmente com relação à organização do citoesqueleto e articulação com a MEC.

As imagens de microscopia confocal das CMLV marcadas com faloidina foram utilizadas para avaliação da forma celular e da orientação das fibras de α -actina (Figura 20, as letras A e B). Optou-se por avaliar a forma das CMLV porque estudos prévios correlacionaram a morfologia das CMLV com seu fenótipo (55, 111). CMLV fusiformes sempre foram associadas com um fenótipo mais diferenciado (contrátil) em comparação às CMLV romboides, associadas a fenótipo mais proliferativo e secretor (111, 112). Nas análises realizadas, as CMLV de diferentes artérias diferiram quanto a sua forma ($p < 0,001$, tanto para AR quanto para circularidade). As CMLV da artéria femoral e da artéria coronária apresentaram-se mais alongadas em comparação com as CMLV de outros vasos (Figura 20, a letra A). Não foi encontrada diferença significativa com relação à orientação de fibras de α -actina entre os vasos ($p = 0,24$).

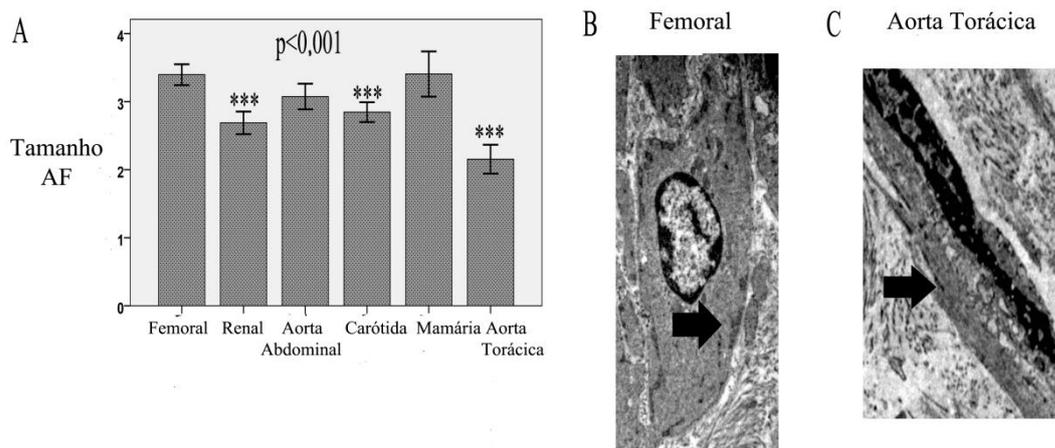


Figura 19: Comparação das dimensões de adesões focais (AF) entre CMLV de diferentes leitos arteriais por imagens de microscopia eletrônica de transmissão. As CMLV de diferentes origens diferiram significativamente em termos de tamanho das AF (ANOVA one-way, $p < 0,001$). A. As CMLV de artéria femoral apresentaram área média de AF significativamente maior do que as CMLV das outras artérias estudadas. Colunas: conversão logarítmica da área de AF. Barras: intervalo de confiança de 95%. Os

asteriscos marcam as comparações post-hoc das artérias em relação à artéria femoral. B. Imagem de MET (2500x) de CMLV de artéria femoral. A seta aponta a estrutura de uma AF. C. Imagem de MET (5000x) de CMLV de aorta torácica. A seta aponta a estrutura de uma AF. Os resultados apresentados reforçam que as CMLV da artéria femoral organizam diferentemente o citoesqueleto em relação às CMLV de outras artérias.

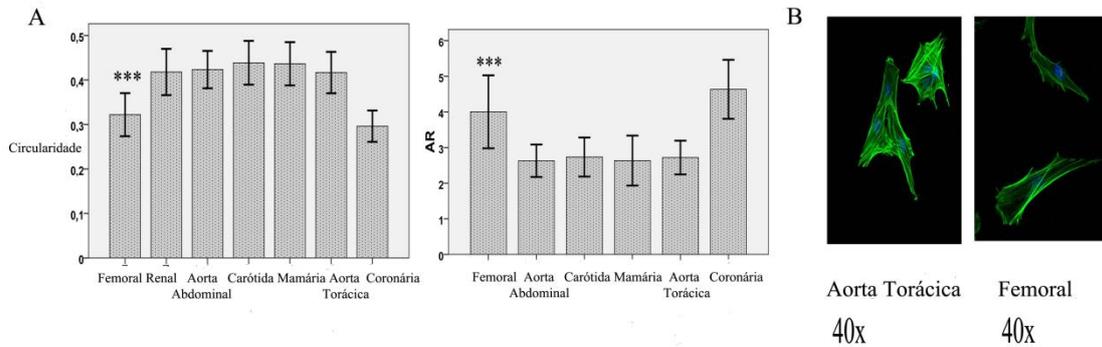


Figura 20. Comparação da forma das CMLV entre diferentes artérias. A. As CMLV de artéria femoral apresentaram-se mais alongadas do que as CMLV de outros vasos (exceto artéria coronária). No primeiro gráfico, a variável estudada foi circularidade e, no segundo, AR (maior eixo celular/menor eixo celular). Colunas: Média ± intervalo de confiança 95%. B. Imagens de microscopia confocal de CMLV de artéria femoral e aorta torácica marcadas com faloidina, destacando o citoesqueleto de α -actina. Estes resultados apresentados reforçam que as CMLV da artéria femoral organizam diferentemente o citoesqueleto em relação às CMLV de outras artérias.

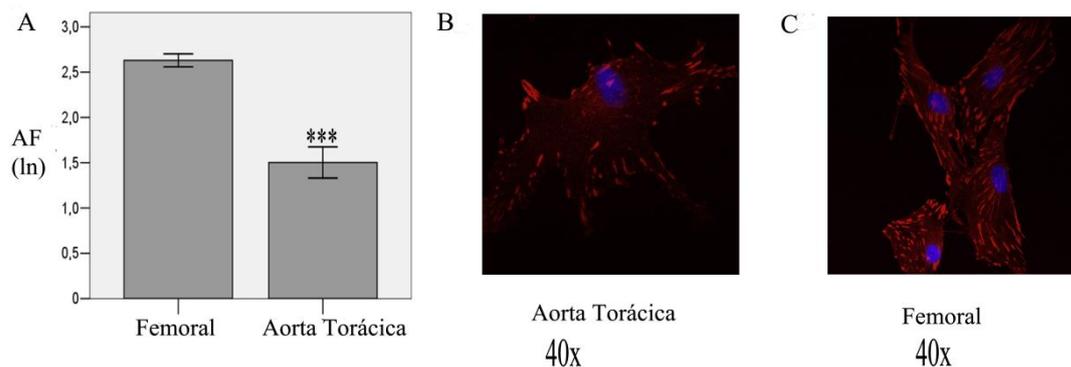


Figura 21. Comparação das dimensões de adesões focais (AF) entre CMLV de aorta torácica e de artéria femoral por imagens de microscopia confocal. A. Comparou-se o tamanho in vitro de AF entre CMLV de artéria femoral e de aorta torácica utilizando imagens com marcação imunofluorescente da proteína vinculina (B e C, vermelho: vinculina, azul: núcleo). Consistente com os resultados obtidos usando imagens de MET, as CMLV de aorta torácica apresentaram AF significativamente menores em comparação com as CMLV de artéria femoral. Colunas: média da área de AF após conversão logarítmica. Barras: intervalo de confiança de 95%.

4.2.3 Análise do ciclo celular

As CMLV das diferentes artérias foram submetidas à análise do ciclo celular e apresentaram-se homogêneas em termos de porcentagem de células em cada fase do ciclo, independentemente da sua artéria de origem (Figura 22). Foram identificadas, em média, $0,89 \pm 0,34\%$ das células na fase G0 –G1; $73,28 \pm 9,2\%$ das células na fase S; $3,99 \pm 1,6\%$ das células na fase G2 e $12,21 \pm 5,7\%$ das células na fase sub-G0.

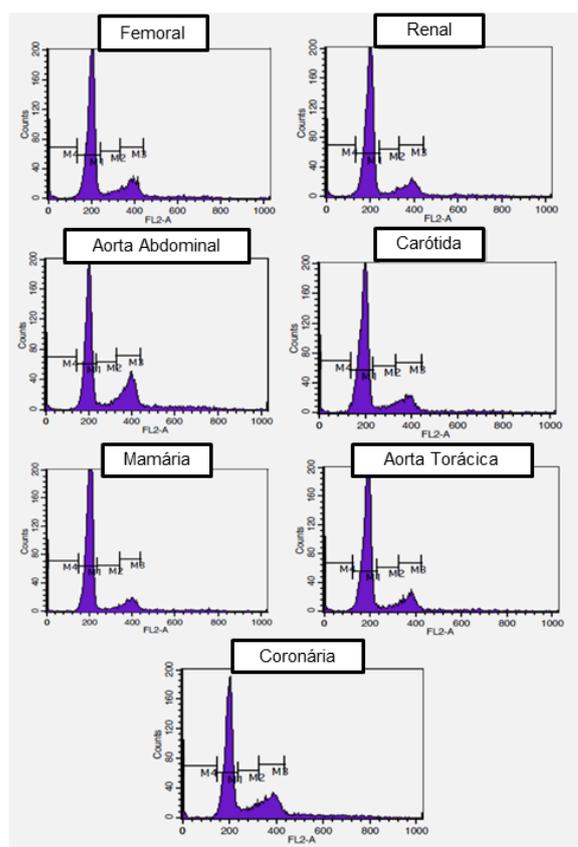


Figura 22: Resultado da análise de ciclo celular das culturas de CMLV das artérias estudadas. A porcentagem de células em cada fase do ciclo celular foi homogênea, independentemente do vaso de origem. M1: fase G0-G1, M2: fase S, M3: fase G2, M4: fase sub-G0.

4.2.4 Caracterização mecânica das CMLV das diferentes artérias

Foram realizados os seguintes experimentos de OMTC válidos: 51, renal; 33, aorta abdominal; 49, femoral; 51, mamária; 63, carótida; 16, coronária e 33, aorta torácica. O experimento foi considerado válido se as seguintes condições fossem atendidas: 1- As CMLV encontravam-se confluentes, 2- O número mínimo de 150 grânulos ferromagnéticos foi identificado dentro do poço, 3- As CMLV exibiram morfologia normal pré e pós-experimento.

As CMLV de diferentes artérias diferiram quanto ao G, sendo os resultados consistentes em todos os animais analisados (Figura 23, letra B). A mediana do escore-Z foi calculada para cada artéria (ZG), como exposto na seção de métodos, e diferença significativa foi encontrada entre os leitos arteriais ($p < 0,001$, Figura 23, letra A). A aorta torácica exibiu o menor valor de ZG e a artéria femoral, o mais elevado ($p < 0,001$, Figura 23, letra A). Em uma análise mais abrangente, as CMLV da aorta torácica exibiram ZG significativamente menor que as CMLV dos vasos infradiafragmáticos (aorta abdominal, renal e femoral) ($p < 0,001$), o que reflete um citoplasma menos rígido das CMLV originárias desse primeiro vaso. No que diz respeito à distância do vaso a partir do coração, uma clara tendência de elevação de ZG com o aumento dessa distância foi observada (Figura 23, letras A). Essa constatação não se aplica à artéria coronária, que recebe irrigação sanguínea durante diástole. O escore-Z de η (ηZ) não diferiu estatisticamente entre os diferentes vasos, o que significa que histerese das CMLV é homogênea entre eles ($p = 0,12$).

Em todos os experimentos com a histamina, independentemente do animal, foi observado um aumento de G após a transferência da droga. A mediana do valor de G normalizado (G final pós-droga /G basal pré-droga) foi de 1,6 (intervalo interquartil - IQR 0,56). A resposta ao isoproterenol foi mais heterogênea (mediana de G normalizado=0,82, IQR 0,42) e variou significativamente entre os animais ($p<0,001$). Esse comportamento já foi descrito anteriormente (113) e pode refletir a quantidade de β -receptores presentes na membrana celular. As CMLV não diferiram em relação à intensidade da resposta, tanto à droga agonista quanto à antagonista de contração ($p=0,33$ para histamina e $p=0,23$ para isoproterenol).

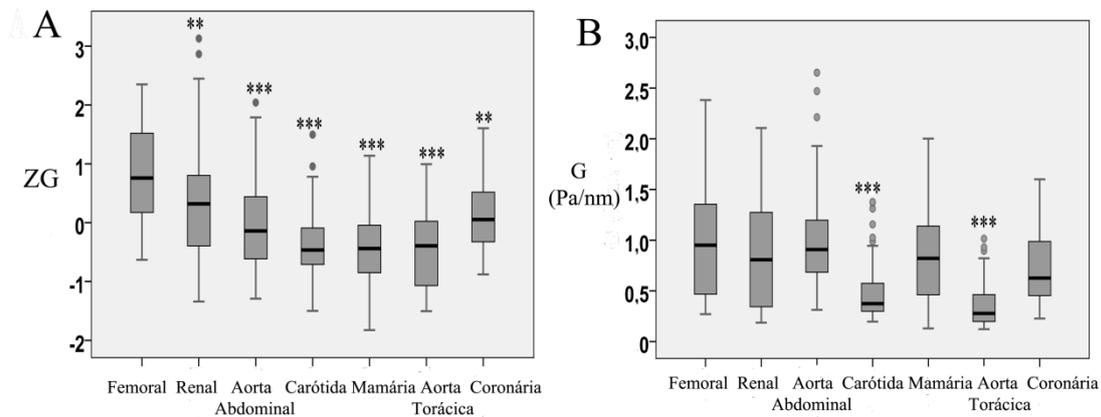


Figura 23: Variação da rigidez das CMLV de acordo com a posição na árvore arterial. Os valores do escore-Z da variável G (ZG) para cada artéria são apresentados no primeiro gráfico (A) e, no segundo (B), são apresentados os valores brutos de G. Em ambos, as artérias estão dispostas na ordem de distância decrescente a partir do coração (femoral, renal, aorta abdominal, carótida, mamária, aorta torácica e coronária), e um aumento da rigidez das CMLV conforme seu vaso de origem se distancia do coração pode ser evidenciado ($p<0,001$). Quando esses dados mecânicos são interpretados em conjunto com os dados anatômicos dos vasos previamente expostos, é evidente que as CMLV de artérias com menos fibras elásticas e menos MEC, em camada média (femoral e renal), são mais rígidas em comparação com as CMLV da aorta torácica. Em ambos os gráficos, os asteriscos marcam as comparações post-hoc das artérias em relação à artéria femoral.

4.2.5 Identificação de possíveis fatores moduladores da mecânica de CMLV

Após o reconhecimento de que a rigidez basal das CMLV varia de acordo com a sua posição na árvore arterial, foi estudado se a composição da MEC e a deformação cíclica da parede arterial devido ao fluxo sanguíneo têm qualquer influência sobre este fenótipo.

- **Correlação entre dados de MEC e rigidez de CMLV**

Quando os resultados de mecânica celular são comparados com os dados anatômicos vasculares, é explícito que as CMLV de artérias com menos fibras elásticas e menos MEC circundante (femoral e renal) apresentaram-se mais rígidas que as CMLV de aorta torácica (rica em elastina e em MEC). Encontrou-se forte correlação negativa entre o percentual de elastina do vaso e a rigidez das CMLV (ZG) ($p < 0,01$, coeficiente de correlação = $-0,72$ e $r^2 = 0,52$) e entre a relação de MEC/CMLV e a rigidez CMLV (ZG) ($p < 0,01$, coeficiente de correlação = $-0,85$ e $r^2 = 0,72$). A maior rigidez apresentada pelas CMLV de artéria femoral é consistente com a observação anterior de que essas células apresentam AF mais extensas, tanto em análise ultraestrutural quanto em imagens de imunofluorescência *in vitro*.

- **Avaliação da modificação do comportamento mecânico das CMLV após período prolongado de estiramento cíclico**

O principal objetivo desse experimento foi verificar se a tensão circunferencial cíclica aplicada sobre as paredes das artérias poderia influenciar o comportamento mecânico das CMLV, e não reproduzir as condições específicas de estiramento de cada vaso estudado. Foi escolhido o protocolo com intensidade de estiramento de 10% e 1Hz de frequência, que é classicamente considerado fisiológico (56, 114) e tem capacidade de reproduzir o regime arterial (115).

As CMLV de cada vaso estudado foram submetidas ao experimento de estiramento cíclico durante 24h e 48h. Cada experimento foi repetido duas vezes, em diferentes ocasiões, e com CMLV de diferentes animais, a fim de garantir reprodutibilidade dos resultados. Foi realizado o seguinte número de experimentos de OMTC válidos com 24h de estiramento / 48h de estiramento: 12 / 12, carótida; 12 / 9, femoral; 12 / 12, renal; 12 / 8, aorta abdominal; 12 / 8, aorta torácica e 12 / 8, coronária. Fez-se o mesmo número de experimentos com células de controle.

As CMLV da artéria mamária submetidas a estiramento por 24h mostraram-se menos rígidas em comparação aos controles estáticos ($p < 0,001$) (Figura 24, letra A). As CMLV dos outros vasos não alteraram significativamente o seu comportamento elástico após 24h de estiramento. Por outro lado, após 48h de estiramento, as CMLV de todos os vasos apresentaram-se menos rígidas em relação aos controles, sendo a magnitude da redução da variável G expressa após normalização do valor de G pós-

estiramento com o G controle (G de CMLV pós-estiramento/G médio dos poços de controle), semelhante para todos os vasos ($p = 0,67$) (Figura 24, letra B).

Uma vez demonstrado que o estiramento cíclico é regulador do fenótipo mecânico das CMLV, foi avaliado se as diferenças mecânicas inicialmente evidenciadas entre os leitos vasculares persistiam, depois de um curso de peristaltismo, o que representaria um modelo *in vitro* mais fisiológico. Para tal, a rigidez das CMLV de quatro vasos diferentes (femoral, renal, carótida, aorta torácica) foi comparada após 48h de estiramento cíclico. O experimento foi realizado, em um mesmo momento, para todos os vasos, viabilizando as comparações dos dados mecânicos entre eles. Identificou-se a persistência de diferenças mecânicas entre as CMLV dos vasos estudados ao fim de 48h de experimento ($p < 0,01$) (Figura 25). Tal achado reforça que a rigidez das CMLV é diferente de acordo com sua posição na árvore arterial. Não foram estudadas, nessa etapa, todas as artérias inclusas no estudo porque o equipamento de estiramento foi desenhado para experimento simultâneo de apenas quatro placas.

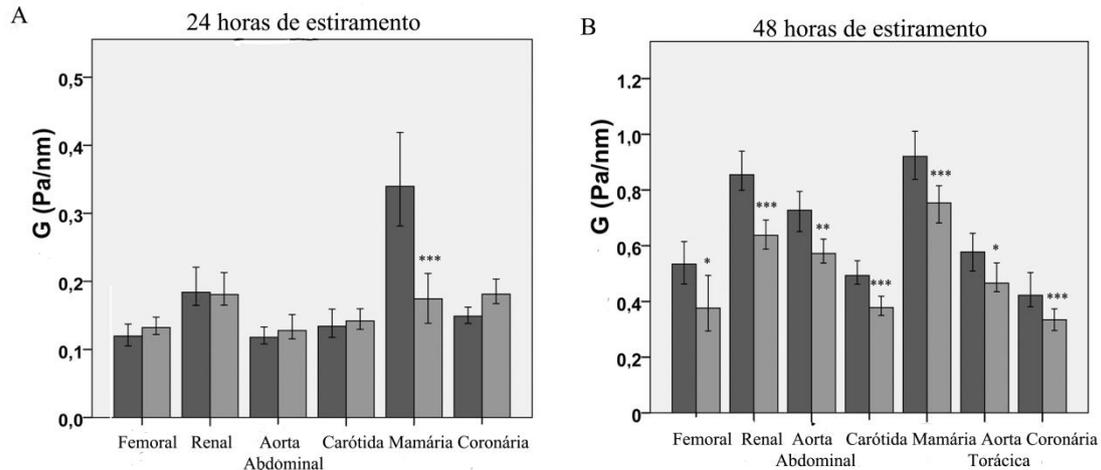


Figura 24. Modificação do comportamento mecânico das CMLV após estiramento cíclico. **A.** Depois de 24h de estiramento cíclico (10%/1Hz), apenas as CMLV da artéria mamária apresentaram-se menos rígidas em relação aos controles. **B.** Após 48h de estiramento cíclico (10%/1Hz), todas as CMLV tornaram-se menos rígidas em relação aos seus controles. Em ambos os gráficos (A e B), os valores de G não podem ser comparados entre os leitos arteriais, visto que as CMLV dos diferentes leitos vasculares foram avaliadas em experimentos diferentes, fato que sabidamente interfere nos resultados do experimento de OMTc. As colunas pretas representam mediana de G das CMLV-controle não estiradas e as colunas cinza, a mediana de G pós-estiramento. As barras representam o intervalo de Confiança 95%.

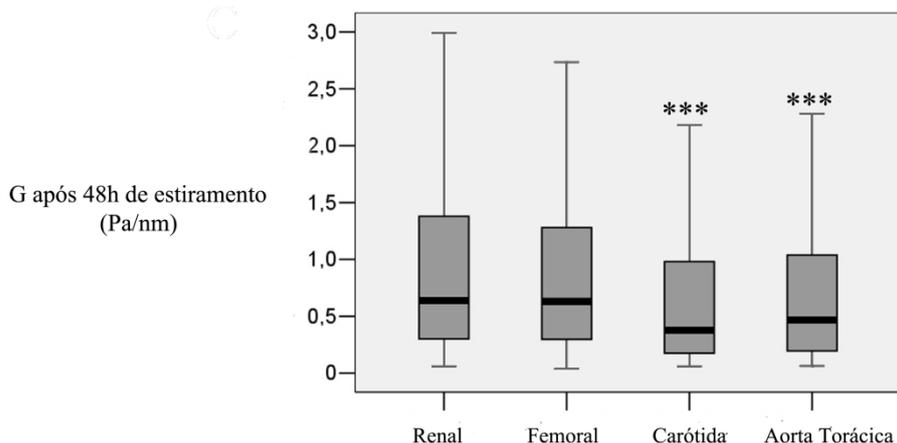


Figura 25. Persistência das diferenças regionais de rigidez de CMLV após 48h de estiramento cíclico. O gráfico mostra que a rigidez das CMLV das artérias carótida e aorta torácica continua significativamente menor que a apresentada pelas CMLV das artérias renal e femoral mesmo após 48h de estiramento cíclico. Os asteriscos marcam as comparações post-hoc das artérias em relação à artéria femoral. Esse achado reforça que a rigidez basal das CMLV varia de acordo com a sua posição na árvore arterial.

4.2.6 Comparação da expressão proteica entre CMLV com origem e comportamento mecânico diferentes usando a técnica de proteômica *Shotgun*

A expressão proteica das CMLV da aorta torácica e da artéria femoral, que apresentaram comportamentos mecânicos muito distintos, foi quantitativamente comparada usando a técnica de proteômica *Shotgun* (Figura 26). Essa metodologia foi escolhida com base na sua alta sensibilidade e reprodutibilidade para a avaliação da quantidade de proteínas em amostras biológicas e, no nosso caso, para a comparação de dois proteomas dinâmicos diferentes, bem como devido à sua elevada capacidade de processamento. Um total de 1.628 proteínas foram quantificadas e/ou identificadas, das quais 232 foram identificadas exclusivamente em CMLV de aorta; 168, em CMLV de artéria femoral e 1233, em ambos os grupos (Figura 26, letra A). As proteínas quantificadas foram submetidas à análise estatística, sendo constatado que 10 estavam superexpressas no grupo da aorta e 3, no grupo femoral ($p < 0,05$, Figura 26, letra C).

Com base em análise de enriquecimento, identificou-se que as CMLV da aorta expressaram quantidades significativamente maiores de proteínas relacionadas com os processos biológicos de contração e organização do citoesqueleto (Figura 26, a letra C). As proteínas envolvidas na rede biológica do citoesqueleto, principalmente na organização do citoesqueleto de α -actina, foram significativamente mais expressas em CMLV de aorta do que nas CMLV da artéria femoral. Na análise estatística, foram identificadas como proteínas diferenciais da aorta: proteína associada aos microtúbulos, α -actinina 4,

frutose-bisfosfatoaldolase A, vinculina (isoforma 2), α -actinina 2, actina de músculo liso, proteína do músculo liso 22- α , malatodesidrogenase, fosfogliceratomutase-1, e a proteína DJ-1. Dessas proteínas diferenciais, a actina se destaca por ser a mais importante do citoesqueleto estrutural, diretamente responsável pela capacidade de deformação e integridade celular.

O aumento na expressão de actina pelas CMLV da aorta foi acompanhado por um aumento também da expressão de proteínas envolvidas na organização das fibras de tensão de actina (α -actinina e vinculina isoforma2). Essas proteínas compõem as adesões focais, que têm um papel importante na determinação da mecânica das células por meio da organização espacial das fibras de α -actina e sua polimerização. Esses resultados sugerem que o maquinário proteico das CMLV da aorta é dedicado a atender a necessidade contínua de reorganização do citoesqueleto devido à fluidificação e ressolidificação cíclica do seu citoplasma celular.

As proteínas expressas em maiores quantidades pelas CMLV de artéria femoral estavam relacionadas com a rede de ciclo celular (síntese e metabolismo de nucleotídeos de bases purínicas, Anexo). Com base em nossa análise de ciclo celular, esse achado não significa que as CMLV da artéria femoral proliferam mais que as CMLV da aorta, mas talvez isso reflita que os diferentes níveis de proteínas são necessários para atingir uma taxa semelhante de replicação em diferentes ambientes, como observado anteriormente (116). No Anexo A estão dispostas as listas das proteínas superexpressas tanto em CMLV de aorta quanto em CMLV de artéria femoral, bem como os gráficos comparando a expressão proteica desses dois segmentos por processos e redes.

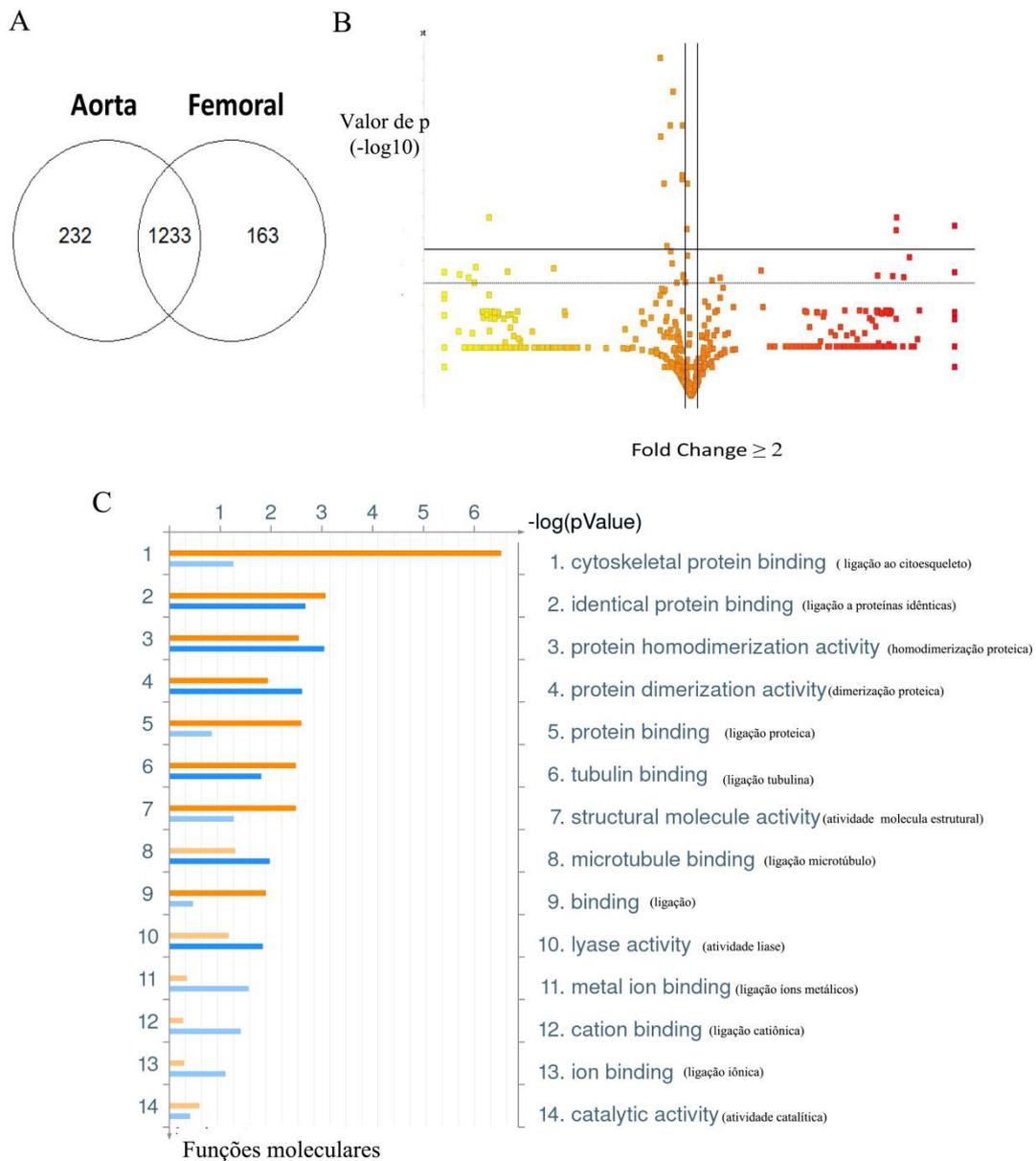


Figura 26. Comparação de expressão proteica entre CMLV de aorta e de artéria femoral (proteômica shotgun) **A.** Um total de 1.628 proteínas foram identificadas/quantificadas (232 exclusivamente nas CMLV de aorta e 168, exclusivamente nas CMLV de artéria femoral). **B.** 10 proteínas foram superexpressas nas CMLV de aorta e estavam principalmente relacionadas com a estrutura e a organização do citoesqueleto ($p < 0,05$). **C.** Comparação de expressão proteica entre CMLV da aorta e femoral por função molecular. O tamanho das barras representa a quantidade dessas proteínas (barras laranja: CMLV de aorta, barras azuis: CMLV de artéria femoral). A quantidade de proteínas relacionadas com a organização do citoesqueleto expressas pelas CMLV de aorta foi notavelmente superior em relação à expressa pelas CMLV de artéria femoral ($p < 0,05$). Esse resultado é consistente com o comportamento mecânico dicotômico das CMLV desses dois territórios.

4.3 Resultados Fase 3

- **Descrição da amostra populacional estudada**

Aceitaram participar do estudo 148 pacientes com diagnóstico de insuficiência coronariana crônica a serem submetidos à cirurgia de revascularização do miocárdio. De todos os pacientes inclusos, foi possível o isolamento de CMLV e a realização do experimento de OMTC, em segunda passagem celular, em 80 indivíduos. Dos outros pacientes recrutados, 67 não puderam ser avaliados por problemas técnicos referentes à cultura de células (contaminação bacteriana ou fúngica, falha no isolamento de CMLV, fragmento de artéria mamária insuficiente para a realização da técnica de explante primário, amostra fora dos padrões morfológicos de qualidade durante o experimento de OMTC) ou por impossibilidade de coleta de amostra sanguínea para extração de DNA, e um paciente foi excluído por ser de raça amarela.

A população estudada era composta majoritariamente por homens (72,5%) e exibia predomínio de ancestralidade europeia, conforme ilustrado na Figura 27. Com relação às outras variáveis de interesse para o estudo, 57% dos pacientes foram classificados como tabagistas e 52,5% tinham o diagnóstico de diabetes mellitus. A prevalência de hipertensão arterial sistêmica foi de 100%, com a ressalva de que, em seis casos, este dado não pode ser confirmado, mesmo após contato telefônico. Todas as mulheres inclusas no estudo estavam em período pós-menopausa. O resumo dos dados epidemiológicos da amostra populacional está exposto na Tabela 2.

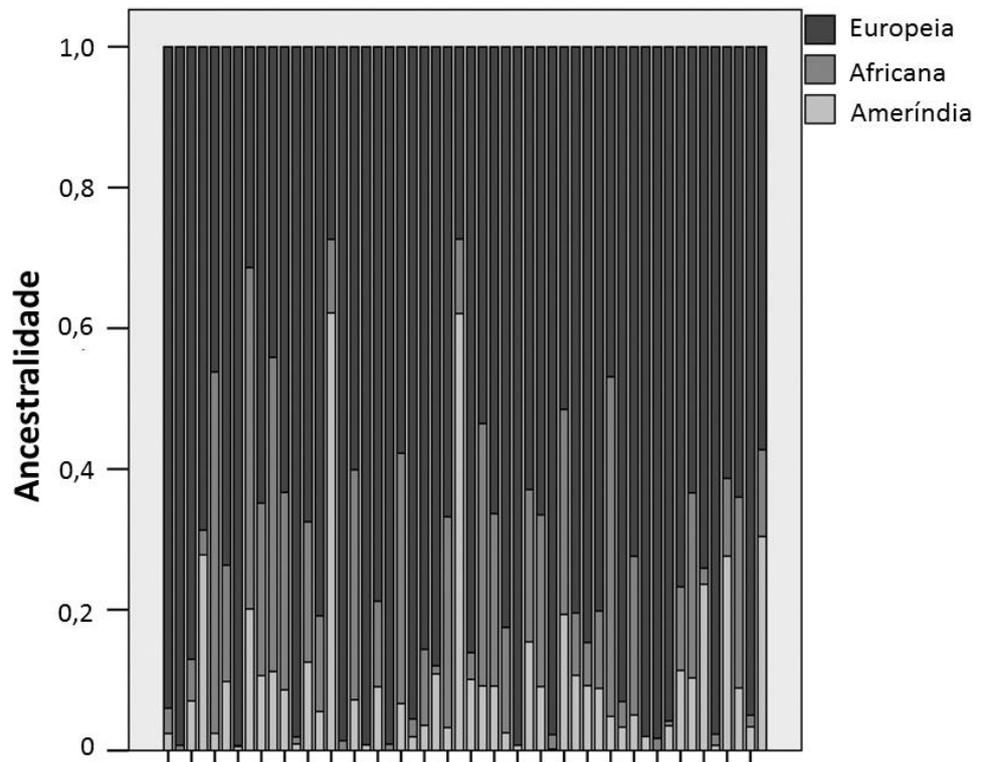


Figura 27. Dispersão da ancestralidade racial da população estudada. Os números na barra da ordenada representam a proporção de contribuição para a ancestralidade racial, variando entre zero e um. O gráfico demonstra que houve predomínio de ancestralidade Europeia (barras cinza-escuro) em relação à ancestralidade Africana (barras cinza de tom intermediário) e Ameríndia (barras cinza-claro).

Tabela 2- Principais características clínicas dos pacientes incluídos no estudo

Número amostral	80
Insuficiência coronariana crônica	80 (100%)
Sexo (feminino/masculino)	22 (27,5%) / 58 (72,5%)
Idade (anos / média \pm DP)	63,6 \pm 9,6
Ancestralidade (média \pm DP)	
Européia	0,75 \pm 0,2
Africana	0,15 \pm 0,14
Ameríndia	0,1 \pm 0,1
Diabetes Mellitus (sim/não)	42 (52,5%) / 38 (47,5%)
Tabagismo (sim/não)*	41 (57%) / 31 (43%)
Hipertensão (sim/não)*	74 (100%)
Dislipidemia (sim/não)*	64 (90%) / 7 (10%)
Insuficiência renal crônica (sim/não)	8 (10%) / 72 (90%)
Síndrome coronariana aguda (sim/não)	55 (68,7%) / 25 (31,3%)
Angina estável sintomática (sim/não)*	38 (50,7%) / 37 (49,3%)
Doença pulmonar obstrutiva crônica (sim/não)	2 (2,5%) / 78 (97,5%)

* Nessas variáveis, a soma total de pacientes é inferior a 80 devido à perda de dados. A porcentagem apresentada compreende apenas os casos válidos.

- **Avaliação da influência das variáveis clínicas estudadas sobre as medidas quantitativas de mecânica celular**

Para cada paciente incluso no estudo, foram realizadas seis replicatas biológicas do experimento de OMTC, sendo a mediana dos valores de G , G'' e G' utilizada para as análises estatísticas. Após a correção para os diferentes lotes de grânulos magnéticos usados nos experimentos, os resíduos não normalizados de G , G'' e G' (denominados G_r , G''_r e G'_r) foram calculados e mostraram ter distribuição normal de acordo com o teste de Kolmogorov-Smirnov ($p=0,2$, $p=0,2$ e $p=0,09$, respectivamente). A análise dos gráficos de dispersão das variáveis mecânicas aferidas demonstra a existência de variabilidade interindividual das propriedades viscoelásticas das CMLV, fato nunca reportado anteriormente. A Figura 28 mostra a variabilidade de distribuição da viscoelasticidade celular (G_r) com seus componentes dissipativo (G''_r) e elástico (G'_r).

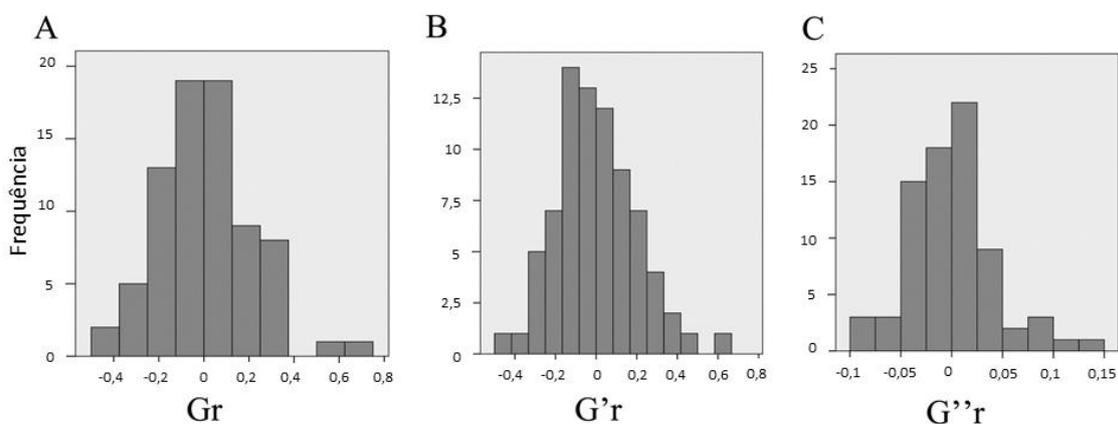


Figura 28. Histogramas representando a distribuição das variáveis mecânicas definidoras da viscoelasticidade das CMLV na população estudada. Os gráficos mostram que a rigidez aparente da célula (Gráfico A, variável Gr), com os seus componentes elástico (Gráfico B, variável G'r) e dissipativo (Gráfico C, variável G''r) exibem distribuição normal na amostra populacional (Kolmogorov-Smirnov: $p=0,2$; $p=0,2$ e $p=0,09$, respectivamente), destacando que existe variabilidade interindividual desse traço biológico.

As variáveis Gr e G'r diferiram significativamente entre os pacientes de sexo feminino e masculino ($p=0,04$ e $0,04$, respectivamente) e entre os tabagistas e não tabagistas ($p=0,02$ e $0,01$, respectivamente) na análise estatística univariada. Usando esse mesmo tipo de análise, as outras variáveis clínicas de interesse (diabetes mellitus, ancestralidade africana e idade) não estiveram associadas com alterações significativas das variáveis mecânicas. Nenhuma das possíveis variáveis de confusão (hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia, insuficiência renal crônica e doença pulmonar obstrutiva crônica)

esteve significativamente associada a modificações das propriedades mecânicas avaliadas. Como o p valor encontrado nessa situação foi superior a 0,2 para todas as variáveis de confusão, elas não foram incluídas na análise estatística multivariada.

A análise multivariada foi realizada incluindo como variáveis dependentes: G_r , G''_r e G'_r e como variáveis independentes: idade, gênero, ancestralidade africana, diabetes mellitus e tabagismo (Tabela 3). O modelo obtido confirmou o sexo feminino como preditor de aumento de G_r ($p=0,02$), G'_r ($p=0,02$) e G''_r ($p=0,01$) e o tabagismo como preditor de aumento de G_r ($p=0,02$) e G'_r ($p=0,01$) (Tabela 3). Esse resultado demonstra a influência tanto das condições fisiológicas associadas ao sexo feminino pós-menopausa quanto do tabagismo sobre o aumento da viscoelasticidade de CMLV (G_r), principalmente por incremento em seu componente elástico (G'_r), que reflete a rigidez celular (Figura 29, letras A e B). O sexo feminino também foi associado, em menores proporções, ao aumento no módulo dissipativo de G_r (G''_r), que representa a viscosidade do citoplasma (Figura 29, letra A). As outras variáveis clínicas de interesse (diabetes mellitus, ancestralidade africana e idade) não se associaram significativamente com nenhuma das variáveis mecânicas estudadas (Tabela 3).

Tabela 3- Modelo estatístico resultante da análise multivariada utilizada para avaliação do potencial das variáveis clínicas estudadas em modular a viscoelasticidade das CMLV

Gr	Coeficientes Não normalizados		
Modelo	β	Erro Padrão	<i>p</i>
Constante	-0,028	0,226	
Sexo (1-Masculino / 2-Feminino)	0,125	0,053	0,022
Tabagismo (1-Sim / 2-Não)	-0,114	0,047	0,018
Idade (anos)	0	0,003	0,933
Ancestralidade Africana (intervalo: 0-1)	0,092	0,208	0,661
Diabetes Mellitus (1-Sim / 2-Não)	-0,008	0,047	0,859
R2=0,164 (p=0,042)			
G'r	Coeficientes Não normalizados		
Modelo	β	Erro Padrão	<i>p</i>
Constante	-0,089	0,211	
Sexo (1-Masculino / 2-Feminino)	0,12	0,05	0,019
Tabagismo (1-Sim / 2-Não)	-0,119	0,044	0,009
Idade (anos)	0,001	0,002	0,823
Ancestralidade Africana (intervalo: 0-1)	0,1	0,194	0,608
Diabetes Mellitus (1-Sim / 2-Não)	0,004	0,044	0,934
R2=0,183 (p=0,023)			
G''r	Coeficientes Não normalizados		
Modelo	β	Erro Padrão	<i>p</i>
Constante	-0,009	0,047	
Sexo (1-Masculino / 2-Feminino)	0,29	0,11	0,011
Tabagismo (1-Sim / 2-Não)	-0,018	0,01	0,066
Idade (anos)	0	0,01	0,859
Ancestralidade Africana (intervalo: 0-1)	0,012	0,04	0,766
Diabetes Mellitus (1-Sim / 2-Não)	0,001	0,01	0,901
R2=0,141 (p=0,082)			

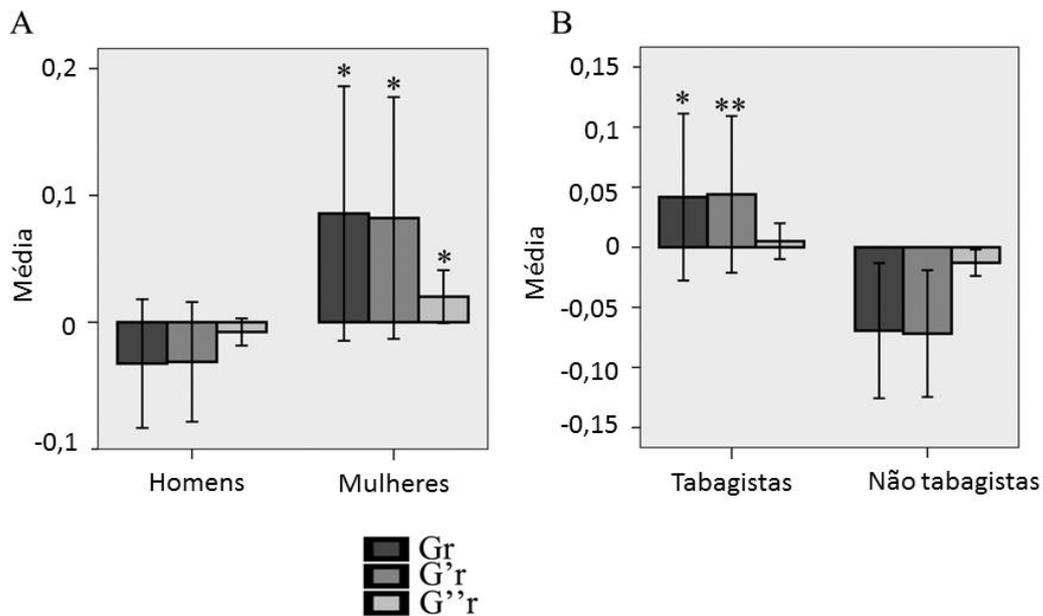


Figura 29. Comparação das propriedades mecânicas das CMLV entre mulheres e homens / tabagistas e não tabagistas. A. Gráfico exibindo as diferenças entre as variáveis mecânicas de CMLV (G_r , G'_r , G''_r) de mulheres e homens. As mulheres apresentam maior rigidez aparente de CMLV (G_r) em comparação aos homens, principalmente por aumento do módulo elástico (G'_r). B. De forma análoga ao observado em mulheres, os tabagistas apresentaram rigidez aparente de CMLV (G_r) maior do que não tabagistas, principalmente por aumento do módulo elástico (G'_r). As barras de erro representam o intervalo de confiança de 95% e suas dimensões são compatíveis com análise por poço dos experimentos de OMTc.

O modelo estatístico resultante da análise multivariada apresentou um R^2 de 0,16 ($p=0,04$) para G_r , 0,18 ($p=0,02$) para G'_r e 0,14 ($p=0,08$) para G''_r . Esse dado demonstra que a variabilidade interindividual observada para a viscoelasticidade de CMLV é minoritariamente determinada pelas variáveis clínicas estudadas, sendo provavelmente dependente de outros moduladores.

5. Discussão

5.1 Modificações das propriedades mecânicas das CMLV durante cultivo *in vitro*

Os resultados da primeira fase deste estudo evidenciam que as CMLV modificam suas propriedades mecânicas com o avanço do tempo de cultura *in vitro*, reduzindo progressivamente a rigidez do citoplasma e aumentando a histerese celular. A permanência prolongada das CMLV *in vitro* foi associada também a modificações no citoesqueleto de α -actina, ao aumento na taxa de proliferação celular e à redução na secreção de colágeno tipo I. A última observação pode representar um prejuízo adquirido à capacidade das CMLV em secretar MEC ou ser reflexo do aumento da taxa de proliferação celular, uma vez que o tempo de permanência em cada subcultivo é progressivamente menor.

Os efeitos deletérios do cultivo *in vitro* prolongado sobre o fenótipo de culturas primárias já foram descritos para uma grande variedade de células diferenciadas, especialmente para os condrócitos e os cardiomiócitos (117, 118). Os estudos em condrócitos mostram que a expansão celular *in vitro* está associada à transformação do fenótipo cartilaginoso em um fenótipo fibroblasto-símile, pouco diferenciado (119). De forma similar, os cardiomiócitos sofrem desdiferenciação quando submetidos a períodos prolongados de cultivo *in vitro*, evoluindo com perda de sua morfologia característica, bem como de suas propriedades eletrofisiológicas (118). Apesar de não serem células terminalmente diferenciadas, linhagens de células cancerígenas e de células-tronco mesenquimais também modificam significativamente seu comportamento biológico em subcultivos avançados (120, 121).

O cultivo *in vitro* de CMLV sabidamente cursa com progressiva perda do fenótipo contrátil associada ao aparecimento de fenótipo secretor, especialmente quando há acréscimo de soro fetal ao meio de cultura (122). Além de múltiplas modificações de morfologia e de resposta a drogas que as CMLV exibem durante o cultivo *in vitro* (123, 124), observa-se também redução na expressão do gene de α -actina, que se reflete em menores concentrações dessa proteína estrutural no citoplasma (125). Estudos prévios descrevem que a síntese de α -actina decai rapidamente nos primeiros dias de cultivo *in vitro* de CMLV, volta a aumentar até o estágio de confluência celular e, após essa fase, permanece baixa indefinidamente (125-128). Apesar de a α -actina ter sido o principal alvo desses estudos, é plausível que outras proteínas estruturais do citoesqueleto também sofram modificações após múltiplas expansões de cultura celular (129). Ainda que as variações de expressão de α -actina durante o cultivo *in vitro* de CMLV já tenham sido descritas, as modificações das propriedades mecânicas dessas células associadas a essa situação nunca tinham sido documentadas até o presente estudo.

Os resultados apresentados mostram que as CMLV modificam progressivamente seu comportamento mecânico durante o cultivo *in vitro*. A progressiva redução de rigidez de citoplasma observada com o aumento dos subcultivos é provavelmente o resultado final de modificações significativas na organização de citoesqueleto, principalmente envolvendo a α -actina. O aumento da histerese celular detectado em paralelo à perda de rigidez citoplasmática, por sua vez, pode refletir um aumento de líquido no citoplasma secundário à redução da quantidade de α -actina polimerizada (F-actina).

Ambas as alterações mecânicas encontradas provavelmente são parte do processo de desdiferenciação celular que células terminalmente diferenciadas sofrem quando cultivadas *in vitro* por períodos prolongados. De acordo com essa hipótese, as CMLV passariam, com o avanço dos subcultivos, de um fenótipo contrátil, com plena expressão das proteínas contráteis de músculo liso, para um fenótipo menos diferenciado, em que a taxa de proliferação celular é maior e a densidade do citoesqueleto de α -actina, menor.

Ainda que células de cultura primária possam sofrer senescência após múltiplos subcultivos *in vitro*, essa hipótese não sustenta os resultados apresentados (130). Somente uma pequena porcentagem de células senescentes é normalmente identificada em culturas primárias e os resultados apresentados mostram um aumento da taxa de proliferação celular, ao longo das passagens, achado condizente com desdiferenciação e não com senescência celular. Uma hipótese alternativa para nossos achados é a de que, a cada novo subcultivo, sejam selecionados clones de CMLV menos diferenciados e com maior capacidade proliferativa.

Existe descrição prévia das modificações da mecânica de células endoteliais quando cultivadas *in vitro*, porém somente após curto período de tempo de acompanhamento, em que se observou aumento de rigidez celular (131, 132). Considerando-se que características fenotípicas das células endoteliais são muito distintas das apresentadas pelas CMLV, especialmente quanto à organização de citoesqueleto no status totalmente diferenciado, provavelmente o processo de desdiferenciação atua de forma diferente nestes dois tipos celulares, justificando a disparidade dos dados encontrados.

A constatação de que as propriedades mecânicas das CMLV são modificadas com o cultivo prolongado *in vitro* certamente representa uma limitação para a extrapolação dos achados encontrados experimentalmente para o cenário vascular. A fim de limitar esse viés, medidas quantitativas da mecânica das CMLV só podem ser realizadas em culturas celulares com baixo número de subcultivos (passagens), visto que as modificações de citoesqueleto que se acumulam após esse período distanciam cada vez mais o fenótipo estudado daquele apresentado pelas CMLV *in vivo*. De forma análoga, as comparações mecânicas entre CMLV de diversos indivíduos, leitos vasculares diferentes ou provenientes de condições experimentais distintas só podem ser realizadas se for garantido o mesmo tempo de cultivo *in vitro* para todas as culturas avaliadas.

5.2 Heterogeneidade das propriedades mecânicas e de expressão proteica das CMLV oriundas de leitos arteriais distintos

Os resultados da segunda fase deste estudo mostram que as CMLV de diversos leitos arteriais diferem quanto ao fenótipo mecânico: CMLV da aorta torácica, vaso mais próximo ao coração, são significativamente menos rígidas do que as CMLV das artérias renal e femoral, vasos mais distantes do coração. A rigidez de citoplasma apresentada por CMLV correlacionou-se negativamente com a quantidade de elastina da camada média vascular e com a quantidade total de MEC circundando as CMLV, sugerindo um modulador

comum para essas variáveis ou uma influência da MEC sobre o comportamento mecânico das CMLV. O estiramento cíclico das CMLV (simulando o regime de grandes artérias elásticas) levou à redução homogênea da rigidez citoplasmática, demonstrando que as forças mecânicas regionais influenciam as propriedades mecânicas das CMLV, independentemente da MEC, e que parte das diferenças interarteriais de fenótipo mecânico podem ser devidas à intensidade de deformação cíclica da parede vascular, que difere conforme o vaso.

A quantidade de proteínas de citoesqueleto expressas em CMLV com comportamento complacente (aorta torácica) foi significativamente superior àquela expressa em CMLV rígidas (artéria femoral), que, por sua vez, expressaram mais proteínas envolvidas com o processo de ciclo celular. A avaliação das adesões focais e da morfologia das CMLV com comportamento mecânico e expressão proteica díspares mostrou que a organização do citoesqueleto era significativamente diferente entre elas, confirmando que uma maior quantidade de proteínas estruturais de citoesqueleto no citoplasma não traduz maior rigidez celular. A diferença de expressão proteica entre as CMLV provenientes da aorta torácica e da femoral, provavelmente, reflete as diferenças regionais de forças mecânicas e de composição da MEC, que influenciam a organização do citoesqueleto.

Os resultados apresentados confirmam, pela primeira vez, a heterogeneidade da mecânica da CMLV ao longo da árvore arterial, usando medidas diretas de rigidez citoplasmática e de avaliação global de expressão proteica, além de apontar as forças mecânicas regionais e a composição da

MEC como possíveis moduladores desse fenótipo específico. Estudos prévios desenhados para a avaliação de heterogeneidade das CML de diferentes origens focaram-se na comparação entre CMLV e CML viscerais (133) ou entre CMLV de artérias e veias (51). O objeto escolhido nessas comparações foi a expressão de genes de proteínas contráteis de músculo liso e de seus fatores de transcrição, não sendo feita avaliação quantitativa das propriedades mecânicas celulares.

A constatação de que as CMLV são mecanicamente diferentes ao longo da árvore arterial é muito relevante, visto que contraria a rotulagem indiscriminada e simplista do comportamento das CMLV como “secretor” ou “contrátil”, tanto em situações fisiológicas quanto em situações patológicas. As CMLV de diferentes vasos sintetizam a MEC de forma heterogênea, tanto qualitativa quanto quantitativamente, a depender das condições de fluxo sanguíneo regional durante a fase de desenvolvimento arterial (14). Após esse período, as CMLV classicamente assumem um fenótipo denominado “contrátil”, quiescente do ponto de vista de secreção de MEC e com baixa taxa de proliferação (30). Tendo em vista que a mecânica das CMLV é consideravelmente variável entre os diferentes leitos arteriais, a classificação uniforme do fenótipo dessas células como “contrátil” não parece correta. Da mesma forma, o conceito de modulação fenotípica, comumente utilizado para designar a mudança do fenótipo das CMLV em situações patológicas (30), deve ser utilizado com cautela, uma vez que não leva em consideração a heterogeneidade interarterial da mecânica das CMLV e, conseqüentemente, não prevê as variações desse processo ao longo da árvore vascular.

A origem embrionária dos vasos é sempre apontada como um dos fatores responsáveis pela diversidade fenotípica das CMLV, visto que as células de vasos com diferentes origens embrionárias diferem em termos de morfologia, capacidade proliferativa e resposta a fatores de crescimento (19). As diferenças na mecânica das CMLV, como demonstradas nos resultados desta dissertação, podem estar relacionadas à origem embrionária vascular: a aorta torácica e a artéria mamária, cujas CMLV são mais complacentes, são derivadas do mesoderma paraxial e da crista neural cranial, enquanto que a aorta abdominal e seus ramos, cujas CMLV apresentaram-se mais rígidas, são derivados do mesoderma esplâncnico. Entretanto, os resultados mostram que a MEC e o estresse circunferencial aplicado pelo fluxo sanguíneo nas paredes vasculares também modulam o fenótipo mecânico das CMLV. Sendo assim, embora haja influência da origem embrionária das CMLV sobre sua mecânica, ela não é a única determinante da variabilidade interarterial desse fenótipo.

Observou-se correlação clara entre a rigidez das CMLV e a quantidade / composição da MEC na camada média vascular. Constatou-se correlação negativa entre a quantidade de MEC e rigidez celular, sendo a aorta torácica o vaso com a maior quantidade de MEC circundando as CMLV, as quais se apresentaram menos rígidas. A redução progressiva na quantidade de elastina na camada média vascular com o afastamento das artérias do coração foi acompanhada por aumento da rigidez das CMLV na mesma direção. Uma hipótese plausível é que o fenótipo mecânico das CMLV possa ser influenciado pela MEC. Estudos prévios já demonstraram que a elasticidade e a espessura da MEC sabidamente influenciam a organização do citoesqueleto e a mecânica

celular: a MEC rígida leva à formação de adesões focais maiores e mais estáveis, enquanto que a MEC complacente leva à formação de adesões focais transitórias (110). A análise ultraestrutural das CMLV realizada neste estudo vai ao encontro dessas observações prévias, visto que as células da aorta torácica (maior quantidade de elastina circundante) exibiram adesões focais menores em comparação às células da artéria femoral (menor quantidade de elastina circundante). Com relação à composição da MEC, a presença de elastina já foi associada à maior organização do citoesqueleto celular e menor taxa de proliferação celular (134). Entretanto, neste estudo, não foram encontradas diferenças significativas em termos de orientação de fibras de α -actina ou de taxa de proliferação entre CMLV de territórios arteriais com diferentes quantidades de integrina na MEC. Apesar das evidências de que a composição da MEC influencia a mecânica celular, uma explicação alternativa para nossos achados é a de que, como as CMLV secretam MEC durante a fase de desenvolvimento arterial, a correlação entre composição / quantidade de MEC e as propriedades mecânicas das CMLV pode ser reflexo de um modulador comum a ambos os parâmetros.

O estiramento axial cíclico prolongado das CMLV levou à modificação das suas propriedades mecânicas, tornando-as mais complacentes, independentemente do leito arterial de origem. As condições do experimento refletiam o estiramento a que as CMLV de grandes vasos elásticos, mais especificamente da aorta, são submetidas em situações fisiológicas (115). Esse resultado demonstra que a tensão circunferencial aplicada sobre a parede vascular pela circulação pulsátil é capaz de modular o fenótipo mecânico das

CMLV. Apesar de as CMLV de vasos periféricos exibirem maior rigidez de citoplasma em relação às da aorta torácica, quando submetidas ao estiramento cíclico, simulando o regime da aorta, ocorreu redução da complacência celular. Portanto, a tensão circunferencial pode ser considerada um dos determinantes da heterogeneidade interarterial das propriedades mecânicas das CMLV.

Os resultados apresentados são os primeiros a demonstrar modificações quantitativas de elasticidade de CMLV após o estiramento cíclico prolongado. O estiramento cíclico sabidamente ativa várias vias de sinalização das CML (GTPase Rac, proteína quinase A, proteína quinase e proteína quinase ativada pelo mitógeno p38) (135, 136) e intensifica tanto a síntese de MEC (57) quanto a expressão de proteínas contráteis de músculo liso (57). Ele pode levar à reorientação das fibras de tensão de α -actina, a depender do tipo celular, das características do substrato e da intensidade de deformação (137), além de ter a capacidade de modificar o comportamento proliferativo das CMLV (56). A maioria dos estudos envolvendo estiramento cíclico e citoesqueleto celular avaliaram somente a organização final das fibras de tensão após o término dos ciclos de estiramento (138, 139). Entretanto, o processo de adaptação do citoesqueleto ao estiramento é muito dinâmico e não pode ser fidedignamente representado apenas pela figura final da organização de suas fibras de tensão, visto que a fim de adaptar o citoplasma às deformações cíclicas, as CMLV polimerizam e despolimerizam as fibras de α -actina, bem como aumentam e reduzem as adesões focais (110). A avaliação da viscoelasticidade das CMLV pré e pós-estiramento parece contemplar melhor a adaptação celular a esse tipo de deformação mecânica.

A análise de proteômica realizada em CMLV com comportamentos mecânicos distintos (aorta torácica e femoral) claramente demonstrou que essas células diferem em termos de expressão de proteínas envolvidas nos processos de contração muscular e organização de citoesqueleto. As CMLV da aorta torácica expressaram uma quantidade significativamente maior de proteínas de citoesqueleto, tanto estruturais (α -actina) quanto componentes das adesões focais (vinculina, α -actinina). Por outro lado, as CMLV da artéria femoral expressaram mais proteínas envolvidas na rede de ciclo celular. Como apresentado anteriormente, as CMLV da aorta torácica apresentaram-se mais complacentes do que as CMLV de artéria femoral e, em análise ultraestrutural, as células da aorta torácica exibiram adesões focais de membrana significativamente menores. Tanto as células de aorta torácica quanto as de artéria femoral apresentaram-se distribuídas de forma similar em cada estágio do ciclo celular. O senso comum levaria à interpretação de que as CMLV com maior quantidade de proteínas de citoesqueleto teriam um citoplasma mais rígido, enquanto que as CMLV com maior quantidade de proteínas de ciclo celular proliferariam mais. Nos resultados apresentados, esse tipo de extrapolação provou ser errôneo e evidenciou que o estudo cauteloso da fisiologia celular antes da interpretação de qualquer dado de proteômica é essencial para evitar conclusões incorretas.

A organização das fibras de tensão de α -actina é altamente dinâmica e envolve a participação de uma ampla gama de proteínas ligadoras de α -actina e de proteínas associadas às adesões focais, que regulam a polimerização e a estabilidade das fibras de tensão e permitem que as CMLV se adaptem a

diferentes forças mecânicas (112). Embora a quantidade de α -actina seja mantida constante, a rigidez do citoplasma pode ser modificada em virtude de mudanças nas taxas de polimerização de fibras de tensão (140) e no tamanho das adesões focais (110, 141), ambos modulados por forças mecânicas. Esse conceito foi reforçado pelos resultados apresentados, em que as CMLV da aorta apresentaram-se menos rígidas do que as CMLV de artéria femoral e exibiram menores adesões focais. Ainda que não tenham sido identificadas diferenças envolvendo o alinhamento das fibras de tensão entre as CMLV desses dois leitos vasculares, elas diferiram com relação à sua forma, que indiretamente reflete a organização do citoesqueleto.

Segundo observações prévias de Trepap et al (142) e Chen et al (143), a resposta celular ao estiramento é a fluidificação do citoplasma. A aorta torácica é o vaso cujas paredes sofrem deformidade cíclica mais intensa, resultante da força mecânica imposta pelo fluxo sanguíneo na sístole cardíaca. Como consequência, as CMLV desse leito arterial sofrem fluidificação de citoplasma durante a sístole e re-solidificação deste durante a diástole. A adaptação rápida e efetiva do citoesqueleto depende da organização dos filamentos de α -actina, principalmente, por meio da plasticidade das adesões focais e da ação de múltiplas proteínas de ligação à α -actina, permitindo que as CMLV respondam adequadamente às deformações cíclicas da MEC decorrentes da tensão circunferencial aplicada. Acredita-se que isso justifique a maior expressão de proteínas de organização do citoesqueleto apresentada pelas CMLV de aorta em comparação às CMLV de artérias periféricas, onde esse processo de deformação cíclica é menos intenso.

Finalmente, a contribuição da rigidez de CMLV para as propriedades mecânicas finais de qualquer vaso sempre foi considerada como insignificante (144). Esse conceito começou a mudar recentemente, visto que surgiram evidências: de que a rigidez arterial senil se deve, em parte, ao enrijecimento de CMLV (64); de que a remoção seletiva da túnica média vascular pode alterar a morfologia vascular (145) e de que mutações no gene da miosina de cadeia pesada (MYH11) reduzem a contratilidade da aorta por mudanças no citoesqueleto celular (65). Nos experimentos apresentados, a rigidez das CMLV mostrou-se consistente com descrições prévias de complacência e elasticidade de MEC dos respectivos leitos arteriais de origem. Sendo assim, o citoplasma mais rígido foi observado em CMLV de vasos menos complacentes e com menor quantidade de elastina na MEC, e vice-versa. Entretanto, não foi possível estabelecer uma relação causal, visto que esse tópico não foi diretamente contemplado nos objetivos do estudo.

5.3 Variabilidade interindividual da mecânica das CMLV e seu enrijecimento em tabagistas e mulheres pós-menopausa

Os resultados da terceira fase deste estudo demonstram, pela primeira vez, que existe variabilidade interindividual da viscoelasticidade das CMLV e que há associação entre tabagismo e sexo feminino com o seu enrijecimento. O efeito pró-enrijecimento observado em associação a essas variáveis clínicas representa um elemento importante para a compreensão da rigidez vascular observada em mulheres pós-menopausa e em pacientes tabagistas, uma vez

que modificações significativas, tanto na MEC quanto nas CMLV, nunca foram descritas em associação a tais condições (70, 78). O enrijecimento das CMLV foi detectado na ausência de estímulo endotelial, fato especialmente relevante no caso do tabagismo, em que a rigidez arterial sempre esteve unicamente relacionada à disfunção de células endoteliais (146).

O enrijecimento de CMLV foi recentemente apontado como um fator importante na fisiopatogenia da rigidez arterial, contrariando o conceito vigente de que a redução de complacência de grandes vasos se devia majoritariamente a modificações na MEC (1). Existem duas situações experimentais em que o enrijecimento de CMLV foi associado ao aumento do tônus vascular: hipertensão arterial e rigidez arterial senil. Na primeira situação, foi demonstrado que as CMLV de ratos espontaneamente hipertensos eram mais rígidas em comparação com os controles não hipertensos, usando microscopia de força atômica para a avaliação da rigidez celular e modelos de aorta revestidos por CMLV para a demonstração do impacto da rigidez das CMLV na mecânica vascular (66). Na segunda situação, as CMLV de símios idosos com rigidez arterial se mostraram mais rígidas do que as CMLV de símios jovens sem rigidez de aorta, usando a mesma metodologia descrita para o estudo anterior (64). Em ambos os estudos, a MEC foi avaliada e não foram identificadas anormalidades.

Este estudo é o primeiro a avaliar a viscoelasticidade de CMLV humanas primárias e a correlacionar o referido fenótipo com cinco fatores associados à rigidez arterial (idade, gênero, raça, diabetes mellitus e tabagismo). Os resultados encontrados mostram que tabagismo e sexo

feminino são preditores independentes de enrijecimento de CMLV. Trata-se da primeira descrição de uma anormalidade vascular significativa associada ao tabagismo e ao sexo feminino pós-menopausa, uma vez que a literatura carece de estudos demonstrando modificações significativas na MEC e nas CMLV nessas situações. É difícil quantificar a contribuição relativa da mecânica das CMLV e da composição da MEC para o fenótipo vascular final desses pacientes. Entretanto, os resultados sugerem que a viscoelasticidade das CMLV é ao menos um fator que contribui para o enrijecimento vascular associado a essas duas variáveis.

Mulheres pós-menopausa exibem maior rigidez aórtica e menor complacência vascular global em relação aos homens (78), situação que tem impacto significativo na mortalidade por causas cardiovasculares desse grupo (147) e que se associa provavelmente aos baixos níveis de estrógeno (148-150). Ainda que alguns autores argumentem que um menor diâmetro da raiz da aorta é responsável pelo aumento de pressão de pulso e de VOP observado em mulheres (79), existem fortes evidências demonstrando que a composição da parede arterial é o principal fator responsável por esse achado (78). As diferenças de composição da MEC e/ou de comportamento biológico das CMLV entre homens e mulheres nunca foram antes avaliadas. O fato de as CMLV de mulheres serem mais rígidas do que as de homens, independentemente de outras variáveis clínicas de confusão (idade, raça, tabagismo, diabetes, hipertensão e dislipidemia), representa a primeira evidência de que existem diferenças de estrutura vascular intergênero. Esse

achado também representa um potencial alvo terapêutico a ser estudado no futuro.

O tabagismo também é um fator de risco importante para a rigidez arterial (151, 152), estando associado à redução de complacência de grandes vasos que é apenas parcialmente reversível com o fim da exposição (94). A disfunção vasomotora observada em tabagistas sempre esteve associada à lesão de endotélio secundária ao estresse oxidativo e inflamatório deflagrado pela fumaça do cigarro (146, 153). A redução de complacência vascular era considerada como uma resposta fisiológica das CMLV aos estímulos do endotélio disfuncional (146). O presente estudo mostra que as CMLV de tabagistas são mais rígidas do que as de não tabagistas, independentemente da presença do endotélio, sugerindo uma ação direta da exposição sobre a mecânica das CMLV ou o cenário final de modificações crônicas celulares inicialmente deflagradas pelo endotélio disfuncional ou por modificações da MEC. Existe descrição prévia da associação entre tabagismo e modificações crônicas no citoesqueleto celular, sendo estas secundárias ao aumento da produção de PDGF pelas CMLV (154). Entretanto, de forma análoga ao que foi descrito para as mulheres, existem poucos estudos de qualidade que avaliam modificações de MEC e de fenótipo de CMLV pelo tabaco (155). O achado de que a mecânica de CMLV é afetada pelo tabagismo ajuda a explicar sua associação à rigidez arterial.

O achado de que as CMLV de mulheres e tabagistas apresentam maior rigidez de citoplasma tem importância que transcende a fisiologia, visto que representa um possível alvo terapêutico para tratamento da rigidez arterial

associada a essas variáveis de risco, dada a plasticidade do fenótipo mecânico das CMLV (156). Como demonstrado anteriormente neste estudo, a composição da MEC e as forças mecânicas regionais são fatores moduladores da mecânica das CMLV, mas muito difíceis de serem modificados *in vivo* (157). Em contrapartida, existem peptídeos capazes de afetar diretamente o tônus das CMLV, principalmente a angiotensina II (158) e a aldosterona (159), ambas associadas com rigidez arterial e cujo bloqueio pode melhorar a complacência vascular. Mais além, drogas que aumentam a produção de óxido nítrico, como o inibidor da coenzima A redutase fluvastatina, são capazes de reduzir indiretamente o tônus de CMLV (160). A eficácia dessas opções terapêuticas na redução da rigidez de grandes artérias em mulheres e tabagistas precisa ser futuramente explorada.

Finalmente, este é o primeiro estudo a demonstrar a presença de variabilidade interindividual da viscoelasticidade das CMLV. A variabilidade da mecânica das CMLV pode justificar a variabilidade de rigidez de grandes vasos observada entre indivíduos de mesma idade (87). Apesar de ter sido demonstrado que as condições fisiológicas de mulheres pós-menopausa e o tabagismo são capazes de enrijecer as CMLV, o modelo estatístico obtido nos resultados é capaz de explicar menos de 20% da variabilidade desse traço biológico. O conhecimento das variáveis moduladoras do fenótipo mecânico das CMLV é de grande importância clínica, dadas as evidências crescentes associando rigidez de CMLV e rigidez arterial. Estudos futuros que avaliem possíveis moduladores genéticos da mecânica das CMLV são necessários para auxiliar no entendimento da fisiopatogenia da rigidez vascular.

6. Limitações

As CMLV, quando em cultura celular, sofrem mudanças fenotípicas progressivas que as distanciam do comportamento biológico exibido *in vivo*. Neste estudo, esse viés foi minimizado, primeiramente, pela utilização de culturas primárias ao invés de linhagens celulares imortalizadas, permitindo a avaliação mecânica de células provenientes de fragmentos vasculares e, dessa forma, recém-expostas aos estímulos ambientais. Além disso, optou-se pela restrição do número de subcultivos para a realização das medidas mecânicas, baseando-se no achado de que a progressão do cultivo *in vitro* estava associada à perda de rigidez das CMLV.

No ambiente vascular, as células endoteliais exercem papel regulatório sobre as CMLV, principalmente em resposta a mudanças no estresse de cisalhamento. Essa ação regulatória não foi especificamente avaliada no estudo.

A única forma de se avaliar a mecânica celular pré e pós-experimento de estiramento cíclico, pela metodologia OMTC, é por meio do desprendimento das células do substrato usado no estiramento, seguido pela adesão delas aos poços a serem usados nas medidas mecânicas. Isso faz com que a avaliação mecânica celular tenha sido realizada em uma situação de organização de citoesqueleto que não correspondia exatamente à apresentada pelas CMLV ao final do estiramento. Entretanto, esse desenho experimental traduziu precisamente a situação em que as CMLV dos diferentes leitos arteriais foram inicialmente avaliadas e em que a heterogeneidade de fenótipo mecânico entre elas foi encontrada. Sendo assim, ainda que não permitisse avaliar o efeito do estiramento sobre o alinhamento das CMLV *in vitro*, o experimento realizado

permitiu definir que o estiramento cíclico é modulador da mecânica dessas células *in vivo*.

Ainda que a ancestralidade racial tenha sido acessada por meio de ferramentas genéticas, evitando os vieses associados ao uso da raça autodeclarada, houve importante predominância de pacientes com ancestralidade europeia na amostra estudada. Isso possivelmente limitou o poder do estudo de associar ancestralidade africana e enrijecimento de CMLV. De forma similar, a dispersão de idade apresentada pela população de pacientes incluída no estudo foi muito baixa, prejudicando a correlação entre essa variável e a viscoelasticidade de CMLV.

A associação entre hipertensão arterial sistêmica e enrijecimento de CMLV, demonstrada em modelos animais, não foi evidenciada neste estudo. Isso se deve ao fato de todos os pacientes incluídos, com exceção de uma pequena percentagem em que a análise de prontuário foi inválida, apresentarem esse diagnóstico.

O objetivo da terceira fase do projeto era associar as variáveis clínicas com os dados de mecânica de CMLV. Não foi feita a medida de VOP nos pacientes incluídos no estudo, impossibilitando o diagnóstico de rigidez arterial. Entretanto, a tentativa de associação entre as propriedades mecânicas de CMLV com as medidas de VOP seria prejudicada por não se ter a avaliação da MEC desses pacientes.

7. Conclusões

A extrapolação do comportamento mecânico das CMLV observado *in vitro* para o cenário vascular *in vivo* é limitada pelo fato de que tais células apresentam mudanças significativas de viscoelasticidade após período prolongado em cultura celular. Essas modificações mecânicas estão associadas a aumento da taxa de proliferação celular, reforçando observações prévias que indicam que células terminalmente diferenciadas sofrem processo de desdiferenciação quando submetidas a múltiplos subcultivos *in vitro*. A restrição do número de subcultivos ou do tempo de cultivo *in vitro* é, dessa forma, condição *sine qua non* para permitir a correta interpretação dos resultados obtidos experimentalmente quando da avaliação da mecânica das CMLV.

A viscoelasticidade demonstrada pelas CMLV é resultado da organização tridimensional do citoesqueleto, processo altamente dinâmico e dependente da interação entre as proteínas estruturais com suas proteínas ligadoras, e da organização e extensão das adesões focais. Sendo assim, apesar de a expressão de proteínas contráteis de músculo liso ser frequentemente utilizada como substituta da avaliação mecânica das CMLV, ela não traduz a organização do citoesqueleto celular e pode levar a conclusões errôneas.

As CMLV são heterogêneas em termos de viscoelasticidade e expressão de proteínas do citoesqueleto ao longo da árvore arterial. A mecânica das CMLV é modulada pelas características da MEC (composição e quantidade) e pela tensão circunferencial cíclica aplicada às paredes vasculares pela circulação pulsátil. Essas observações reforçam o conceito de plasticidade fenotípica das CMLV e confirmam a existência de um espectro de

fenótipos intermediários entre os fenótipos contrátil e secretor, classicamente associados à modulação fenotípica dessas células.

Mulheres pós-menopausa e tabagistas exibem enrijecimento de CMLV. Essa modificação da mecânica das CMLV é provavelmente um fator que contribui para a rigidez arterial associada a essas condições e representa um possível alvo terapêutico a ser avaliado futuramente.

Existe variabilidade interindividual significativa da viscoelasticidade de CMLV, que é minoritariamente explicada por variáveis clínicas. Considerando-se as recentes evidências que associam viscoelasticidade das CMLV com mecânica vascular, a identificação de moduladores desse fenótipo certamente contribuirá para melhor compreensão da fisiopatogenia da rigidez arterial.

8. Anexos

Anexo A**Comparação de expressão proteica entre células de músculo liso vascular (CMLV) de artéria femoral e aorta torácica****Proteínas com expressão diferencial em CMLV de Aorta (p<0,05)**

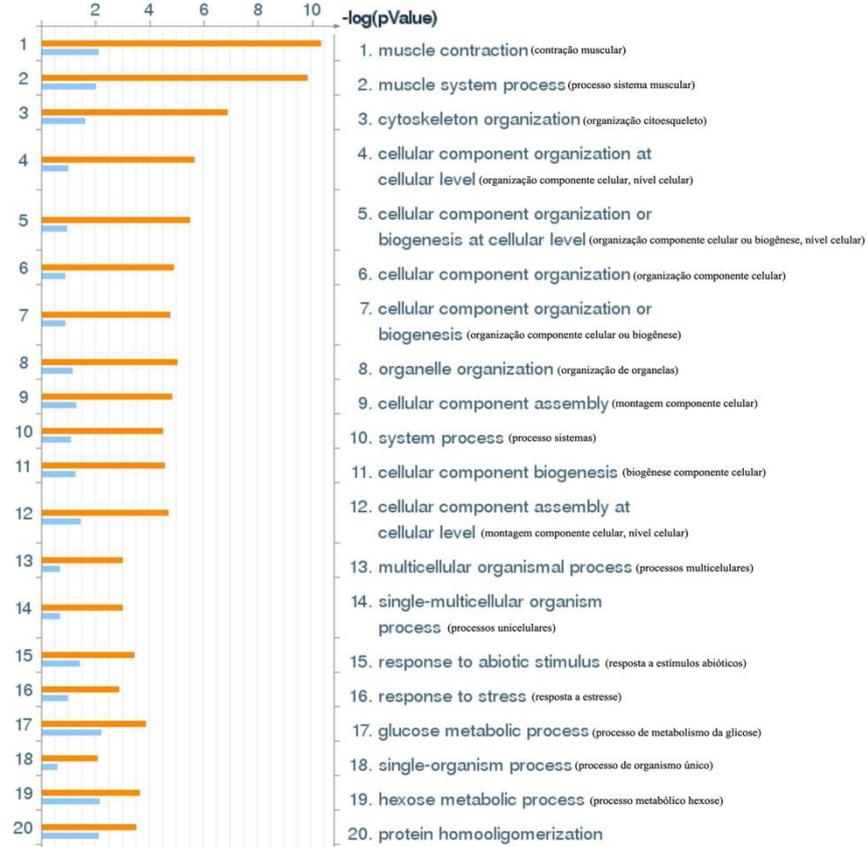
Proteína
Actina de músculo liso
Proteína 22 α de músculo liso (SM 22 α)
α -Actinina 4
α -Actinina 2
Vinculina isoforma 2
Malato desidrogenase
Frutose-bifosfonato aldolase A
Fosfoglicerato mutase 1
Proteína DJ-1
Proteína associada a microtúbulos

Proteínas com expressão diferencial em CMLV de Femoral (p<0,05)

Proteína
β -enolase
Proteína α B-cristalino
Vinculina isoforma 1

Comparação de expressão proteica entre CMLV de Aorta versus Femoral – Processos e Redes (p<0,05)

Processos



Redes



Quantidade de proteínas diferencialmente expressas, organizadas por processos e redes. Barras laranja = Aorta; barras azuis = Femoral.

Proteínas com expressão diferencial em CMLV de Aorta (p<0,1)

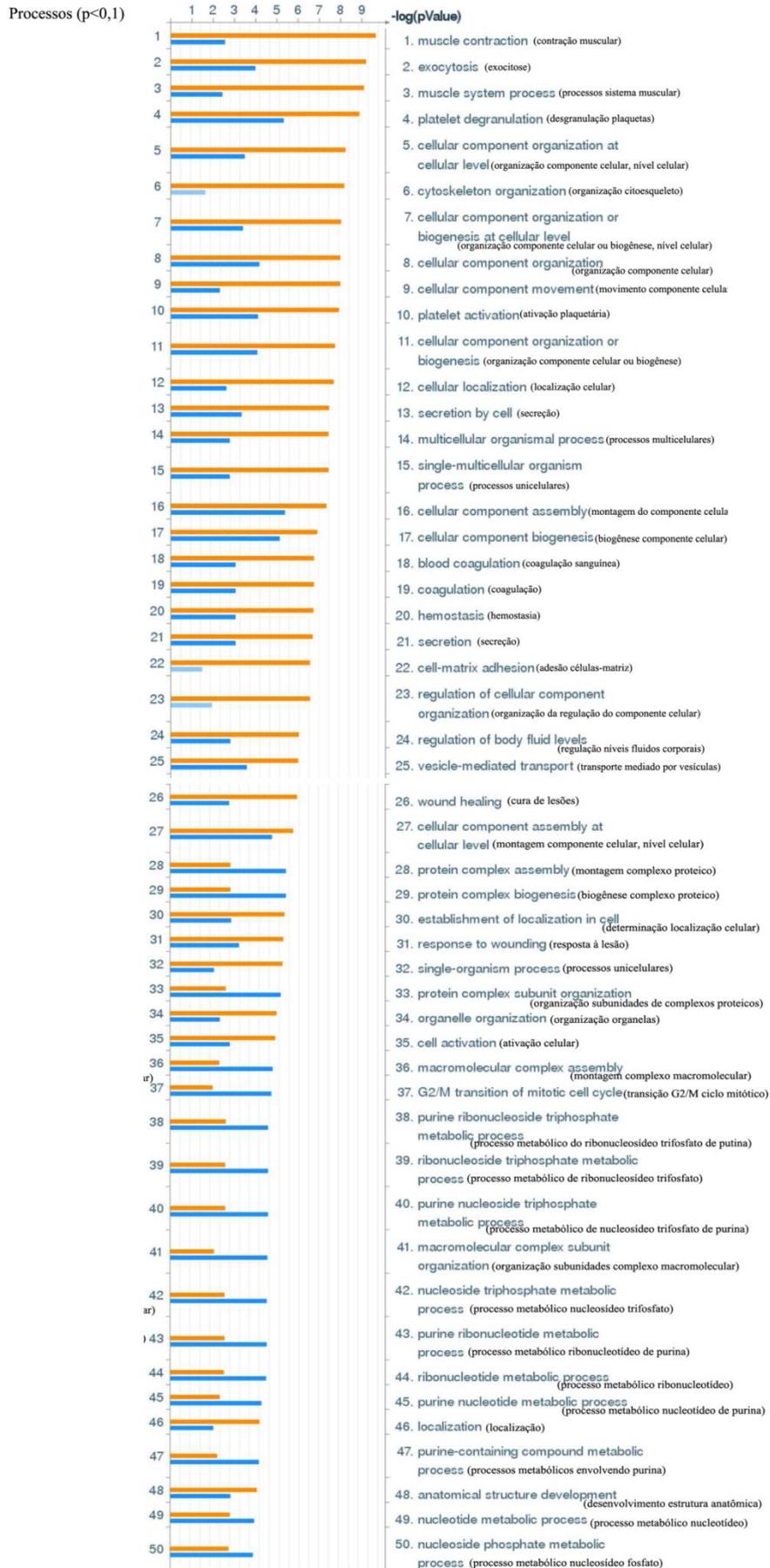
Proteína
Actina de músculo liso
Proteína de músculo liso 22- α (SM 22 α)
Proteína relacionada à actina 3
α -actinina 1 isoforma 3
Calmodulina
α -actinina 4
α -actinina 2

α -actinina 3
Vinculina
Frutose bifosfonato aldolase A
Proteína associada ao microtúbulo
Fosfoglicerato mutase 1
Nucleosídeo difosfato quinase B (isoforma 3)
Transgelina 2
14-3-3 γ -proteína
Malato desidrogenase
Fibronectina
Proteína AHNAK
Proteína DJ-1
β -espectrina não eritrocitária 4

Proteínas com expressão diferencial em CMLV de Femoral ($p < 0,1$)

Proteína
β -enolase
Tubulina, cadeia α
Proteína α B-cristalino
α -2-HS-glicoproteína
ATP sintase α , mitocondrial
Vinculina isoforma 1
Proteína <i>heat-shock-related</i> 70kDa
Actinina, α -2 variante
Proteína droga-sensível 1

Comparação de expressão proteica entre CMLV de Aorta versus Femoral – Processos ($p < 0,1$)



Quantidade de proteínas diferencialmente expressas, organizadas por processos celulares.
Barras laranja = Aorta; barras azuis = Femoral.

Anexo B

Biorheology 49 (2012) 365–373
DOI 10.3233/BIR-120621
IOS Press

365

Vascular smooth muscle cells exhibit a progressive loss of rigidity with serial culture passaging

Carla Luana Dinardo^a, Gabriela Venturini^a, Samantha Vieira Omae^a, Enhua H. Zhou^c, Joaquim Maurício da Motta-Leal-Filho^d, Rafael Dariolli^a, José Eduardo Krieger^a, Adriano Mesquita Alencar^{b,**} and Alexandre Costa Pereira^{a,*,**}

^a *Laboratory of Genetics and Molecular Cardiology, Heart Institute, School of Medicine of São Paulo University, São Paulo, Brazil*

^b *Laboratory of Microrheology and Molecular Physiology, Instituto de Física da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil*

^c *Program in Molecular and Integrative Physiological Sciences, Department of Environmental Health, Harvard School of Public Health, Boston, MA, USA*

^d *Interventional Radiology, Vascular and Endovascular Surgery-Diagnostic Imaging Sector, School of Medicine of São Paulo University, São Paulo, Brazil*

Received 26 June 2012

Accepted in revised form 18 December 2012

Abstract. One drawback of *in vitro* cell culturing is the dedifferentiation process that cells experience. Smooth muscle cells (SMC) also change molecularly and morphologically with long term culture. The main objective of this study was to evaluate if culture passages interfere in vascular SMC mechanical behavior. SMC were obtained from five different porcine arterial beds. Optical magnetic twisting cytometry (OMTC) was used to characterize mechanically vascular SMC from different cultures in distinct passages and confocal microscopy/western blotting, to evaluate cytoskeleton and extracellular matrix proteins. We found that vascular SMC rigidity or viscoelastic complex modulus (G) decreases with progression of passages. A statistically significant negative correlation between G and passage was found in four of our five cultures studied. Phalloidin-stained SMC from higher passages exhibited lower mean signal intensity per cell (confocal microscopy) and quantitative western blotting analysis showed a decrease in collagen I content throughout passages. We concluded that vascular SMC progressively lose their stiffness with serial culture passaging. Thus, limiting the number of passages is essential for any experiment measuring viscoelastic properties of SMC in culture.

Keywords: Cell culture, optical magnetic twisting cytometry, smooth muscle cells, dedifferentiation

* Address for correspondence: Dr. Alexandre da Costa Pereira, Laboratory of Genetics and Molecular Cardiology, Heart Institute, University of São Paulo, Avenida Doutor Eneas de Carvalho Aguiar, 44, 10th floor (Building II), Cerqueira César, São Paulo 05403-000, SP, Brazil. Tel.: +55 11 3069 5579; E-mail: alexandre.pereira@incor.usp.br.

** Co-senior authors.

1. Introduction

Current understanding of various biological phenomena is largely due to cultivating cells from different tissue origins. Cultured cells retain a number of *in vivo* biochemical characteristics, validating the usefulness of this method for the study of cell physiology. However, a drawback of biological primary cultures is the dedifferentiation that many cells exhibit while subjected to multiple passages [11,16,25].

Indeed, primary smooth muscle cells (SMC) serially passaged display changes in a number of physiological properties, including biosynthetic properties and morphology [19]. Several on-going large-scale projects use primary cultures of vascular smooth muscle cells to describe, characterize, select and map complex biological phenotypes. Concerns about this subject already exist, as studies that evaluate viscoelasticity of cells in primary cultures frequently limit passages [26]. Nonetheless, this issue has not been clearly characterized in the literature.

The main objective of this study was to quantitatively evaluate if serial passaging has an influence on the mechanical behavior of vascular SMC (VSMC).

2. Materials and methods

2.1. Cell isolation and culture

Fragments of aorta, femoral, renal, mammary and carotid arteries were collected from two same aged and weighted adult pigs, using protocols approved by our ethics committee. Vessels were used to isolate VSMC through a primary explant technique. Changes of passages were defined every time cells reached confluency in a certain plate and trypsinization followed by cell plating in a doubled-sized recipient was required. In order to perform our mechanical measures, VSMC were seeded at a 96-well plastic plate (Costar) at passages 4, 5 and 7, for aorta; 4, 8, 10 and 11, for femoral; 4, 5, 6 and 7, for renal; 4, 5, 6 and 8, for mammary; and 4, 5, 8, 10 and 11 for carotid (1×10^4 cells per well). Past 24 h after cell plating, VSMC were serum deprived, irrespective of the passage. After 24 h in starving, VSMC were covered with ferromagnetic beads previously coated with RGD (arginine-glycine-aspartate) peptide (American Peptide Company, Cat# 44-0-19B, Solid Phase Peptide Synthesis).

2.2. Preparation of ferrimagnetic beads

Ferrimagnetic beads (4.5 μm diameter) were covered with a synthetic peptide containing Arg-Gly-Asp (RGD) sequence. RGD is known to anchor cytoskeleton's actin through binding β_1 -integrin. Past 24 h after RGD coverage, beads were resuspended in serum-deprived media and added to cells at a concentration of 10 μg per well. After 20 min of incubation, optical magnetic twisting cytometry (OMTC) experiments began.

2.3. Optical magnetic twisting cytometry (OMTC)

Detailed descriptions and validations of OMTC have been published elsewhere [8]. OMTC is an optical-magnetical method that can determine the rigidity of individual cells and has been widely used to probe the mechanics of adherent cells [3,5,17]. In brief, a 0.75 Hz sinusoidal vertical magnetic field of 90 Gauss generates a torque to the previously magnetized ferromagnetic beads (9,000 Gauss). The magnetic torque over the beads results in a horizontal displacement, which was optically registered by

a charge-coupled device camera mounted on an inverted microscope (Leica DMI-4000, 40× magnification).

The ratio between torque and bead displacement in the frequency (f) domain defined a complex apparent stiffness of the cell, $g^*(f)$, measured in Pa/nm. The apparent stiffness $g^*(f)$ was converted into a viscoelastic modulus $G^*(f)$ after taking into consideration the shape and thickness of the cell and the degree of bead embedding [15]. The viscoelastic modulus has two components: the in-phase elastic modulus $G'(f)$ and the out-of-phase viscous modulus $G''(f)$, which are used to compute the hysteresivity of the cell η (the ratio G''/G'). Here we used a fixed frequency $f = 0.75$ Hz, thus $G = |G^*(f)|$.

2.4. Confocal microscopy

For immunofluorescence staining, cells were grown on glass slides. We selected cells from four different cultures at different passages: renal (P9 and P12), femoral (P6, P8 and P9), mammary (one culture was analyzed at P7 and P10, another one at P9 and P12). After 48 h, cells were fixed with 4% paraformaldehyde, washed with PBS, blocked for 30 min with 5% BSA/PBS, and incubated for 3 h with phalloidin conjugated with Alexa (Alexa Fluor 488 Phalloidin[®], Invitrogen, 1:400). Phalloidin is a bicyclic peptide used in imaging applications to selectively label F-actin, with low non-specific binding. Fluorescence image studies were performed using a Zeiss laser-scanning confocal microscope LSM 510 META. Setting conditions were normalized using a negative control glass slide and magnification was 20× for all images obtained. Images were analyzed using ImageJ[®] software.

2.5. Western blotting

In order to extract smooth muscle cells total protein, plates were washed twice with PBS and 100 μ l of extraction buffer (1% TRITON X-100, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 5 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 25 mM HEPES supplemented with PMSF (Sigma), phosphatase inhibitor cocktail 1 and 2 (Sigma) and total protease inhibitor (Sigma)) was used for cell lysis. Samples (5 and 15 μ g) were loaded and subjected to SDS-PAGE. After electrophoresis, proteins were electro-transferred to a nitrocellulose membrane (GE Healthcare). The membrane was incubated in a blocking buffer and then probed with antibodies against Collagen Type I (#sc8784 – Santa Cruz). Detection was performed using enhanced chemiluminescence reagents (GE Healthcare) and densitometry analysis was performed with the ImageJ program. Protein levels of GAPDH (ab22555 – Abcam) were used to normalize the results.

2.6. Statistical analysis

We correlated the mechanical variables G and η (obtained from data recorded for each valid bead) with passage number for each type of vascular SMC. The correlation was carried out using Spearman's rank correlation. It was considered statistically significant at $p < 0.001$. Mean signal intensity per cell obtained from confocal microscopy images was compared between passages using the t -student test (if two samples) or one-way ANOVA (more than two samples) and it was considered significant at $p < 0.01$.

3. Results

We performed 29 OMTC experiments with renal culture, 25 with aorta culture, 20 with femoral culture, 32 with mammary culture and 18 with carotid culture. Time between passages decreased progres-

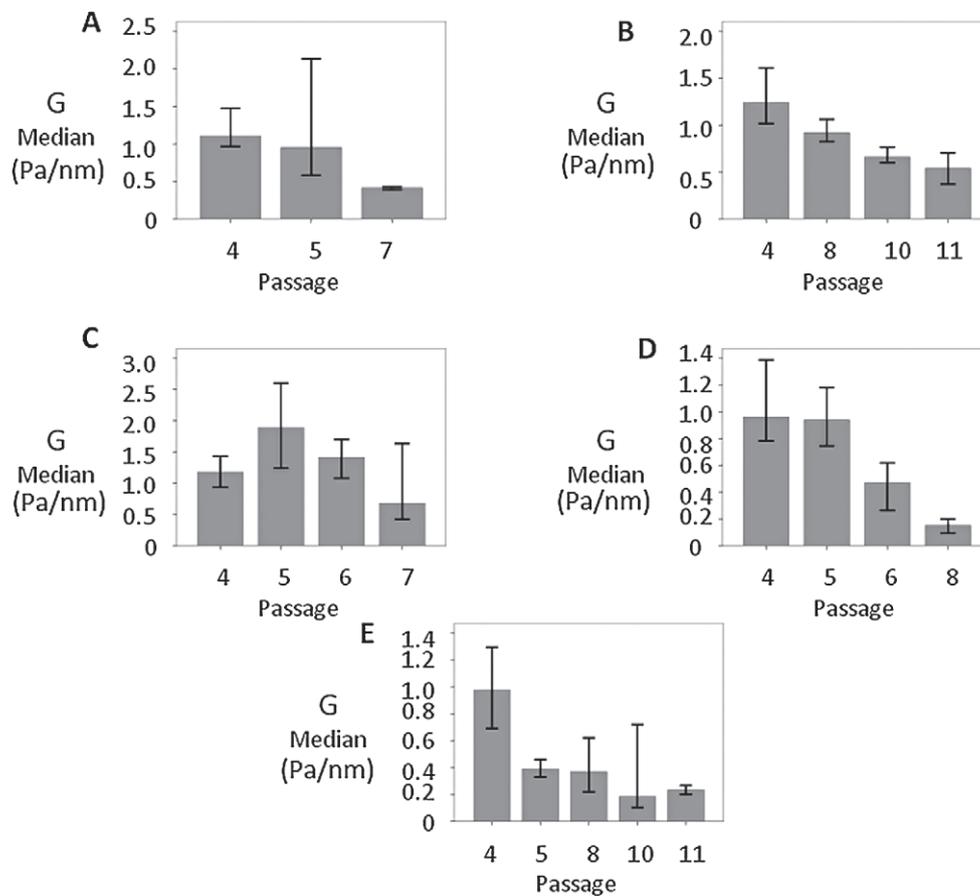


Fig. 1. Variability of rigidity (G) across different passages. There was a negative correlation between G and passages for all cultures, except renal. A: Aorta (CC = -0.319 , $p < 0.001$); B: Femoral (CC = -0.298 , $p < 0.001$); C: Renal (CC = -0.059 , $p = 0.337$). D: Mammary (CC = -0.368 , $p < 0.001$); E: Carotid (CC = -0.419 , $p < 0.001$). Bars represent medians with 95% CI.

sively (P5: 11 ± 2.53 days, P6: 6.6 ± 0.54 days, P7: 4.6 ± 2.2 days, others passages were not computed because not all cultures reached them).

In all cell cultures, except for renal culture, there was a progressive reduction in G value with passaging, representing a reduction in the VSMC rigidity. Thus, we found a negative correlation between G and passaging, represented by a correlation coefficient (CC) of -0.319 for aorta ($p < 0.001$), -0.298 for femoral ($p < 0.001$), -0.059 for renal ($p = 0.337$), -0.368 for mammary ($p < 0.001$) and -0.419 for carotid ($p < 0.001$, Fig. 1).

Regarding η (hysteresivity), a statistically significant positive correlation between this variable and passage was found, represented by a CC of 0.45 for aorta ($p < 0.001$), 0.329 for mammary ($p < 0.001$) and 0.618 for carotid ($p < 0.001$). We were unable to find a statistically significant correlation between η and passage for femoral and renal cultures, with p values of 0.31 and 0.011 , respectively (Fig. 2).

We found a statistically significant difference regarding signal intensity per cell value (gray scale) in VSMC stained with phalloidin at different passages: renal VSMC P9 (mean 113.77 ± 32.9) and P12 (mean 60.43 ± 25.38), $p < 0.01$; femoral VSMC P6 (mean 146.43 ± 35.36), P8 (mean 59.87 ± 35.36) and P9 (mean 92.17 ± 39.26), $p < 0.01$; mammary VSMC P7 (mean 72.54 ± 18.27) and P10 (51.10 ± 21.66),

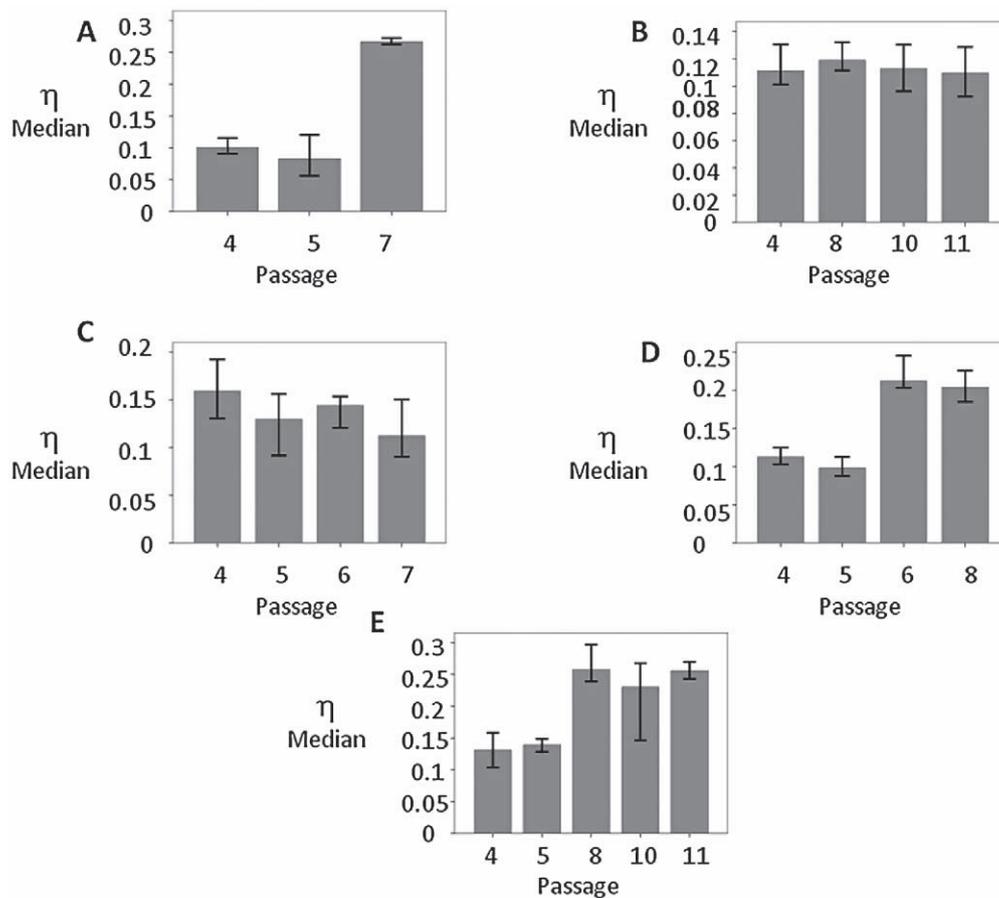


Fig. 2. Variability of hysteresivity (η) across different passages. η correlated positively with passages with statistical significance in three of five cultures studied. A: Aorta ($CC = 0.45$, $p < 0.001$); B: Femoral ($CC = -0.043$, $p = 0.31$); C: Renal ($CC = -0.154$, $p = 0.011$); D: Mammary ($CC = 0.329$, $p < 0.001$); E: Carotid ($CC = 0.618$, $p < 0.001$). Bars represent medians with 95% CI.

$p < 0.01$; and mammary VSMC P7 (mean 89.29 ± 50.8) and P12 (mean 75.36 ± 20.92), $p < 0.01$ (Fig. 3).

Western blotting analysis revealed a significant decrease in collagen-1 content throughout passaging. As this was an exploratory data resulting from the observation of one VSMC culture, we did not make any statistical analysis (Fig. 4).

4. Discussion

Our results provide evidence that VSMC exhibit a progressive modification in their mechanical behavior with the increase in culture passages, mainly loss of rigidity (G) but also increase in hysteresivity (η). We also detected a reduction in average signal intensity per cell between phalloidin stained VSMC at lower and higher passages, which may reflect the amount of f-actin within those cells.

Similarly, quantitative western blotting analysis revealed a decrease in collagen I throughout passages, which may help to explain our mechanical findings and also raises the possibility that the secretory status

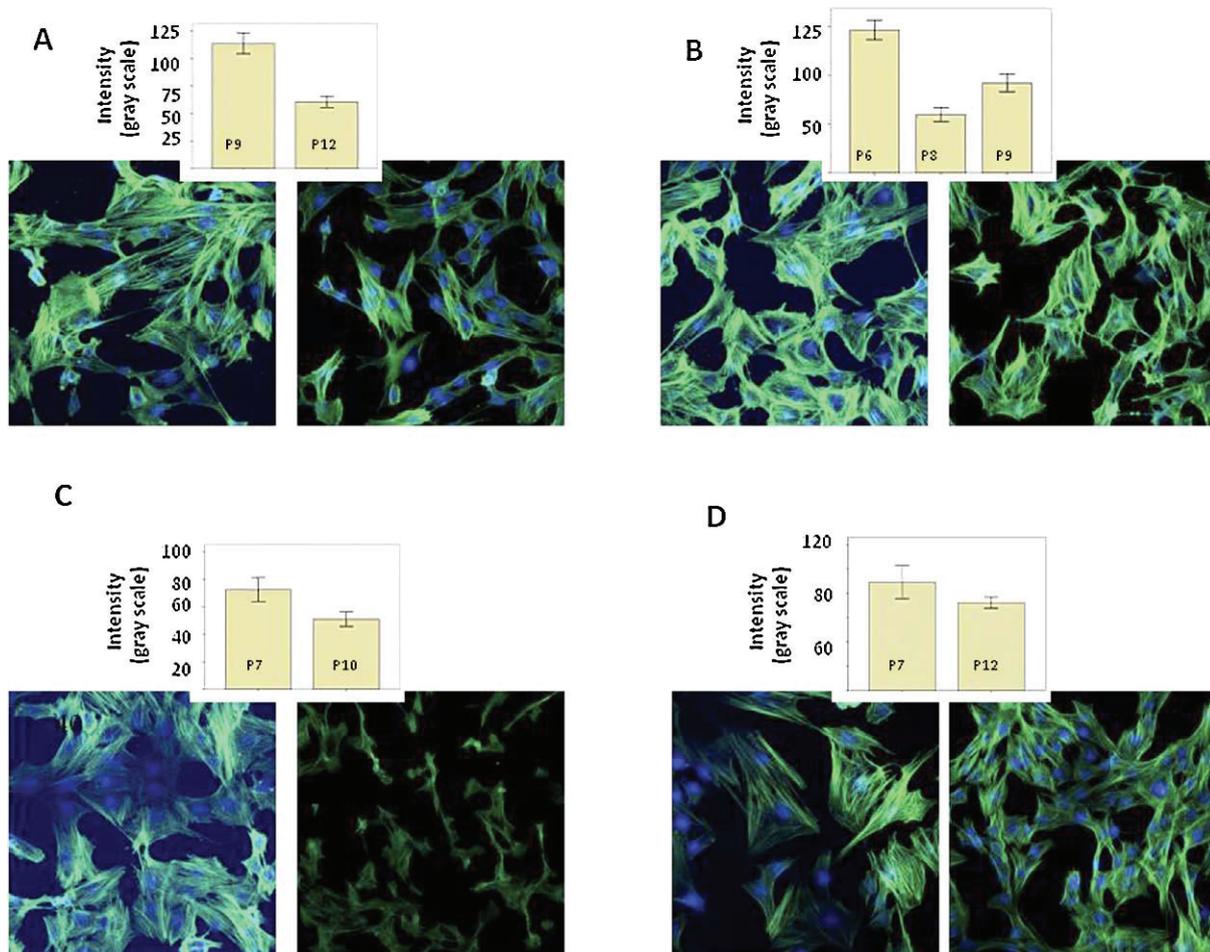


Fig. 3. Comparison of mean signal intensity per cell (gray scale) of phalloidin-stained VSMC obtained at different passages (confocal microscopy). A: Renal culture, B: Femoral culture, C and D: Mammary cultures. We found a statistically significant difference in all cases ($p < 0.01$). Bars represent mean with 95% CI. (Colors are visible in the online version of the article; <http://dx.doi.org/10.3233/BIR-120621>.)

of VSMC may also be affected by long-term *in vitro* culturing. Regarding this latter hypothesis, however, our study design could not exclude the possibility that the decrease in the amount of collagen 1 observed throughout passages was a consequence of the decrease in culture time.

The potential effects of progressive subcultures on cell phenotype have already been described for a wide range of differentiated cells, especially chondrocytes and cardiomyocytes [6,9,24]. Studies on chondrocytes show that *in vitro* expansion culture is associated with loss of cartilaginous phenotype and transformation into a fibroblast-like phenotype [11,16]. Cardiomyocytes also undergo dedifferentiation while subjected to long term culture, presenting with loss of typical morphology and characteristic electrophysiological properties [24]. Cancer cell lines and mesenchymal stem cells, even though not final-differentiated cells, experience significant modifications regarding their behavior at high passages [2,23].

In vitro culturing of SMC is generally associated with loss of their contractile properties in serum containing media [18]. Besides several changes that SMCs experience while in culture in terms of mor-

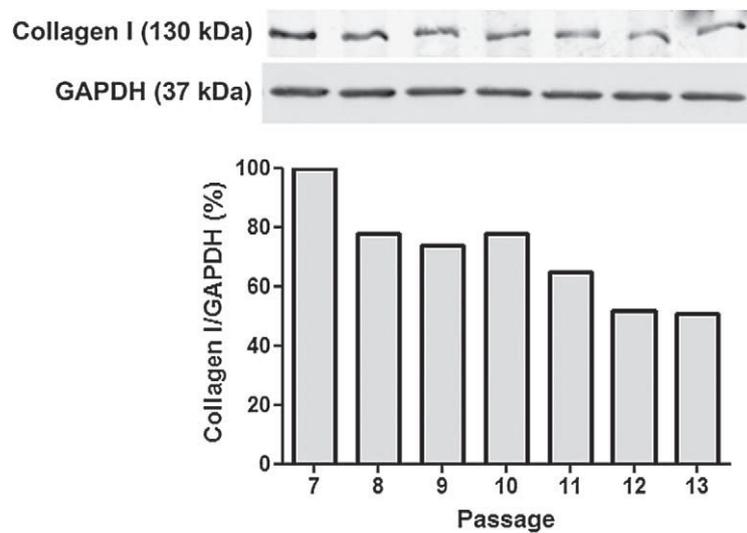


Fig. 4. Decrease in the amount of collagen-1 in cellular extracts obtained from VSMC cultivated from passage 7 until passage 12, using western blotting. The first passage studied (P7) was considered as 100% of collagen-1 content.

phology and response to drugs [4,14], it is also known that alpha-actin mRNA content decreases in cultured SMC [13] and are located predominantly in the cytoplasm [12]. Previous studies have shown that alpha muscle actin synthesis and content in SMC decrease sharply in the first few days in primary culture, rise variably upon achievement of confluency and, thereafter remain low [1,12,13,21]. Similar to α -actin, other cytoskeleton proteins may change after multiple subcultures [10].

The progressive mechanical changes we demonstrated VSMC may experience with serial passaging are probably related to significant modifications regarding cytoskeleton organization (f-actin) and extracellular matrix secretion (collagen-1). Loss of rigidity may be explained by quantitative depletion of both cytoskeleton and extracellular matrix proteins, whereas the increase of hysteresivity could be a reflection of a more liquid cytoplasm caused by the decrease in the total amount of f-actin.

All mechanical changes described may be part of a dedifferentiation process experienced by final differentiated cells, as it was expose above. Even though cells from primary culture may suffer from senescence, we do not consider that this hypothesis can sustain our results. Only a small percentage of senescent cells are identified for sure within a primary cell culture [22] and what we observed was an increase in proliferative rate throughout passages, which is different from what is proposed for senescent cells.

To our knowledge, this is the first study that addresses mechanical behavior of VSMC in long term *in vitro* culture. There are reports of increased rigidity of endothelial cells while on culture [7,20], but the time cells were kept on culture was significantly shorter than ours and the phenotypic characteristics of endothelial cells are quite diverse from VSMC and may have affected the dedifferentiation process we presume they suffer.

In conclusion, VSMC in culture exhibit a significant change in their mechanical behavior over passages. This finding is consistent and may contribute to explain previous observations indicating that differentiated cells exhibit dedifferentiation while subjected to prolonged *in vitro* culture. These results highlight the importance of controlling culture passage when evaluating VSMC' viscoelastic properties.

References

- [1] F. Barja, C. Coughlin, D. Belin and G. Gabbiani, Actin isoform synthesis and mRNA levels in quiescent and proliferating rat aortic smooth muscle cells *in vivo* and *in vitro*, *Lab. Invest.* **55** (1986), 226–233.
- [2] M.E. Bernardo, N. Zaffaroni, F. Novara, A.M. Cometa, M.A. Avanzini, A. Moretta et al., Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term *in vitro* culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms, *Cancer Res.* **67** (2007), 9142–9149.
- [3] P. Berntsen, C.Y. Park, B. Rothen-Rutishauser, A. Tsuda, T.M. Sager, R.M. Molina et al., Biomechanical effects of environmental and engineered particles on human airway smooth muscle cells, *J. R. Soc. Interface* **7**(Suppl 3) (2010), S331–S340.
- [4] M. Breton, E. Berrou, E. Deudon and J. Picard, Changes in proteoglycans of cultured pig aortic smooth muscle cells during subculture, *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **26** (1990), 157–161.
- [5] P. Bursac, G. Lenormand, B. Fabry, M. Oliver, D.A. Weitz, V. Viasnoff et al., Cytoskeletal remodelling and slow dynamics in the living cell, *Nat. Mater.* **4** (2005), 557–561.
- [6] J.H. Campbell, O. Kocher, O. Skalli, G. Gabbiani and G.R. Campbell, Cytodifferentiation and expression of alpha-smooth muscle actin mRNA and protein during primary culture of aortic smooth muscle cells, Correlation with cell density and proliferative state, *Arteriosclerosis* **9** (1989), 633–643.
- [7] U. Cavallaro, V. Castelli, U. Del Monte and M.R. Soria, Phenotypic alterations in senescent large-vessel and microvascular endothelial cells, *Mol. Cell. Biol. Res. Commun.* **4** (2000), 117–121.
- [8] B. Fabry, G.N. Maksym, J.P. Butler, M. Glogauer, D. Navajas, N.A. Taback et al., Time scale and other invariants of integrative mechanical behavior in living cells, *Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.* **68** (2003), 041914.
- [9] T. Hoshiba, T. Yamada, H. Lu, N. Kawazoe and G. Chen, Maintenance of cartilaginous gene expression on extracellular matrix derived from serially passaged chondrocytes during *in vitro* chondrocyte expansion, *J. Biomed. Mater. Res. A* **100** (2012), 694–702.
- [10] S. Kawamoto and R.S. Adelstein, Characterization of myosin heavy chains in cultured aorta smooth muscle cells. A comparative study, *J. Biol. Chem.* **262** (1987), 7282–7288.
- [11] M. Kino-Oka, Y. Maeda, Y. Sato, N. Maruyama, Y. Takezawa, A.B. Khoshfetrat et al., Morphological evaluation of chondrogenic potency in passaged cell populations, *J. Biosci. Bioeng.* **107** (2009), 544–551.
- [12] O. Kocher and G. Gabbiani, Expression of actin mRNAs in rat aortic smooth muscle cells during development, experimental intimal thickening, and culture, *Differentiation* **32** (1986), 245–251.
- [13] O. Kocher and G. Gabbiani, Analysis of alpha-smooth-muscle actin mRNA expression in rat aortic smooth-muscle cells using a specific cDNA probe, *Differentiation* **34** (1987), 201–209.
- [14] S.L. Lee, J. Dunn, F.S. Yu and B.L. Fanburg, Serotonin uptake and configurational change of bovine pulmonary artery smooth muscle cells in culture, *J. Cell. Physiol.* **138** (1989), 145–153.
- [15] S.M. Mijailovich, M. Kojic, M. Zivkovic, B. Fabry and J.J. Fredberg, A finite element model of cell deformation during magnetic bead twisting, *J. Appl. Physiol.* **93** (2002), 1429–1436.
- [16] M.M. Nadzir, M. Kino-oka, N. Maruyama, Y. Sato, M.H. Kim, K. Sugawara and M. Taya, Comprehension of terminal differentiation and dedifferentiation of chondrocytes during passage cultures, *J. Biosci. Bioeng.* **112** (2011), 395–401.
- [17] C.Y. Park, D. Tambe, A.M. Alencar, X. Trepast, E.H. Zhou, E. Millet et al., Mapping the cytoskeletal prestress, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **298** (2010), C1245–C1252.
- [18] L. Raphel, A. Talasila, C. Cheung and S. Sinha, Myocardin overexpression is sufficient for promoting the development of a mature smooth muscle cell-like phenotype from human embryonic stem cells, *PLoS One* **7** (2012), e44052.
- [19] A. Rothman, T.J. Kulik, M.B. Taubman, B.C. Berk, C.W. Smith and B. Nadal-Ginard, Development and characterization of a cloned rat pulmonary arterial smooth muscle cell line that maintains differentiated properties through multiple subcultures, *Circulation* **86** (1992), 1977–1986.
- [20] H. Sato, N. Kataoka, F. Kajiyama, M. Katano, T. Takigawa and T. Masuda, Kinetic study on the elastic change of vascular endothelial cells on collagen matrices by atomic force microscopy, *Colloids Surf. B. Biointerfaces.* **34** (2004), 141–146.
- [21] O. Skalli, W.S. Bloom, P. Ropraz, B. Azzarone and G. Gabbiani, Cytoskeletal remodeling of rat aortic smooth muscle cells *in vitro*: relationships to culture conditions and analogies to *in vivo* situations, *J. Submicrosc. Cytol.* **18** (1986), 481–493.
- [22] M.N. Starodubtseva, Mechanical properties of cells and ageing, *Ageing Res. Rev.* **10** (2011), 16–25.
- [23] G. Xie, J. Zhan, Y. Tian, Y. Liu, Z. Chen, C. Ren et al., Mammosphere cells from high-passage MCF7 cell line show variable loss of tumorigenicity and radioresistance, *Cancer Lett.* **316** (2012), 53–61.
- [24] Y. Zhang, T.S. Li, S.T. Lee, K.A. Wawrowsky, K. Cheng, G. Galang et al., Dedifferentiation and proliferation of mammalian cardiomyocytes, *PLoS One* **5** (2010), e12559.

- [25] Y. Zhao, S.D. Waldman and L.E. Flynn, The effect of serial passaging on the proliferation and differentiation of bovine adipose-derived stem cells, *Cells, Tissues, Organs* **195** (2012), 414–427.
- [26] E.H. Zhou, R. Krishnan, W.D. Stamer, K.M. Perkumas, K. Rajendran, J.F. Nabhan et al., Mechanical responsiveness of the endothelial cell of Schlemm's canal: scope, variability and its potential role in controlling aqueous humour outflow, *J. R. Soc. Interface* **9** (2012), 1144–1155.

Anexo C

Am J Physiol Heart Circ Physiol 306: H505–H516, 2014.
First published December 13, 2013; doi:10.1152/ajpheart.00655.2013.

Variation of mechanical properties and quantitative proteomics of VSMC along the arterial tree

Carla Luana Dinardo,¹ Gabriela Venturini,¹ Enhua H. Zhou,² Ii Sei Watanabe,³ Luciene Cristina Gastalho Campos,¹ Rafael Dariolli,¹ Joaquim Maurício da Motta-Leal-Filho,⁴ Valdemir Melechco Carvalho,⁵ Karina Helena Morais Cardozo,⁵ José Eduardo Krieger,¹ Adriano Mesquita Alencar,^{6*} and Alexandre Costa Pereira^{1*}

¹Heart Institute (InCor), University of São Paulo Medical School, São Paulo, Brazil; ²Department of Environmental Health, Harvard School of Public Health, Boston, Massachusetts; ³Institute of Biomedical Sciences, Department of Anatomy, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; ⁴Interventional Radiology, Vascular and Endovascular Surgery, University of São Paulo Medical School, São Paulo, Brazil; ⁵Fleury Group, São Paulo, Brazil; and ⁶Instituto de Física, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Submitted 26 August 2013; accepted in final form 9 December 2013

Dinardo CL, Venturini G, Zhou EH, Watanabe IS, Campos LC, Dariolli R, da Motta-Leal-Filho JM, Carvalho VM, Cardozo KH, Krieger JE, Alencar AM, Pereira AC. Variation of mechanical properties and quantitative proteomics of VSMC along the arterial tree. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 306: H505–H516, 2014. First published December 13, 2013; doi:10.1152/ajpheart.00655.2013.—Vascular smooth muscle cells (VSMCs) are thought to assume a quiescent and homogeneous mechanical behavior after arterial tree development phase. However, VSMCs are known to be molecularly heterogeneous in other aspects and their mechanics may play a role in pathological situations. Our aim was to evaluate VSMCs from different arterial beds in terms of mechanics and proteomics, as well as investigate factors that may influence this phenotype. VSMCs obtained from seven arteries were studied using optical magnetic twisting cytometry (both in static state and after stretching) and shotgun proteomics. VSMC mechanical data were correlated with anatomical parameters and ultrastructural images of their vessels of origin. Femoral, renal, abdominal aorta, carotid, mammary, and thoracic aorta exhibited descending order of stiffness (G , $P < 0.001$). VSMC mechanical data correlated with the vessel percentage of elastin and amount of surrounding extracellular matrix (ECM), which decreased with the distance from the heart. After 48 h of stretching simulating regional blood flow of elastic arteries, VSMCs exhibited a reduction in basal rigidity. VSMCs from the thoracic aorta expressed a significantly higher amount of proteins related to cytoskeleton structure and organization vs. VSMCs from the femoral artery. VSMCs are heterogeneous in terms of mechanical properties and expression/organization of cytoskeleton proteins along the arterial tree. The mechanical phenotype correlates with the composition of ECM and can be modulated by cyclic stretching imposed on VSMCs by blood flow circumferential stress.

vascular smooth muscle; extracellular matrix; aorta; smooth muscle cells

THE FACT THAT VESSELS DIFFER SO significantly in terms of anatomic characteristics is commonly attributed to the heterogeneity of blood flow within their territories during the arterial tree development phase, which determines vessel diameter and thickness (13). In this scenario, vascular smooth muscle cells

(VSMCs) orchestrate extracellular matrix (ECM) synthesis/organization and are thought to assume a quiescent contractile status after. However, VSMCs are known to play an important role in the structural modifications that some vessels undergo during pathologic conditions like atherosclerosis and hypertension (11), highlighting the fact that these cells are constantly influenced by diverse stimuli and modulate their synthetic and proliferative properties based on these stimuli. This puts into question the homogeneous quiescent mechanical status of VSMCs mentioned before.

Earlier studies have suggested that elimination of VSMC function did not significantly change the static mechanical properties of large vessels (42). Recent reports show that vessel structural modifications, such as wall rigidity, may account for the substantial contribution of the VSMC mechanical phenotype (32, 36) and that VSMC cytoskeleton proteins are positively influenced by the composition of surrounding ECM and by the pattern of local shear stress (20, 37).

VSMC location in the vascular tree changes the patterns of gene expression, mainly SMC marker genes, as well as their molecular functioning (14, 45). Considering the key role played by VSMCs in controlling ECM production and organization to maintain vessel integrity, in reorganizing vessel tunica media in the face of blood flow changes, and in regulating tissue perfusion within smaller arteries, it may be expected that their mechanical properties might vary according to the vessel of origin. Hypothetical factors that could influence VSMC mechanics and cytoskeleton organization are their embryological origin, the local blood flow, and the amount of surrounding ECM.

Based on these findings, the main objective of this study was to characterize VSMC obtained from different arterial beds in terms of mechanics and protein expression and explore if eventual differences in their mechanical profile correlate with anatomical or blood flow diversities of their vessels of origin.

MATERIALS AND METHODS

Study Design

See Fig. 1.

Vessels

Fragments of abdominal aorta, femoral, renal, mammary, carotid, coronary, and thoracic aorta arteries were collected from five same-

* M. Alencar and A. Costa Pereira contributed equally to this work.

Address for reprint requests and other correspondence: A. Costa Pereira, Avenida Doutor Enéas de Carvalho Aguiar, 44, 10th floor. Heart Institute (InCor), Univ. of São Paulo Medical School, São Paulo, SP, Brazil (e-mail: lbmpereira@incor.usp.br).

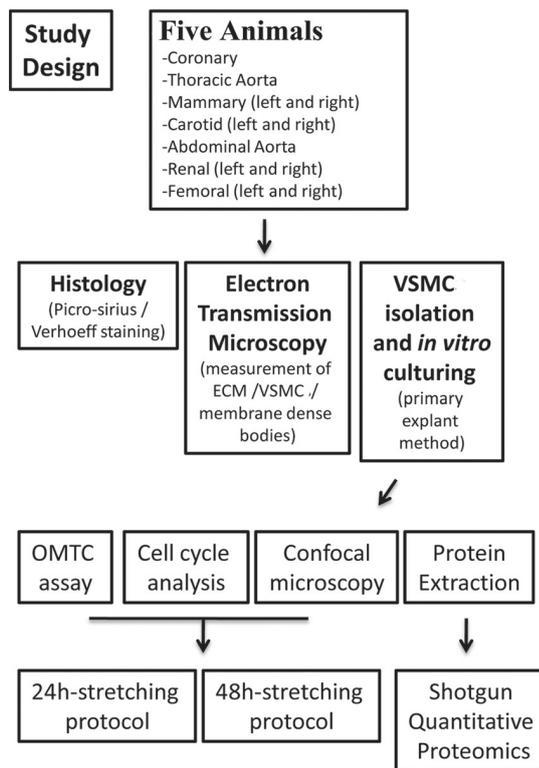


Fig. 1. The study was designed to address the mechanical phenotype of vascular smooth muscle cells (VSMCs) and its possible modulators along arterial tree. Selected arteries were anatomically evaluated using conventional Verhoeff and picrosirius staining, as well as using transmission electron microscopy (TEM). VSMC rigidity was directly accessed using optical magnetic twisting cytometry (OMTC) assay, and protein expression was evaluated using shotgun proteomics. ECM, extracellular matrix.

aged (4 mo) and -weighted female pigs (*Susscrofadomesticus*, lineage MS60 EMBRAPA, Granja RG, Suzano-SP, 15–20 kg). The animals were preanesthetized with ketamine hydrochloride (10 mg/kg) and midazolam (0.4 mg/kg), and the anesthesia was performed with sodium thiopental (10 mg/kg). Animals underwent tracheal intubation, and the anesthesia was maintained with isoflurane with 100% oxygen in a ventilator during the procedure. Saline infusion was kept throughout the procedure, and a single dose of 10,000 IU of heparin was administered. Asepsis/antisepsis was performed over the regions of interest for vessel extraction. After all vascular segments were extracted, the animals, still under anesthesia, were killed by an overdose of potassium chloride (KCl, ~30 ml). The procedure was approved according to our local ethics committee (CAPesq–Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina USP-0272/11).

Cell Isolation and Culture

Fragments of the collected vessels were used to isolate VSMCs using the primary explant technique. Vessel fragments had their lumen opened and were cut into small pieces (4 × 4 mm), which were placed on a six-well plate, previously coated with 3% cutaneous porcine gelatin (catalog no. G9136; Sigma-Aldrich). Growth media used consisted of high-glucose DMEM (catalog no. 12100–046; GIBCO) supplemented with 20% fetal bovine serum (catalog no. 16000–044; GIBCO), 100 unit/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin (catalog no. 15140–122; GIBCO). VSMCs were stained for alpha-smooth muscle actin (sc-53142, 1:400; Santa Cruz Biotechnology) and characterized using confocal microscopy (>95% positivity). The staining protocol was identical to that described for anti-vinculin antibody in *Confocal Microscopy*. VSMCs were ex-

panded to subsequent passages at a 1:2 proportion. To limit VSMCs progressive softening and dedifferentiation with serial culture passaging, we performed the mechanical assay, the stretching experiment, and the acquisition of confocal images using VSMCs up to the fifth passage (10).

Cell Cycle Analysis

VSMCs (1×10^5 , 4th passage) were plated in culture dishes at concentrations determined to yield 90–100% confluence. Afterwards, cells were harvested and centrifuged for 5 min at 1,699 g in 4°C. Subsequently, cells were washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS), and then the supernatant was discarded, and the pellets were fixed with 1 ml of ice-cold 70% ethanol at 4°C overnight. Next, cells were centrifuged for 5 min in 4°C at 4,248 g and washed twice with PBS. The supernatants were withdrawn, and the cells were resuspended in 500 µl of DNA staining solution (20 µg/ml of PI, 100 µg/ml of RNase A in PBS, and 0.1% Triton-X) for 30 min at 37°C. DNA content was analyzed using FACS Calibur flow cytometry equipment (BD). The cell population in each phase of the cell cycle was determined using CellQuestPro software.

Histological Characterization of Vessels

Paraffin-embedded sections of all artery sections were stained with Verhoeff Van-Gieson (elastic stain kit, catalog no. HT25A; Sigma-Aldrich) and picrosirius red solution (catalog no. P6744; Sigma-Aldrich). Deparaffinized and hydrated sections were stained with Verhoeff solution for 1 h, rinsed (twice), differentiated in 2% ferric chloride (1–3 min), washed in tap water, treated with 5% sodium thiosulfate for 1 min, washed for 5 min, counterstained in Van Gieson solution for 3 min, dehydrated through 95% alcohol, and cleared in xylene (3 min/twice). According to the picrosirius protocol, deparaffinized and hydrated sections were stained in picrosirius red for 1 h, washed in acidified water (twice), dehydrated in 100% ethanol (3 times), and cleared in xylene.

Slides were analyzed using Leica Qwin software, and the percentage of elastic fibers (Verhoeff-stained slices) and collagen (picrosirius-stained slices) within media tunica was calculated for each vessel. Anatomical data referring to the vessel internal diameter and media thickness were calculated using the same slides. Groups were statistically compared in terms of percentage of elastin, percentage of collagen, internal diameter, media thickness, and media thickness/internal diameter ratio using one-way ANOVA. $P < 0.05$ was considered significant. The name of the vessel was not revealed to the researcher that analyzed the slices. Instead, a numerical code was given.

Transmission Electron Microscopy

Vessel fragments were preserved in modified Karnovsky solution and processed according to the methodology described by Watanabe (43). Images were acquired using Jeol-1010 equipment.

We calculated the extracellular matrix area/VSMC area ratio and the mean size of membrane-dense bodies for each selected vessel using ImageJ software. Groups were compared in terms of both variables using one-way ANOVA. $P < 0.05$ was considered significant. Data referring to dense body size underwent logarithm conversion before statistical analysis to achieve a normal distribution. Images were acquired and analyzed by two different researchers and a second one reanalyzed them to avoid subjectiveness.

Optical Magnetic Twisting Cytometry

Preparation of ferromagnetic beads. Ferromagnetic beads (4.5-µm diameter, provided by Harvard School of Public Health, Boston, MA) were covered with a synthetic peptide containing Arg-Gly-Asp (RGD) sequence (cat no. 44-0-1913; American Peptide) and suspended into a sterile carbonate buffer at a concentration of 1mg/ml.

Optical magnetic twisting cytometry experiment. VSMCs (4th culture passage) were plated on a 96-well plate (catalog no. 9102; Corning) previously coated with 3% porcine gelatin (catalog no. G9136; Sigma-Aldrich) at a concentration of 1×10^4 cells per well. Twelve hours after plating, VSMCs were serum-deprived for 24 h and then ferromagnetic beads were added at a concentration of 10 μg per well. VSMCs were then incubated for 20 min and washed once to remove loosely bound beads before the performance of mechanical measurements.

Detailed descriptions and validations of optical magnetic twisting cytometry (OMTC) have been published elsewhere (12, 31). Briefly, OMTC is a method used to measure cell viscoelasticity based on the application of a sinusoidal magnetic torque to ferromagnetic beads, which are intrinsically attached to cytoskeleton. In our experiments, beads were magnetized horizontally (9,000 Gauss) and, after, a vertical magnetic field oscillating at 0.75 Hz was put into action (90 Gauss). The resulting bead displacement was optically registered by a charge-coupled device camera mounted on an inverted microscope (Leica DMI-4000).

The ratio between the Fourier transformation of the specific torque and bead displacement defined a complex apparent stiffness of the cell, $g^*(f)$, measured in units of Pa nm^{-1} . Based on this value, it was possible to compute the elastic modulus g' , the loss modulus g'' , and hysteresivity η (the ratio g''/g') for the cell. The apparent stiffness $g^*(f)$ was converted into a shear modulus G^* after taking into consideration the shape and thickness of the cell and the degree of bead embedding, based on previous finite-element simulations (30). G^* at 0.75 Hz was labeled G . In half of experiments, contractile agonist histamine or antagonist isoproterenol were added to wells 30 s after the beginning of magnetization, and bead displacement was registered for 5 min thereafter.

VSMCs from different arteries were compared in terms of G and η . Taking into consideration a random variation between the animals, we calculated Z-score of G and η (ZG and $Z\eta$) using resultant G and η of all analyzed wells (individually for each animal). After that, the values of ZG and $Z\eta$ were compared using the nonparametric Kruskal-Wallis test and $P < 0.05$ was considered significant. A Mann-Whitney test was performed as post hoc analysis, and Spearman's rank order correlation was performed to correlate variables obtained from histological analysis with ZG . We used SPSS software (17th version) in all statistical analysis.

Stretch Protocol

VSMCs were stretched using Flexcell FX-4000 cell stretching system (Flexcell International). This system applies biaxial, homogeneous tensile strains to cells cultured on silicone rubber membranes (2) and is suitable for simulating the physiological stretch applied by blood flow to most arteries (17). Then, 2×10^5 cells (5th passage) were plated in Bioflex plates previously coated with 10% porcine skin gelatin (catalog no. G9136; Sigma-Aldrich) and underwent a 10% stretch, at 1 Hz frequency, for 24 and 48 h. Control VSMCs were plated using the same protocol (also in Bioflex plates) and were kept within the same incubator as stretched VSMCs. After the end of the stretch protocol, VSMCs were harvested and prepared for OMTC experiments, as described previously. Control VSMCs were compared with stretched VSMCs using a Mann-Whitney test, and $P < 0.05$ was considered significant.

Confocal Microscopy

VSMCs were cultured on glass slides. After 48 h, cells were fixed with 4% paraformaldehyde (catalog no. 158127; Sigma-Aldrich) for 60 min, permeabilized for 30 min with 0.1% PBS-Nonidet 40 (Sigma-Aldrich), blocked overnight with 1% albumin from bovine serum (catalog no. A9418; Sigma-Aldrich) diluted in PBS, and incubated for 3 h with phalloidin conjugated with Alexa (1:400; Alexa Fluor 488 Phalloidin; Invitrogen) or for 12 h with anti-vinculin primary antibody (1:200; catalog no. V9131; Sigma-Aldrich), in this case followed by

2 h incubation with anti-mouse secondary antibody (Alexa Fluor 555 goat anti-mouse IgG, 1:500; Invitrogen). The cell nucleus was stained using 1:300 DAPI (catalog no. D9532; Sigma-Aldrich), which was added to mounting media. Fluorescence image studies were performed using a Zeiss laser-scanning confocal microscope LSM 510 META. Confocal images were acquired by one researcher, who knew their vessel of origin, but were analyzed by a second researcher after the name of the vessel had been removed and replaced by a sequential number.

ImageJ software and its plugin OrientationJ were used to analyze phalloidin-stained images regarding stress-fiber orientation, which was calculated and expressed, using as unit, the percentage of coherence: the more the fibers had a predominant orientation within the cell, the higher the coherence was. VSMCs were studied in terms of shape using ImageJ software. The variables major axis/minor axis ratio (AR) and circularity were chosen as shape descriptors, and the latter was calculated using the formula 4π (area/perimeter²), the maximum value (one) was representative of a perfect circle and the decrease of the value towards zero reflective of cell elongation. Finally, the size of focal adhesions was calculated using vinculin-stained images and ImageJ particle analysis function.

Groups were compared in terms of stress-fiber orientation and shape-descriptors (AR/circularity) using one-way ANOVA, and $P < 0.05$ was considered significant. Femoral and thoracic aorta were compared in terms of the size of focal adhesions (vinculin-stained images) using Student *t*-test, and $P < 0.05$ was considered significant.

Proteomics

Protein extraction. Five aortic cell plates and six femoral cell plates with 1.0×10^6 cells were extracted with 100 μl of extraction buffer and mechanical lysis. Proteins were centrifuged at 16,000 *g* for 15 min at 4°C. The supernatant was then quantified in triplicate using the Bradford protein assay (Bio-Rad no. 500–0201) according to manufacturer's specifications.

Protein digestion. The protein digestion was carried out according to Camargo et al. (5) with a few modifications. Different from Camargo et al., we diluted 50 μg of total protein in 50 mM ammonium bicarbonate to a final volume of 60 μl , whereas Camargo et al. diluted in Milli-Q water to a volume of 30 μl . We used 21 μl of the internal standard (yeast alcohol dehydrogenase-P00330 at 1 pmol/ μl) whereas Camargo et al. used 5 μl of the internal standard at 250 fmol/ml. Briefly, 50 μg of total protein were diluted in 50 mM ammonium bicarbonate to a final volume of 60 μl . The protein samples were denatured with 0.2% (wt:vol) RapiGest SF for 15 min at 80°C, reduced with 2.5 μl of 100 mM dithiothreitol at 60°C for 30 min, alkylated with 2.5 μl of 300 mM iodoacetamide at room temperature, and enzymatically digested at 37°C overnight with trypsin at a 1:100 (wt/wt) enzyme:protein ratio. Then, 10 μl of 5% trifluoroacetic acid were added to the digestion mixture to hydrolyze the RapiGest, and the samples were incubated at 37°C for 90 min. The tryptic peptide solution was then centrifuged at 16,000 *g* for 30 min at 6°C, and the pH of the supernatant was adjusted to 9.8 by the addition of 5 μl 1 M NH_4OH . Finally, 21 μl of the internal standard (yeast alcohol dehydrogenase-P00330 at 1 pmol/ μl) were added to the resulting solution.

Two-dimensional liquid chromatography/mass spectrometry analysis. Separation of peptides was performed using two-dimensional high performance liquid chromatography (2D-HPLC) employing reversed-phase in both dimensions. Separation was achieved using pH 9.8 in the first and pH 2.6 in the second LC dimension. The separation at pH 9.8 was performed in off-line mode on Acquity UPLC I-Class system equipped with photodiode array (PDA) detector (Waters, Manchester, UK), with Gemini NX 3 μm 50 \times 2.0 mm column mobile phase were ammonium formate in water, 20 mM, pH 9.8 and acetonitrile. Eight fractions of 0.5 min each were automatically collected and were evaporated. The final pellet was resuspended in 50 μl of 0.1%

trifluoroacetic acid in 5% acetonitrile. Each fraction was injected into a second LC dimension through a nanoACQUITY system (Waters). The samples were first trapped in a Symmetry C18 5 μm , 180 mm \times 20 mm column (Waters) with 0.1% TFA in 3% acetonitrile, then peptides were eluted from the trap column to a HSS T3 1.8 μm , 75 μm \times 15cm analytical column (Waters) using as mobile *phase A*: water with 0.1% formic acid and *B*: 0.1% formic acid in acetonitrile.

Mass spectrometric acquisition was achieved in a Synapt MS Q-TOF mass spectrometer equipped with a NanoLockSpray source in the positive ion mode (Waters). For all measurements, the mass spectrometer was operated in the "V" mode with a typical resolving power of at least 12,500. Data-independent scanning (MSE) experiments were performed by switching between low (3 eV) and elevated collision energies (15–50 eV) applied to the trap "T-wave" cell filled with argon. Scan times of 0.8 s were used for low- and high-energy scans from m/z 50 to 2000.

Protein identification and database analysis. Protein identification was performed in Global Server v.2.5 (PLGS) with human UniProtKB Complete Proteome database. Maximum missed cleavages by trypsin allowed were up to 1, fixed modification by carbamidomethylation (cysteine), and variable modifications by acetyl NH_2 -terminal and oxidation (methionine) were considered. Label-free quantification was obtained by the PLGS processing, and the lists of identified and/or quantified proteins in each condition (aortic and femoral) were performed.

Statistical analysis. The data were analyzed using the Student *t*-test and fold change to assess differences between aortic and femoral cells with statistical significance ($P < 0.05$ and fold change > 1.5). Network analyses were performed using MetaCore version 6.14 (<http://portal.genego.com>).

RESULTS

Structural Characterization of the Vessels

Studied vessels (coronary, thoracic aorta, mammary, carotid, abdominal aorta, renal, and femoral) differed in terms of thickness ($P < 0.001$), internal diameter ($P < 0.001$), thickness/internal diameter ratio ($P < 0.001$), percentage of elastin ($P < 0.001$), and percentage of collagen ($P = 0.02$), both measured within tunica media (Fig. 2). Descriptive data are available in the Table 1.

The content of elastin decreased significantly as the vessels moved away from the heart, consistent with previous observations (35), and the thoracic aorta exhibited the highest percentage of elastin (Fig. 2, A and C). The thickness/internal diameter ratio was significantly higher in abdominal aorta branches (femoral and renal arteries) compared with the abdominal aorta itself and to thoracic vessels (thoracic aorta, mammary, and coronary; $P < 0.001$; Fig. 2B). Differences found regarding internal diameter and media thickness were striking because of the higher dimensions of the thoracic aorta. Even though the percentage of collagen was different among the vessels, a pattern for this variation has not been identified.

The proportion of ECM within tunica media of different vessels was calculated using transmission electron microscopy (TEM) images and was expressed as the ratio ECM area/VSMC area. The thoracic aorta exhibited the highest amount of ECM surrounding VSMCs, followed by the mammary artery (Fig. 2D). The thoracic aorta and mammary ECM/VSMC ratio was approximately times higher than the highest ECM/VSMC ratio of the infra-diaphragm arteries (abdominal aorta, renal, and femoral; $P < 0.001$; Fig. 2D). As well as the higher amount of ECM, the thoracic aorta and mammary also exhib-

ited less aligned VSMCs compared with femoral and renal arteries (Fig. 2E).

Our results regarding the structure of different arteries were consistent with previous data from literature, which show that elastin predominates in the thoracic aorta and decreases significantly in the extra thoracic arteries, followed by an increase in both the elastic modulus and the pulse wave velocity (16). Also, vessel diameters were proportional to those previously described for humans (33). Considering the striking differences regarding distance from the heart and ECM composition between the thoracic aorta and femoral artery, those vessels were chosen to be contrasted in some of our analysis.

Morphometric Analysis of VSMCs and Membrane Dense Bodies

As a step before the mechanical evaluation of VSMCs, we chose to directly access their membrane dense bodies (MDB) using TEM, as the ultrastructural evaluation allowed us to most closely visualize VSMCs as they were arranged in vivo, especially regarding the linkage to ECM. MDB (focal adhesions) anchor actin filaments to plasma membrane, influence SMC cytoskeleton remodeling and linkage to ECM, and may be directly related to vessel rigidity (19, 36). MDB mean size was significantly different between VSMCs from different territories ($P < 0.001$): femoral had the largest MDBs, and thoracic aorta had the smallest (Fig. 3, A-C). To evaluate if this difference regarding focal adhesion area was persistent in vitro, we have analyzed vinculin-stained immunofluorescence images of VSMCs and the results were consistent: VSMCs from the thoracic aorta presented with significantly smaller focal adhesions compared with VSMCs from the femoral artery (Fig. 3, F and G). As larger MDB/focal adhesions are positively associated with greater cell rigidity, this finding highlights that femoral VSMCs may have a different final mechanical behavior compared with other arteries, especially regarding cytoskeleton organization and linkage to ECM.

Phalloidin-stained confocal images were studied regarding VSMC shape and actin stress-fiber orientation (Fig. 3, D and E). We decided to evaluate VSMC shape based on previous observations that have correlated the morphology of VSMCs and their phenotype: spindle-shaped VSMCs were always associated with a more differentiated phenotype (contractile) compared with rhomboid SMCs (proliferative) (15, 38). In our analysis, VSMCs were morphologically different ($P < 0.001$, for both AR and circularity): femoral and coronary VSMCs were more elongated compared with VSMCs from the other vessels (Fig. 3D). We did not find a significant difference regarding stress-fiber orientation between the vessels ($P = 0.242$).

Cell-Cycle Analysis

VSMCs obtained from different arteries were subjected to cell-cycle analysis. VSMCs cultured in vitro were homogeneous in terms of percentage of cells within each stage of the cell cycle, irrespective of their vessel of origin (Fig. 4). We identified, on average, $0.89 \pm 0.34\%$ cells in G_0 - G_1 , $73.28 \pm 9.2\%$ in S phase, $3.99 \pm 1.6\%$ in G_2 , and $12.21 \pm 5.7\%$ in sub- G_0 .

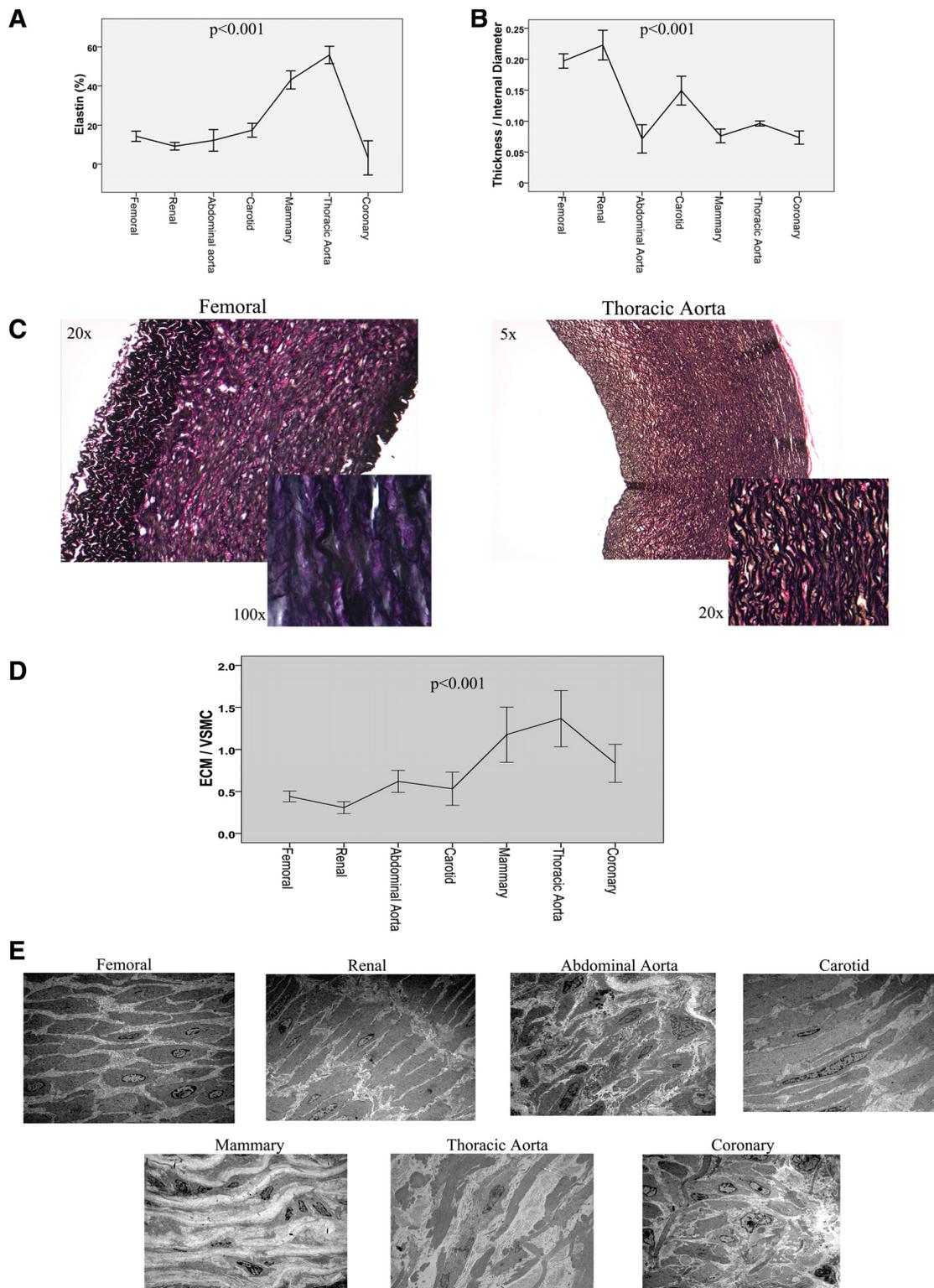


Fig. 2. Structural characterization of studied arteries. *A*: amount of elastin within tunica media decreased as vessels moved away from heart. Thoracic aorta presented with the highest amount of elastic fibers, while femoral and renal arteries presented the lowest ones. In the graph, arteries are disposed in descending order of distance from the heart. Points: mean value; error bars: 95% confidence interval. *B*: thickness/internal diameter ratio was higher in the branches of the abdominal aorta, compared with thoracic vessels. Points: mean value, error bars 95% confidence interval. *C*: Verhoeff Van-Gieson staining of femoral and thoracic aorta. Thoracic aorta presented the highest thickness and the highest amount of elastin within its media layer, compared with all other vessels. Femoral and thoracic aorta are compared in terms of tunica media thickness (main pictures) and in terms of percentage of elastin (smaller pictures, in which elastic fibers are stained in deep purple). *D*: amount of ECM surrounding VSMC was lower in heart-distant femoral and renal arteries compared with thoracic aorta and mammary arteries. Transmission Electron Microscopy (TEM) images of all vessels (*E*) clearly expose that difference and also highlights that femoral and renal VSMCs are more aligned than thoracic aorta and mammary VSMCs.

Table 1. *Anatomical and structural differences of studied vessels*

	Femoral	Renal	Abdominal Aorta	Carotid	Mammary	Thoracic Aorta	Coronary
Media thickness, μm	324 \pm 21	207 \pm 39	318 \pm 16	270 \pm 42	142 \pm 21	1,242 \pm 56	94 \pm 10
Internal diameter, μm	1,645 \pm 12	944 \pm 134	4,500 \pm 500	1,896 \pm 340	1,924 \pm 244	12,876 \pm 251	1,284 \pm 90
Thickness/internal diameter	0.2 \pm 0.01	0.22 \pm 0.04	0.071 \pm 0.01	0.149 \pm 0.04	0.076 \pm 0.02	0.096 \pm 0.002	0.074 \pm 0.01
Collagen, %	12.78 \pm 6.57	24.17 \pm 5.63	12.76 \pm 3.82	22.34 \pm 8.45	14.7 \pm 3.5	18.13 \pm 3.9	19.23 \pm 9.9
Elastin, %	14.3 \pm 2.9	9.2 \pm 3.5	12.2 \pm 4.5	17.4 \pm 5.3	43.1 \pm 7.7	56 \pm 2.8	3.2 \pm 1
ECM/VSMC ratio	0.44 \pm 0.09	0.31 \pm 0.09	0.62 \pm 0.2	0.53 \pm 0.22	1.18 \pm 0.35	1.4 \pm 0.27	0.83 \pm 0.3

Data are expressed as means \pm SD. ECM, extracellular matrix; VSMC, vascular smooth muscle cell.

Mechanical Characterization of VSMCs

VSMCs from different arteries were evaluated using OMTC assay. We performed the following number of valid OMTC experiments: 51 (renal), 33 (abdominal aorta), 49 (femoral), 51 (mammary), 63 (carotid), 16 (coronary), and 33 (thoracic aorta). An experiment was considered valid if the following conditions were met: 1) VSMCs were confluent, 2) a minimum of 150 ferromagnetic beads were identified within the well, and 3) VSMCs exhibited a regular morphology pre- and post-OMTC experiment.

VSMCs differed in terms of G among the different arterial beds, being the results consistent in all analyzed animals. The Z-score of G was calculated for each artery (ZG), as exposed in MATERIALS AND METHODS, and a significant difference was found ($P < 0.001$; Fig. 5A). The thoracic aorta exhibited the lowest value of ZG and femoral artery exhibited the highest ones ($P < 0.001$; Fig. 5A). In a more comprehensive analysis, thoracic aorta VSMCs exhibited significantly lower ZG than VSMCs from infra-diaphragm vessels (abdominal aorta, renal, and femoral arteries; $P < 0.001$), reflecting a less rigid behavior of VSMCs originating from that vessel. Regarding vessel distance from the heart, a clear tendency of ZG elevation with the increase of that distance was observed (Fig. 5A). This statement does not apply to the coronary artery, which receives blood irrigation during diastoles. The η median Z-score (ηZ) did not statistically differ between the different vessels, meaning that histeresivity did not change significantly between the VSMC ($P = 0.115$).

In all experiments with histamine, regardless of the animal, an increase of G after the addition of drug was observed and was reflected by a median normalized G (final postdrug G/basal predrug G) of 1.604 (interquartile range: 0.559). Response to isoproterenol was more heterogeneous (median normalized G of 0.816; interquartile range: 0.416) and significantly varied between animals ($P < 0.001$). This behavior has already been described elsewhere (47) and may reflect the amount of beta-receptors present within cell membrane. VSMCs from different vessels did not differ regarding their intensity of response to both antagonists and agonists drugs ($P = 0.327$ for histamine and $P = 0.234$ for isoproterenol).

Identification of Possible Modulating Factors of VSMCs Mechanics

After the recognition that VSMCs static rigidity varied according to their position in the arterial tree, we studied whether the ECM composition and the cyclic deformation of the arterial wall due to blood flow had any influence on this behavior.

Correlation between ECM data and VSMC rigidity. When OMTC results are contrasted with our previous presented vessels anatomic data, it is clear that VSMCs from arteries with less elastic fibers and less surrounding ECM (femoral and renal) were stiffer compared with the thoracic aorta VSMCs (elastin and ECM-rich). We found a strong negative correlation between the vessel percentage of elastin and the VSMC rigidity (ZG; $P < 0.01$, correlation coefficient: -0.724 and $r^2 = 0.524$) and between the ECM/VSMC ratio and the VSMC rigidity (ZG; $P < 0.01$, correlation coefficient: -0.847 and $r^2 = 0.718$). Femoral VSMC higher rigidity was consistent with our previous observations that those cells presented larger MDB in ultrastructural analysis.

VSMC mechanical behavior after prolonged stretching. Our main objective with this experiment was to verify if cyclic circumferential stress applied over artery walls could influence VSMC mechanical behavior and not to reproduce each vessel-specific stretching condition. We chose the 10% intensity/1-Hz rate protocol, as it is classically considered as physiological (7, 22) and has proven to reproduce an arterial regimen (6).

VSMCs from each studied vessel underwent cyclic stretching (10%, 1 Hz) for 24 and 48 h. Each experiment was repeated twice, on different occasions and with VSMCs from different animals, to guarantee reproducibility. We performed the following valid OMTC experiments after 24 h of stretching/48 h of stretching: 12/12 (carotid), 12/9 (femoral), 12/12 (renal), 12/8 (abdominal aorta), 12/8 (thoracic aorta), and 12/8 (coronary). The same number of control experiments was done.

The 24-h-stretched VSMCs from the mammary artery were less stiff compared with their static controls ($P < 0.001$; Fig. 5B). VSMCs from other vessels did not significantly change their elastic behavior after 24 h of stretching. By contrast, after 48 h of stretching, VSMCs from all vessels were less stiff compared with controls and the magnitude of G reduction, expressed in terms of normalized poststretching G (G of poststretched VSMCs/median G of control wells), was similar for all vessels ($P = 0.675$; Fig. 5B).

Comparison of Protein Expression Between VSMCs with Different Rigidity Using Shotgun Proteomics

VSMCs from the thoracic aorta and femoral artery, which had highly heterogeneous mechanical behaviors, were quantitatively compared using shotgun quantitative proteomics (Fig. 6). This methodology was chosen based on its high sensitivity and reproducibility in profiling protein content in biological samples and, in our case, in comparing two different dynamic proteomes, as well as due to its high-throughput capacity. A total of 1,628 proteins were quantified and/or identified, of which 232 were exclusively identified in aorta VSMCs, 168

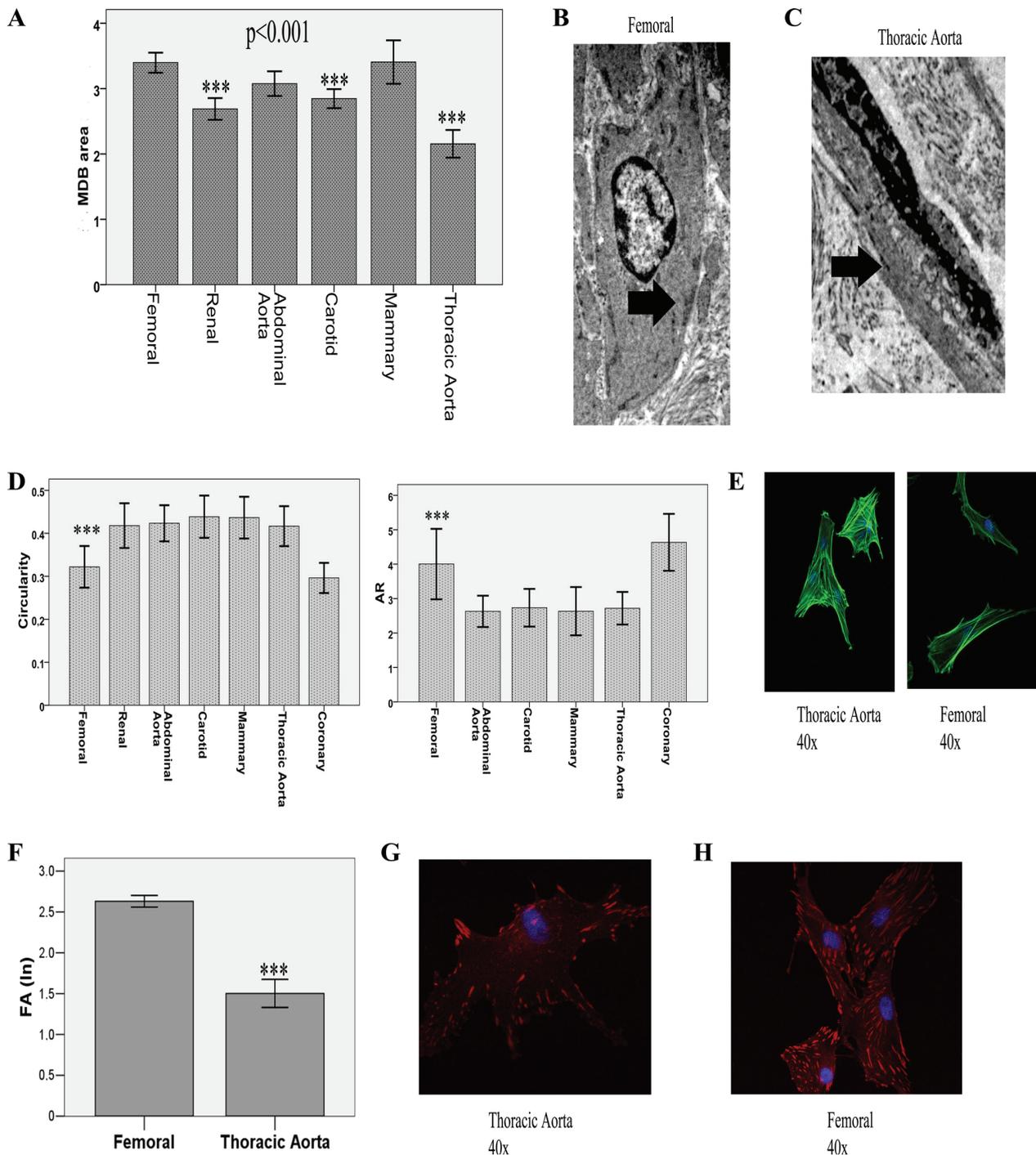


Fig. 3. VSMCs from different arteries were significantly different in terms of shape and membrane dense body dimensions (MDB; ANOVA, $P < 0.001$). **A**: femoral VSMC had an average area of MDB significantly larger than the other vessels. Graph: bars represent logarithm conversion of MDB area and error bars represent 95% confidence interval. Asterisks mark post hoc comparisons of the arteries in relation to the femoral artery. **B**: $\times 2,500$ TEM image of femoral VSMCs. Arrow point: one MDB. **C**: $\times 5,000$ TEM image of thoracic aorta VSMCs. Arrow point one MDB. **D**: femoral VSMCs were more elongated than the others (except for coronary). In the first graph, the studied variable was circularity and, in the second graph, major axis/minor axis ratio (AR). Bars represent mean and error bars represent 95% confidence interval. **E**: confocal images of femoral and thoracic aorta VSMC stained with phalloidin. Femoral VSMC are more elongated than thoracic aorta VSMC. Both the size of MDB and the VSMC shape may have an influence on their final mechanical behavior. These results highlight that femoral VSMC differently organize the cytoskeleton. **F**: in vitro size of focal adhesions (FAs) was compared between VSMCs from femoral and thoracic aorta arteries using vinculin-stained immunofluorescence images (**G** and **H**, red: vinculin, blue: nucleus). Consistent with our previous results using TEM images (**A**), the thoracic aorta presented significantly smaller FAs compared with the femoral artery (**F**, bars: mean value of FA area after logarithm conversion, error bars: 95% confidence interval).

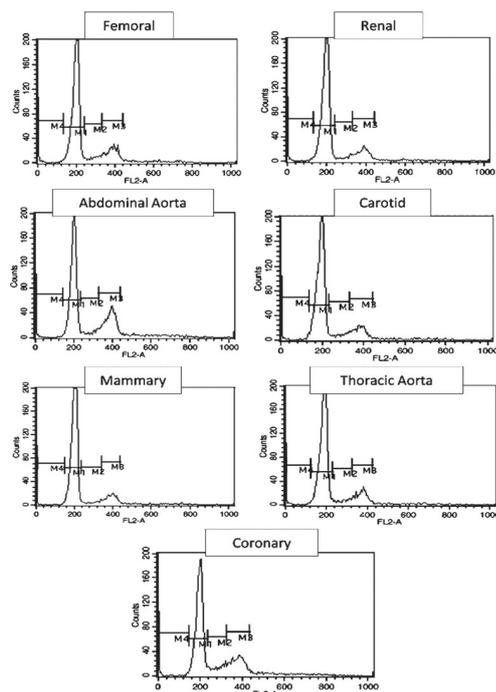


Fig. 4. Histograms representing cell cycle analysis of VSMCs from all arteries. M1: phase G₀-G₁; M2: phase S; M3: phase G₂; and M4: phase sub-G₀. Percentage of cells within each phase of the cell cycle was homogeneous, irrespective of the vessel of origin.

exclusively identified in femoral VSMCs, and 1,233 were identified in both groups (Fig. 6A). Quantified proteins were submitted to statistical analysis, 10 proteins were overexpressed in aorta VSMC group and 3 overexpressed in femoral VSMC group ($P < 0.05$, Fig. 6C).

Based on enrichment analysis, aorta expressed significantly higher amounts of proteins related to the biological processes of contraction and cytoskeletal organization (Fig. 6C). Proteins involved in the cytoskeletal biological network, mainly regarding regulation of cytoskeleton rearrangement and actin filaments, were strikingly more expressed in VSMC from the aorta than in those from the femoral artery. In statistical analysis, we identified the differential proteins of the aorta as microtubule-associated protein, α -actinin 4, fructose-bisphosphatealdolase A, vinculin (isoform 2), α -actinin 2, actin, 22- α smooth muscle protein, malate dehydrogenase, phosphoglycerate mutase-1, and protein DJ-1.

Of these differential proteins, actin stands out as the most important structural cytoskeletal protein, directly responsible for cell deformability and integrity, followed by microtubule-associated protein. The increased expression of actin by aorta VSMCs was accompanied by an also increased expression of proteins involved in the organization of actin stress fibers (α -actinin and vinculin isoform 2). Those “organizer” proteins form VSMC dense bodies/focal adhesions, which play an important role in determining cell mechanics through rearrangement of actin fibers. The impression is that aorta VSMC protein machinery is intensely dedicated to meeting the continuous need of cytoskeleton reorganization due to cyclic fluidization and re solidification of cell cytoplasm.

Femoral differential proteins (quantitatively most different from aorta) were related to the cell cycle network. Based on our cell-cycle analysis, this finding does not mean that femoral VSMCs have a higher replicative behavior than aorta VSMCs, but maybe this reflects that different levels of proteins are required to achieve a similar rate of replication in different environments, as previously observed (18).

DISCUSSION

Our results point out that VSMCs from different vessels of the arterial tree differ in terms of mechanical phenotype: VSMCs from the thoracic aorta are significantly less rigid than VSMCs from heart-distant renal and femoral arteries. VSMC rigidity was lower in the vessels with the higher percentage of elastin and higher amount of ECM, suggesting a common modulator for all parameters or an influence of ECM on VSMC rigidity. Cyclic stretching of VSMCs (simulating elastic artery regimens) led to homogeneous reduction of their rigidity. This finding highlights the finding that regional mechanical forces have an influence on VSMC mechanics independent of ECM cross-signaling and that some interarterial static differences regarding this phenotype may be due to the intensity of cyclic wall deformation imposed by blood flow. The amount of cytoskeletal proteins expressed in VSMCs with extreme compliant behavior (thoracic aorta) was significantly higher than that present in their stiffer opponent (femoral), which expressed more proteins involved in the cell cycle process. This may be reflective of different regional mechanical stresses and ECM composition, which influence VSMC cytoskeletal organization.

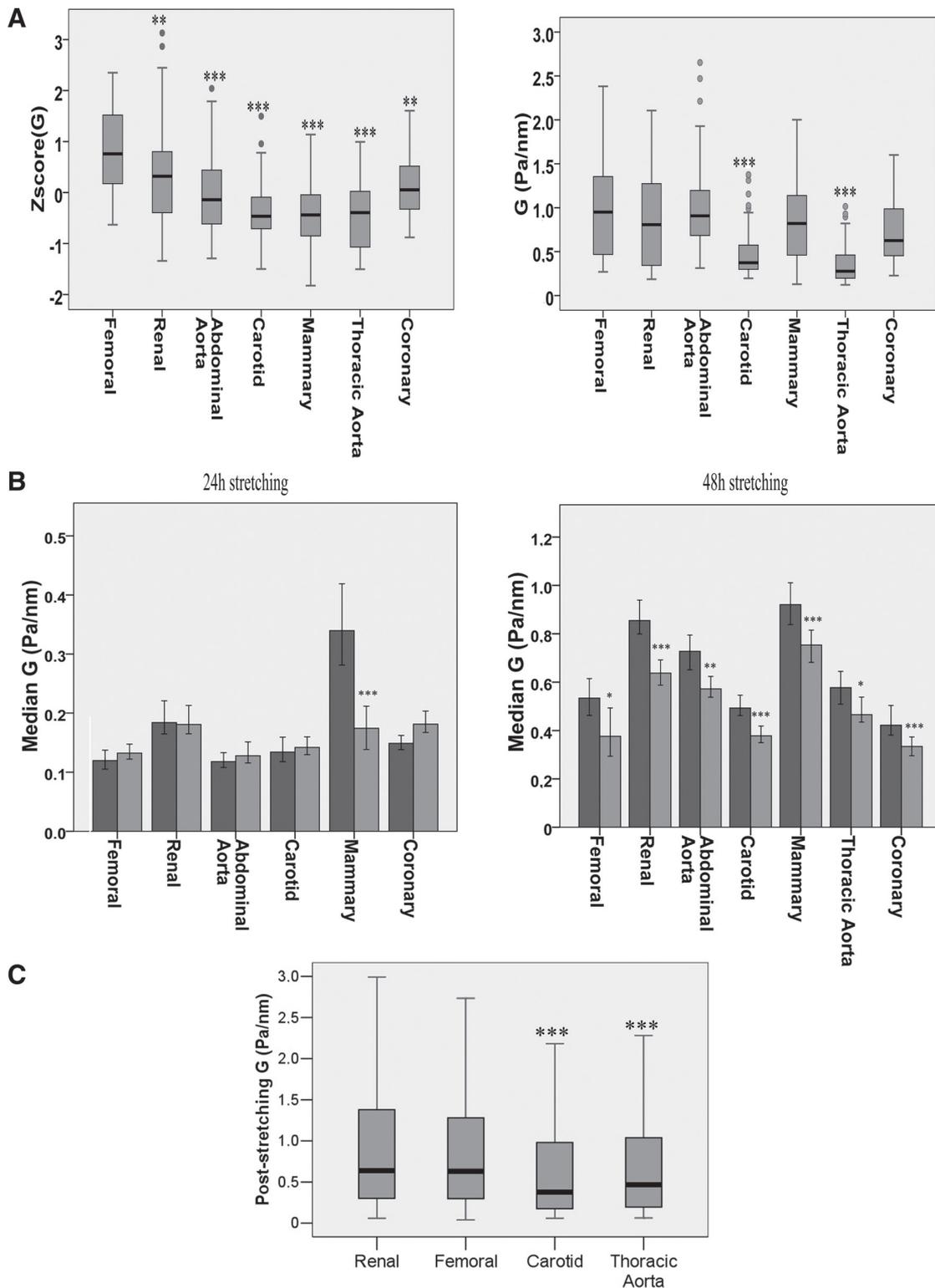
The present study is the first to confirm the heterogeneity of VSMCs mechanics along arterial tree through direct measuring of cytoplasm rigidity and through evaluation of global protein

Fig. 5. VSMC rigidity varied according to the position in arterial tree (Z-score G and G, Kruskal-Wallis, $P < 0.001$). A: Z-scores of the variable G for each artery are disposed in the first graph and, in the second graph, raw data (G) is presented. In both graphs, arteries are displayed in descending order of distance from the heart (femoral, renal, abdominal aorta, carotid, mammary, thoracic aorta, and coronary), and an increase in VSMC rigidity as their vessel of origin moves away from the heart is noticed. When those mechanical data are interpreted taking into consideration previously exposed vessel anatomy, it is clear that VSMCs from arteries with less elastic fibers and less surrounding ECM (femoral and renal) were stiffer compared with the thoracic aorta VSMCs. In both graphs, asterisks mark the post hoc comparisons of the arteries in relation to the femoral artery. B: to evaluate if mechanical differences found between VSMCs from different arteries were due to the differences in regional mechanical forces, we subjected cells to 24- and 48-h-cyclic stretching protocol. After 24 h of stretching, only mammary VSMCs acquired a less rigid behavior. However, after 48 h of stretching, all VSMCs were less rigid compared with their controls (black bars represent median G of control non-stretched VSMC and gray bars represent median G of stretched VSMC, error bars are 95% confidence interval). C: as it was demonstrated that cyclic stretching is a regulator of VSMC mechanical phenotype, we compared VSMC rigidity after 48-h stretching between 4 different vessels (femoral, renal, carotid, and thoracic aorta) to evaluate if the mechanical differences we initially found persisted after a course of peristalsis, which would represent a more physiological in vitro model. We chose four vessels to assure that VSMC were stretched within the same experiment, avoiding biased comparisons. The persistence of mechanical differences between VSMCs from different origins is shown in the graph, in which asterisks mark the post hoc comparisons of the arteries in relation to the femoral artery. This finding reinforces that VSMC rigidity varies according to their position in arterial tree.

expression, as well as the first to identify regional forces and ECM as possible modulating factors of this specific phenotype. Previous studies that have addressed the heterogeneity of SMCs from different origins mostly compared VSMCs with visceral SMCs (23) or arterial VSMCs vs. venous VSMCs (28)

and relied mainly on evaluating expression of SMC marker genes and their transcription factors (45).

The observation that VSMCs are mechanically different along arterial tree is indeed relevant, as it goes against indiscriminate labeling of VSMC mechanical and synthetic behav-



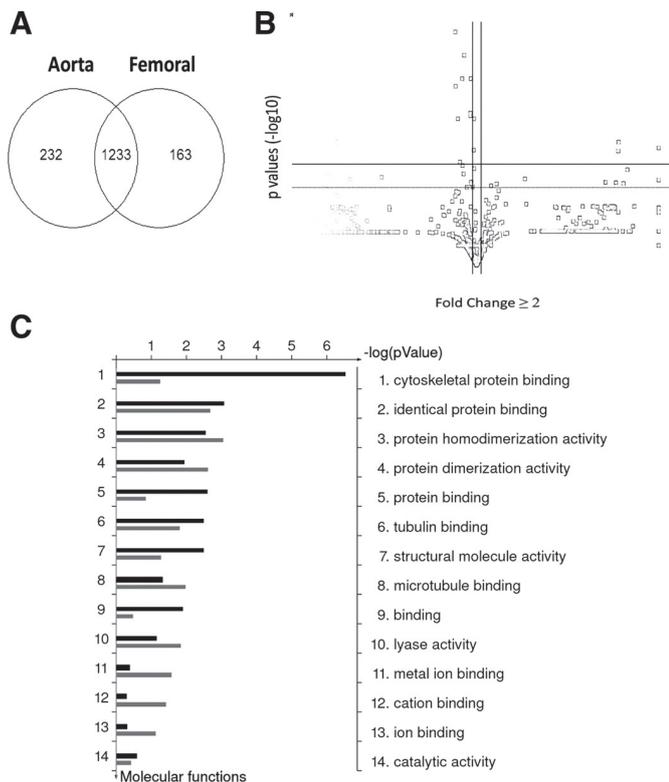


Fig. 6. Aorta VSMCs were compared with femoral VSMCs using quantitative shotgun proteomics. **A**: 1,628 proteins were identified/quantified (232 exclusively in aorta VSMC and 168 exclusively in femoral VSMC). **B**: volcano plot analysis: 10 proteins were overexpressed in aorta VSMC and they were mainly related to the cytoskeleton structure and organization ($P < 0.05$). **C**: molecular functions of aorta differential proteins are quantitatively exposed in this graph (black: aorta VSMC, gray: femoral VSMC). The amount of proteins related to cytoskeleton organization expressed by aorta VSMC was strikingly higher than that expressed by femoral VSMC. This finding is consistent with our results showing the dichotomous mechanical behavior of VSMC from these 2 territories.

iors, both in physiological and pathological situations. VSMCs from different vessels synthesize ECM quantitatively and qualitatively heterogeneously, depending on the regional blood flow during the arterial tree development phase. After this period, VSMCs classically assume a quiescent, low-proliferative and contractile phenotype (29). Considering that static VSMC mechanics are considerably variable among different arteries, classifying all of them as “contractile” does not seem to be correct. Even the concept of “phenotypic switching,” commonly used to explain the assumption of a more proliferative and synthetic behavior of VSMCs in pathological situations (19), needs to be considered carefully, as it does not foresee heterogeneous cell mechanics and, consequently, does not take into consideration a plausible heterogeneity in this process along the arterial tree.

The embryological origin of vessels is always pointed out as one of the things responsible for VSMC phenotypical diversity, as cells from vessels of distinct embryological origin differ in terms of morphology, growth, and response to growth factors (40). Differences regarding VSMC mechanical behavior, as demonstrated by our results, may also be related to the embryological origin of the vessels: thoracic aorta and mammary, whose VSMCs were less rigid, are para-axial mesoderm and

cranial neural crest derived, while the abdominal aorta and its branches, whose VSMCs were more elastic, are derived from splanchnic mesoderm. However, based on our results, ECM and circumferential stress also play a role in determining VSMC mechanical phenotypes.

We found a clear correlation between VSMC rigidity and the amount/composition of ECM within the media layer. There was a negative correlation between the amount of medial ECM and VSMC rigidity, the thoracic aorta being the vessel with the greatest amount of surrounding ECM and with the least elastic VSMC. The progressive decrease in elastin content as vessels moved away from the heart was accompanied by an increase in VSMC rigidity towards the same direction. One hypothesis is that VSMC mechanical phenotype may be influenced by ECM properties. Indeed, elasticity and thickness of ECM are known to influence cytoskeletal organization and cell mechanics: rigid ECM leads to formation of large and stable focal adhesions, whereas soft matrices lead to the establishment of transient ones (4, 36). Our ultrastructural analyses of VSMCs are in accordance with these previous observations, as cells from the thoracic aorta (higher amount of elastin) exhibited smaller focal adhesion compared with cells from the femoral artery (lower amount of elastin).

The presence of elastin within ECM has been previously demonstrated to regulate VSMC functioning, as it positively influences VSMC cytoskeletal organization and negatively influences their proliferative rate (20). In our analysis, we found neither significant differences regarding stress fiber orientation between the territories, nor significant differences regarding proliferative behavior. Even though cell adhesion to ECM is known to regulate cytoskeleton organization mainly through focal adhesion plasticity (36) an alternative explanation to our findings is that, as VSMC secrete ECM during development, the correlation of composition/amount of ECM and VSMC mechanics may be reflective of a common modulator of both parameters.

Circumferential stress applied towards the vessels by blood flow influences VSMC mechanical heterogeneity, as chronic cyclic axial stretching at a fixed intensity was able to change static VSMC rigidity in our experiments, this response being homogeneous for all studied vessels. Stretching conditions simulated in our experiments are best compared with the condition that VSMCs from elastic vessels undergo during physiological situations. VSMCs from the thoracic aorta, which undergoes the most intense circumferential stress, exhibited a static compliant profile. Femoral and renal VSMCs, which were more rigid, assumed a more compliant static behavior after cyclic stretching, shedding light on circumferential stress as a determinant of VSMC mechanical heterogeneity.

Cyclic stretching is known to stimulate some SMC signaling pathways (GTPase Rac, protein kinase A, protein kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase) (21, 27) and to increase both the ECM synthesis (26) and the expression of SMC contractile marker-genes proteins (alpha-actin, sm-22, calponin, and smooth muscle myosin heavy chain) (38). Also, stretching may lead to reorientation of stress fibers, depending on the cell type, substrate characteristics and intensity of deformation (9) and may change VSMC proliferative behavior (7). However, most studies assess the final results of cyclic stretching-induced cytoskeletal reorganization. It must be highlighted that, to fluidize and resolidify their cytoplasm during

cyclic deformation, VSMCs suffer assembly/disassembly of their stress fibers, as well as growth and disruption of focal adhesions (36). Therefore, the process is much more dynamic.

Our proteomics analysis of VSMCs with opposing mechanical behaviors (thoracic aorta and femoral) clearly demonstrates that these cells quantitatively differ in terms of proteins involved in the processes of muscle contraction and cytoskeleton organization. VSMCs from the thoracic aorta expressed a significantly higher amount of cytoskeleton proteins, both constituents of cytoskeleton structure itself (actin, microtubule-associated protein) and members of focal adhesions (vinculin, alpha-actinin). On the contrary, VSMCs from the femoral artery expressed significantly more proteins involved in cell cycle network. As presented earlier, the thoracic aorta's VSMC had a static mechanical behavior more compliant than femoral VSMCs, and in ultrastructural analysis the thoracic aorta had significantly smaller membrane focal adhesions. Both thoracic aorta and femoral arteries had similar amounts of cells in each stage of cell cycle. The common sense understanding would be that VSMCs with higher amounts of cytoskeletal proteins have a more rigid cytoplasm and that VSMCs with higher amounts of cell cycle proteins proliferate more. In our observations, this extrapolation proved not to be true, and carefully studying cell physiology before the interpretation of any proteomics data is essential to avoid inaccuracies.

The organization of actin stress fibers is highly dynamic and involves a large array of actin-binding proteins and focal-adhesion associated proteins, which regulate stress fibers assembly and stability, allowing cells to properly adapt to different mechanical forces (39). Even if the amount of actin is kept constant, cytoplasm rigidity can change due to modifications in the rate of stress fiber assembly (44) and focal adhesion enlargement, which is dependent on mechanical stress (34, 36). In our results, VSMCs from the aorta were less rigid than VSMCs from femoral, but the former presented with smaller focal adhesions. Even though we could not detect differences regarding stress fibers alignment, VSMCs from aorta and femoral were heterogeneous regarding their shape, which may indirectly reflect their cytoskeleton organization.

Based on previous observations of Trepat et al. (41) and Chen et al. (8), cell response to stretch is cytoplasm fluidization. Considering mechanical forces imposed by blood flow in the thoracic aorta, VSMCs from this area experience both fluidization during systole and resolidification during diastole. The quick and effective reorganization of the cytoskeleton, especially through focal adhesion plasticity, allows VSMCs to meet ECM cyclic deformation due to circumferential stress. As this process may be less intense in peripheral arteries, it may justify the lower expression of proteins related to cytoskeletal organization within their VSMCs.

Finally, the contribution of VSMC rigidity to the resultant mechanical property of any vessel has always been considered nonsignificant (1). This concept has recently begun to change, as there is evidence that senescent arterial rigidity may be due to the stiffening of VSMCs (32), that selective removal of VSMCs from tunica media may alter vessel morphology (24), and that mutations in the myosin heavy chain (MYH11) may alter aorta contractility due to modifications in the VSMC cytoskeleton (25). In our experiments, VSMC-measured rigidity was consistent with previously described compliance and ECM elasticity of their vessels of origin, so that a more rigid

behavior was observed in VSMCs from more rigid vessels that exhibited lower elastin content. However, a causal relationship cannot be established, as this subject was not addressed directly in the present study.

Our study has some limitations. The first is that the regulatory function that endothelial cells may exert on VSMC mechanical behavior was not specifically studied. It is known that this influence may be mostly related to changes in shear stress, which are directly sensed by these cells (37). VSMC behavior in vitro may not be completely extrapolated to their properties in vivo, but restricting culture passage and selecting a primary culture may have helped in preserving cell phenotype (10). Vessel intrinsic tone, which is regulated by adrenergic stimulus (46), may influence VSMC rigidity by modifying substrate stiffness (3). In our study, the influence of this factor on VSMC behavior was not directly evaluated. Finally, our choice in focusing on the media layer was an attempt to evaluate the environment surrounding terminally differentiated VSMCs, which might have a direct influence on their behavior, but it is known that adventitia may also contribute to vessel mechanics.

In conclusion, VSMCs are heterogeneous in terms of viscoelasticity and the amount of cytoskeletal proteins expressed along the arterial tree, their mechanical phenotype possibly being influenced by ECM characteristics (amount and composition) as well as being modulated by cyclic circumferential stress applied to vessel walls by blood flow.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Sônia Regina Yokomizo, Márcio José Chaves, and Ana Lúcia Garippo for the technical help.

GRANTS

This work was supported by Grant No. 2012/21103-0, São Paulo Research Foundation (FAPESP), and Fleury Group, São Paulo, Brazil.

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the author(s).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Author contributions: C.L.D., J.E.K., A.M.A., and A.C.P. conception and design of research; C.L.D., G.V., I.S.W., L.C.G.C., R.D., J.M.d.M.-L.F., V.M.C., and K.H.M.C. performed experiments; C.L.D., G.V., E.H.Z., L.C.G.C., R.D., J.M.d.M.-L.F., V.M.C., K.H.M.C., A.M.A., and A.C.P. analyzed data; C.L.D., G.V., E.H.Z., L.C.G.C., R.D., J.M.d.M.-L.F., V.M.C., K.H.M.C., J.E.K., A.M.A., and A.C.P. interpreted results of experiments; C.L.D. and I.S.W. prepared figures; C.L.D. drafted manuscript; C.L.D., J.E.K., and A.C.P. edited and revised manuscript; E.H.Z., J.E.K., and A.C.P. approved final version of manuscript.

REFERENCES

- Berry CL, Greenwald SE, Rivett JF. Static mechanical properties of the developing and mature rat aorta. *Cardiovasc Res* 9: 669–678, 1975.
- Bieler FH, Ott CE, Thompson MS, Seidel R, Ahrens S, Epari DR, Wilkening U, Schaser KD, Mundlos S, Duda GN. Biaxial cell stimulation: A mechanical validation. *J Biomech* 42: 1692–1696, 2009.
- Brown XQ, Bartolak-Suki E, Williams C, Walker ML, Weaver VM, Wong JY. Effect of substrate stiffness and PDGF on the behavior of vascular smooth muscle cells: implications for atherosclerosis. *J Cell Physiol* 225: 115–122, 2010.
- Bryant PW, Zheng Q, Pumiglia KM. Focal adhesion kinase is a phospho-regulated repressor of Rac and proliferation in human endothelial cells. *Biol Open* 1: 723–730, 2012.
- Camargo M, Intasqui Lopes P, Del Giudice PT, Carvalho VM, Cardozo KH, Andreoni C, Fraietta R, Bertolla RP. Unbiased label-free quantitative proteomic profiling and enriched proteomic pathways in

- seminal plasma of adult men before and after varicocelelectomy. *Hum Reprod* 28: 33–46, 2013.
6. Campos LC, Miyakawa AA, Barauna VG, Cardoso L, Borin TF, Dallan LA, Krieger JE. Induction of CRP3/MLP expression during vein arterialization is dependent on stretch rather than shear stress. *Cardiovasc Res* 83: 140–147, 2009.
 7. Chapman GB, Durante W, Hellums JD, Schafer AI. Physiological cyclic stretch causes cell cycle arrest in cultured vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278: H748–H754, 2000.
 8. Chen C, Krishnan R, Zhou E, Ramachandran A, Tambe D, Rajendran K, Adam RM, Deng L, Fredberg JJ. Fluidization and resolidification of the human bladder smooth muscle cell in response to transient stretch. *PLoS One* 5: e12035, 2010.
 9. Colo GP, Hernandez-Varas P, Lock J, Bartolome RA, Arellano-Sanchez N, Stromblad S, Teixido J. Focal adhesion disassembly is regulated by a RIAM to MEK-1 pathway. *J Cell Sci* 125: 5338–5352, 2012.
 10. Dinardo CL, Venturini G, Omae SV, Zhou EH, da Motta-Leal-Filho JM, Dariolli R, Krieger JE, Alencar AM, Costa Pereira A. Vascular smooth muscle cells exhibit a progressive loss of rigidity with serial culture passaging. *Biorheology* 49: 365–373, 2012.
 11. Doran AC, Meller N, McNamara CA. Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28: 812–819, 2008.
 12. Fabry B, Maksym GN, Shore SA, Moore PE, Panettieri RA, Butler JP, Fredberg JJ. Selected contribution: time course and heterogeneity of contractile responses in cultured human airway smooth muscle cells. *J Appl Physiol* 91: 986–994, 2001.
 13. Gerrity RG, Cliff WJ. The aortic tunica media of the developing rat. I. Quantitative stereologic and biochemical analysis. *Lab Invest* 32: 585–600, 1975.
 14. Halayko AJ, Solway J. Molecular mechanisms of phenotypic plasticity in smooth muscle cells. *J Appl Physiol* 90: 358–368, 2001.
 15. Hao H, Ropraz P, Verin V, Camenzind E, Geinoz A, Pepper MS, Gabbiani G, Bochaton-Piallat ML. Heterogeneity of smooth muscle cell populations cultured from pig coronary artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 1093–1099, 2002.
 16. Harkness ML, Harkness RD, McDonald DA. The collagen and elastin content of the arterial wall in the dog. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 146: 541–551, 1957.
 17. Holzapfel GA, Ogden RW. Modelling the layer-specific three-dimensional residual stresses in arteries, with an application to the human aorta. *J R Soc Interface* 7: 787–799, 2010.
 18. Jackson CL, Schwartz SM. Pharmacology of smooth muscle cell replication. *Hypertension* 20: 713–736, 1992.
 19. Jin L, Kern MJ, Otey CA, Wamhoff BR, Somlyo AV. Angiotensin II, focal adhesion kinase, and PRX1 enhance smooth muscle expression of lipoma preferred partner and its newly identified binding partner palladin to promote cell migration. *Circ Res* 100: 817–825, 2007.
 20. Karnik SK, Brooke BS, Bayes-Genis A, Sorensen L, Wythe JD, Schwartz RS, Keating MT, Li DY. A critical role for elastin signaling in vascular morphogenesis and disease. *Development* 130: 411–423, 2003.
 21. Katsumi A, Milanini J, Kiosses WB, del Pozo MA, Kaunas R, Chien S, Hahn KM, Schwartz MA. Effects of cell tension on the small GTPase Rac. *J Cell Biol* 158: 153–164, 2002.
 22. Kawasaki T, Sasayama S, Yagi S, Asakawa T, Hirai T. Non-invasive assessment of the age related changes in stiffness of major branches of the human arteries. *Cardiovasc Res* 21: 678–687, 1987.
 23. Kim S, Ip HS, Lu MM, Clendenin C, Parmacek MS. A serum response factor-dependent transcriptional regulatory program identifies distinct smooth muscle cell sublineages. *Mol Cell Biol* 17: 2266–2278, 1997.
 24. Kochova P, Kuncova J, Svirglerova J, Cimrman R, Miklikova M, Liska V, Tonar Z. The contribution of vascular smooth muscle, elastin and collagen on the passive mechanics of porcine carotid arteries. *Physiol Meas* 33: 1335–1351.
 25. Kuang SQ, Kwartler CS, Byanova KL, Pham J, Gong L, Prakash SK, Huang J, Kamm KE, Stull JT, Sweeney HL, Milewicz DM. Rare, nonsynonymous variant in the smooth muscle-specific isoform of myosin heavy chain, MYH11, R247C, alters force generation in the aorta and phenotype of smooth muscle cells. *Circ Res* 110: 1411–1422.
 26. Lee RT, Yamamoto C, Feng Y, Potter-Perigo S, Briggs WH, Landschulz KT, Turi TG, Thompson JF, Libby P, Wight TN. Mechanical strain induces specific changes in the synthesis and organization of proteoglycans by vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 276: 13847–13851, 2001.
 27. Li W, Chen Q, Mills I, Sumpio BE. Involvement of S6 kinase and p38 mitogen activated protein kinase pathways in strain-induced alignment and proliferation of bovine aortic smooth muscle cells. *J Cell Physiol* 195: 202–209, 2003.
 28. Lilly B, Olson EN, Beckerle MC. Identification of a CARg box-dependent enhancer within the cysteine-rich protein 1 gene that directs expression in arterial but not venous or visceral smooth muscle cells. *Dev Biol* 240: 531–547, 2001.
 29. Lu X, Zhao JB, Wang GR, Gregersen H, Kassab GS. Remodeling of the zero-stress state of femoral arteries in response to flow overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H1547–H1559, 2001.
 30. Mijailovich SM, Kojic M, Zivkovic M, Fabry B, Fredberg JJ. A finite element model of cell deformation during magnetic bead twisting. *J Appl Physiol* 93: 1429–1436, 2002.
 31. Park CY, Tambe D, Alencar AM, Trepast X, Zhou EH, Millet E, Butler JP, Fredberg JJ. Mapping the cytoskeletal prestress. *Am J Physiol Cell Physiol* 298: C1245–C1252, 2010.
 32. Qiu H, Zhu Y, Sun Z, Trzeciakowski JP, Gansner M, Depre C, Resuello RR, Natividad FF, Hunter WC, Genin GM, Elson EL, Vatner DE, Meininger GA, Vatner SF. Short communication: vascular smooth muscle cell stiffness as a mechanism for increased aortic stiffness with aging. *Circ Res* 107: 615–619, 2010.
 33. Reymond P, Bohraus Y, Perren F, Lazeyras F, Stergiopoulos N. Validation of a patient-specific one-dimensional model of the systemic arterial tree. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301: H1173–H1182, 2011.
 34. Riveline D, Zamir E, Balaban NQ, Schwarz US, Ishizaki T, Narumiya S, Kam Z, Geiger B, Bershadsky AD. Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. *J Cell Biol* 153: 1175–1186, 2001.
 35. Rosenquist TH, McCoy JR, Waldo KL, Kirby ML. Origin and propagation of elastogenesis in the developing cardiovascular system. *Anat Rec* 221: 860–871, 1988.
 36. Saphirstein RJ, Gao YZ, Jensen MH, Gallant CM, Vetterkind S, Moore JR, Morgan KG. The focal adhesion: a regulated component of aortic stiffness. *PLoS One* 8: e62461, 2013.
 37. Scott D, Tan Y, Shandas R, Stenmark KR, Tan W. High pulsatility flow stimulates smooth muscle cell hypertrophy and contractile protein expression. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 304: L70–L81, 2013.
 38. Thakar RG, Cheng Q, Patel S, Chu J, Nasir M, Liepmann D, Komvopoulos K, Li S. Cell-shape regulation of smooth muscle cell proliferation. *Biophys J* 96: 3423–3432, 2009.
 39. Tojkander S, Gateva G, Lappalainen P. Actin stress fibers—assembly, dynamics and biological roles. *J Cell Sci* 125: 1855–1864, 2012.
 40. Topouzis S, Majesky MW. Smooth muscle lineage diversity in the chick embryo. Two types of aortic smooth muscle cell differ in growth and receptor-mediated transcriptional responses to transforming growth factor-beta. *Dev Biol* 178: 430–445, 1996.
 41. Trepast X, Deng L, An SS, Navajas D, Tschumperlin DJ, Gerthoffer WT, Butler JP, Fredberg JJ. Universal physical responses to stretch in the living cell. *Nature* 447: 592–595, 2007.
 42. Wagenseil JE, Mecham RP. Vascular extracellular matrix and arterial mechanics. *Physiol Rev* 89: 957–989, 2009.
 43. Watanabe I. Fine structure of lamellated nerve endings in the gingiva of man and the Cebus apella monkey. *Okajimas Folia Anat Jpn* 59: 181–198, 1982.
 44. Wei S, Gao X, Du J, Su J, Xu Z. Angiogenin enhances cell migration by regulating stress fiber assembly and focal adhesion dynamics. *PLoS One* 6: e28797, 2011.
 45. Yoshida T, Owens GK. Molecular determinants of vascular smooth muscle cell diversity. *Circ Res* 96: 280–291, 2005.
 46. Zacharia J, Mauban JR, Raina H, Fisher SA, Wier WG. High vascular tone of mouse femoral arteries in vivo is determined by sympathetic nerve activity via alpha1A- and alpha1D-adrenoceptor subtypes. *PLoS One* 8: e65969, 2013.
 47. Zhou EH, Krishnan R, Stamer WD, Perkumas KM, Rajendran K, Nabhan JF, Lu Q, Fredberg JJ, Johnson M. Mechanical responsiveness of the endothelial cell of Schlemm's canal: scope, variability and its potential role in controlling aqueous humour outflow. *J R Soc Interface* 9: 1144–1155, 2012.

9. Referências Bibliográficas

1. Wagenseil JE, Mecham RP. Vascular extracellular matrix and arterial mechanics. *Physiological reviews*. 2009;89(3):957-89.
2. Schwartz SM, Benditt EP. Studies on aortic intima. I. Structure and permeability of rat thoracic aortic intima. *The American journal of pathology*. 1972;66(2):241-64.
3. Coll-Bonfill N, Musri MM, Ivo V, Barbera JA, Tura-Ceide O. Transdifferentiation of endothelial cells to smooth muscle cells play an important role in vascular remodelling. *American journal of stem cells*. 2015;4(1):13-21.
4. Hopkins PN. Molecular biology of atherosclerosis. *Physiological reviews*. 2013;93(3):1317-542.
5. Berry CL, Sosa-Melgarejo JA, Greenwald SE. The relationship between wall tension, lamellar thickness, and intercellular junctions in the fetal and adult aorta: its relevance to the pathology of dissecting aneurysm. *The Journal of pathology*. 1993;169(1):15-20.
6. Berry CL, Looker T, Germain J. The growth and development of the rat aorta. I. Morphological aspects. *Journal of anatomy*. 1972;113(Pt 1):1-16.
7. Greenwald SE, Moore JE, Jr., Rachev A, Kane TP, Meister JJ. Experimental investigation of the distribution of residual strains in the artery wall. *Journal of biomechanical engineering*. 1997;119(4):438-44.
8. Roach MR, Burton AC. The reason for the shape of the distensibility curves of arteries. *Canadian journal of biochemistry and physiology*. 1957;35(8):681-90.
9. Gibbons CA, Shadwick RE. Functional similarities in the mechanical design of the aorta in lower vertebrates and mammals. *Experientia*. 1989;45(11-12):1083-8.
10. Shadwick RE. Mechanical design in arteries. *The Journal of experimental biology*. 1999;202(Pt 23):3305-13.
11. Stenmark KR, Nozik-Grayck E, Gerasimovskaya E, Anwar A, Li M, Riddle S, et al. The adventitia: Essential role in pulmonary vascular remodeling. *Comprehensive Physiology*. 2011;1(1):141-61.
12. Burton AC. Relation of structure to function of the tissues of the wall of blood vessels. *Physiological reviews*. 1954;34(4):619-42.
13. Geudens I, Gerhardt H. Coordinating cell behaviour during blood vessel formation. *Development*. 2011;138(21):4569-83.
14. Hungerford JE, Little CD. Developmental biology of the vascular smooth muscle cell: building a multilayered vessel wall. *Journal of vascular research*. 1999;36(1):2-27.

15. Mecham RP, Stenmark KR, Parks WC. Connective tissue production by vascular smooth muscle in development and disease. *Chest*. 1991;99(3 Suppl):43S-7S.
16. Gabbiani G, Schmid E, Winter S, Chaponnier C, de Ckhasstonay C, Vandekerckhove J, et al. Vascular smooth muscle cells differ from other smooth muscle cells: predominance of vimentin filaments and a specific alpha-type actin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1981;78(1):298-302.
17. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 1997;386(6626):671-4.
18. van der Loop FT, Schaart G, Timmer ED, Ramaekers FC, van Eys GJ. Smoothelin, a novel cytoskeletal protein specific for smooth muscle cells. *The Journal of cell biology*. 1996;134(2):401-11.
19. Topouzis S, Majesky MW. Smooth muscle lineage diversity in the chick embryo. Two types of aortic smooth muscle cell differ in growth and receptor-mediated transcriptional responses to transforming growth factor-beta. *Developmental biology*. 1996;178(2):430-45.
20. Rosenquist TH, Beall AC, Modis L, Fishman R. Impaired elastic matrix development in the great arteries after ablation of the cardiac neural crest. *The Anatomical record*. 1990;226(3):347-59.
21. Gadson PF, Jr., Rossignol C, McCoy J, Rosenquist TH. Expression of elastin, smooth muscle alpha-actin, and c-jun as a function of the embryonic lineage of vascular smooth muscle cells. *In vitro cellular & developmental biology Animal*. 1993;29A(10):773-81.
22. Murphy ME, Carlson EC. An ultrastructural study of developing extracellular matrix in vitelline blood vessels of the early chick embryo. *The American journal of anatomy*. 1978;151(3):345-75.
23. Drushel RF, Pechak DG, Caplan AI. The anatomy, ultrastructure and fluid dynamics of the developing vasculature of the embryonic chick wing bud. *Cell differentiation*. 1985;16(1):13-28.
24. Gerrity RG, Cliff WJ. The aortic tunica media of the developing rat. I. Quantitative stereologic and biochemical analysis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1975;32(5):585-600.
25. Langille BL, O'Donnell F. Reductions in arterial diameter produced by chronic decreases in blood flow are endothelium-dependent. *Science*. 1986;231(4736):405-7.
26. Guyton JR, Hartley CJ. Flow restriction of one carotid artery in juvenile rats inhibits growth of arterial diameter. *The American journal of physiology*. 1985;248(4 Pt 2):H540-6.

27. Davidson JM, Hill KE, Mason ML, Giro MG. Longitudinal gradients of collagen and elastin gene expression in the porcine aorta. *The Journal of biological chemistry*. 1985;260(3):1901-8.
28. Li DY, Brooke B, Davis EC, Mecham RP, Sorensen LK, Boak BB, et al. Elastin is an essential determinant of arterial morphogenesis. *Nature*. 1998;393(6682):276-80.
29. Weiser MC, Belknap JK, Grieshaber SS, Kinsella MG, Majack RA. Developmental regulation of perlecan gene expression in aortic smooth muscle cells. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 1996;15(5):331-40.
30. Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiological reviews*. 2004;84(3):767-801.
31. Lacolley P, Regnault V, Nicoletti A, Li Z, Michel JB. The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: a cell that can take on multiple roles. *Cardiovascular research*. 2012;95(2):194-204.
32. Thyberg J, Hedin U, Sjolund M, Palmberg L, Bottger BA. Regulation of differentiated properties and proliferation of arterial smooth muscle cells. *Arteriosclerosis*. 1990;10(6):966-90.
33. Owens GK. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiological reviews*. 1995;75(3):487-517.
34. Thyberg J. Phenotypic modulation of smooth muscle cells during formation of neointimal thickenings following vascular injury. *Histology and histopathology*. 1998;13(3):871-91.
35. Turley EA. Extracellular matrix remodeling: multiple paradigms in vascular disease. *Circulation research*. 2001;88(1):2-4.
36. Frid MG, Moiseeva EP, Stenmark KR. Multiple phenotypically distinct smooth muscle cell populations exist in the adult and developing bovine pulmonary arterial media in vivo. *Circulation research*. 1994;75(4):669-81.
37. Han CI, Campbell GR, Campbell JH. Circulating bone marrow cells can contribute to neointimal formation. *Journal of vascular research*. 2001;38(2):113-9.
38. Yoshida T, Owens GK. Molecular determinants of vascular smooth muscle cell diversity. *Circulation research*. 2005;96(3):280-91.
39. Mack CP, Thompson MM, Lawrenz-Smith S, Owens GK. Smooth muscle alpha-actin CARG elements coordinate formation of a smooth muscle cell-selective, serum response factor-containing activation complex. *Circulation research*. 2000;86(2):221-32.

40. Tang Y, Yang X, Friesel RE, Vary CP, Liaw L. Mechanisms of TGF-beta-induced differentiation in human vascular smooth muscle cells. *Journal of vascular research*. 2011;48(6):485-94.
41. Corjay MH, Thompson MM, Lynch KR, Owens GK. Differential effect of platelet-derived growth factor- versus serum-induced growth on smooth muscle alpha-actin and nonmuscle beta-actin mRNA expression in cultured rat aortic smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry*. 1989;264(18):10501-6.
42. Jawien A, Bowen-Pope DF, Lindner V, Schwartz SM, Clowes AW. Platelet-derived growth factor promotes smooth muscle migration and intimal thickening in a rat model of balloon angioplasty. *The Journal of clinical investigation*. 1992;89(2):507-11.
43. Owens GK, Geisterfer AA, Yang YW, Komoriya A. Transforming growth factor-beta-induced growth inhibition and cellular hypertrophy in cultured vascular smooth muscle cells. *The Journal of cell biology*. 1988;107(2):771-80.
44. Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circulation research*. 2002;90(3):251-62.
45. Xin M, Small EM, Sutherland LB, Qi X, McAnally J, Plato CF, et al. MicroRNAs miR-143 and miR-145 modulate cytoskeletal dynamics and responsiveness of smooth muscle cells to injury. *Genes & development*. 2009;23(18):2166-78.
46. Manabe I, Owens GK. Recruitment of serum response factor and hyperacetylation of histones at smooth muscle-specific regulatory regions during differentiation of a novel P19-derived in vitro smooth muscle differentiation system. *Circulation research*. 2001;88(11):1127-34.
47. Alexander MR, Owens GK. Epigenetic control of smooth muscle cell differentiation and phenotypic switching in vascular development and disease. *Annual review of physiology*. 2012;74:13-40.
48. Cameron A, Davis KB, Green G, Schaff HV. Coronary bypass surgery with internal-thoracic-artery grafts--effects on survival over a 15-year period. *The New England journal of medicine*. 1996;334(4):216-9.
49. Corbin JD, Francis SH. Cyclic GMP phosphodiesterase-5: target of sildenafil. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(20):13729-32.
50. Li L, Miano JM, Mercer B, Olson EN. Expression of the SM22alpha promoter in transgenic mice provides evidence for distinct transcriptional regulatory programs in vascular and visceral smooth muscle cells. *The Journal of cell biology*. 1996;132(5):849-59.

51. Lilly B, Olson EN, Beckerle MC. Identification of a CArG box-dependent enhancer within the cysteine-rich protein 1 gene that directs expression in arterial but not venous or visceral smooth muscle cells. *Developmental biology*. 2001;240(2):531-47.
52. Manabe I, Owens GK. CArG elements control smooth muscle subtype-specific expression of smooth muscle myosin in vivo. *The Journal of clinical investigation*. 2001;107(7):823-34.
53. Bochaton-Piallat ML, Clowes AW, Clowes MM, Fischer JW, Redard M, Gabbiani F, et al. Cultured arterial smooth muscle cells maintain distinct phenotypes when implanted into carotid artery. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2001;21(6):949-54.
54. Scott D, Tan Y, Shandas R, Stenmark KR, Tan W. High pulsatility flow stimulates smooth muscle cell hypertrophy and contractile protein expression. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2013;304(1):L70-81.
55. Thakar RG, Cheng Q, Patel S, Chu J, Nasir M, Liepmann D, et al. Cell-shape regulation of smooth muscle cell proliferation. *Biophysical journal*. 2009;96(8):3423-32.
56. Chapman GB, Durante W, Hellums JD, Schafer AI. Physiological cyclic stretch causes cell cycle arrest in cultured vascular smooth muscle cells. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2000;278(3):H748-54.
57. Lee RT, Yamamoto C, Feng Y, Potter-Perigo S, Briggs WH, Landschulz KT, et al. Mechanical strain induces specific changes in the synthesis and organization of proteoglycans by vascular smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(17):13847-51.
58. MOHAMMAD R. K. MOFRAD RDK. *Cytoskeletal Mechanics MODELS AND MEASUREMENTS*: Cambridge University Press; 2006.
59. Kanchanawong P, Shtengel G, Pasapera AM, Ramko EB, Davidson MW, Hess HF, et al. Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. *Nature*. 2010;468(7323):580-4.
60. Kuo JC. Mechanotransduction at focal adhesions: integrating cytoskeletal mechanics in migrating cells. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2013;17(6):704-12.
61. Yamin R, Morgan KG. Deciphering actin cytoskeletal function in the contractile vascular smooth muscle cell. *The Journal of physiology*. 2012;590(Pt 17):4145-54.
62. Hong Z, Reeves KJ, Sun Z, Li Z, Brown NJ, Meininger GA. Vascular smooth muscle cell stiffness and adhesion to collagen I modified by vasoactive agonists. *PloS one*. 2015;10(3):e0119533.

63. Guo DC, Pannu H, Tran-Fadulu V, Papke CL, Yu RK, Avidan N, et al. Mutations in smooth muscle alpha-actin (ACTA2) lead to thoracic aortic aneurysms and dissections. *Nature genetics*. 2007;39(12):1488-93.
64. Qiu H, Zhu Y, Sun Z, Trzeciakowski JP, Gansner M, Depre C, et al. Short communication: vascular smooth muscle cell stiffness as a mechanism for increased aortic stiffness with aging. *Circulation research*. 2010;107(5):615-9.
65. Kuang SQ, Kwartler CS, Byanova KL, Pham J, Gong L, Prakash SK, et al. Rare, nonsynonymous variant in the smooth muscle-specific isoform of myosin heavy chain, MYH11, R247C, alters force generation in the aorta and phenotype of smooth muscle cells. *Circulation research*. 2012;110(11):1411-22.
66. Sehgel NL, Zhu Y, Sun Z, Trzeciakowski JP, Hong Z, Hunter WC, et al. Increased vascular smooth muscle cell stiffness: a novel mechanism for aortic stiffness in hypertension. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2013;305(9):H1281-7.
67. Vlachopoulos C, Aznaouridis K, Stefanadis C. Prediction of cardiovascular events and all-cause mortality with arterial stiffness: a systematic review and meta-analysis. *Journal of the American College of Cardiology*. 2010;55(13):1318-27.
68. Mitchell GF, Hwang SJ, Vasan RS, Larson MG, Pencina MJ, Hamburg NM, et al. Arterial stiffness and cardiovascular events: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2010;121(4):505-11.
69. Huynh J, Nishimura N, Rana K, Peloquin JM, Califano JP, Montague CR, et al. Age-related intimal stiffening enhances endothelial permeability and leukocyte transmigration. *Science translational medicine*. 2011;3(112):112ra22.
70. Levenson J, Simon AC, Cambien FA, Beretti C. Cigarette smoking and hypertension. Factors independently associated with blood hyperviscosity and arterial rigidity. *Arteriosclerosis*. 1987;7(6):572-7.
71. Giannattasio C, Mangoni AA, Failla M, Carugo S, Stella ML, Stefanoni P, et al. Impaired radial artery compliance in normotensive subjects with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 1996;124(2):249-60.
72. Salomaa V, Riley W, Kark JD, Nardo C, Folsom AR. Non-insulin-dependent diabetes mellitus and fasting glucose and insulin concentrations are associated with arterial stiffness indexes. The ARIC Study. *Atherosclerosis Risk in Communities Study*. *Circulation*. 1995;91(5):1432-43.
73. Blacher J, Asmar R, Djane S, London GM, Safar ME. Aortic pulse wave velocity as a marker of cardiovascular risk in hypertensive patients. *Hypertension*. 1999;33(5):1111-7.

74. Giannattasio C, Failla M, Stella ML, Mangoni AA, Carugo S, Pozzi M, et al. Alterations of radial artery compliance in patients with congestive heart failure. *The American journal of cardiology*. 1995;76(5):381-5.
75. London GM, Marchais SJ, Safar ME, Genest AF, Guerin AP, Metivier F, et al. Aortic and large artery compliance in end-stage renal failure. *Kidney international*. 1990;37(1):137-42.
76. Jia G, Aroor AR, DeMarco VG, Martinez-Lemus LA, Meininger GA, Sowers JR. Vascular stiffness in insulin resistance and obesity. *Frontiers in physiology*. 2015;6:231.
77. Osborne-Pellegrin M, Labat C, Mercier N, Challande P, Lacolley P. Changes in aortic stiffness related to elastic fiber network anomalies in the Brown Norway rat during maturation and aging. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2010;299(1):H144-52.
78. Coutinho T, Borlaug BA, Pellikka PA, Turner ST, Kullo IJ. Sex differences in arterial stiffness and ventricular-arterial interactions. *Journal of the American College of Cardiology*. 2013;61(1):96-103.
79. Mitchell GF, Gudnason V, Launer LJ, Aspelund T, Harris TB. Hemodynamics of increased pulse pressure in older women in the community-based Age, Gene/Environment Susceptibility-Reykjavik Study. *Hypertension*. 2008;51(4):1123-8.
80. Morris AA, Patel RS, Binongo JN, Poole J, Mheid IA, Ahmed Y, et al. Racial differences in arterial stiffness and microcirculatory function between Black and White Americans. *Journal of the American Heart Association*. 2013;2(2):e002154.
81. Stein CM, Lang CC, Singh I, He HB, Wood AJ. Increased vascular adrenergic vasoconstriction and decreased vasodilation in blacks. Additive mechanisms leading to enhanced vascular reactivity. *Hypertension*. 2000;36(6):945-51.
82. Stein CM, Lang CC, Nelson R, Brown M, Wood AJ. Vasodilation in black Americans: attenuated nitric oxide-mediated responses. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 1997;62(4):436-43.
83. Adefurin A, Ghimire LV, Kohli U, Muszkat M, Sofowora GG, Paranjape SY, et al. Blacks have a greater sensitivity to alpha1-adrenoceptor-mediated venoconstriction compared with whites. *Hypertension*. 2013;61(4):915-20.
84. Santos PC, Alvim Rde O, Ferreira NE, de Sa Cunha R, Krieger JE, Mill JG, et al. Ethnicity and arterial stiffness in Brazil. *American journal of hypertension*. 2011;24(3):278-84.

85. Karamat FA, Clark JF, Brewster LM. Is creatine kinase the intrinsic factor of smooth muscle enhancing vascular contractility in subjects of african ancestry? *Hypertension*. 2013;62(3):e7.
86. Smulyan H, Lieber A, Safar ME. Hypertension, Diabetes Type II, and Their Association: Role of Arterial Stiffness. *American journal of hypertension*. 2015.
87. Jia G, Aroor AR, Sowers JR. Arterial Stiffness: A Nexus between Cardiac and Renal Disease. *Cardiorenal medicine*. 2014;4(1):60-71.
88. Sell DR, Monnier VM. Molecular basis of arterial stiffening: role of glycation - a mini-review. *Gerontology*. 2012;58(3):227-37.
89. Doronzo G, Russo I, Mattiello L, Anfossi G, Bosia A, Trovati M. Insulin activates vascular endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells: influence of nitric oxide and of insulin resistance. *European journal of clinical investigation*. 2004;34(10):664-73.
90. O'Rourke MF, Mancia G. Arterial stiffness. *Journal of hypertension*. 1999;17(1):1-4.
91. Mitchell GF, Wang N, Palmisano JN, Larson MG, Hamburg NM, Vita JA, et al. Hemodynamic correlates of blood pressure across the adult age spectrum: noninvasive evaluation in the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2010;122(14):1379-86.
92. Mitchell GF. Arterial stiffness and hypertension: chicken or egg? *Hypertension*. 2014;64(2):210-4.
93. Gentner NJ, Weber LP. Secondhand tobacco smoke, arterial stiffness, and altered circadian blood pressure patterns are associated with lung inflammation and oxidative stress in rats. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2012;302(3):H818-25.
94. Hata K, Nakagawa T, Mizuno M, Yanagi N, Kitamura H, Hayashi T, et al. Relationship between smoking and a new index of arterial stiffness, the cardio-ankle vascular index, in male workers: a cross-sectional study. *Tobacco induced diseases*. 2012;10(1):11.
95. Park CY, Tambe D, Alencar AM, Trepast X, Zhou EH, Millet E, et al. Mapping the cytoskeletal prestress. *American journal of physiology Cell physiology*. 2010;298(5):C1245-52.
96. Fabry B, Maksym GN, Shore SA, Moore PE, Panettieri RA, Jr., Butler JP, et al. Selected contribution: time course and heterogeneity of contractile responses in cultured human airway smooth muscle cells. *Journal of applied physiology*. 2001;91(2):986-94.
97. Mijailovich SM, Kojic M, Zivkovic M, Fabry B, Fredberg JJ. A finite element model of cell deformation during magnetic bead twisting. *Journal of applied physiology*. 2002;93(4):1429-36.

98. Dinardo CL, Venturini G, Omae SV, Zhou EH, da Motta-Leal-Filho JM, Dariolli R, et al. Vascular smooth muscle cells exhibit a progressive loss of rigidity with serial culture passaging. *Biorheology*. 2012;49(5-6):365-73.
99. Watanabe I. Fine structure of lamellated nerve endings in the gingiva of man and the *Cebus apella* monkey. *Okajimas folia anatomica Japonica*. 1982;59(2-3):181-98.
100. Bieler FH, Ott CE, Thompson MS, Seidel R, Ahrens S, Epari DR, et al. Biaxial cell stimulation: A mechanical validation. *Journal of biomechanics*. 2009;42(11):1692-6.
101. Holzapfel GA, Ogden RW. Modelling the layer-specific three-dimensional residual stresses in arteries, with an application to the human aorta. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*. 2010;7(46):787-99.
102. Camargo M, Intasqui Lopes P, Del Giudice PT, Carvalho VM, Cardozo KH, Andreoni C, et al. Unbiased label-free quantitative proteomic profiling and enriched proteomic pathways in seminal plasma of adult men before and after varicocelelectomy. *Human reproduction*. 2013;28(1):33-46.
103. Cardena MM, Ribeiro-dos-Santos A, Santos S, Mansur AJ, Pereira AC, Fridman C. Amerindian genetic ancestry is associated with higher survival rates compared to African and European ancestry in Brazilian patients with heart failure. *International journal of cardiology*. 2014;176(2):527-8.
104. Human Genome Diversity Project [Internet]. Stanford Human Genome Center. [21/01/2014]. Disponível: <http://www.hagsc.org/>.
105. International HapMap Project [Internet]. [1/12/2014]. Disponível: <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>.
106. Rosenquist TH, McCoy JR, Waldo KL, Kirby ML. Origin and propagation of elastogenesis in the developing cardiovascular system. *The Anatomical record*. 1988;221(4):860-71.
107. Harkness ML, Harkness RD, McDonald DA. The collagen and elastin content of the arterial wall in the dog. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Containing papers of a Biological character Royal Society*. 1957;146(925):541-51.
108. Reymond P, Bohraus Y, Perren F, Lazeyras F, Stergiopoulos N. Validation of a patient-specific one-dimensional model of the systemic arterial tree. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2011;301(3):H1173-82.
109. Jin L, Kern MJ, Otey CA, Wamhoff BR, Somlyo AV. Angiotensin II, focal adhesion kinase, and PRX1 enhance smooth muscle expression of lipoma preferred partner and its newly identified binding partner palladin to promote cell migration. *Circulation research*. 2007;100(6):817-25.

110. Saphirstein RJ, Gao YZ, Jensen MH, Gallant CM, Vetterkind S, Moore JR, et al. The focal adhesion: a regulated component of aortic stiffness. *PloS one*. 2013;8(4):e62461.
111. Hao H, Ropraz P, Verin V, Camenzind E, Geinoz A, Pepper MS, et al. Heterogeneity of smooth muscle cell populations cultured from pig coronary artery. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2002;22(7):1093-9.
112. Tojkander S, Gateva G, Lappalainen P. Actin stress fibers--assembly, dynamics and biological roles. *Journal of cell science*. 2012;125(Pt 8):1855-64.
113. Zhou EH, Krishnan R, Stamer WD, Perkumas KM, Rajendran K, Nabhan JF, et al. Mechanical responsiveness of the endothelial cell of Schlemm's canal: scope, variability and its potential role in controlling aqueous humour outflow. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*. 2012;9(71):1144-55.
114. Kawasaki T, Sasayama S, Yagi S, Asakawa T, Hirai T. Non-invasive assessment of the age related changes in stiffness of major branches of the human arteries. *Cardiovascular research*. 1987;21(9):678-87.
115. Campos LC, Miyakawa AA, Barauna VG, Cardoso L, Borin TF, Dallan LA, et al. Induction of CRP3/MLP expression during vein arterialization is dependent on stretch rather than shear stress. *Cardiovascular research*. 2009;83(1):140-7.
116. Jackson CL, Schwartz SM. Pharmacology of smooth muscle cell replication. *Hypertension*. 1992;20(6):713-36.
117. Hoshiba T, Yamada T, Lu H, Kawazoe N, Chen G. Maintenance of cartilaginous gene expression on extracellular matrix derived from serially passaged chondrocytes during in vitro chondrocyte expansion. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2012;100(3):694-702.
118. Zhang Y, Li TS, Lee ST, Wawrowsky KA, Cheng K, Galang G, et al. Dedifferentiation and proliferation of mammalian cardiomyocytes. *PloS one*. 2010;5(9):e12559.
119. Kino-Oka M, Maeda Y, Sato Y, Maruyama N, Takezawa Y, Khoshfetrat AB, et al. Morphological evaluation of chondrogenic potency in passaged cell populations. *Journal of bioscience and bioengineering*. 2009;107(5):544-51.
120. Bernardo ME, Zaffaroni N, Novara F, Cometa AM, Avanzini MA, Moretta A, et al. Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. *Cancer research*. 2007;67(19):9142-9.

121. Xie G, Zhan J, Tian Y, Liu Y, Chen Z, Ren C, et al. Mammosphere cells from high-passage MCF7 cell line show variable loss of tumorigenicity and radioresistance. *Cancer letters*. 2012;316(1):53-61.
122. Raphel L, Talasila A, Cheung C, Sinha S. Myocardin overexpression is sufficient for promoting the development of a mature smooth muscle cell-like phenotype from human embryonic stem cells. *PloS one*. 2012;7(8):e44052.
123. Breton M, Berrou E, Deudon E, Picard J. Changes in proteoglycans of cultured pig aortic smooth muscle cells during subculture. *In vitro cellular & developmental biology : journal of the Tissue Culture Association*. 1990;26(2):157-61.
124. Lee SL, Dunn J, Yu FS, Fanburg BL. Serotonin uptake and configurational change of bovine pulmonary artery smooth muscle cells in culture. *Journal of cellular physiology*. 1989;138(1):145-53.
125. Kocher O, Gabbiani G. Analysis of alpha-smooth-muscle actin mRNA expression in rat aortic smooth-muscle cells using a specific cDNA probe. *Differentiation; research in biological diversity*. 1987;34(3):201-9.
126. Barja F, Coughlin C, Belin D, Gabbiani G. Actin isoform synthesis and mRNA levels in quiescent and proliferating rat aortic smooth muscle cells in vivo and in vitro. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1986;55(2):226-33.
127. Kocher O, Gabbiani G. Expression of actin mRNAs in rat aortic smooth muscle cells during development, experimental intimal thickening, and culture. *Differentiation; research in biological diversity*. 1986;32(3):245-51.
128. Skalli O, Bloom WS, Ropraz P, Azzarone B, Gabbiani G. Cytoskeletal remodeling of rat aortic smooth muscle cells in vitro: relationships to culture conditions and analogies to in vivo situations. *Journal of submicroscopic cytology*. 1986;18(3):481-93.
129. Kawamoto S, Adelstein RS. Characterization of myosin heavy chains in cultured aorta smooth muscle cells. A comparative study. *The Journal of biological chemistry*. 1987;262(15):7282-8.
130. Starodubtseva MN. Mechanical properties of cells and ageing. *Ageing research reviews*. 2011;10(1):16-25.
131. Cavallaro U, Castelli V, Del Monte U, Soria MR. Phenotypic alterations in senescent large-vessel and microvascular endothelial cells. *Molecular cell biology research communications : MCBRC*. 2000;4(2):117-21.

132. Sato H, Kataoka N, Kajiya F, Katano M, Takigawa T, Masuda T. Kinetic study on the elastic change of vascular endothelial cells on collagen matrices by atomic force microscopy. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces*. 2004;34(2):141-6.
133. Kim S, Ip HS, Lu MM, Clendenin C, Parmacek MS. A serum response factor-dependent transcriptional regulatory program identifies distinct smooth muscle cell sublineages. *Molecular and cellular biology*. 1997;17(4):2266-78.
134. Karnik SK, Brooke BS, Bayes-Genis A, Sorensen L, Wythe JD, Schwartz RS, et al. A critical role for elastin signaling in vascular morphogenesis and disease. *Development*. 2003;130(2):411-23.
135. Katsumi A, Milanini J, Kiosses WB, del Pozo MA, Kaunas R, Chien S, et al. Effects of cell tension on the small GTPase Rac. *The Journal of cell biology*. 2002;158(1):153-64.
136. Li W, Chen Q, Mills I, Sumpio BE. Involvement of S6 kinase and p38 mitogen activated protein kinase pathways in strain-induced alignment and proliferation of bovine aortic smooth muscle cells. *Journal of cellular physiology*. 2003;195(2):202-9.
137. Zeidan A, Nordstrom I, Dreja K, Malmqvist U, Hellstrand P. Stretch-dependent modulation of contractility and growth in smooth muscle of rat portal vein. *Circulation research*. 2000;87(3):228-34.
138. Liu SQ. Influence of tensile strain on smooth muscle cell orientation in rat blood vessels. *Journal of biomechanical engineering*. 1998;120(3):313-20.
139. Gambillara V, Thacher T, Silacci P, Stergiopoulos N. Effects of reduced cyclic stretch on vascular smooth muscle cell function of pig carotids perfused ex vivo. *American journal of hypertension*. 2008;21(4):425-31.
140. Wei S, Gao X, Du J, Su J, Xu Z. Angiogenin enhances cell migration by regulating stress fiber assembly and focal adhesion dynamics. *PloS one*. 2011;6(12):e28797.
141. Riveline D, Zamir E, Balaban NQ, Schwarz US, Ishizaki T, Narumiya S, et al. Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. *The Journal of cell biology*. 2001;153(6):1175-86.
142. Trepap X, Deng L, An SS, Navajas D, Tschumperlin DJ, Gerthoffer WT, et al. Universal physical responses to stretch in the living cell. *Nature*. 2007;447(7144):592-5.
143. Chen C, Krishnan R, Zhou E, Ramachandran A, Tambe D, Rajendran K, et al. Fluidization and resolidification of the human bladder smooth muscle cell in response to transient stretch. *PloS one*. 2010;5(8):e12035.

144. Berry CL, Greenwald SE, Rivett JF. Static mechanical properties of the developing and mature rat aorta. *Cardiovascular research*. 1975;9(5):669-78.
145. Kochova P, Kuncova J, Svirglerova J, Cimrman R, Miklikova M, Liska V, et al. The contribution of vascular smooth muscle, elastin and collagen on the passive mechanics of porcine carotid arteries. *Physiological measurement*. 2012;33(8):1335-51.
146. Ambrose JA, Barua RS. The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease: an update. *Journal of the American College of Cardiology*. 2004;43(10):1731-7.
147. Regnault V, Thomas F, Safar ME, Osborne-Pellegrin M, Khalil RA, Pannier B, et al. Sex difference in cardiovascular risk: role of pulse pressure amplification. *Journal of the American College of Cardiology*. 2012;59(20):1771-7.
148. Waddell TK, Dart AM, Gatzka CD, Cameron JD, Kingwell BA. Women exhibit a greater age-related increase in proximal aortic stiffness than men. *Journal of hypertension*. 2001;19(12):2205-12.
149. Mullick AE, Walsh BA, Reiser KM, Rutledge JC. Chronic estradiol treatment attenuates stiffening, glycooxidation, and permeability in rat carotid arteries. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2001;281(5):H2204-10.
150. Stefanadis C, Tsiamis E, Dernellis J, Toutouzas P. Effect of estrogen on aortic function in postmenopausal women. *The American journal of physiology*. 1999;276(2 Pt 2):H658-62.
151. Takami T, Saito Y. Effects of smoking cessation on central blood pressure and arterial stiffness. *Vascular health and risk management*. 2011;7:633-8.
152. Tomiyama H, Hashimoto H, Tanaka H, Matsumoto C, Odaira M, Yamada J, et al. Continuous smoking and progression of arterial stiffening: a prospective study. *Journal of the American College of Cardiology*. 2010;55(18):1979-87.
153. Barua RS, Ambrose JA, Srivastava S, DeVoe MC, Eales-Reynolds LJ. Reactive oxygen species are involved in smoking-induced dysfunction of nitric oxide biosynthesis and upregulation of endothelial nitric oxide synthase: an in vitro demonstration in human coronary artery endothelial cells. *Circulation*. 2003;107(18):2342-7.
154. Cucina A, Sapienza P, Corvino V, Borrelli V, Randone B, Santoro-D'Angelo L, et al. Nicotine induces platelet-derived growth factor release and cytoskeletal alteration in aortic smooth muscle cells. *Surgery*. 2000;127(1):72-8.
155. Jacob-Ferreira AL, Palei AC, Cau SB, Moreno H, Jr., Martinez ML, Izidoro-Toledo TC, et al. Evidence for the involvement of matrix metalloproteinases in the cardiovascular effects produced by nicotine. *European journal of pharmacology*. 2010;627(1-3):216-22.

156. Liu WF. Mechanical regulation of cellular phenotype: implications for vascular tissue regeneration. *Cardiovascular research*. 2012;95(2):215-22.
157. Dinardo CL, Venturini G, Zhou EH, Watanabe IS, Campos LC, Dariolli R, et al. Variation of mechanical properties and quantitative proteomics of VSMC along the arterial tree. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2013.
158. Louis H, Kakou A, Regnault V, Labat C, Bressenot A, Gao-Li J, et al. Role of alpha1beta1-integrin in arterial stiffness and angiotensin-induced arterial wall hypertrophy in mice. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2007;293(4):H2597-604.
159. Galmiche G, Pizard A, Gueret A, El Moghrabi S, Ouvrard-Pascaud A, Berger S, et al. Smooth muscle cell mineralocorticoid receptors are mandatory for aldosterone-salt to induce vascular stiffness. *Hypertension*. 2014;63(3):520-6.
160. Ichihara A, Hayashi M, Ryuzaki M, Handa M, Furukawa T, Saruta T. Fluvastatin prevents development of arterial stiffness in haemodialysis patients with type 2 diabetes mellitus. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2002;17(8):1513-7.