THAÍS GIRÃO DA SILVA

**Mecanismos moleculares envolvidos no fenótipo
endotelial em resposta a estímulos físicos e químicos**

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

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

Orientadora: Profa. Dra Ayumi Aurea Miyakawa Yamaguchi

São Paulo

2018

THAÍS GIRÃO DA SILVA

**Mecanismos moleculares envolvidos no fenótipo
endotelial em resposta a estímulos físicos e químicos**

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

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

Orientadora: Profa. Dra Ayumi Aurea Miyakawa Yamaguchi

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Thaís Girão da
Mecanismos moleculares envolvidos no fenótipo
endotelial em resposta a estímulos físicos e químicos
/ Thaís Girão da Silva. -- São Paulo, 2018.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências Médicas.Área de
Concentração: Distúrbios Genéticos de
Desenvolvimento e Metabolismo.
Orientadora: Ayumi Aurea Miyakawa Yamaguchi.

Descritores: 1.Células endoteliais 2.Transdução
de sinais 3.Citoesqueleto de actina
4.Transdiferenciação celular 5.Inibidor 1 de
ativador de plasminogênio 6.Proteínas smad

USP/FM/DBD-198/18

Responsável: Kátia Maria Bruno Ferreira - CRB-8/6008

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular (LGCM) do Instituto do Coração (InCor) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – processo 2014/06844-9) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – processo 401749/2012-6).

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho às pessoas fundamentais em minha vida:

*Aos meus pais, **José Patrício** e **Neusa**, que me dão o exemplo diário de que responsabilidade, dedicação e honestidade são pilares fundamentais na construção do ser humano. Minha jornada na ciência só é possível graças ao suporte de vocês.*

*Ao meu irmão, **Vitor**, que desde cedo compartilha comigo as alegrias e frustrações do caminho. Com você aprendi a ser mais objetiva e a trabalhar em equipe, características fundamentais para a profissão que escolhi por amor.*

*Ao meu filho, **Matheus**, pois foi necessário eu gerar uma vida para que ela pudesse me ensinar como viver plenamente a minha...*

AGRADECIMENTOS

Todo o trabalho aqui apresentado foi possível graças à uma rede de colaboração e suporte. Por isso, é com imensa alegria que agradeço:

À minha orientadora Dra Ayumi Aurea Miyakawa por todos os ensinamentos compartilhados, as palavras de apoio frente as frustrações na bancada (que foram inúmeras!) e os constantes estímulos para que eu saísse sempre de minha zona de conforto. Mais do que orientação científica, encontrei em você um apoio emocional imenso, sem o qual seria muito difícil encarar as dificuldades que surgiram no meio do caminho. Muito obrigada por tudo!

Ao Dr José Eduardo Krieger por toda orientação preciosa e pela oportunidade de desfrutar de um ambiente tão enriquecedor como o LGCM. A sua paixão pela ciência é tão grande que me inspira a querer aprender sempre mais. Muito obrigada pelos desafios constantes, só com eles conseguimos alcançar posições almejadas.

Ao Dr Marco C Harmsen por sempre estimular meu raciocínio científico e me ensinar a apreciar a ciência com mais leveza. Marco, bedankt voor de mogelijkheid om jouw Lab te leren kennen, voor al jouw geduld met moeilijkheden die we zijn tegengekomen en voor het delen van wetenschap en levenservaringen!

Ao Dr Aaron Baker pelo suporte científico e físico! Nosso trabalho progrediu graças à possibilidade de realizar experimentos em seu laboratório. Dr Baker, thank you for the great opportunity to stay in your lab, to share experiences with your students and for all relevant supervision you gave me. The short time I spend in Austin was fundamental for the conclusion of this work.

Ao Dr. Elazer R Edelman pela supervisão do trabalho e contribuições científicas de relevância para minha formação. Dr Edelman thank you for the great scientific comments and work supervision.

Ao Dr Vinícius Bassaneze, querido amigo e o responsável por me levar ao LGCM em um passado longínquo. Amigo, não tenho palavras para expressar a importância da sua presença em minha vida profissional e pessoal. Você tem uma alma pura, um amor genuíno pela

ciência, e me deu o suporte que precisava para concluir mais essa etapa. Gratidão eterna por tudo.

Aos membros do grupo vascular e “agregados” por toda a discussão em reuniões, protocolos, projetos, auxílio nos experimentos e momentos de descontração! Obrigada: Miriam Alaniz, Ana Mattos, João Carlos, Samantha (“Sassa”), Iguaracy e Luiz Fernando.

À gerente do LGCM, Renata Carmona, por toda a dedicação em “fazer as coisas andarem” em todos os sentidos! Obrigada por estar presente e disponível nos momentos em que mais precisei.

À toda equipe do LGCM que contribuiu com aspectos técnicos, burocráticos e emocionais para este trabalho: Ana Maria, Andréia, Brendo, Éliada, Jean, Maíde, Marcellly, Márcio Chaves, Mariliza, Mariana Bozoklian, Mariana Carvalho, Priscila Miagui, Síleide, Silvana e Thiago Turaça: muito obrigada pelo auxílio em todos os momentos!

Às amizades que construí ao longo desses anos de laboratório: Gabriela Venturini, Juliana Nakamuta, Camila “Babi”, Fernanda Sodré, Sassa, Mari e Ana Elisa. A vida na pesquisa se tornou muito mais leve e divertida com a presença de vocês, muito obrigada!

Aos colegas do laboratório, em especial à Pamella, Cynthia, Ana Laura, Bruno e Renato. A convivência diária, na bancada e fora dela, contribuiu demais para minha formação.

Aos técnicos do confocal Ana Garipo e Mário Costa Cruz, pelo auxílio na obtenção das imagens.

Ao Laboratório de Biologia Vascular do Incor pela disponibilização de equipamento, reagentes e preciosos ensinamentos. Em especial ao Vitor, Denise, Laura Ventura, Leonardo e João por todo auxílio quando necessário.

Ao Dr Luis Alberto Oliveira Dallan pela preciosa dedicação em coletar as amostras de veia safena, tão fundamentais para a realização deste trabalho.

Aos colegas que fiz na Holanda e em Austin, vocês contribuíram na minha formação em ciência e na vida.

À minha amada família, que sempre me deu todo o suporte necessário para a realização de meus sonhos. Vocês são minha maior fonte de motivação, incentivo e de acolhimento diário. Obrigada pai, mãe,

Vitor, Juliana, meus queridos sobrinhos Luíza e André, meus tios/ tias e primos: sou extremamente abençoada e agradecida por estar cercada por tanto amor.

Em especial escrevo ao meu filho: obrigada por compreender, mesmo tão pequeno, minhas ausências em períodos de congresso e estágio fora do país. Obrigada por ser meu parceiro de laboratório aos finais de semana. Obrigada pelo aconchego quando chegava exausta e frustrada com equipamentos que não funcionavam ou experimentos que falharam. Obrigada por me dar uma nova métrica sobre o que vale a pena nessa vida. Você foi o maior motivador desse trabalho.

Aos meus amigos de infância que SEMPRE tiveram presentes em todos os momentos de minha vida. Agradeço a cada um de vocês por não me deixarem desistir, pelos incentivos constantes, por estarem disponíveis em qualquer situação! Vana, Mek, Jú Sorriinha e Paulinho: obrigada por estarem comigo nessa jornada. Vocês são especiais!

Aos amigos “herdados” da vida: Giovanna/ Celso, Flávia/ João, Jú Barreto/ Alê, Ana/Rodrigo, Gui/Maria. Acredito que nada na vida é por acaso, vocês foram fundamentais nessa etapa da minha vida. Obrigada por acolherem a mim e ao Matheus com tanto zelo e amor.

À FAPESP pelo auxílio financeiro que viabilizou a execução deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, que certamente trarão contribuições relevantes para o presente trabalho e para minha formação acadêmica.

Como mencionei anteriormente, este trabalho é fruto de uma rede imensa de suporte. Tenho plena consciência de que sou privilegiada e nada disso seria possível sem a presença constante de Deus em minha vida. Obrigada a todos pela conclusão de mais uma etapa na minha jornada!

EPÍGRAFE

“Cientistas são humanos, temos nossos pontos cegos e preconceitos. A Ciência é um mecanismo projetado para desentocá-los”

Neil D. Tyson

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES.....	I
LISTA DE SIMBOLOS.....	II
ÍNDICE DE TABELAS.....	III
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
RESUMO.....	V
ABSTRACT.....	VI
APRESENTAÇÃO.....	VII

Efeito do alto estiramento em célula endotelial de veia safena humana (hSVEC)

1. Introdução.....	2
1.1 Revascularização Cardíaca	3
1.2 Adaptação do enxerto à nova condição hemodinâmica.....	5
1.3 Mecanotransdução na célula endotelial e os impactos do alto estiramento	6
1.4 A proposta do trabalho.....	12
2. Objetivos.....	13
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
3. Materiais e Métodos	15
3.1 Cultura Celular	16
3.2 Estímulo mecânico.....	17
3.3 Expressão gênica	20
3.4 Expressão proteica	22
3.5 Imunofluorescência (IF)	23
3.6 Dosagem de óxido nítrico (NO).....	25
3.7 Array de citocinas	25
3.8 Análise dos resultados.....	26
4. Resultados.....	27
4.1 Indução da EndMT em hSVEC por estímulo químico	28
4.2 Avaliação do fenótipo de hSVEC por estímulo mecânico	32
4.3 Redução do filamento de actina (F-actina) promovida pelo alto estiramento em hSVEC.....	39

4.4	Considerações finais.....	63
5.	Conclusões.....	64
6.	Perspectivas.....	66
7.	Referências.....	68
8.	Anexos.....	78
8.1	ANEXO 1: Aprovação da CAPPesq.....	79
8.2	ANEXO 2: TCLE aprovado pela CAPPesq.....	81
8.3	ANEXO 3: Aprovação do CEUA FMUSP.....	83
9.	Apêndices.....	84
9.1	Apêndice 1: Manuscrito publicado.....	85
9.2	Apêndice 2: EndMT no remodelamento patológico <i>in vivo</i>	94

LISTA DE ABREVIações (I)

AF	Adesões focais
ALK5	do inglês “ <i>Activin Receptor-Like Kinase 5</i> ”, receptor tipo I de TGF β
ATP	Adenosina trifosfato
BAEC	Célula endotelial de aorta bovina
BME UT	Departamento de Bioengenharia da Universidade do Texas
BSA	Albumina sérica bovina
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CT	Ciclo comparativo
DAC	Doença arterial coronariana
DAPI	Diaminofenilidol
DEPC	Dietilpirocarbonato
dNTP	Desoxinucleotídeos trifosfatos
DTT	do inglês “ <i>Dithiothreitol</i> ”
ECL	do inglês “ <i>Enhanced Chemiluminescence</i> ”
ECs	Células endoteliais
EndMT	Transição endotélio mesenquimal
eNOS	Enzima óxido nítrico sintase
ERK	do inglês “ <i>Extracellular-Regulated Kinase</i> ”
F-actina	Filamento de actina
FAK	Quinase de adesão focal
FBS	Soro fetal bovino
G-actina	Actina globular ou monômeros de actina
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HAEC	Célula endotelial de aorta humana
HCAEC	Célula endotelial de carótida humana
hEGF	Fator de crescimento epidermal humano

hFGF	Fator de crescimento de fibroblasto humano
hSVEC	Célula endotelial de veia safena humana
HUVEC	Célula endotelial de cordão umbilical humano
IF	Imunofluorescência
IFN γ	Interferon Gama
IGF-1	Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1
IL1 α	Interleucina do tipo 1 alfa
IL1 β	interleucina do tipo 1 beta
IL-6	Interleucina 6
InCor-HCFMUSP	Instituto do Coração/ Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP
JNK	do inglês " <i>c-Jun-N-terminal Kinase</i> "
MAPK	do inglês " <i>Mitogen Activate Protein Kinase</i> "
MAPK	do inglês <i>Mitogen Activate Protein Kinase</i>
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
mTOR	do inglês " <i>Mammalian target of rapamycin</i> "
NLS	Sequência de localização nuclear
NO	Óxido nítrico
NO ₂	Nitrito
NOX	Enzima NADPH oxidase
O ²⁻	superóxido
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAI-1	Inibidor do ativador do plasminogênio
PBS	Tampão fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDGF-BB	Fator de crescimento derivado de plaqueta do tipo BB
PECAM-1	do inglês " <i>Platelet and Endothelial Cell Adhesion Molecule 1</i> "
PFA 4%	Paraformaldeído a 4%
pFAK	Proteína quinase de adesão focal fosforilada

PVDF	do inglês " <i>Polyvinylidene difluoride</i> "
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SDS	do inglês " <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> "
SM22	do inglês "Smooth Muscle protein 22-alpha"
SMC	Célula muscular lisa
TAE	Tampão tris acetato EDTA
TBST	Tampão tris com 0,1% detergente <i>tween</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF- β	Fator de crescimento transformante do tipo beta
TGF β R	Receptor do fator de crescimento transformante do tipo beta
TNF α	Fator de necrose tumoral tipo alfa
UMCG	do inglês " <i>University Medical Centre Groningen</i> "
VE-cad	Caderina do endotélio vascular
VEGF	Fator de Crescimento endotelial vascular
vWF	fator de <i>von Willebrand</i>
YFP	do inglês " <i>Yellow Fluorescent Protein</i> "
α -SMA	Alfa actina de músculo liso

LISTA DE SIMBOLOS (II)

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
°C	Graus Celsius
<i>g</i>	Gravidade
h	Hora
Hz	Hertz
KDa	Kilodaltons
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mmHg	Milímetro por mercúrio
ng	Nanograma
nmol	Nanomol
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotações por minuto
µg	Micrograma
µL	Microlitro

ÍNDICE DE TABELAS (III)

Tabela 1: Sequência dos oligonucleotídeos utilizados e o tamanho do amplificado gerado (em pares de base – pb).	21
Tabela 2: Anticorpos e diluições utilizadas na técnica de <i>Western Blot</i>	23
Tabela 3: Anticorpos e diluições utilizadas na imunofluorescência	24
Tabela 4: Perfil secretório de citocinas inflamatórias em hSVEC nas condições indicadas. Ensaio de <i>array</i> (Raybiotech) obtido através do meio de cultura das células endoteliais.....	58

ÍNDICE DE FIGURAS (IV)

Figura 1: Desenho esquemático dos mecanismos moleculares envolvidos na oclusão do enxerto venoso.....	4
Figura 2: Forças hemodinâmicas atuantes no vaso..	5
Figura 3: Mecanotransdução na célula endotelial..	7
Figura 4: Indução da transição endotélio-mesenquimal.	10
Figura 5: Estiramento celular pelo flexcell® FX-5000™.....	18
Figura 6: Estiramento celular pelo equipamento da UT-austin.....	19
Figura 7: Mecanismo de funcionamento do array de citocinas.....	26
Figura 8: O tratamento químico com TGFβ2 e IL1β é capaz de induzir endmt em célula endotelial de veia safena humana (hSVEC).	29
Figura 9: O estímulo combinado de TGFβ2 com IL1β é mais eficiente na indução da transição mesenquimal em hsvec.....	30
Figura 10: Via de sinalização envolvida na indução de ENDMT em hSVEC. .	31
Figura 11: A hsvec apresenta rápido e alto potencial de indução química.....	32
Figura 12: O estiramento fisiológico não altera a expressão dos marcadores estudados em hsvec no período avaliado.....	33
Figura 13: O alto estiramento não induz endmt em hSVEC no período avaliado.....	36
Figura 14: O alto estiramento mecânico não potencializa a indução mesenquimal promovida pelo tratamento químico em hSVEC. ...	38

Figura 15: O alto estiramento reduz o filamento de actina em hsvec, mas não altera o padrão na célula endotelial arterial (HAEC).	41
Figura 16: A redução dos filamentos de actina após alto estiramento em hsvec é um fenômeno reversível.....	42
Figura 17: O alto estiramento prolongado promove translocação nuclear da g-actina.....	44
Figura 18: Envolvimento da cofilina na regulação da G-actina.....	46
Figura 19: O alto estiramento altera a localização da cofilina total nas hSVECS ao longo do tempo.....	47
Figura 20: O alto estiramento promove a fosforilação da cofilina em diferentes locais nas hSVEC.....	49
Figura 21: O alto estiramento reduz o número e o tamanho das adesões focais em hSVEC.	51
Figura 22: Redução da fosforilação da FAK após alto estiramento prolongado em hSVEC.	53
Figura 23: O alto estiramento em hsvec diminui a biodisponibilidade de óxido nítrico (NO).....	54
Figura 24: Perfil secretório após estímulo mecânico em hSVEC.	57
Figura 25: As espécies reativas de oxigênio regulam a atividade de GTPases e o padrão de filamento de actina em células endoteliais.....	61
Figura 26: Expressão gênica da NOX4 após diferentes intensidades de estiramento mecânico..	62

RESUMO (V)

Silva TG. *Mecanismos moleculares envolvidos no fenótipo endotelial em resposta a estímulos físicos e químicos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

O endotélio reveste a parede vascular e possui função essencial na manutenção da homeostase. A célula endotelial é capaz de perceber estímulos extracelulares, como fatores químicos e mecânicos, transmitir a informação para dentro da célula e regular sua função e fenótipo. Neste sentido, investigamos os mecanismos moleculares associados as células endoteliais em dois contextos importantes de intervenções vasculares 1) nos *stents* farmacológicos, onde a rapamicina exerce funções antiproliferativas e pró-trombogênicas, e 2) na revascularização cardíaca por ponte de safena, onde o alto estiramento mecânico exerce grande impacto no remodelamento vascular e no fenótipo da célula endotelial. A rapamicina pertence à classe de drogas limus, bastante utilizadas nos *stents* farmacológicos usados no procedimento de desobstrução vascular. Além de sua função antiproliferativa, exploramos os efeitos deletérios associados a pró-trombogênese. Os dados demonstraram que a rapamicina ativa o receptor de TGF independentemente de seu ligante TGF β , promovendo aumento na expressão da PAI-1 (pró-trombogênica), alteração no fenótipo endotelial (Transição endotélio-mesenquimal - EndMT) e na formação de fibras de estresse. Os efeitos observados são dependentes da ativação de Smad2 e independentes da via clássica antiproliferativa por mTOR. Experimentos *in vivo* mostraram que o tratamento com inibidor do receptor de TGF diminui os efeitos pró-trombogênicos e a expressão de PAI-1 induzidos pela rapamicina em artérias carótidas de camundongos. A ponte de safena é um procedimento bastante utilizado na cirurgia de revascularização cardíaca e a arterialização do segmento venoso submetido ao estresse hemodinâmico arterial resulta em remodelamento vascular, que influencia o sucesso do procedimento. Nossos dados demonstram que a célula endotelial humana de veia safena humana (hSVEC), susceptível as modificações do tipo EndMT induzido quimicamente

(estímulo pró-fibrótico e pró-inflamatório), não expressou o mesmo comportamento em resposta ao aumento de estiramento mecânico que ocorre durante a arterialização venosa. Entretanto, detectamos uma pronunciada redução dos filamentos de actina, modulação no padrão de ativação da cofilina e na proporção de actina glomerular (G-actina) entre citoplasma e núcleo, com redução da biodisponibilidade de NO. De modo interessante, demonstramos que a redução no filamento de actina é específica para a célula endotelial venosa, não sendo observado em células endoteliais de origem arterial de aorta e coronária. Em conjunto, os dados mostram que 1) efeitos pró-trombogênicos associados a rapamicina são mediados por ativação do receptor de TGF independente do seu ligante e da atividade antiproliferativa da droga e 2) a adaptação da célula endotelial venosa ao estiramento mecânico envolve modulação da síntese/degradação de filamentos de actina e redução na biodisponibilidade de NO. Estes novos elementos sobre o mecanismo de transdução de estímulos químicos e físicos pelo endotélio poderão ser explorados terapeuticamente para modular a plasticidade endotelial em disfunções cardiovasculares.

Descritores: células endoteliais; transdução de sinais; citoesqueleto de actina; transdiferenciação celular; inibidor 1 de ativador de plasminogênio; proteínas smad.

ABSTRACT (VI)

Silva TG. *Molecular mechanisms involved in endothelial phenotype in response to physical and chemical stimuli* [tese]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

Endothelium is the inner layer in vascular wall and displays an essential role in the maintenance of cardiovascular homeostasis. Endothelial cell senses the extracellular stimuli, such as chemical and mechanical factors, transduce and process these signals to regulate cell function and phenotype. Here, we investigated molecular underpinning of the endothelial cells under two important scenarios: 1) in drug-eluting stents, where rapamycin exerts antiproliferative and undesirable prothrombogenic functions, and 2) in vein graft bypass surgery, where increased stretch modulates vascular remodeling and endothelial cell phenotype. Rapamycin belongs to the class of limus drugs and is widely used in drug eluting stents (DES) to vascular restenosis. In addition to its antiproliferative function, we explore the deleterious effects associated with prothrombogenesis. Our data demonstrated that rapamycin activates TGF receptor independent of its ligand TGF β , in concert with promotion of PAI-1 expression (prothrombogenic), changes in endothelial phenotype (Endothelial to Mesenchymal Transition - EndMT) and stress fibers induction. These effects are Smad2 dependent and independent of the classical antiproliferative mTOR pathway of rapamycin. Our in vivo experiments showed that TGF receptor inhibitor treatment decreases prothrombogenic effects and PAI-1 expression induced by rapamycin in mice carotid arteries. Saphenous vein is widely used in coronary artery bypass surgery (CABG) and the vein arterialization remodeling in response to the increased stress influences graft patency. Our data demonstrated that human saphenous vein endothelial cell (hSVEC) is susceptible to chemically induced endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT) by pro-fibrotic and pro-inflammatory stimuli. On the other hand, physical stimulus associated with high stretch failed to induce EndMT. However, we detected a pronounced decrease of actin filaments, modulation of the cofilin activation, changes in the proportion of glomerular actin

(G-actin) between cytoplasm and nucleus, and reduction of NO bioavailability. Interestingly, the reduction of actin fibers by high stretch is specific to venous endothelial cell since arterial endothelial cells from aorta, and coronary artery failed to display the response. Altogether, our data show that 1) the thrombogenic effects of rapamycin are mediated by TGF receptor activation independent of its ligand and independent of the antiproliferative pathway of the drug, and 2) the adaptation of venous endothelial cell to mechanical stretch involves synthesis/degradation of actin filaments and reduced NO bioavailability. These new elements on signal transduction of endothelial cells in response to chemical and physical stimuli may be therapeutically explored to modulate endothelial plasticity in cardiovascular disorders.

Descriptors: endothelial cells; signal transduction; actin cytoskeleton; cell transdifferentiation; plasminogen activator inhibitor 1; smad proteins.

APRESENTAÇÃO (VII)

A DAC se destaca dentro das doenças isquêmicas como a principal responsável pelo número de óbitos no mundo: 7 milhões de mortes em 2010, com prevalência de 46% nos homens e 38% nas mulheres, segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS). Essa doença se estabelece pela oclusão da(s) artéria(s) coronária(s) em um processo complexo e longo que se inicia de modo silencioso na fase jovem, manifestando-se mais tardiamente na vida adulta. Um importante participante no desenvolvimento e progressão da DAC é o endotélio pois atua em funções vitais para homeostase vascular, tais como controle da permeabilidade, coagulação, inflamação e do tônus. Essas diversas funções são reguladas de modo complexo, dinâmico, e altamente eficientes pela monocamada de células endoteliais. Assim, o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos neste processo é essencial para melhor compreender como a disfunção endotelial participa nas patologias cardiovasculares e direcionar tratamentos eficazes para a doença. O tema da disfunção endotelial é amplo e de grande interesse, e as nossas atividades se focaram no melhor entendimento sobre a modulação do fenótipo endotelial em resposta aos efeitos de estímulos químicos e físicos. Optamos por apresentar na forma de tese os resultados sobre a influência do estímulo físico obtidas no modelo de arterialização de enxertos venosos. Os resultados sobre a influência de estímulos químicos foram obtidos por meio da caracterização de novas vias de transdução associadas às influências deletérias do uso de rapamicina em *stents* farmacológicos, que foram recentemente publicados e que constam do apêndice da tese como descrito abaixo.

O tratamento da DAC se baseia na utilização de drogas e/ou terapias invasivas para restabelecimento do fluxo sanguíneo, como (I) angioplastia com inserção de *stents* farmacológicos e (II) a cirurgia de revascularização cardíaca. Embora esses procedimentos apresentem grande melhora no prognóstico da doença, ainda há alguns desafios a serem enfrentados em cada um deles:

I. A angioplastia com *stents* farmacológicos é amplamente utilizada em função de sua eficácia em impedir uma nova oclusão da artéria (fenômeno

conhecido como restenose). Esse tipo de *stent* é recoberto com drogas antiproliferativas, tais como a rapamicina, que são liberadas diretamente no lúmen do vaso e reduzem a formação da neoíntima. No entanto, alguns pacientes apresentam complicações decorrentes de eventos trombóticos, o que reduz a eficiência do procedimento e requer tratamento prolongado com drogas para preveni-los. Sabe-se que a rapamicina induz a expressão da proteína pró-trombótica PAI-1 (do inglês “Plasminogen Activator Inhibitor-1”) no endotélio, mas a via de sinalização envolvida nesse processo não havia sido elucidada até o momento. Neste sentido, demonstramos a via de sinalização envolvidas na indução da trombogênese pela rapamicina em células endoteliais, que acontece independente da via antiproliferativa oferecendo a oportunidade de novos alvos terapêuticos. Este trabalho foi publicado recentemente na revista *Clinical Science*, com o título: **“RAPAMYCIN ACTIVATES TGF RECEPTOR INDEPENDENTLY OF ITS LIGAND: IMPLICATIONS FOR ENDOTHELIAL DYSFUNCTION”**.

II. A revascularização cardíaca utilizando veia safena é bastante efetiva, entretanto aproximadamente 30 a 40% dos enxertos ocluem no primeiro ano de cirurgia. Após o procedimento de implantação do enxerto, a veia safena passa a ser submetida a um regime pulsátil presente no leito arterial. Este aumento das forças hemodinâmicas à qual a veia safena é submetida influencia o fenótipo da camada endotelial e contribui no remodelamento da arterialização venosa. Desse modo, avaliamos o efeito do alto estiramento no fenótipo da célula endotelial de veia safena humana (hSVEC) e seu impacto no remodelamento das fibras de actina e no fenótipo endotelial.

Os dados referentes ao trabalho (I) já estão publicados, e desta forma apresentados no apêndice I. Os dados do trabalho (II) estão discutidos nesta tese sob o título “Efeito do alto estiramento em célula endotelial de veia safena humana (hSVEC)”.

*Efeito do alto estíramento em célula
endotelial de veia safena humana (hSVEC)*

1. Introdução

1.1 Revascularização Cardíaca

A revascularização do miocárdio por meio de pontes de safena foi inicialmente descrita no início da década de 50, e desde então vem sendo realizada para restabelecimento do fluxo coronariano ¹. Apesar de bastante efetiva, aproximadamente 30 a 40% dos enxertos venosos ocluem no primeiro ano de cirurgia, taxa que aumenta para 50-60% após 10 anos ²⁻⁴.

Diferentes leitos arteriais também são utilizados para o enxerto, tais como a artéria mamária, torácica interna e radial ⁴. As patências dos enxertos arteriais são maiores, apresentando índices mais baixos de oclusão: de 5-15% no caso da artéria torácica interna após uma década da cirurgia ⁴. No entanto a veia safena continua sendo amplamente utilizada, em função do tamanho disponível, facilidade de acesso e manejo ⁴⁻⁶.

Sabe-se que a oclusão do enxerto ocorre inicialmente em função de eventos trombóticos, como consequência da manipulação cirúrgica do vaso, isquemia e denudação do endotélio ^{6,7}. Dados do estudo PREVENT IV demonstraram que a lesão do endotélio durante a endoscopia para retirada da veia está associada à oclusão do enxerto ⁵. Neste cenário ocorre liberação de fatores pró-inflamatórios e trombóticos, redução da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO, do inglês “Nitric Oxide”), culminando em um fenótipo vascular pró-trombogênico. Concomitante a esses eventos ocorre migração celular e formação da neoíntima, sendo que mais tardiamente a oclusão ocorre pela progressão da aterosclerose ^{4,6,7}. A figura 1 apresenta um resumo dos eventos moleculares envolvidos nessa oclusão, retirada de uma revisão recentemente publicada por Gaudino e colaboradores ⁴.

Figura 1: Desenho esquemático dos mecanismos moleculares envolvidos na oclusão do enxerto venoso. A primeira etapa é caracterizada pelo aumento da trombose, que ocorre no primeiro mês. Na sequência há aumento da hiperplasia e formação da neoíntima. Na última fase, após o primeiro ano, a oclusão ocorre em função do desenvolvimento de aterosclerose. Imagem retirada da revisão de Gaudino e colaboradores ⁴.

Tanto a manipulação do tecido nas etapas operatórias, como o ambiente pró-inflamatório decorrente do processo cirúrgico, acometem igualmente todos os tipos de vasos utilizados para o enxerto. Desse modo, a oclusão maior observada nos enxertos venosos pode ser explicada, em grande parte, pela alteração na condição hemodinâmica a qual a veia safena passa a ser submetida, com maior fluxo e pressão pulsátil presente no novo leito arterial ^{4,6,7}.

Corroborando essa hipótese, dados experimentais demonstraram que o espessamento da neoíntima ocorre quando a veia é interposta na circulação arterial, ao passo que quando é colocada em leito venoso esse fenômeno não ocorre ⁷. Além disso, ocorre regressão no espessamento da neoíntima quando o enxerto é colocado novamente na condição venosa ⁸.

1.2 Adaptação do enxerto à nova condição hemodinâmica

No sistema cardiovascular os vasos estão continuamente expostos e responsivos aos estímulos mecânicos promovidos pelo fluxo sanguíneo e pela pressão pulsátil, em função dos batimentos cardíacos. Essas forças hemodinâmicas são conhecidas como: (A) *shear stress* e (B) estiramento celular⁹.

O *shear stress* é caracterizado como a força de cisalhamento (atrito) na camada endotelial ocorrida em função do fluxo sanguíneo, conforme representação esquemática na figura 2A^{9,10}. Já o estiramento é decorrente da mudança constante no diâmetro do vaso, em função da pressão sanguínea pulsátil (Figura 2B), sendo normalmente expresso como a porcentagem de mudança referente às dimensões originais^{9,10}.

Para manutenção da homeostase, cada componente do tecido vascular responde rapidamente aos estímulos químicos e físicos, como esquematizado na figura 2C¹⁰. Alterações rápidas das forças hemodinâmicas são compensadas pela alteração no tônus vascular. Entretanto, altos estímulos prolongados levam a um remodelamento do tecido de modo a compensar o aumento na tensão e restabelecer as condições basais de força^{6,9}.

Figura 2: Forças hemodinâmicas atuantes no vaso. **A:** *Shear stress*, ou força de cisalhamento (atrito), promovido pelo fluxo sanguíneo na camada endotelial. **B:** Estiramento do vaso promovido pela pressão sanguínea. **C:** Esquema dos efeitos hemodinâmicos em cada componente celular do vaso. Figura retirada do artigo de Hsiai e colaboradores¹⁰.

A veia safena utilizada na revascularização cardíaca é subitamente submetida ao regime hemodinâmico arterial, ou seja, a um aumento na pressão pulsátil (120/80 mmHg), com alto estiramento (10 – 15%) e *shear stress* ^{11,12}. Sendo assim, a veia necessita adaptar-se a esta nova condição hemodinâmica, ocorrendo um remodelamento vascular com espessamento da parede do vaso e formação de camada neoíntima, num processo conhecido como arterialização venosa ¹³. Este espessamento ocorre em função do aumento do número de células que expressam a proteína α -SMA (do inglês “alpha Smooth Muscle Actin”) e de matriz extracelular (colágeno e elastina) (Figura 1) ^{6,7,14}.

A oclusão do enxerto em alguns pacientes ocorre em função de um desbalanço nesse remodelamento, culminando num aumento exacerbado da camada neoíntima. Neste cenário, o efeito do *shear stress* é amplamente estudado no fenótipo da célula endotelial, e observamos menor enfoque para o efeito do estiramento, que também acomete diretamente essa camada (Figura 2).

1.3 Mecanotransdução na célula endotelial e os impactos do alto estiramento

O endotélio é formado por uma monocamada de células endoteliais (ECs, do inglês “Endothelial Cells”), promovendo uma barreira dinâmica entre a circulação sanguínea e o tecido vascular (Figura 2) ¹⁵.

Em condições fisiológicas as ECs estão fortemente conectadas entre si através das junções aderentes e oclusivas, estruturas ricas em proteínas como a caderina vascular (VE-cad, do inglês “Vascular Endothelial cadherin”) e ocludinas, respectivamente, que formam uma barreira endotelial eficaz no controle da permeabilidade do endotélio ^{16,17}. As células também estão aderidas na lâmina basal, composta por matriz extracelular, através das adesões focais (AFs) ¹⁸. As AFs são um complexo de proteínas que se localizam na periferia celular e que fazem a conexão do citoesqueleto de actina com a matriz extracelular, assim como estão envolvidas diretamente na sinalização celular ¹⁸.

O aumento das forças hemodinâmicas nas células endoteliais é percebido por meio de um processo conhecido como mecanotransdução de sinais, que de

modo geral ocorre em 3 etapas: 1. Mecanossensores - sensores específicos reconhecem o estímulo mecânico e fazem a conversão dessa força em sinalização química; 2. Transdução de sinais – moléculas responsáveis pela propagação do sinal no citoplasma e núcleo; 3. Efetores – ativação das vias (por expressão gênica e proteica) que controlam as funções celulares básicas, tais como proliferação, sobrevivência e diferenciação ¹⁹⁻²¹ (Figura 3).

Diversos sensores já foram descritos na célula endotelial, como receptores transmembranas, canais iônicos, glicocálce, caveolas, adesões focais ²¹. Na mecanotransdução por exemplo, ocorre a participação do NO, das espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês “Reactive Oxide Species”), GTPases e do citoesqueleto ¹⁹⁻²¹. Toda essa sinalização culmina no controle da função endotelial, conforme desenho esquemático representado na figura 3 ²².

Figura 3: Mecanotransdução na célula endotelial. Desenho da célula endotelial e suas conexões intercelular e na matriz extracelular. Representação geral da transdução de sinais após estímulo mecânico. Figura retirada do artigo de Tsimbouri PM ²².

Existem alguns modelos sobre a mecanotransdução de sinais, dentre elas a descentralizadora ou “tensegrity model” proposta inicialmente por Luo Y e colaboradores ²³. Neste modelo, a força mecânica exercida na célula endotelial é percebida por sensores presentes na adesão focal que o transmite via citoesqueleto para as diversas partes da célula, inclusive para o núcleo (Figura 3). De fato, muitos trabalhos demonstram a relevância do citoesqueleto de actina na transmissão e na função endotelial após alto estiramento ^{24–28}.

A grande maioria dos estudos de estiramento em célula endotelial são focados em células de origem pulmonar, em função do estímulo cíclico constante nesse tecido ^{18,24,26,28–31}. Nestes trabalhos, demonstrou-se alterações na mecanotransdução via citoesqueleto de actina com impacto nas junções celulares, culminando no aumento da permeabilidade vascular ^{24–28}.

De modo interessante, Cevallos e colaboradores demonstraram que 10% de estiramento em célula endotelial humana de cordão umbilical (HUVEC) aumentou a expressão de proteínas envolvidas no citoesqueleto, como o SM22 e alfa actina de músculo liso (α -SMA) ³². Interessante destacar que essas proteínas são marcadores de célula muscular lisa (SMC, do inglês “Smooth Muscle Cell”), sugerindo que o alto estiramento leva a uma diferenciação para SMC ³². Neste sentido, diversos estudos demonstram a plasticidade da célula endotelial em fazer a transição para um fenótipo mesenquimal, em um processo conhecido como transição endotélio-mesenquimal (EndMT) ^{33–36}.

Dentro do contexto de arterialização do enxerto venoso, a transição mesenquimal do endotélio poderia contribuir para a formação da neoíntima. Inicialmente acreditava-se que a origem das células positivas para α -SMA na formação da neoíntima era decorrente exclusivamente do aumento na proliferação de SMC presentes na própria camada média ^{37,38}. Entretanto, dados experimentais vêm demonstrando que tais células podem ser provenientes de diferentes fontes tais como diferenciação/ migração de fibroblastos da adventícia, de células-tronco circulantes ^{33–36}.

1.3.1 Transição Endotélio-Mesenquimal (EndMT)

A plasticidade endotelial permite às ECs alterarem seu fenótipo quiescente para fenótipos inflamatórios e mesenquimais em condições patológicas. A transição endotélio-mesenquimal foi inicialmente descrita na formação dos septos e válvulas cardíacas durante desenvolvimento embrionário³⁹. Nesse processo as células endoteliais perdem a adesão celular, destacam-se da membrana basal, migram para o tecido adjacente, aumentam secreção de matriz extracelular e alteram sua morfologia³⁹. Ocorre redução dos marcadores endoteliais, como VE-caderina e PECAM-1 (do inglês “Platelet and Endothelial Cell Adhesion Molecule 1”), assim como aquisição de marcadores mesenquimais, tais como: SM22 (do inglês “Smooth Muscle protein 22), Calponina e α -SMA^{40,41}. Desse modo, a EndMT é caracterizada pela redução dos marcadores endoteliais, aquisição de marcadores mesenquimais (conferindo potencial contrátil) e aumento da produção de matriz, especialmente colágeno tipo I e III.

1.3.2 Indução de EndMT: via de sinalização do TGF β

A indução de EndMT é dependente da via de sinalização do fator de crescimento TGF β ^{40–44}. O mecanismo de ação clássico (via canônica) envolve a ativação do receptor I ALK5 (do inglês “Activin Receptor-Like Kinase 5) e sua subsequente fosforilação da proteína Smad2/3⁴⁴. A Smad2/3 fosforilada é então transportada para o núcleo pela Smad 4 aonde induz a expressão dos genes envolvidos na transição mesenquimal, como o fator de transcrição Snail^{45,46}. Ocorre também ativação da via não canônica das MAP quinases (MAPK, do inglês “Mitogen Activate Protein Kinase”), tais como a p38, ERK (do inglês “Extracellular-Regulated Kinase”) e JNK (do inglês “c-Jun-N-terminal Kinase”). Um esquema representativo das vias envolvidas na indução de EndMT se encontra na figura 4, cuja imagem foi retirada de uma revisão recentemente publicada por Pardali e colaboradores⁴⁴.

Figura 4: Indução da transição endotélio-mesenquimal. **A:** Sinalização da via TGF β . Após ligação da proteína no receptor II há ativação do receptor I (ALK5), fosforilação da Smad2/3 e formação do complexo com Smad4 responsável pela transcrição dos genes alvos. Ocorre também ativação da via não canônica, como as MAP quinases demonstradas na figura. **B:** Esquema representativo dos mecanismos moleculares envolvidos na transição da EndMT. Figura retirada da revisão de Evangelia Pardali e colaboradores (2017).

O TGF β possui 3 isoformas conhecidas: TGF β 1, TGF β 2 e TGF β 3. Experimentos *in vitro* indicam que o tratamento com todas as isoformas é capaz de promover a alteração de fenótipo, entretanto esse processo é mais eficiente com a β 2^{45–47}. Em um trabalho bastante interessante, Azhar e colaboradores demonstraram que camundongos knockouts para TGF β 2 não apresentam indução de EndMT (e consequente formação das válvulas cardíacas), ao passo que animais knockout para TGF β 1 ou TGF β 3 não demonstraram alterações significantes no desenvolvimento cardíaco⁴⁸. Esses dados comprovam a maior eficiência da isoforma β 2 na indução de EndMT.

Sabe-se que a indução de EndMT é potencializada na presença de estímulos inflamatórios^{47,49,50,51}. O tratamento de células endoteliais de cordão umbilical humana (HUVEC, do inglês “Human Vein Endothelial Cells”) com IL1 β , TNF α ou IFN γ (respectivamente, do inglês “Interleukin 1 beta”; “Tumor Necrosis Factor -Alpha” e “Interferon Gamma”) aumenta a expressão dos marcadores de

EndMT ⁴⁹. O tratamento *in vitro* de TGF β 2 combinado com a IL1 β potencializa a indução da EndMT ^{47,51}. Interessante notar que a participação da IL1 β é importante para iniciar o processo de transição, não sendo necessária para manutenção do fenótipo ⁴⁷. Esse resultado sugere que o processo inflamatório presente após injúria tecidual poderia participar ativamente na indução da EndMT e contribuir para o remodelamento do tecido.

1.3.3 *EndMT na arterialização venosa*

Em indivíduos adultos a presença de EndMT já foi descrita em diversas condições patológicas, tais como fibrose em diversos órgãos ^{52,53}, câncer ⁵⁴, hipertensão pulmonar ⁵³, aterosclerose e restenose ⁵⁵. Mais recentemente, a EndMT foi demonstrada estar presente no remodelamento de arterialização venosa ^{49,50,55,56}.

Um transplante arterial realizado em camundongos demonstrou presença de 10% de EndMT na camada neoíntima ⁴⁹. Nesse mesmo trabalho, dado semelhante foi obtido no modelo de conexão veia cava com artéria aorta em camundongos ⁴⁹. De maneira bastante elegante, Brian C Cooley e colaboradores, utilizando modelo de rastreamento das células endoteliais YFP (do inglês “Yellow Fluorescent Protein”) positivas, demonstraram a presença da EndMT na restenose pós enxerto venoso ⁵⁶. A veia jugular de camundongos com células endoteliais marcadas (YFP+) foi interposta na artéria femoral, sendo que a análise após 35 dias demonstrou uma neoíntima composta por aproximadamente 50% de células derivadas de ECs. Os autores demonstraram que o processo de EndMT obtido na arterialização venosa envolveu a ativação clássica da via do TGF β (do inglês “Transforming Growth Factor β ”), por meio da smad2/3 e Slug ⁵⁶.

Dados de nosso laboratório (não publicados) demonstraram aumento da expressão de IL1 β e TGF β 2 em veia jugulares arterializadas, utilizando modelo de arterialização em ratos. Esses dados demonstram que as sinalizações de IL1 β e TGF β estão aumentadas durante a arterialização venosa, indicando

condições propícias para o acontecimento do processo de EndMT e disfunção endotelial.

1.4 A proposta do trabalho

Durante o processo de remodelamento do enxerto venoso no leito arterial, ocorre dano endotelial devido à alteração das forças hemodinâmicas e liberação de citocinas. Nossa hipótese é que o alto estiramento mecânico nas células endoteliais de safena humana é um estímulo patológico que promove disfunção endotelial e alteração do fenótipo.

Este trabalho foi desenvolvido em colaboração com o Dr Martin C Harmsen, professor titular do Departamento de Patologia da University Medical Centre Groningen (UMCG) na Holanda, e com o Dr Aaron Baker, professor associado do Departamento de Bioengenharia Cardiovascular da Universidade do Texas em Austin (UT Austin).

2. Objetivos

2.1 OBJETIVO GERAL

Testar a hipótese que o alto estiramento em células endoteliais de veia safena humana produz efeitos patológicos no fenótipo endotelial.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o potencial de indução de EndMT por estímulo químico;
- Verificar se o alto estiramento induz e/ou potencializa a EndMT em hSVEC;
- Avaliar os impactos do alto estiramento no fenótipo endotelial da hSVEC.

3. Materiais e Métodos

3.1 Cultura Celular

3.1.1. Obtenção das células endoteliais de veia safena humana (hSVEC)

Os segmentos de veia safena humana foram obtidos de pacientes submetidos à cirurgia de revascularização cardíaca no Instituto do Coração/ Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (InCor-HCFMUSP). Esse protocolo de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq SDC 4292/15/119) do HC-FMUSP (ANEXO 1). Após o procedimento cirúrgico, e com a aprovação dos pacientes através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – ANEXO 2), os segmentos que não foram utilizados no enxerto serviram para extração de células endoteliais.

As hSVECs foram extraídas por digestão enzimática de acordo com protocolo já estabelecido no laboratório ⁵⁷. O lúmen da veia foi incubado com collagenase tipo II (1mg/mL) durante 1 hora a 37°C. Em seguida, o vaso foi lavado com tampão fosfato (PBS, do inglês “Phosphate Buffered Saline”), o conteúdo centrifugado (2000 rpm por 10 minutos), as células ressuspensas e mantidas em estufa umidificada (37°C, 5% CO₂). As hSVECs foram mantidas em meio de cultura EGM2 (LONZA) com adição de suplementos específicos para cultivo de EC: hEGF (do inglês “human Epidermal Growth Factor”); hidrocortisona, gentamicina/ anfotericina; VEGF (do inglês “Vascular Endothelial Growth Factor”); hFGF (do inglês “human Fibroblast Growth Factor”), R3-IGF (do inglês “Insulin-like Growth Factor 1); ácido ascórbico, heparina e 2% de soro fetal bovino (FBS, do inglês “Fetal Bovine Serum”). As células foram mantidas em cultura e utilizadas até a passagem 8.

As células endoteliais de origem arterial provenientes de aorta e coronária, HAEC (do inglês “Human Aortic Endothelial Cells”) e HCAEC (do inglês “Human Coronary Artery Endothelial Cells”) respectivamente, foram compradas pela empresa LONZA e mantidas com mesmo meio de cultura descrito para hSVEC.

3.1.2. Indução de EndMT

Depois de atingirem 100% de confluência as hSVECs foram tratadas com 10ng/mL de TGF β 2 (R&D Systems) e/ou TGF β 2 + IL1 β (Peprotech) (ambos a 10ng/mL) diariamente no meio de cultura, por um período de até 96 horas. No período determinado as células foram processadas para extração de RNA, proteína ou imunofluorescência.

3.2 Estímulo mecânico

Foram utilizados dois equipamentos distintos para estiramento multidirecional das células endoteliais: (3.2.1) Flexcell® FX-5000™ e (3.2.2) um aparelho construído pelo laboratório de Bioengenharia Cardiovascular da Universidade do Texas em Austin (BME-UT Austin).

3.2.1. Flexcell® FX-5000™

De modo geral, o Flexcell® FX-5000™ consiste em um suporte para as placas de cultura, conectado a um equipamento que controla os parâmetros e um sistema de vácuo. As células endoteliais foram cultivadas em placas de 6 poços específicas para esse sistema, cuja base é formada por membrana de silicone e recobertas com colágeno tipo I (Figura 5). O estiramento celular é normalmente apresentado como a porcentagem de mudança referente à dimensão original e, na figura 5 há uma representação esquemática exemplificando como esse estímulo é aplicado nas células. Após atingirem 100% de confluência, as células endoteliais neste equipamento foram submetidas à frequência de 1Hz em duas intensidades de estiramento: 5% (simulando a condição venosa) e 15% (simulando a condição arterial); por um período de até 96 horas. Após o estímulo, foram coletados os meios de cultura e as células foram processadas de acordo com o protocolo de interesse.

Figura 5: Estiramento celular pelo Flexcell® FX-5000™. As células foram cultivadas em placas cuja base é de membrana de silicone. Através de um sistema de vácuo foi possível controlar a intensidade e frequência, por meio do qual foi realizado o estiramento celular.

3.2.2. Equipamento da BME UT Austin

Parte dos experimentos foi realizada no laboratório do Dr Aaron Baker (BME - UT Austin) por meio de um equipamento de estiramento celular construído por eles, representado na figura 6⁵⁸. As placas também possuem a base flexível com membrana de silicone, e foram recobertas com colágeno do tipo I. No entanto, diferente do Flexcell®, o sistema de estiramento se baseia em pistões de teflon que, conectados a um motor, se movimentam de maneira cíclica - para cima e para baixo (Figura 6).

As células utilizadas nos experimentos realizados em Austin foram cultivadas em meio MCDB 131 (Thermo), no entanto os suplementos (Lonza) foram os mesmos já descritos no item 3.1.1 desta tese. O estímulo mecânico foi aplicado após 100% de confluência celular.

Os experimentos realizados nesse equipamento também foram com frequência 1Hz, mas por limitação metodológica as intensidades de estiramento utilizadas foram: 2,5% (simulando a condição venosa) e 12,5% (simulando a condição arterial); por um período de até 96 horas. Após o estímulo as células foram processadas para imunofluorescência.

Importante destacar que as células endoteliais apresentaram o mesmo fenótipo após alto estiramento tanto com 15% (Flexcell®), como com 12,5% (equipamento UT Austin). Deste modo, apresentamos os dados na tese como alto estiramento (12,5-15%) e baixo estiramento (2,5-5%) para facilitar a compreensão.

Figura 6: Estiramento celular pelo equipamento da UT-Austin. As células são cultivadas em placas cuja base é de membrana de silicone. Através de um sistema com pistões conectados a um motor foi possível controlar a intensidade e frequência, por meio do qual foi realizado o estiramento celular. Vista lateral (**A**) e inferior (**B**) de uma placa de 6 poços, evidenciando seus componentes. O equipamento com o motor e a base para as placas se encontra representado em desenho esquemático (**C-D**), assim como em foto (**E**). Imagem retirada do artigo de Jason Lee e colaboradores ⁵⁸.

3.3 Expressão gênica

3.3.1 Extração de RNA

As células foram lisadas com 1mL de *Trizol Reagent* (Invitrogen) e o protocolo de extração foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. De modo resumido, as amostras foram incubadas com clorofórmio (200µL/ amostra) e centrifugadas (12000g, 4°C, 15 minutos) para separação das fases. O sobrenadante, onde se localiza o RNA, foi coletado e incubado por 10 minutos à temperatura ambiente com 500µL de isopropanol. Após centrifugação (12000g, 4°C, 10 minutos) o precipitado de RNA foi incubado com 1mL de etanol 75%, e novamente centrifugado (7500g, 4°C, 5 minutos). Após período de secagem, o precipitado de RNA foi diluído em 20µL de água deionizada autoclavada com dietilpirocarbonato (DEPC).

A quantificação do RNA total foi realizada em espectrofotômetro (nanodrop), e a integridade foi checada através da eletroforese em gel de agarose 1% com tampão Tris-acetato EDTA (TAE :Tris-base 0,5M, ácido acético 1M, EDTA 0,5M pH 8) e corante *GelRed* (Uniscience).

3.3.2 Síntese de cDNA

A síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada a partir da reação de transcriptase reversa com a enzima *Superscript III* (Thermo), conforme instruções do fabricante. Em uma primeira etapa, para cada cDNA foram utilizados de 2 a 3µg de RNA total, 1µL de oligo(dT), 1µL de dNTP (10mM) e quantidade suficiente de água para completar o volume para 13µL. As amostras foram colocadas no termociclador por 5 minutos à 65°C. Na sequência, após período de pelo menos 1 minuto a 4°C, foram adicionados 7 µL de tampão contendo: 4µL de tampão fornecido no *kit*, 1µL de 0,1M DTT, 1µL inibidor de RNase e 1µL da enzima *SuperScript III*. A amostra, com volume final de 20µL, foi colocada novamente no termociclador onde permaneceu por 60 minutos a 50°C e 15 minutos finais a 70°C. As amostras de cDNA foram armazenadas em -20°C para posterior utilização.

3.3.3 PCR em tempo real

A expressão gênica foi realizada através da técnica de PCR em tempo real utilizando o equipamento *7500 Fast Real-Time PCR* (Thermo). Para tal, o cDNA foi incubado com o reagente *SYBR™ Green PCR Master Mix* (Thermo) e com o oligonucleotídeo específico para o gene de interesse (tabela 1). As concentrações de cDNA utilizadas para cada gene foram padronizadas de modo a obter maior eficiência da reação.

Nesta técnica, a amplificação por PCR é combinada ao intercalante *SYBR™ Green*, cujo sinal fluorescente é gerado proporcionalmente à quantidade do produto de PCR gerada. A intensidade de fluorescência é monitorada a cada ciclo do PCR, o que possibilita a análise durante a fase exponencial da reação. Ao final da reação a curva de dissociação permite verificar se apenas um produto foi amplificado. Todas as amostras foram analisadas em triplicata e o gene GAPDH foi utilizado para normalização dos resultados. A análise dos dados foi realizada pelo método do ciclo comparativo (CT), sendo que o CT se refere ao número de ciclos em que a quantidade do gene alvo atinge um limiar fixo. O ΔCT é a diferença de ciclos entre o gene de estudo e o gene normalizador (GAPDH). Os níveis de expressão gênica foram determinados pelo valor de $2^{-\Delta\Delta CT}$, em que $\Delta\Delta CT$ é o valor de ΔCT subtraído do ΔCT do gene alvo.

Tabela 1: Sequência dos oligonucleotídeos utilizados e o tamanho do amplificado gerado (em pares de base – pb).

Gene	Senso (5'- 3')	Anti-senso (5'- 3')	Amplicon (pb)
VE-Cad	ACAACTGGCCTGTGTTACGCA	GAGGTCCCCACAGCCGACGA	69
PECAM1	GCAACACAGTCCAGATAGTCGT	GACCTCAAACCTGGGCATCAT	74
SM22 α	CTGAGGACTATGGGGTCATC	TAGTGCCCATCATTCTTGGT	133
Calponina	TGAAGTACGCAGAGAAGCAG	CAGCTTGGGGTCGTAGAG	155
NOS3	ATCCCCCGGAGAATGGAGA	GCAGGAGATGCTGTTGAAGC	122
NOX4	TTGGGGCTAGGATTGTGTCT	TCGGCACATGGGTAAAAGGA	86
GAPDH	CCCATGTTTCGTCATGGGTGT	TGGTCATGAGTCCTTCCACGATA	145

3.4 Expressão proteica

3.4.1 Extração e quantificação de proteína

Após lavagem com PBS 1x, as proteínas foram obtidas por lise mecânica com tampão de extração (60mM Tris-HCl pH 6,8; 5% glicerol e 2% SDS – do inglês “Sodium Dodecyl Sulfate”), seguida de aquecimento a 95°C por 10 minutos. A concentração total de proteína foi obtida através do *kit* de detecção *BCA™* (PIERCE Biotechnology), conforme manual do fabricante. As amostras foram mantidas em -20°C para posterior utilização.

3.4.2 Western Blot

Foram utilizados 25µg de extrato total para separação da proteína através da eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS. Foi utilizado padrão de peso molecular *Kaleidoscope™* (Bio-Rad) para posterior identificação da proteína alvo (peso molecular de cada proteína na tabela 2). Após a eletroforese, utilizou-se equipamento de transferência úmida (Bio-Rad) para transferir as proteínas do gel para uma membrana de *PVDF* (do inglês “Polyvinylidene difluoride”) previamente ativada com metanol. Para tal, foi utilizado tampão de transferência (25mM Tris-Base, 192mM glicina, 20% metanol), com voltagem fixa de 90V durante 1h30. Na sequência, a membrana foi incubada com tampão de bloqueio (5% de BSA, do inglês “Bovine Serum Albumin”) por 1 hora a temperatura ambiente, para inibir ligações inespecíficas. Em seguida, houve incubação por 16 horas com anticorpo primário específico (tabela 2). Posteriormente, após etapas de lavagem com tampão TBS (do inglês “Tris-buffered Saline”) + 0,1% de detergente tween (tampão TBST), a membrana foi incubada com anticorpo secundário específico conjugado com peroxidase (HRP, do inglês “Horsehadish Peroxidase”) por 1 hora a temperatura ambiente. Após nova etapa de lavagem com TBST, a membrana foi incubada com solução ECL (do inglês “Enhanced Chemiluminescence”) e revelada por uma reação de quimioluminescência utilizando o fotodocumentador *ImageQuant* (LAS 4000, GE Healthcare). As bandas obtidas foram quantificadas por densitometria através do *software* ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Utilizamos o GAPDH como normalizador proteico.

Tabela 2: Anticorpos e diluições utilizadas na técnica de Western Blot

Anticorpos	Marca/ Catálogo	Diluição	Tamanho (KDa)
pSMAD2	Cell signaling/ #3108	1-1000	60
pp38	Cell signaling/ #9216	1-1000	38
pERK1/2	Cell signaling/ #4377	1-1000	42
Snail	Cell signaling/ #3895	1-500	29
VE-cad	Cell signaling/ #2500	1-1000	115
PECAM1	Abcam/ ab24590	1-1000	130
Calponina	Millipore/ 04-589	1-500	34
SM22	Abcam/ ab10135	1-1000	22
pFAK	Life/ 44-624	1-500	125
GAPDH	Abcam/ ab9485	1-5000	37

3.5 Imunofluorescência (IF)

As células foram fixadas com solução de paraformaldeído a 4% (PFA 4%) por 30 minutos a temperatura ambiente e lavadas com tampão TBST. As membranas de silicone foram cuidadosamente cortadas em pedaços pequenos, de modo a caberem em lâminas de cultura celular para realização da imunofluorescência. Após essa etapa foram permeabilizadas com solução de PBS + 0,1% do detergente NP40 por 15 minutos, em temperatura ambiente. Na sequência, houve incubação com solução de bloqueio (PBS+1%BSA) por 1 hora e depois com um anticorpo primário ou, no caso de dupla marcação, com 2 anticorpos distintos (produzidos em animais diferentes) (tabela 3). As membranas ficaram incubando a 4°C por aproximadamente 16 horas. No dia seguinte, após etapa de lavagens (TBST), as membranas foram incubadas por 2 horas (temperatura ambiente) com anticorpo secundário fluorescente (tabela 3) e com intercalante de DNA para marcação do núcleo (DAPI). As marcações de filamento de actina (F-actina) e monômeros de actina (G-actina) seguiram protocolo diferenciado, uma vez que os anticorpos já eram conjugados ao fluoróforo. Nesse caso, após a etapa de bloqueio as amostras foram incubadas com Faloidina conjugada ao Alexa 568 (marcação da F-actina) e com Deoxyribonuclease conjugada ao Alexa 488 (marcação da G-actina), juntamente com o DAPI, pelo período de 2 horas a temperatura ambiente. Após lavagem final, as lamínulas foram montadas com tampão PBS-Glicerol (1:1) e vedadas

com esmalte. Durante toda essa etapa, até o final da análise, as membranas foram protegidas da luz e mantidas a 4°C, para evitar a perda da fluorescência do anticorpo.

Tabela 3: Anticorpos e diluições utilizadas na imunofluorescência

	Anticorpos	Marca/ Catálogo	Diluição
<i>Primários</i>	VE-cad	Cell signaling/ #2500	1-100
	PECAM1	Abcam/ ab24590	1-100
	Calponin	Millipore/ 04-589	1-100
	SM22	Abcam/ ab10135	1-100
	Colágeno I	Abcam/ ab34710	1-500
	Cofilina	Abcam/ ab42824	1-100
	fosfo Cofilina (Ser3)	Abcam/ ab12866	1-100
	vinculina	Sigma/ V9131	1-100
	pFAK	Life/ 44-624	1-100
<i>Conjugados</i>	Phalloidin	Life/ A12380	1-200
	G actina AF488	Life/ D12371	1-200

3.5.1 Microscopia confocal

As imagens de imunofluorescência realizadas no Brasil foram obtidas em dois equipamentos distintos:

- Sistema Confocal Zeiss LSM 510 Meta, através da REDE PREMium da FMUSP (FAPESP 04/08908-2);
- Sistema Confocal Zeiss 780 NLO, através do Centro de Facilidades de Apoio a pesquisa da USP (CEFAP-USP).

As imagens realizadas na UT Austin foram obtidas através no Microscópio Fluoview FV 101 da marca Olympus.

Ao início de cada registro, todos os parâmetros dos *lasers* foram estabelecidos a partir de amostras de controle negativo e do controle estático (intensidade de ganho da fluorescência), e foram mantidos ao longo de todas as amostras experimentais. O registro de cada imagem ocorreu aproximadamente no mesmo plano focal, aonde a intensidade de marcação se mostrou maior. Em

alguns casos foram realizados cortes em série (“Z stack”), de modo a obter uma imagem em 3D (pelo ImageJ) para melhor definição de localização das proteínas observadas. Para cada experimento foram obtidas de 4 a 10 imagens para posterior quantificação pelo software ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

3.6 Dosagem de óxido nítrico (NO)

O óxido nítrico é um gás com rápida meia vida, desse modo nós medimos um de seus metabólitos acumulado no meio de cultura: o nitrito (NO_2). Para isso utilizamos o detector quimioluminescente *NO Analyzer* (NOA 280 Sievers Instruments). Foram injetados 20 μl de meio de cultura no aparelho, junto com uma solução redutora de KI/HAc em temperatura ambiente. A concentração de NO_2 foi baseada na curva de calibração feita no mesmo dia com solução padrão de NaNO_2 (0.05 - 20 μM). Todos os valores obtidos foram ajustados pelo volume total de meio de cultura coletado.

3.7 Array de citocinas

O sobrenadante das células foi coletado e avaliado quanto ao perfil secretório. Para isso utilizamos Kits comerciais para análise de um painel com 40 citocinas inflamatórias em duplicata (RayBio Antibody Array AAH-IFN-3-8). Na figura 7 se encontra um esquema de como funciona o ensaio, modificado do manual de instruções. Incubamos cada membrana com a mesma quantidade de meio de cultura obtidas para cada condição (estático e alto estiramento), nos tempos de 24 e 48 horas. O protocolo foi seguido de acordo com as recomendações do fabricante. A quantificação das proteínas foi realizada pelo software ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>), sendo que as proteínas de cada membrana foram normalizadas pelos controles positivos internos (conforme destacado na figura 7).

Figura 7: Mecanismo de funcionamento do array de citocinas. Modificado do manual de instruções (RayBio Antibody Array AAH-IFN-3-8). Destaque na imagem da membrana indicando os controles positivos internos.

3.8 Análise dos resultados

Os resultados foram representados como média $\pm$ erro padrão da média. As comparações estatísticas entre grupos foram realizadas por meio do teste t de *Student* para valores não pareados ou análises de variâncias de uma ou duas vias (ANOVA) com *post-hoc* do tipo Bonferroni, quando apropriados. Valores com $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos. Todas as análises foram realizadas pelo software GraphPad Prism 5.

4. Resultados

4.1 Indução da EndMT em hSVEC por estímulo químico

As hSVECs foram tratadas com estímulo químico clássico descrito na literatura (TGF β 2+IL1 β) por um período de 96 horas para determinar sua capacidade de indução para EndMT. A análise por microscopia ótica mostrou diferenças morfológicas após 24 horas de tratamento, em que as células deixaram de apresentar a forma arredondada (“cobblestone”) e passaram a ter um formato mais alongado (“spindle shaped”), característico de células mesenquimais (Figura 8A). A análise da expressão gênica após o tratamento não demonstrou redução significativa dos marcadores endoteliais PECAM-1, NOS3 e VE-caderina (Figura 8B), entretanto podemos visualizar a redução dos mesmos em nível proteico (Figura 8C). A aquisição dos marcadores mesenquimais avaliados (SM22 e calponina) foi evidenciada na expressão gênica (Figura 8B), sendo corroborada pelos níveis proteicos (Figura 8C). A hSVEC também aumentou a expressão de colágeno tipo I após a indução química (Figura 8C).

Assim como esperado, observamos alteração na organização dos filamentos de actina (F-actina), marcados pela Faloidina (Figura 8C). Na condição fisiológica as células endoteliais apresentam padrão cortical da F-actina (Figura 8C, painel superior), sendo que após estímulo externo (químico e/ou físico) há formação de fibras de *stress* ao longo da célula (Figura 8C, painel inferior) ⁵⁹.

É demonstrado que o tratamento apenas com TGF β 2 é capaz de induzir EndMT ^{45,46}. Nossos dados indicam que o TGF β 2 sozinho aumentou a expressão de SM22, que é um marcador mesenquimal mais inicial, ao passo que não aumentou o marcador mais tardio: a calponina (Figura 9A). Já o tratamento combinado de TGF β 2 com IL1 β potencializa a indução mesenquimal em hSVEC (Figura 9A), assim como descrito para HUVEC ⁴⁷. Foi observado o aumento significativo de SM22 e calponina (Figuras 9C e 9D), assim como redução no marcador endotelial PECAM-1 (Figura 9B). Esses resultados confirmam o potencial de transição mesenquimal da hSVEC com o tratamento utilizado.

A

B

C

Figura 8: O tratamento químico com TGFβ2 e IL1β é capaz de induzir EndMT em célula endotelial de veia safena humana (hSVEC). **A:** Análise morfológica, por microscopia óptica, das células nos períodos indicados. Objetiva de 10x com zoom de 3 vezes **B:** Expressão gênica, por PCR em tempo real, dos marcadores endoteliais (PECAM-1, NOS3 e VE-cad) e mesenquimais (SM22 e calponina) após 4 dias de tratamento. *p<0,05; barras indicam erro padrão da média, n=3. **C:** Imagens representativas de imunofluorescência (n=4-5), por microscopia confocal, dos marcadores indicados em cada painel. Núcleo celular em azul (DAPI), microscopia confocal, objetiva de 40x com zoom de 2 vezes, escala:10µm.

Figura 9: O estímulo combinado de TGFβ2 com IL1β é mais eficiente na indução da transição mesenquimal em hSVEC. **A:** Imagens representativas de imunofluorescência, por microscopia confocal, dos marcadores indicados em cada painel; objetiva de 20x, escala: 100µm. Células endoteliais foram tratadas com estímulos individuais (TGFβ2 ou IL1β) ou estímulo combinado (TGFβ2 + IL1β). **B-D:** Quantificação da intensidade de marcação após tratamento combinado (TGFβ2 + IL1β). Houve redução no marcador endotelial (**B**), assim como aumento nos mesenquimais SM22 (**C**) e calponina (**D**). Quantificações da imunofluorescência obtidas pelo software ImageJ; barras indicam erro padrão da média, *p<0,05 e **p<0,01, n=4-5.

A indução mesenquimal em hSVEC ativa as vias canônicas e não-canônicas descritas na literatura (Figura 10)⁴⁴. A análise de ativação das vias foi realizada através da fosforilação das proteínas envolvidas pela técnica de *Western Blot*. Durante os períodos iniciais avaliados (2h, 6h e 24h) houve aumento nas fosforilações da Smad2 (Figura 10A), p38 (Figura 10B) e pERK1/2 (Figura 10C). O fator de transcrição Snail teve sua expressão aumentada após o tratamento, conforme demonstrado na Figura 10D.

Figura 10: Via de sinalização envolvida na indução de EndMT em hSVEC. O tratamento químico utilizado aumentou a fosforilação da Smad2 (A, n=5), da p38 (B, n=4) e da ERK1/2 (C, n=4). Houve aumento na expressão do fator de transcrição Snail (D, n=3). Dados obtidos pela técnica de Western Blot, quantificações pelo software ImageJ. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001; barras indicam erro padrão da média.

Nos chama atenção que a hSVEC apresenta maior sensibilidade para indução química de EndMT quando comparado a dados na literatura com outras células endoteliais. Podemos observar na Figura 11A que a partir de 2 horas já ocorre alteração na morfologia das células tratadas. Após 6 horas de tratamento

os marcadores endoteliais começam a reduzir, apresentando diferença significativa já a partir de 24 horas (Figuras 11B e 11C). No trabalho de Maleszewska e colaboradores foi observada diferença significativa após 3 dias de tratamento químico em HUVEC ⁴⁷.

Figura 11: A hSVEC apresenta rápido e alto potencial de indução química. **A:** análise por microscopia óptica demonstrou alteração na morfologia a partir de 2 horas do tratamento químico. Objetiva de 10x com zoom de 3 vezes. Expressão proteica por *Western Blot* dos marcadores endoteliais PECAM-1 (**B**) e VE-caderina (**C**) nos tempos indicados. Quantificações pelo software *ImageJ*; barras indicam erro padrão da média, * $p < 0,05$, $n = 5$.

4.2 Avaliação do fenótipo de hSVEC por estímulo mecânico

A hSVEC pertence a um sistema venoso, ou seja, ambiente predominantemente de baixa pressão e estiramento. No presente estudo

avaliamos o fenótipo da hSVEC frente a um estímulo patológico como o alto estiramento, simulando o que ocorre no processo de arterialização venosa. Inicialmente realizamos experimentos com estiramento fisiológico para esse tipo celular (2,5 -5%) para avaliar seu comportamento comparado a condição estática. Conforme pode ser observado na Figura 12, o estímulo fisiológico não modificou a expressão proteica de nenhum marcador de EndMT avaliado.

Figura 12: O estiramento fisiológico não altera a expressão dos marcadores estudados em hSVEC no período avaliado. Expressão proteica por western blot dos marcadores endoteliais, PECAM-1 (A) e VE-caderina (B), e do marcador mesenquimal SM22 (C). Quantificações pelo software ImageJ; barras indicam erro padrão da média, n=4.

Para avaliar o efeito do alto estiramento mecânico no fenótipo endotelial testamos duas hipóteses: (4.2.1) se o estiramento *per se* é capaz de induzir EndMT; (4.2.2) se o estiramento acelera o processo de EndMT induzido quimicamente.

4.2.1 Efeito do alto estiramento (12,5 -15%) na indução de EndMT em hSVEC

Tendo em vista a alta habilidade de indução das hSVECs, avaliamos a presença dos marcadores de EndMT a partir de 24 horas até o período de 96 horas de estímulo.

O alto estiramento não foi capaz de induzir EndMT nas condições testadas (Figura 13). Em relação aos marcadores endoteliais, nossos dados de imunofluorescência (n=3) e *western blot* (n=4) mostraram que não houve alteração na expressão da PECAM-1 (Figura 13A e 13B) e da VE-caderina (Figura 13D e 13E) em nenhum dos tempos analisados. Da mesma forma, não foi observado indução dos marcadores mesenquimais calponina (Figura 13A e 13C) e SM22 (Figura 13F e 13G). Verificamos pela imunofluorescência a presença de calponina em algumas células (marcação em vermelho, Figura 13A), mas se mostrou de maneira bem esparsa e randômica entre os grupos. De fato, não detectamos sinal da proteína em nenhum dos grupos pela técnica de *western blot*, em que utilizamos proteína de célula muscular lisa humana como controle positivo.

Esses resultados contrastam com alguns dados da literatura que mostram a indução de EndMT após estímulo mecânico ^{32,60}. Cevallos M e colaboradores avaliaram o efeito de 10% de estiramento em HUVEC por até 96 horas, e demonstraram um aumento da expressão de marcadores mesenquimais, ao passo que obtiveram apenas uma leve redução na expressão gênica dos marcadores endoteliais, sem indícios de alteração das proteínas avaliadas ³². Resultado semelhante foi obtido por outro grupo, também em HUVEC, com estiramento de 15% por 48 horas ⁶⁰.

As células HUVECs diferem da maioria das células endoteliais venosas dos tecidos adultos, visto que a veia umbilical transporta sangue oxigenado e rico em nutrientes para o feto, apresentando maior volume e fluxo do que as outras veias ⁶¹. Outro fator importante é que as hSVECs utilizadas nesse trabalho são obtidas de adultos idosos (60-80 anos), já com complicações cardiovasculares. Esses fatores podem explicar a divergência nos resultados obtidos. Vale ressaltar que até o presente momento não há estudos publicados com estiramento em células endoteliais de safena humana, que pertence ao leito vascular utilizado amplamente nas cirurgias de revascularização cardíaca.

Ainda que não tenha sido observada alteração na expressão de marcadores endoteliais pelo alto estiramento, houve uma acentuada modificação na organização dos filamentos de actina, demonstrada pela marcação com Faloidina (em vermelho, Figura 13D). Após 24 horas do estímulo, os filamentos ao redor das células ficaram mais evidentes e observa-se um alongamento da sua morfologia. Esse mesmo resultado foi obtido em outro trabalho, no qual o estiramento foi feito em HUVEC por até 24 horas ⁶². No entanto, após 48 horas de estiramento houve uma marcada redução dos filamentos de actina nas hSVECs (Figura 13D), que se manteve até 96 horas (dado não mostrado). Esta redução nos filamentos de actina ocorreu em sentido oposto à nossa expectativa. Esperávamos que o alto estiramento induzisse um aumento na formação de fibras de actina, de modo que a hSVEC suportasse melhor o estímulo mecânico. Esse dado foi melhor caracterizado e os dados estão apresentados nos próximos tópicos da tese.

Figura 13: O alto estiramento não induz EndMT em hSVEC no período avaliado. **A, D, F:** Imagens representativas da imunofluorescência para marcadores de EndMT obtidas por microscopia confocal, objetiva de 40x, escala: 50μm. Marcadores endoteliais em verde: PECAM-1 (**A**) e VE-caderina (**D**); marcadores mesenquimais em vermelho: Calponina (**A**) e SM22 (**F**). Núcleo celular corado com DAPI (azul). **B, E, G:** Quantificação do *western blot*, através do software ImageJ. Barras indicam erro padrão da média, n=4. Foi utilizada proteína de célula muscular lisa humana como controle positivo para o marcador calponina (**C**).

4.2.2 Efeito do alto estiramento (12,5 -15%) como possível potencializador da indução mesenquimal química em hSVEC

Estimulamos as hSVECs com alto estiramento na presença do tratamento químico clássico indutor de EndMT ($TGF\beta 2 + IL1\beta$). Como podemos observar na Figura 14, não há evidência de potencialização da indução pelo estímulo mecânico. O alto estiramento não reduziu os marcadores endoteliais, PECAM-1 (Figura 14A) e VE-caderina (Figura 14B), assim como não aumentou os mesenquimais, Calponina (Figura 14A) e SM22 (Figura 14C), quando comparados ao seu controle estático tratado em cada período avaliado. Na realidade houve até uma redução, embora não significativa, na expressão de Calponina após o estímulo combinado (Figura 14A, à direita). Novamente verificamos a redução significativa na marcação dos filamentos de actina, como demonstrado na figura 14B.

Interessante destacar que o estímulo prolongado, a partir de 72 horas, mostrou-se inviável uma vez que muitas células soltaram da placa, impedindo o processamento da amostra (Figura 14). Sabemos que durante a transição mesenquimal as células perdem diversas moléculas de adesão, aumentando a capacidade migratória das mesmas ⁴⁴. Desse modo, acreditamos que o estímulo combinado foi muito agressivo, fazendo as células se desprenderem da placa, possivelmente pela perda das proteínas de adesão. Outra possibilidade para o fenômeno observado seria o aumento na apoptose, entretanto não realizamos experimento para comprovação dessa hipótese.

Figura 14: O alto estiramento mecânico não potencializa a indução mesenquimal promovida pelo tratamento químico em hSVEC. **A-C:** Imagens representativas da IF para marcadores de EndMT (painel da esquerda) e suas respectivas quantificações nos tempos indicados (à direita). **A:** Dupla marcação para PECAM-1 (verde) e Calponina (vermelho). **B:** Dupla marcação para VE-caderina (verde) e Faloidina (vermelho). **C:** IF para SM22 (vermelho). Núcleo celular corado com DAPI (azul); microscopia confocal, objetiva de 40x, escala: 50μm. Quantificações das imunofluorescências obtidas pelo software ImageJ; barras indicam erro padrão da média, * $p < 0,05$, $n = 3$.

Considerando a alta habilidade de indução química das hSVECs, esperávamos alteração fenotípica nos tempos iniciais. No entanto, as células submetidas ao estímulo combinado (químico + mecânico) apresentaram o mesmo perfil de marcadores que as células estimuladas apenas quimicamente (Figura 14). Assim, nossos dados sugerem que o alto estiramento não foi capaz de acelerar o processo de EndMT.

Desta forma, nossos dados demonstraram que nas condições testadas o alto estiramento em hSVEC não foi capaz de induzir EndMT, assim como também não potencializou a indução química padrão. Também realizamos alguns testes para avaliar a participação da EndMT no modelo de arterialização venosa em rato, em que a veia jugular é conectada com a artéria carótida, conforme caracterizado por nosso laboratório ^{14,57}. Não obtivemos êxito nessa abordagem e os resultados estão apresentados no apêndice 2.

De modo interessante, notamos que o alto estiramento sozinho e combinado com o tratamento químico promoveu uma grande redução nos filamentos de actina a partir de 48 horas (Figuras 13D e 14B).

4.3 Redução do filamento de actina (F-actina) promovida pelo alto estiramento em hSVEC

Esta é a primeira descrição de redução dos filamentos de actina em célula endotelial após estímulo mecânico. A participação do citoesqueleto de actina na regulação de diversas funções endoteliais, como controle da permeabilidade vascular, migração e transdução de sinais, é amplamente evidenciada na literatura ^{23,29,63,64}. Sendo assim, os mecanismos envolvidos nessa redução e as implicações na função celular são de suma importância no entendimento da função endotelial.

4.3.1 O alto estiramento modula a F-actina em célula de origem venosa, mas não em origem arterial

As hSVECs quando submetidas ao baixo estiramento, mais fisiológico, não demonstraram alteração no padrão dos filamentos de actina (Figura 15A). As

células endoteliais permaneceram com o padrão cortical semelhante à condição estática, até o período de 96 horas (não representado na figura). Esse resultado contrasta bastante com o obtido após alto estiramento, em que depois de 48 horas do estímulo houve redução significativa na expressão da F-actina (Figura 15B).

Para avaliar se a redução dos filamentos após alto estiramento é exclusiva de célula de origem venosa, submetemos células endoteliais de aorta humana (HAEC, do inglês “Human Aortic Endothelial Cells”) ao mesmo estímulo e avaliamos o perfil da F-actina. Como pode ser observado na figura 15C, não houve alteração no padrão e expressão do filamento de actina. Mesmo dado foi obtido com um experimento em célula endotelial humana de artéria coronária (HCAEC, do inglês “Human Coronary Artery Endothelial Cells”) (dado não mostrado).

Esses resultados sugerem que a redução da F-actina após aumento do estiramento é um fenômeno da célula endotelial venosa estudada. Além disso, é importante destacar que essa diminuição não parece ocorrer em função de um aumento na apoptose. Podemos observar que após 48 horas de alto estiramento os núcleos celulares das hSVECs se apresentam íntegros, sem fragmentação, o que sugere a não ativação de apoptose (Figura 15B).

Figura 15: O alto estiramento reduz o filamento de actina em hSVEC, mas não altera o padrão na célula endotelial arterial (HAEC). Marcação de F-actina por Faloidina (vermelho) nas seguintes condições: **A:** baixo estiramento em hSVEC, n=5; **B:** alto estiramento em hSVEC, n=9; **C:** alto estiramento em célula endotelial de aorta humana (HAEC), n=3. Núcleo celular corado por DAPI (azul). Microscopia confocal, objetiva de 40x, escala: 50μm. Quantificação da imunofluorescência obtida pelo software ImageJ; barras indicam erro padrão da média; *p<0,05.

4.3.2 A redução da F-actina pelo alto estiramento em hSVEC é um fenômeno reversível

A redução dos filamentos de actina em hSVEC induzida pelo alto estímulo mecânico mostrou-se reversível, uma vez que após 24 horas na condição estática foi verificada novamente a presença da marcação por Faloidina (Figura 16).

Figura 16: A redução dos filamentos de actina após alto estiramento em hSVEC é um fenômeno reversível. Imagens representativas da marcação de F-actina (Faloidina em vermelho) obtidas por microscopia confocal, objetiva de 60x. Condições: estática (A), após 48 horas de alto estiramento (B) e 24 horas pós alto estiramento (C). Núcleo corado por DAPI (azul). D: Quantificação da imunofluorescência obtida pelo software ImageJ. Barras indicam erro padrão da média; linha tracejada em vermelho marca o controle estático, ** $p < 0,005$, $n=3$.

A formação e degradação do filamento de actina é regulada de modo dinâmico e complexo, mediante envolvimento de uma série de proteínas, de acordo com a necessidade celular ^{59,65}. De modo geral, o filamento é formado a partir da polimerização de monômeros de actina, conhecidos como actina globular (G-actina). Esse é um processo dependente de ATP (do inglês, “Adenosine Triphosphate”) e reversível, ou seja, a degradação da F-actina ocorre a partir da despolimerização, e consequente liberação da G-actina ^{59,65}. As células não musculares apresentam quantidades equilibradas de G-actina e F-actina, e dependendo do estímulo recebido há alteração no *pool* dessas formas, levando à formação ou degradação dos filamentos ⁶⁶.

Sendo assim, fomos avaliar a G-actina por imunofluorescência em nossos grupos experimentais (Figura 17). Verificamos que não houve diferença na quantificação da proteína nos grupos avaliados (Figura 17D), entretanto o padrão de localização da G-actina se demonstrou diferente após alto estiramento. A célula na condição estática apresenta um acúmulo da G-actina no citoplasma (Figura 17A). Interessantemente, após 48 horas do estímulo mecânico verificamos a presença da G-actina no núcleo celular (Figura 17C). Verificamos que 24 horas após cessado o estímulo mecânico houve alteração novamente da proteína para o citoplasma (Figura 17D). Para comprovar essa translocação realizamos análise por *z-stack* no microscópio confocal, de modo a obter uma imagem tridimensional de nossas células. Podemos verificar claramente que após estiramento de 48 horas a G-actina está presente no núcleo, como evidenciado pela seta em vermelho (Figura 17F). Na condição estática a proteína se encontra mais difusa no citoplasma, como demonstrado na figura 17E.

Figura 17: O alto estiramento prolongado promove translocação nuclear da G-actina. Imagens representativas da marcação de G-actina (em verde) obtidas por microscopia confocal, objetiva de 60x, escala: 20µm. Condições: estática (**A**), após alto estiramento por 48 horas (**B**) e 24 horas após alto estiramento (**C**). **D:** Quantificação da imunofluorescência obtida pelo software ImageJ. Barras indicam erro padrão da média; linha tracejada em vermelho marca o controle estático, n=3. Imagens tridimensionais das células foram obtidas por z-stack no microscópio confocal (objetiva de 60x) e montadas pelo ImageJ para hSVEC mantidas na condição estática (**E**) ou após alto estiramento por 48 horas (**F**).

Tem sido demonstrado que a actina presente no núcleo desempenha funções fundamentais para o funcionamento celular ⁶⁷⁻⁶⁹. A actina nuclear participa diretamente do controle da expressão gênica, visto que é um componente constitutivo das 3 isoformas de RNA polimerase ⁶⁸. Também está envolvida no processamento do RNA mensageiro (mRNA) e seu transporte para o citoplasma, assim como no remodelamento da cromatina ^{67,69}.

Desse modo, a translocação da G-actina entre o citoplasma e o núcleo ocorre de acordo com a necessidade da célula. Esse mecanismo de transporte é dinâmico e altamente controlado por proteínas distintas responsáveis pela entrada (importinas) ou saída (exportinas) da G-actina no núcleo ⁷⁰⁻⁷². Interessante destacar que a G-actina não possui sequência de localização nuclear (NLS, do inglês “Nuclear Localization Sequence”), sendo necessária a ligação com proteínas de transporte para sua entrada no núcleo, mas possui duas sequências de exportação do núcleo ⁷⁰⁻⁷². Na prática isso significa que em condições normais é importante a manutenção de baixos níveis de actina nuclear. A retenção da G-actina no núcleo é possível após modificações pós-traducionais, como o processo de sumoilação que previne a exportação da proteína ⁷³.

Nossos dados indicam que após alto estiramento prolongado em hSVEC a G-actina transloca para o núcleo e fica retida nesse compartimento (Figura 17), o que sugere um aumento na transcrição gênica dessas células baseado nos fatos expostos acima.

Diversos estudos apontam a proteína cofilina como responsável pelo transporte nuclear da G-actina ^{74,75}. Essa proteína se liga aos monômeros de actina e, por meio da importina 9, esse complexo entra no núcleo da célula, conforme desenho esquemático na figura 18A ^{72,76,77}. De fato, a G-actina se co-localiza com a cofilina nas hSVECs, como evidenciado pela dupla marcação na figura 18B.

Figura 18: Envolvimento da cofilina na regulação da G-actina. **A:** desenho esquemático do transporte nuclear da G-actina realizado pela cofilina. **B:** Co-localização da G-actina e cofilina nas células endoteliais de veia safena humana (hSVEC). G-actina em verde, cofilina em vermelho e sobreposição das duas proteínas em amarelo. Imagens representativas obtidas por microscopia confocal, objetiva de 40x, escala: 20µm.

Em vista de sua importância na modulação do citoesqueleto de actina, a participação da cofilina foi avaliada em células hSVECs sob alto estiramento mecânico.

Na figura 19, encontra-se a imunofluorescência obtida para cofilina e G-actina. Não houve diferença na quantificação da cofilina total entre os grupos estudados (Figura 19C), mas ocorreu alteração na localização da proteína de acordo com o tempo de exposição ao estímulo mecânico (Figura 19A). Na condição estática verificamos a presença da cofilina tanto no núcleo como no citoplasma (Figura 19A I). Após 24 horas de alto estiramento há um grande deslocamento da proteína para o citoplasma celular (Figura 19A II). Entretanto, após 48 horas do estímulo verificamos a translocação da cofilina novamente para o núcleo (Figura 19A III). Quando a célula foi avaliada 24 horas depois do término do estiramento, a marcação voltou para o mesmo padrão obtido na condição estática (Figura 19A IV). Interessante notar que esse padrão de distribuição ao

longo do tempo é semelhante ao observado para a G-actina, conforme demonstrado novamente na Figura 19B para facilitar a comparação.

Embora não tenhamos realizado dupla marcação para confirmar a co-localização dessas proteínas durante os períodos avaliados, o padrão semelhante de translocação entre eles sugere fortemente a associação já descrita previamente na literatura. Somado a isso, temos evidências de que a G-actina se co-localiza com a cofilina nas hSVECs, conforme evidenciado na figura 18B.

Figura 19: O alto estiramento altera a localização da cofilina total nas hSVECs ao longo do tempo. Imagens representativas da marcação de cofilina (A) ou G-actina (B) em hSVEC após diferentes condições, conforme indicação: I estática; II alto estiramento por 24 horas; III alto estiramento por 48 horas; IV 24 horas pós estiramento. Microscopia confocal, objetiva de 60x, escala: 20µm. C: Quantificação da imunofluorescência obtida pelo software ImageJ. Barras indicam erro padrão da média, n=3.

Além de sua função no transporte nuclear da G-actina, a cofilina em seu estado ativo também se liga à F-actina promovendo sua despolimerização ⁷⁸. Um dos principais mecanismos de controle da sua atividade é por meio da fosforilação da Serina 3 que, por bloquear sua ligação com a actina, impede a degradação do filamento ^{74,75}. Logo, a cofilina fosforilada se encontra inativa na célula conforme esquematizado na figura 20A.

O alto estiramento nas hSVECs não alterou a quantidade de cofilina fosforilada nos tempos estudados, mas novamente verificamos alteração no padrão de distribuição celular (Figura 20). Conforme bem descrito na literatura, a presença da cofilina fosforilada (inativa) é evidente na região próxima aos filamentos de actina no citoplasma, conforme evidenciado pela seta branca nas células em condição estática (Figura 20B). Nossos dados demonstram que após estiramento por 48 horas, momento em que há redução no filamento de actina, há também uma redução na fosforilação da cofilina citoplasmática, ou seja, a proteína nessa região se encontra ativa, degradando o filamento de actina (Figura 20D). Outro aspecto importante é a presença da proteína fosforilada no núcleo da hSVEC, como indicado pelas setas amarelas na figura 20D. O padrão de localização da cofilina fosforilada é semelhante ao observado tanto para a G-actina como para a cofilina total (Figuras 17 e 19): no citoplasma após 24 horas de estímulo (Figura 20C) e majoritariamente no núcleo após estiramento por 48 horas (Figura 20D).

Ainda não se sabe qual o papel da cofilina fosforilada no núcleo, uma possibilidade seria a de manter a proteína nesse compartimento, evitando sua exportação para o citoplasma ⁷⁹. Há poucos relatos desse fenômeno na literatura, e sua presença foi demonstrada após *shear stress* em célula endotelial de aorta bovina (BAEC, do inglês “Bovine Aortic Endothelial Cell”) ⁷⁹.

Figura 20: O alto estiramento promove a fosforilação da cofilina em diferentes locais nas hSVEC. **A:** representação esquemática do papel da cofilina fosforilada na degradação da F-actina no citoplasma. **B-E:** Imagens representativas da cofilina fosforilada (em verde, à esquerda) ou em dupla marcação com faloidina (F-actina em vermelho, à direita). Microscopia confocal com objetiva de 60x, escala: 20µm. Condições: estática (**A**), após alto estiramento por 24 horas (**B**) ou 48 horas (**C**) e 24 horas pós estiramento (**D**). As setas brancas dão destaque à localização citoplasmática da cofilina fosforilada no filamento de actina, as setas amarelas indicam posição nuclear. **E:** Quantificação da imunofluorescência obtida pelo software ImageJ. Barras indicam erro padrão da média; n=3.

Em resumo, verificamos que após alto estiramento há modulação do citoesqueleto de actina. A redução da F-actina é um fenômeno reversível, uma vez que ela é polimerizada novamente quando cessado o estímulo mecânico. Além disso, é evidente que a localização celular das proteínas é importante para determinação do fenótipo. Esses dados foram demonstrados a partir de 4 marcações diferentes: F-actina (Figuras 15 e 16), G-actina (Figura 17), Cofilina (Figura 19) e Cofilina fosforilada (Figura 20).

Em função da importância do citoesqueleto de actina em diversas funções endoteliais, nossos próximos passos foram determinar os impactos que essa redução traz ao fenótipo da célula endotelial.

4.3.3 Alteração na mecanotransdução após redução da F-actina

Os filamentos de actina estão conectados nas adesões focais, que são importantes para adesão da célula na matriz extracelular e também na sinalização celular (Figura 3) ¹⁸. No modelo descentralizador de mecanotransdução, previamente descrito ²³, a força mecânica exercida na célula endotelial é percebida por sensores presentes nas AFs que o transmite via citoesqueleto para as diversas partes da célula, inclusive para o núcleo. De modo inverso, os sinais intracelulares, como estímulos para migração por exemplo, também são sentidos e transmitidos pelo citoesqueleto até chegar na AF ^{18,29,64}. Deste modo as adesões focais são transientes, ou seja, são ativamente moduladas de modo que elas podem estar maiores (mais estáveis) ou menores, de acordo com a necessidade da célula ¹⁸.

A vinculina é um dos marcadores de adesão focal amplamente utilizado na literatura. Sabe-se que ela estabiliza a AF, além de estar envolvida na sinalização intracelular, ainda que não se tenha determinado ao certo de que maneira isso ocorre ⁸⁰. Deste modo fomos verificar essa proteína em nosso modelo experimental.

Não houve diferença na expressão da vinculina após alto estiramento (dados não mostrados), no entanto foi observada redução no número de adesões focais e no seu tamanho após o estímulo (Figura 21). As AFs estão na borda da célula, melhor demonstradas pelas setas em branco na figura 21A,

aonde demonstramos a co-localização (em amarelo) do filamento de actina com a vinculina. Quando observamos após 48 horas de alto estiramento, na figura 21B, verificamos que há um menor número de AFs, assim como o tamanho delas é menor comparadas à condição estática (Figura 21A).

Figura 21: O alto estiramento reduz o número e o tamanho das adesões focais em hSVEC. Imagens representativas da vinculina (em verde, à esquerda) ou em dupla marcação com faloidina (F-actina em vermelho, à direita). Microscopia confocal com objetiva de 60x, escala: 20μm. Condições: estática (**A**) e após alto estiramento por 48 horas (**B**). As setas brancas demonstram a localização das adesões focais (em amarelo).

A vinculina não possui atividade enzimática e se apresenta em duas conformações dentro da célula: aberta (que é a forma ativa, capaz de se ligar às demais proteínas do complexo) ou fechada (modo auto inibitório, inativo) ^{81,82}. Desse modo, uma vez que a localização da vinculina foi menor nas AFs após o alto estiramento prolongado, nossa hipótese é que o estímulo mecânico utilizado pode alterar o padrão de conformação dessa proteína.

Além da vinculina, avaliamos a ativação da proteína FAK (do inglês, “Focal Adhesion Kinase”), proteína quinase presente nas adesões focais, considerada um dos principais sensores envolvidos na mecanotransdução de sinais ^{18,29}. Essa proteína possui 6 resíduos de Tirosina (Tyr) passíveis de serem fosforilados, no entanto a fosforilação do resíduo tirosina 397 (descrito aqui como pFAK), o mais próximo do sítio catalítico, é o que vem sendo evidenciado como ativador na mecanotransdução ^{18,29}.

Observamos marcada presença da pFAK nas adesões focais, conforme indicado pelas setas brancas, das hSVECs na condição estática (Figura 22A) e após 24 horas de estiramento (Figura 22B). No entanto, após o estiramento mecânico por 48 horas (concomitante à redução da F-actina) verificamos a presença de pFAK (em verde) no citoplasma, mas não a identificamos nas AFs (Figura 22C). A análise por *western blot* demonstrou redução na pFAK após alto estímulo prolongado (Figura 22D), sendo que essa diferença não foi observada após 24 horas do estímulo (dado não mostrado).

Dados de estiramento celular na literatura demonstram um aumento na fosforilação da FAK, no entanto os experimentos foram realizados em distintos tipos celulares e em tempos reduzidos ^{27,83,84}.

Figura 22: Redução da fosforilação da FAK após alto estiramento prolongado em hSVEC. Imagens representativas da imunofluorescência para pFAK (verde), F-actina (Faloidina, em vermelho) e núcleo celular em azul (DAPI). Microscopia confocal, objetiva de 40x, escala: 10µm. Células na condição estática (**A**) e após alto estiramento por 24 horas (**B**) ou 48 horas (**C**). **D:** Quantificação, pelo software ImageJ, da expressão proteica de pFAK obtida por western blot; barras indicam erro padrão da média, n=4.

Tanto a vinculina como a FAK possuem diferentes ligantes envolvidos na modulação do citoesqueleto de actina ^{18,29}, e nossos resultados vêm corroborar esse envolvimento. Com nossos dados não conseguimos determinar se a modulação da vinculina e FAK estão envolvidas diretamente na redução da F-actina ou se ocorre o contrário: a redução do filamento é que modula essas proteínas. De qualquer maneira fica evidente que o estiramento em hSVEC altera a formação das adesões focais, assim como sua ativação (por meio da pFAK), e desse modo tem implicação direta na mecanotransdução celular.

4.3.4 Impacto do alto estiramento na função endotelial

O óxido nítrico é uma molécula de extrema importância na fisiologia do tecido vascular. Produzido pela enzima Óxido Nítrico Sintase presente nas células endoteliais (eNOS) possui conhecida função vasodilatadora, atuando diretamente nas células musculares lisas ⁸⁵. Possui também papel importante na manutenção do estado antitrombogênico/ anti-inflamatório do endotélio à medida que impede a agregação plaquetária e de monócitos ^{86,87}. Dessa forma, avaliamos o efeito do estiramento na liberação de NO, cujo tempo de vida é de alguns segundos e por isso dosamos um de seus metabólitos: o nitrito (NO_2). Dados prévios do laboratório demonstraram que a hSVEC é capaz de aumentar a liberação de NO em até 200% após estímulo de *shear stress* ^{88,89}. Em relação ao estiramento, o presente trabalho demonstra que níveis fisiológicos (5%) não alteram a produção de NO (Figura 23A), ao passo que o alto estiramento, a partir de 48 horas, reduz significativamente os níveis do óxido nítrico (Figura 23B).

Figura 23: O alto estiramento em hSVEC diminui a biodisponibilidade de Óxido Nítrico (NO). Quantificação do nitrito (NO_2), metabólito do NO, após estiramento fisiológico (A) e alto estiramento (B) nos tempos indicados. Barras indicam erro padrão da média, *** $p < 0,001$, $n = 6$.

Hishikawa e colaboradores demonstraram que o estiramento de 10% foi capaz de aumentar a produção de NO em células endoteliais de aorta humana ⁹⁰. Eles verificaram aumento significativo após a primeira hora do estímulo, mas a produção foi decaindo ao passar do tempo, sendo que após 24 horas não houve diferença com o controle estático ⁹⁰. De modo bem interessante, SVECs

cultivadas em tubos de silicone produziram mais óxido nítrico no estiramento fisiológico comparado à condição estática ⁹¹.

Dada a importância do NO na homeostase vascular, a enzima eNOS é regulada por diversos mecanismos que vão desde a expressão gênica até mecanismos pós transcricionais e pós traducionais. Dentre este último, grande destaque vem sendo dado à regulação por meio do citoesqueleto de actina ⁹²⁻⁹⁷. Já foi demonstrado que a eNOS se liga tanto à G-actina como F-actina cortical presente na célula endotelial, sendo que essa associação interfere diretamente na atividade da enzima ⁹². Diversos trabalhos demonstraram que a atividade da eNOS é dependente da integridade do citoesqueleto de actina ^{93,95-97}.

O rompimento da F-actina por drogas que interferem tanto diretamente no filamento, como a citocalasina, ou em proteínas *upstream* à sua formação, como inibidores da RhoA, aumentam a atividade da eNOS e liberação de NO. De modo muito interessante, foi demonstrado que esse aumento da atividade ocorre em função da maior ligação da eNOS com a G-actina ^{93,95}.

Nossos dados demonstraram uma redução da produção de NO, ou seja, houve diminuição da atividade da eNOS após alto estiramento prolongado (Figura 23B). Também demonstramos que nesse período de estímulo houve redução drástica na F-actina (Figuras 13D, 14B, 15B e 16B) e, embora não tenha ocorrido alteração na quantidade de G-actina total, houve translocação nuclear do monômero de actina (Figuras 17 e 19B). Considerando que a associação da G-actina com a eNOS é importante para a ativação da enzima ^{92,93,95}, nossa hipótese é que a redução da disponibilidade de G-actina no citoplasma, pode estar diminuindo a atividade enzimática da eNOS.

Interessante destacar que a biodisponibilidade de NO é maior em enxertos com artéria mamária quando comparados aos enxertos com veia safena, tendo sido descrito como uma possível explicação pela melhor patência dos arteriais ⁹⁸. Sabemos que a redução do NO caracteriza uma disfunção endotelial nas hSVECs após o estímulo mecânico, sugerindo que as células nessa condição estão mais trombogênicas e pró-inflamatórias. Sendo assim, realizamos um experimento exploratório para detectar proteínas secretadas pelas hSVECs.

Para tal utilizamos um kit capaz de detectar um painel com 40 proteínas inflamatórias, em duplicata, conforme imagem representativa na figura 24A. Dentre as proteínas avaliadas, destacamos 2 em que verificamos aumento significativo após alto estiramento nas hSVECs: PDGF-BB (do inglês, “Platelet Derived Growth Factor – B chain”, Figura 24B) e Interleucina 6 (IL-6, Figura 24C). Esses dados corroboram resultados de outros grupos de pesquisa, que demonstraram aumento desses fatores após estiramento em célula endotelial ⁹⁹⁻¹⁰¹.

O estiramento, tanto de 6% como de 10%, em célula endotelial de aorta bovina aumentou a expressão gênica e proteica do PDGF-BB ¹⁰⁰. Interessante observar que o aumento maior ocorreu nas células com estiramento de 10% ¹⁰⁰. Essa proteína é conhecida por sua potente capacidade de atração e migração de células musculares lisas, plaquetas e monócitos, tendo sido descrita como um dos componentes responsáveis pelo aumento da neointima em alguns modelos de injúria vascular, conforme indicado na figura 1 ^{4,102}.

A IL6 é uma citocina pró-inflamatória que também possui diversas funções nas SMCs, tais como indução da proliferação e migração ¹⁰³. Além da sua conhecida ação parácrina, a IL6 promove disfunção endotelial também por reduzir a biodisponibilidade de NO, em parte por diminuir a expressão de eNOS, assim como por aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês “Reactive Oxygen Species”) ^{25,99,101}. De modo muito interessante, Sasamoto A e colaboradores demonstraram que o estiramento unidirecional em HUVEC aumenta a IL-6 através da sinalização da integrina, outro componente fundamental na adesão focal ²⁵.

No sentido inverso, verificamos uma redução significativa (aproximadamente 50%) na secreção de IL1 α após o estímulo mecânico (Figura 24D).

Sabe-se que em células que formam barreiras, tais como as endoteliais, há expressão constitutiva da IL1 α , pois ela está envolvida em outras funções importantes na homeostase do tecido, além da clássica capacidade inflamatória ^{104,105}. A IL1 α é sintetizada em sua forma precursora pro-IL1 α (31KDa), e clivada

para IL1 α (17KDa) pela ação da enzima calpaína. Ela se difere das demais interleucinas, pois tanto sua forma clivada como a precursora são ativas na célula ^{104,105}. A pro-IL1 α é constantemente ativa e, acredita-se que participa da sinalização intracelular, uma vez que é capaz de se translocar para o núcleo e participar da transcrição de alguns genes ¹⁰⁵. Na célula endotelial por exemplo, foi demonstrado que a superexpressão da pro-IL1 α inibe a proliferação celular ¹⁰⁶. A IL1 α clivada apresenta função tanto secretada, como ligada na membrana celular.

A detecção das citocinas foi obtida através do meio de cultura, logo a redução da IL1 α após o estiramento pode não ser necessariamente resultado de uma diminuição na atividade dessa citocina, conforme os fatos expostos acima. O estímulo mecânico pode ter aumentado a retenção da IL1 α na membrana celular, ou ainda ter promovido modulação/ translocação da pro-IL1 α , por exemplo.

Figura 24: Perfil secretório após estímulo mecânico em hSVEC. **A:** Imagens representativas do array de citocinas na condição estática (painel da esquerda) e após alto estiramento por 48 horas (painel da direita). Destaques em retângulo para as proteínas diferentemente expressas: com linha contínua o PDGF-BB, pontilhado para a IL-6 e tracejado para IL1 α . Quantificação por ImageJ do PDGF-BB (**B**), IL-6 (**C**) e IL1 α (**D**) nos períodos indicados. Barras indicam erro padrão da média, * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$; $n = 1$ em duplicata.

Todas as citocinas e os respectivos valores obtidos pelo *array* estão descritos na tabela 4. Esses dados devem ser validados por outra técnica e com uma amostragem maior, de modo a confirmar o efeito do estiramento patológico na regulação dessas citocinas.

Tabela 4: Perfil secretório de citocinas inflamatórias em hSVEC nas condições indicadas. Ensaio de *array* (Raybiotech) obtido através do meio de cultura das células endoteliais.

<i>proteína</i>	Estático 24h		Alto Estiramento 24h		Estático 48h		Alto Estiramento 48h	
	<i>média</i>	<i>desv.pad.</i>	<i>média</i>	<i>desv.pad.</i>	<i>média</i>	<i>desv.pad.</i>	<i>média</i>	<i>desv.pad.</i>
Eotaxin-1	10,61	0,43	8,41	0,20	10,04	0,08	9,96	0,16
Eotaxin-2	24,14	0,58	18,56	1,58	21,83	0,55	20,33	0,36
G-CSF	2,09	0,30	1,70	0,16	2,06	0,86	1,65	0,25
GM-CSF	6,68	0,69	5,02	0,74	8,75	2,45	6,18	0,78
ICAM1	11,88	0,74	12,42	1,56	25,02	1,42	25,35	0,16
IFN gamma	10,47	1,75	6,77	1,00	9,14	0,93	7,62	0,71
I-309	4,70	0,58	2,67	0,34	5,30	0,58	3,48	0,48
IL1-beta	5,54	0,27	5,47	0,41	4,90	0,66	4,66	0,69
IL-2	4,63	0,30	4,43	0,40	3,55	0,59	2,79	0,32
IL-3	28,75	1,28	25,04	0,18	22,65	1,82	20,66	1,03
IL-4	5,12	0,07	4,73	0,25	4,88	0,42	4,47	0,53
IL-6 sR	16,90	2,81	14,46	0,25	16,78	1,01	15,36	1,43
IL-7	3,93	0,27	3,45	0,03	6,19	0,89	3,96	0,55
IL-8	195,64	4,18	217,37	10,73	249,93	14,59	219,88	7,11
IL-10	35,09	1,27	22,84	2,11	32,31	3,07	24,92	2,81
IL-11	7,68	0,16	5,00	0,41	7,62	0,62	4,98	0,04
IL-12 p40	9,41	1,29	5,25	0,27	8,72	0,58	6,33	0,33
IL-12 p70	4,50	0,47	1,66	0,02	4,19	0,32	1,65	0,18
IL-13	3,20	0,07	3,26	0,10	2,08	0,21	2,65	0,33
IL-15	6,85	0,66	6,25	0,66	5,19	0,66	5,57	0,09
IL-16	14,16	1,27	14,75	1,25	12,54	1,56	12,22	0,19
IL-17	3,81	0,42	4,26	0,05	3,31	0,09	3,08	0,64
IP-10	19,78	1,68	21,39	0,37	21,72	2,61	19,14	0,35
MCP-1	179,28	4,84	214,90	2,60	198,26	2,57	204,98	0,93
MCP-2	7,77	0,82	8,48	0,09	9,81	0,93	10,54	0,25
m-CSF	34,57	5,11	30,95	2,43	27,24	3,27	27,18	1,80
MIG	5,61	0,81	4,00	0,04	4,39	0,71	3,46	0,28
MIP-1 alpha	10,97	0,96	7,33	0,26	8,82	1,39	7,41	0,52
MIP-1 beta	33,71	1,75	20,99	0,58	28,88	0,32	25,15	0,54
MIP-1 delta	5,84	0,52	2,72	0,40	5,71	0,05	2,88	0,47
RANTES	38,66	5,00	42,57	4,40	31,21	7,01	41,90	2,55
TGF beta1	10,58	1,36	11,33	0,68	7,57	1,36	10,70	0,72
TNF alpha	10,45	1,32	12,53	1,11	8,43	1,29	12,27	0,01
TNF beta	14,15	2,23	17,31	1,69	11,80	2,18	16,91	0,86
sTNFRI	12,04	0,91	19,72	1,96	19,37	2,02	24,88	3,12
sTNFRII	9,02	1,05	12,90	1,43	13,21	2,04	15,22	2,14
TIMP-2	145,00	6,55	168,69	2,57	158,30	6,73	179,47	9,51

4.3.5 Possíveis mecanismos de ação na redução do filamento de actina

Como já mencionado, a formação do filamento de actina é regulada mediante envolvimento de uma série de proteínas que promovem a polimerização/ despolimerização da F-actina. Dentre elas, a família de GTPases – Rac, Cdc42 e Rho – estão diretamente envolvidas na regulação do citoesqueleto de actina ¹⁰⁷. Todas as GTPases participam dessa modulação, sendo que a Rac está envolvida diretamente na formação dos filamentos no padrão cortical, típico da condição fisiológica, ao passo que a RhoA participa na formação das fibras de estresse quando a célula é estimulada por fatores externos ³⁰. Sabemos que essa sinalização é dependente de GTP, em que sua ativação ocorre com a conjugação da GTP e sua forma inativa com GDP. Importante destacar que a regulação de todas as GTPases envolve também a sinalização por meio das espécies reativas de oxigênio ^{108–110}.

As células endoteliais estão constantemente em contato com ROS, que em nível fisiológico atuam como segundo mensageiros celulares e controlam diversas funções regulatórias ^{109,111}. Entretanto, altos níveis dessa molécula são prejudiciais para o tecido cardiovascular, aumentando o risco de diversas patologias ¹¹². Diversos trabalhos mostram que o estiramento aumenta a produção de ROS em células endoteliais, sendo que sua modulação depende da integridade do citoesqueleto de actina ^{27,113}.

As proteínas do citoesqueleto e aquelas associadas à sua regulação são altamente passíveis de oxidação, visto a quantidade de resíduos reativos de cisteína que elas apresentam ^{110,114}. De fato, a oxidação da actina (monômeros e filamento) vem sendo amplamente demonstrada ^{115,116}. Interessante destacar que altas concentrações de oxidantes afetam a polimerização da actina, ao passo que baixos níveis parecem ter efeito oposto: aumentando a formação de fibras de estresse ¹¹⁰.

Já foi demonstrado em célula endotelial pulmonar que o balanço entre a quantidade de ROS é responsável pelo controle do padrão de F-actina ³⁰. Em condições de estiramento fisiológico (5%) os níveis basais de ROS promovem ativação da Rac e manutenção do padrão cortical dos filamentos de actina (conforme demonstrado na Figura 25A, modificada de ²⁶). De modo muito interessante, o estiramento patológico (18%) aumentou os níveis de ROS, a

ativação de RhoA e, conseqüentemente, o aumento da formação das fibras de estresse (Figura 25A) ^{24,26,28,31}.

A grande maioria dos estudos de estiramento em célula endotelial são focados em células de origem pulmonar, em função do estímulo cíclico constante nesse tecido. Na tentativa de compreender os mecanismos envolvidos na redução da F-actina observada em hSVEC, acreditamos que o aumento da ROS seja uma hipótese bastante considerável. Nossos dados demonstraram que as células submetidas a baixo estiramento apresentam padrão cortical fisiológico em todos os períodos avaliados, o que sugere um nível fisiológico de ROS e ativação maior da Rac e (Figura 25B, com imagens da Figura 15 representadas novamente para facilitar a comparação). O alto estiramento por 24 horas estimulou o aumento das fibras de estresse, sugerindo ativação da RhoA, que acreditamos ter ocorrido por um aumento nos níveis de ROS (Figura 25C, com imagens da Figura 15 representadas novamente para facilitar a comparação). A exposição prolongada ao estiramento promoveu a redução drástica nos filamentos de actina, como observado a partir de 48 horas (Figura 25C). Interessantemente, dados da literatura mostram que a RhoA em particular apresenta dois sítios de ativação/inativação do estado redox, diferentemente das outras GTPases ¹¹⁰. A oxidação “padrão”, reversível, ocorre na cisteína 20, ao passo que uma exposição alta e contínua de espécies reativas leva a uma oxidação também na cisteína 16, inativando a RhoA ¹¹⁰.

Acreditamos que esse possível aumento no estado redox possa ser patológico para as hSVECs, uma vez que já foi demonstrado que células endoteliais de origem venosa são mais sensíveis aos efeitos de ROS quando comparadas às de origem arterial ⁶². Somado a isso, há evidências experimentais de que o enxerto com veia safena possui menor capacidade antioxidante, maior produção de ROS e de acúmulo de lipídeos quando comparado ao enxerto arterial ¹¹⁷.

Figura 25: As espécies reativas de oxigênio regulam a atividade de GTPases e o padrão de filamento de actina em células endoteliais. **A:** Representação esquemática do controle da F-actina endotelial por ROS, modificada de ²⁶. **B-C:** Hipótese sobre mecanismos moleculares envolvidos na modulação da F-actina após alto estiramento em hSVEC. **B:** Níveis fisiológicos de ROS em baixo estiramento possibilita a ativação de Rac e manutenção do padrão cortical da F-actina. **C:** O alto estiramento aumenta os níveis de ROS, ativando RhoA e formação de filamento de actina após 24 horas. No entanto, o estímulo prolongado leva a célula a um estresse oxidativo, inativação da RhoA e redução da F-actina a partir de 48 horas do estímulo mecânico.

A produção de espécies reativas de oxigênio nas células endoteliais provém de diferentes fontes, tais como mitocôndrias, xantinas oxidases, NADPH oxidases, desacoplamento da eNOS, citocromo P450, dentre outros ^{109,111}. Sabe-se que no sistema vascular uma das fontes mais proeminentes de ROS são as NADPH oxidases, também conhecidas como NOX, que são um complexo

enzimático localizado nas membranas celulares ^{109,111}. A família das NOX é composta por 7 membros: NOX1 à NOX5 e Duox1/2 ^{109,111}.

A NOX 4 é a mais abundante nas células endoteliais ¹¹⁸, e sua participação na regulação do citoesqueleto de actina já foi descrita ¹¹⁹. Além disso, já foi demonstrado que essa enzima ativa a cofilina para remodelamento do citoesqueleto de actina após estiramento em célula muscular lisa ¹²⁰.

A NOX4 em particular se encontra constitutivamente ativa, não sendo necessária a presença de subunidades citosólicas para sua atividade, o que sugere que sua função é controlada pela quantidade de enzima presente na célula ¹²¹. Considerando todos esses fatos, fomos avaliar a expressão gênica da NOX4 em nosso modelo experimental.

A análise por PCR em tempo real demonstrou que o baixo estiramento não alterou a expressão de NOX4 quando comparados ao seu controle estático (Figura 26A). Após 48 horas de alto estiramento verificamos um aumento de $2,2 \pm 0,65$ vezes em relação ao controle estático (Figura 26B). Embora esse resultado não tenha demonstrado significância estatística, é um indício de que essa via possa estar envolvida. Sabe-se que a compartimentalização da NOX é de grande relevância na função da enzima ¹¹¹, desse modo é necessário avaliar a atividade e localização da NOX4 em nosso modelo para melhor compreensão de seu envolvimento.

Figura 26: Expressão gênica da NOX4 após diferentes intensidades de estiramento mecânico. Avaliação por PCR em tempo real em hSVEC submetidas a baixo (A, n=5) e alto estiramento (B, n=7) nos tempos indicados. Expressão gênica das amostras comparadas ao seu controle estático, barras indicam erro padrão da média.

Desta forma, nossa hipótese é de que o alto estiramento nas hSVECs leva a um aumento no estado redox, levando à ruptura do filamento de actina e disfunção endotelial demonstradas no presente trabalho. Baseado em evidências na literatura e em nosso dado preliminar de expressão gênica, sugerimos o envolvimento da NOX4 como mediador no fenótipo obtido.

4.4 Considerações finais

Os dados desse trabalho demonstraram a grande plasticidade da hSVEC frente ao estímulo químico (pró-fibrótico e pró-inflamatório), levando a uma rápida indução da transição mesenquimal. O alto estiramento em hSVEC é patológico, não induziu EndMT mas promoveu remodelamento do citoesqueleto de actina e disfunção endotelial, resultado que não foi observado em célula endotelial de origem arterial. Essa diferença é de grande relevância dentro do contexto de revascularização cardíaca, pois sabe-se que a lesão no endotélio, principalmente nos períodos iniciais pós cirurgia, é de extrema importância para a patência do enxerto venoso.

O sistema *in vitro* possui várias limitações, mas ele nos auxilia a compreender mecanismos específicos que seriam difíceis em outras circunstâncias. A utilização de células endoteliais oriundas de diferentes pacientes nos fornece mais robustez ao dado obtido, mas ainda se faz necessário verificar se a modulação do citoesqueleto de actina ocorre *in vivo*. Nesse sentido, há evidências experimentais que já demonstraram diferença no padrão de organização do citoesqueleto de actina no endotélio de veias e artérias ¹²⁰. Daphne van Geemen e colaboradores realizaram microscopia confocal no tecido vascular ("*en face microscopy*") por meio da qual demonstraram que os filamentos de actina do endotélio venoso são predominantemente corticais, ao passo que nas artérias há mais formação de fibras de estresse. A diferença no fenótipo endotelial é clara e os autores concluem que diferenças biomecânicas poderiam determinar essa característica endotelial ¹²⁰.

5. Conclusões

- Pela primeira vez demonstramos que a célula endotelial de safena humana é capaz de ser induzida à EndMT por indutores químicos TGF e IL-1 β ;
- O alto estiramento não é capaz de induzir a transição mesenquimal e nem potencializar a EndMT promovida pelo tratamento químico;
- O alto estiramento reduz o filamento de actina em hSVEC de maneira reversível e está associado à modulação da localização de proteínas envolvidas no remodelamento do citoesqueleto de actina: G-actina, cofilina e cofilina fosforilada;
- O alto estiramento é patológico para hSVEC, levando à uma redução na biodisponibilidade de NO e aumento de proteínas inflamatórias (IL6 e PDGF-BB).

Em conjunto, concluímos que o alto estiramento é um estímulo patológico para as hSVECs, ocasionando modulação da síntese/degradação de filamentos de actina, redução na biodisponibilidade de NO e aumento de liberação de citocinas inflamatórias. De modo interessante, demonstramos que a redução no filamento de actina é específica da hSVEC, não sendo observado em células endoteliais de origem arterial de aorta e coronária. Estes novos elementos da mecanotransdução pelo endotélio poderão ser explorados terapeuticamente para modular a plasticidade endotelial nos enxertos de veia safena.

6. Perspectivas

Tendo em vista os resultados obtidos nesse trabalho, torna-se imprescindível avaliar as vias de sinalização envolvidas na redução do filamento de actina, assim como modulá-la de modo a evitar a disfunção endotelial observada com o estímulo mecânico. Nossa hipótese é a de que o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio participe dessa regulação. Neste sentido, avaliaremos:

- A produção de ROS, e principalmente determinar o tipo envolvido: superóxido ($O_2^{\cdot -}$) e/ou peróxido de hidrogênio (H_2O_2);
- Identificar a fonte de produção: nossa hipótese é o envolvimento da NOX4, mas não se pode descartar a NOX2 (presente em ECs), outras fontes (tal como mitocôndrias), ou ainda um misto entre elas;
- Identificar a localização de ROS, pois sabe-se que há funções específicas de acordo com o local produzido dentro da célula.

Caso seja demonstrado o envolvimento do estado redox no remodelamento de actina, o próximo passo seria manipular as células com agentes antioxidantes específicos de modo a reverter a disfunção endotelial. Além disto, o efeito do meio condicionado das hSVECs nas células musculares lisas será avaliado, tais como alteração do fenótipo das SMCs, taxa de proliferação, migração, etc.

Uma vez determinado os alvos moleculares envolvidos na disfunção endotelial, esses podem ser testados em modelos de arterialização *in vivo*^{14,57} e/ou sistemas de cultivo de vasos *ex vivo*¹²² para testar o impacto na patência dos enxertos venosos.

7. Referências

1. KUNLIN, J. [Long vein transplantation in treatment of ischemia caused by arteritis]. *Rev Chir* **70**, 206–35
2. Alexander, J. H. *et al.* Efficacy and safety of edifoligide, an E2F transcription factor decoy, for prevention of vein graft failure following coronary artery bypass graft surgery: PREVENT IV: a randomized controlled trial. *JAMA* **294**, 2446–54 (2005).
3. Conte, M. S. *et al.* Results of PREVENT III: a multicenter, randomized trial of edifoligide for the prevention of vein graft failure in lower extremity bypass surgery. *J Vasc Surg* **43**, 742–751; discussion 751 (2006).
4. Gaudino, M. *et al.* Mechanisms, Consequences, and Prevention of Coronary Graft Failure. *Circulation* **136**, 1749–1764 (2017).
5. Hess, C. N. *et al.* Saphenous Vein Graft Failure After Coronary Artery Bypass Surgery: Insights From PREVENT IV. *Circulation* **130**, 1445–1451 (2014).
6. Harskamp, R. E., Lopes, R. D., Baisden, C. E., de Winter, R. J. & Alexander, J. H. Saphenous Vein Graft Failure After Coronary Artery Bypass Surgery. *Ann Surg* **257**, 824–833 (2013).
7. Allaire, E. & Clowes, A. W. Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: the intimal hyperplastic response. *Ann Thorac Surg* **63**, 582–91 (1997).
8. Davies, M. G., Klyachkin, M. L., Dalen, H., Svendsen, E. & Hagen, P. O. Regression of intimal hyperplasia with restoration of endothelium-dependent relaxing factor-mediated relaxation in experimental vein grafts. *Surgery* **114**, 258–70–1 (1993).
9. LEHOUX, S., CASTIER, Y. & TEDGUI, A. Molecular mechanisms of the vascular responses to haemodynamic forces. *J Intern Med* **259**, 381–392 (2006).
10. Hsiai, T. K. & Wu, J. C. Hemodynamic forces regulate embryonic stem cell commitment to vascular progenitors. *Curr Cardiol Rev* **4**, 269–74 (2008).
11. van Andel, C. J., Pisteky, P. V & Borst, C. Mechanical properties of porcine and human arteries: implications for coronary anastomotic connectors. *Ann Thorac Surg* **76**, 58–64–5 (2003).
12. Soulis, J. V., Farmakis, T. M., Giannoglou, G. D. & Louridas, G. E. Wall shear stress in normal left coronary artery tree. *J Biomech* **39**, 742–749 (2006).
13. Zwolak, R. M., Adams, M. C. & Clowes, A. W. Kinetics of vein graft hyperplasia: association with tangential stress. *J Vasc Surg* **5**, 126–36 (1987).
14. Borin, T. F. *et al.* Apoptosis, cell proliferation and modulation of cyclin-dependent kinase inhibitor p21(cip1) in vascular remodelling during vein

- arterialization in the rat. *Int J Exp Pathol* **90**, 328–37 (2009).
15. Vita, J. A. Endothelial Function. *Circulation* **124**, e906–e912 (2011).
 16. Gavard, J. Endothelial permeability and VE-cadherin: a wacky comradeship. *Cell Adh Migr* **8**, 158–64 (2014).
 17. Oldenburg, J. & de Rooij, J. Mechanical control of the endothelial barrier. *Cell Tissue Res* **355**, 545–555 (2014).
 18. Romer, L. H., Birukov, K. G. & Garcia, J. G. N. Focal adhesions: paradigm for a signaling nexus. *Circ Res* **98**, 606–16 (2006).
 19. Dorland, Y. L. & Huveneers, S. Cell-cell junctional mechanotransduction in endothelial remodeling. *Cell Mol Life Sci* **74**, 279–292 (2017).
 20. Zeng, Y. Endothelial glycocalyx as a critical signalling platform integrating the extracellular haemodynamic forces and chemical signalling. *J Cell Mol Med* **21**, 1457–1462 (2017).
 21. Baratchi, S. *et al.* Molecular Sensors of Blood Flow in Endothelial Cells. *Trends Mol Med* **23**, 850–868 (2017).
 22. Tsimbouri, P. M. Adult Stem Cell Responses to Nanostimuli. *J Funct Biomater* **6**, 598–622 (2015).
 23. Luo, Y., Xu, X., Lele, T., Kumar, S. & Ingber, D. E. A multi-modular tensegrity model of an actin stress fiber. *J Biomech* **41**, 2379–87 (2008).
 24. Birukov, K. G. *et al.* Magnitude-dependent regulation of pulmonary endothelial cell barrier function by cyclic stretch. *Am J Physiol Cell Mol Physiol* **285**, L785–L797 (2003).
 25. Sasamoto, A. *et al.* Mechanotransduction by integrin is essential for IL-6 secretion from endothelial cells in response to uniaxial continuous stretch. *Am J Physiol Cell Physiol* **288**, C1012–22 (2005).
 26. Birukova, A. A. *et al.* Differential regulation of pulmonary endothelial monolayer integrity by varying degrees of cyclic stretch. *Am J Pathol* **168**, 1749–61 (2006).
 27. Ali, M. H., Mungai, P. T. & Schumacker, P. T. Stretch-induced phosphorylation of focal adhesion kinase in endothelial cells: role of mitochondrial oxidants. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **291**, L38–45 (2006).
 28. Birukova, A. A., Rios, A. & Birukov, K. G. Long-term cyclic stretch controls pulmonary endothelial permeability at translational and post-translational levels. *Exp Cell Res* **314**, 3466–77 (2008).
 29. Zebda, N., Dubrovskiy, O. & Birukov, K. G. Focal adhesion kinase regulation of mechanotransduction and its impact on endothelial cell functions. *Microvasc Res* **83**, 71–81 (2012).
 30. Birukov, K. G. Small GTPases in mechanosensitive regulation of endothelial barrier. *Microvasc Res* **77**, 46–52 (2009).

31. Tian, Y., Gawlak, G., O'Donnell, J. J., Mambetsariev, I. & Birukova, A. A. Modulation of Endothelial Inflammation by Low and High Magnitude Cyclic Stretch. *PLoS One* **11**, e0153387 (2016).
32. Cevallos, M. *et al.* Cyclic strain induces expression of specific smooth muscle cell markers in human endothelial cells. *Differentiation* **74**, 552–61 (2006).
33. Fogelstrand, P., Osterberg, K. & Mattsson, E. Reduced neointima in vein grafts following a blockage of cell recruitment from the vein and the surrounding tissue. *Cardiovasc Res* **67**, 326–32 (2005).
34. Hu, Y. *et al.* Abundant progenitor cells in the adventitia contribute to atherosclerosis of vein grafts in ApoE-deficient mice. *J Clin Invest* **113**, 1258–65 (2004).
35. Hu, Y. *et al.* Both donor and recipient origins of smooth muscle cells in vein graft atherosclerotic lesions. *Circ Res* **91**, e13-20 (2002).
36. Arciniegas, E., Frid, M. G., Douglas, I. S. & Stenmark, K. R. Perspectives on endothelial-to-mesenchymal transition: potential contribution to vascular remodeling in chronic pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **293**, L1-8 (2007).
37. Liu, C., Nath, K. A., Katusic, Z. S. & Caplice, N. M. Smooth Muscle Progenitor Cells in Vascular Disease. *Trends Cardiovasc Med* **14**, 288–293 (2004).
38. van Oostrom, O., Fledderus, J. O., de Kleijn, D., Pasterkamp, G. & Verhaar, M. C. Smooth muscle progenitor cells: friend or foe in vascular disease? *Curr Stem Cell Res Ther* **4**, 131–40 (2009).
39. Eisenberg, L. M. & Markwald, R. R. Molecular regulation of atrioventricular valvuloseptal morphogenesis. *Circ Res* **77**, 1–6 (1995).
40. Frid, M. G., Kale, V. A. & Stenmark, K. R. Mature vascular endothelium can give rise to smooth muscle cells via endothelial-mesenchymal transdifferentiation: in vitro analysis. *Circ Res* **90**, 1189–96 (2002).
41. van Meeteren, L. A. & ten Dijke, P. Regulation of endothelial cell plasticity by TGF- β . *Cell Tissue Res* **347**, 177–186 (2012).
42. Ishisaki, A., Hayashi, H., Li, A.-J. & Imamura, T. Human umbilical vein endothelium-derived cells retain potential to differentiate into smooth muscle-like cells. *J Biol Chem* **278**, 1303–9 (2003).
43. Arciniegas, E., Sutton, A. B., Allen, T. D. & Schor, A. M. Transforming growth factor beta 1 promotes the differentiation of endothelial cells into smooth muscle-like cells in vitro. *J Cell Sci* **103** (Pt 2), 521–9 (1992).
44. Pardali, E., Sanchez-Duffhues, G., Gomez-Puerto, M. C. & Ten Dijke, P. TGF- β -Induced Endothelial-Mesenchymal Transition in Fibrotic Diseases. *Int J Mol Sci* **18**, 2157 (2017).
45. Kokudo, T. *et al.* Snail is required for TGFbeta-induced endothelial-mesenchymal transition of embryonic stem cell-derived endothelial cells.

J Cell Sci **121**, 3317–24 (2008).

46. Medici, D., Potenta, S. & Kalluri, R. Transforming growth factor- β 2 promotes Snail-mediated endothelial-mesenchymal transition through convergence of Smad-dependent and Smad-independent signalling. *Biochem J* **437**, 515–20 (2011).
47. Maleszewska, M. *et al.* IL-1 β and TGF β 2 synergistically induce endothelial to mesenchymal transition in an NF κ B-dependent manner. *Immunobiology* **218**, 443–54 (2013).
48. Azhar, M. *et al.* Ligand-specific function of transforming growth factor beta in epithelial-mesenchymal transition in heart development. *Dev Dyn* **238**, 431–42 (2009).
49. Chen, P.-Y. *et al.* FGF regulates TGF- β signaling and endothelial-to-mesenchymal transition via control of let-7 miRNA expression. *Cell Rep* **2**, 1684–96 (2012).
50. Chen, P.-Y. *et al.* Endothelial-to-mesenchymal transition drives atherosclerosis progression. *J Clin Invest* **125**, 4514–28 (2015).
51. Nie, L. *et al.* Endothelial-mesenchymal transition in normal human esophageal endothelial cells cocultured with esophageal adenocarcinoma cells: role of IL-1 β and TGF- β 2. *Am J Physiol Physiol* **307**, C859–C877 (2014).
52. Medici, D. & Kalluri, R. Endothelial-mesenchymal transition and its contribution to the emergence of stem cell phenotype. *Semin Cancer Biol* **22**, 379–84 (2012).
53. Zeisberg, E. M. *et al.* Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med* **13**, 952–961 (2007).
54. Potenta, S., Zeisberg, E. & Kalluri, R. The role of endothelial-to-mesenchymal transition in cancer progression. *Br J Cancer* **99**, 1375–1379 (2008).
55. Beranek, J. T. Vascular endothelium-derived cells containing smooth muscle actin are present in restenosis. *Lab Invest* **72**, 771 (1995).
56. Cooley, B. C. *et al.* TGF- β signaling mediates endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT) during vein graft remodeling. *Sci Transl Med* **6**, 227ra34 (2014).
57. Campos, L. C. G. *et al.* Induction of CRP3/MLP expression during vein arterialization is dependent on stretch rather than shear stress. *Cardiovasc Res* **83**, 140–7 (2009).
58. Lee, J., Wong, M., Smith, Q. & Baker, A. B. A novel system for studying mechanical strain waveform-dependent responses in vascular smooth muscle cells. *Lab Chip* **13**, 4573–82 (2013).
59. Prasain, N. & Stevens, T. The actin cytoskeleton in endothelial cell phenotypes. *Microvasc Res* **77**, 53–63 (2009).
60. Mai, J. *et al.* Dyssynchronous pacing triggers endothelial-mesenchymal

- transition through heterogeneity of mechanical stretch in a canine model. *Circ J* **79**, 201–9 (2015).
61. Kiserud, T. Fetal venous circulation - an update on hemodynamics. *J Perinat Med* **28**, 90–6 (2000).
 62. Sung, H.-J., Yee, A., Eskin, S. G. & McIntire, L. V. Cyclic strain and motion control produce opposite oxidative responses in two human endothelial cell types. *Am J Physiol Physiol* **293**, C87–C94 (2007).
 63. Katoh, K., Kano, Y. & Ookawara, S. Role of stress fibers and focal adhesions as a mediator for mechano-signal transduction in endothelial cells in situ. *Vasc Health Risk Manag* **4**, 1273–82 (2008).
 64. Ali, M. H. & Schumacker, P. T. Endothelial responses to mechanical stress: where is the mechanosensor? *Crit Care Med* **30**, S198-206 (2002).
 65. Revenu, C., Athman, R., Robine, S. & Louvard, D. The co-workers of actin filaments: from cell structures to signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 635–46 (2004).
 66. Stossel, T. P. *et al.* Nonmuscle Actin-Binding Proteins. *Annu Rev Cell Biol* **1**, 353–402 (1985).
 67. Gieni, R. S. & Hendzel, M. J. Actin dynamics and functions in the interphase nucleus: moving toward an understanding of nuclear polymeric actin. *Biochem Cell Biol* **87**, 283–306 (2009).
 68. Zheng, B., Han, M., Bernier, M. & Wen, J. Nuclear actin and actin-binding proteins in the regulation of transcription and gene expression. *FEBS J* **276**, 2669–2685 (2009).
 69. Rajakylä, E. K. & Vartiainen, M. K. Rho, nuclear actin, and actin-binding proteins in the regulation of transcription and gene expression. *Small GTPases* **5**, e27539 (2014).
 70. Stüven, T., Hartmann, E. & Görlich, D. Exportin 6: a novel nuclear export receptor that is specific for profilin.actin complexes. *EMBO J* **22**, 5928–40 (2003).
 71. Wada, A., Fukuda, M., Mishima, M. & Nishida, E. Nuclear export of actin: a novel mechanism regulating the subcellular localization of a major cytoskeletal protein. *EMBO J* **17**, 1635–41 (1998).
 72. Dopie, J., Skarp, K.-P., Rajakylä, E. K., Tanhuanpää, K. & Vartiainen, M. K. Active maintenance of nuclear actin by importin 9 supports transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, E544-52 (2012).
 73. Hofmann, W. A. *et al.* SUMOylation of nuclear actin. *J Cell Biol* **186**, 193–200 (2009).
 74. Bernstein, B. W. & Bamburg, J. R. ADF/cofilin: a functional node in cell biology. *Trends Cell Biol* **20**, 187–95 (2010).
 75. Kanellos, G. & Frame, M. C. Cellular functions of the ADF/cofilin family at a glance. *J Cell Sci* **129**, 3211–8 (2016).

76. Pendleton, A., Pope, B., Weeds, A. & Koffer, A. Latrunculin B or ATP Depletion Induces Cofilin-dependent Translocation of Actin into Nuclei of Mast Cells. *J Biol Chem* **278**, 14394–14400 (2003).
77. Chhabra, D. & dos Remedios, C. G. Cofilin, actin and their complex observed in vivo using fluorescence resonance energy transfer. *Biophys J* **89**, 1902–8 (2005).
78. Nishida, E., Maekawa, S. & Sakai, H. Cofilin, a protein in porcine brain that binds to actin filaments and inhibits their interactions with myosin and tropomyosin. *Biochemistry* **23**, 5307–13 (1984).
79. Slee, J. B. & Lowe-Krentz, L. J. Actin realignment and cofilin regulation are essential for barrier integrity during shear stress. *J Cell Biochem* **114**, 782–795 (2013).
80. Goldmann, W. H. Role of vinculin in cellular mechanotransduction. *Cell Biol Int* **40**, 241–256 (2016).
81. Chen, H., Cohen, D. M., Choudhury, D. M., Kioka, N. & Craig, S. W. Spatial distribution and functional significance of activated vinculin in living cells. *J Cell Biol* **169**, 459–70 (2005).
82. Ziegler, W. H., Liddington, R. C. & Critchley, D. R. The structure and regulation of vinculin. *Trends Cell Biol* **16**, 453–460 (2006).
83. Yano, Y., Geibel, J. & Sumpio, B. E. Tyrosine phosphorylation of pp125FAK and paxillin in aortic endothelial cells induced by mechanical strain. *Am J Physiol Physiol* **271**, C635–C649 (1996).
84. Torsoni, A. S., Marin, T. M., Velloso, L. A. & Franchini, K. G. RhoA/ROCK signaling is critical to FAK activation by cyclic stretch in cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **289**, H1488-96 (2005).
85. Joannides, R. *et al.* Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation* **91**, 1314–9 (1995).
86. Wang, G. R., Zhu, Y., Halushka, P. V., Lincoln, T. M. & Mendelsohn, M. E. Mechanism of platelet inhibition by nitric oxide: in vivo phosphorylation of thromboxane receptor by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 4888–93 (1998).
87. Kubes, P., Suzuki, M. & Granger, D. N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 4651–5 (1991).
88. Carneiro, A. P., Fonseca-Alaniz, M. H., Dallan, L. A. O., Miyakawa, A. A. & Krieger, J. E. β -arrestin is critical for early shear stress-induced Akt/eNOS activation in human vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **483**, 75–81 (2017).
89. Barauna, V. G., Mantuan, P. R., Magalhães, F. C., Campos, L. C. G. & Krieger, J. E. AT1 receptor blocker potentiates shear-stress induced nitric oxide production via modulation of eNOS phosphorylation of residues Thr(495) and Ser(1177.). *Biochem Biophys Res Commun* **441**, 713–9

- (2013).
90. Hishikawa, K. & Lüscher, T. F. Pulsatile stretch stimulates superoxide production in human aortic endothelial cells. *Circulation* **96**, 3610–6 (1997).
 91. Casey, P. J. *et al.* The effect of combined arterial hemodynamics on saphenous venous endothelial nitric oxide production. *J Vasc Surg* **33**, 1199–205 (2001).
 92. Su, Y., Kondrikov, D. & Block, E. R. Cytoskeletal Regulation of Nitric Oxide Synthase. *Cell Biochem Biophys* **43**, 439–450 (2005).
 93. Mi, Q. *et al.* Activation of endothelial nitric oxide synthase is dependent on its interaction with globular actin in human umbilical vein endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol* **51**, 419–427 (2011).
 94. Ortiz, P. A., Hong, N. J. & Garvin, J. L. Luminal flow induces eNOS activation and translocation in the rat thick ascending limb. *Am J Physiol Physiol* **287**, F274–F280 (2004).
 95. Kondrikov, D., Han, H.-R., Block, E. R. & Su, Y. Growth and density-dependent regulation of NO synthase by the actin cytoskeleton in pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol Cell Mol Physiol* **290**, L41–L50 (2006).
 96. Takemoto, M., Sun, J., Hiroki, J., Shimokawa, H. & Liao, J. K. Rho-kinase mediates hypoxia-induced downregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* **106**, 57–62 (2002).
 97. Laufs, U. *et al.* Neuroprotection mediated by changes in the endothelial actin cytoskeleton. *J Clin Invest* **106**, 15–24 (2000).
 98. Liu, Z. G., Ge, Z. D. & He, G. W. Difference in endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated hyperpolarization and nitric oxide release between human internal mammary artery and saphenous vein. *Circulation* **102**, III296–301 (2000).
 99. Kobayashi, S. *et al.* Stretch-induced IL-6 secretion from endothelial cells requires NF-kappaB activation. *Biochem Biophys Res Commun* **308**, 306–12 (2003).
 100. Sumpio, B. E. *et al.* Regulation of PDGF-B in endothelial cells exposed to cyclic strain. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**, 349–55 (1998).
 101. Kawai, M. *et al.* Mechanical stress-dependent secretion of interleukin 6 by endothelial cells after portal vein embolization: clinical and experimental studies. *J Hepatol* **37**, 240–6 (2002).
 102. Heldin, C.-H. & Westermark, B. Mechanism of Action and In Vivo Role of Platelet-Derived Growth Factor. *Physiol Rev* **79**, 1283–1316 (1999).
 103. Didion, S. Cellular and Oxidative Mechanisms Associated with Interleukin-6 Signaling in the Vasculature. *Int J Mol Sci* **18**, 2563 (2017).
 104. Di Paolo, N. C. & Shayakhmetov, D. M. Interleukin 1 α and the inflammatory process. *Nat Immunol* **17**, 906–913 (2016).

105. Lie, P. P. Y., Cheng, C. Y. & Mruk, D. D. The biology of interleukin-1: emerging concepts in the regulation of the actin cytoskeleton and cell junction dynamics. *Cell Mol Life Sci* **69**, 487–500 (2012).
106. Maier, J. A., Statuto, M. & Ragnotti, G. Endogenous interleukin 1 alpha must be transported to the nucleus to exert its activity in human endothelial cells. *Mol Cell Biol* **14**, 1845–51 (1994).
107. Nobes, C. D. & Hall, A. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* **81**, 53–62 (1995).
108. MOLDOVAN, L., MYTHREYE, K., GOLDSCHMIDTCLERMONT, P. & SATTERWHITE, L. Reactive oxygen species in vascular endothelial cell motility. Roles of NAD(P)H oxidase and Rac1. *Cardiovasc Res* **71**, 236–246 (2006).
109. Lassegue, B., San Martin, A. & Griendling, K. K. Biochemistry, Physiology, and Pathophysiology of NADPH Oxidases in the Cardiovascular System. *Circ Res* **110**, 1364–1390 (2012).
110. Valdivia, A., Duran, C. & San Martin, A. The role of Nox-mediated oxidation in the regulation of cytoskeletal dynamics. *Curr Pharm Des* **21**, 6009–22 (2015).
111. Panieri, E. & Santoro, M. M. ROS signaling and redox biology in endothelial cells. *Cell Mol Life Sci* **72**, 3281–3303 (2015).
112. Valko, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* **39**, 44–84 (2007).
113. Huot, J., Houle, F., Marceau, F. & Landry, J. Oxidative stress-induced actin reorganization mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase/heat shock protein 27 pathway in vascular endothelial cells. *Circ Res* **80**, 383–92 (1997).
114. Go, Y.-M. & Jones, D. P. The redox proteome. *J Biol Chem* **288**, 26512–20 (2013).
115. DalleDonne, I., Milzani, A. & Colombo, R. The *tert*-Butyl Hydroperoxide-Induced Oxidation of Actin Cys-374 Is Coupled with Structural Changes in Distant Regions of the Protein [†]. *Biochemistry* **38**, 12471–12480 (1999).
116. DalleDonne, I., Milzani, A. & Colombo, R. H₂O₂-treated actin: assembly and polymer interactions with cross-linking proteins. *Biophys J* **69**, 2710–9 (1995).
117. Shi, Y. *et al.* Oxidative stress and lipid retention in vascular grafts: comparison between venous and arterial conduits. *Circulation* **103**, 2408–13 (2001).
118. Schroder, K. *et al.* Nox4 Is a Protective Reactive Oxygen Species Generating Vascular NADPH Oxidase. *Circ Res* **110**, 1217–1225 (2012).
119. Hu, T. *et al.* Reactive oxygen species production via NADPH oxidase mediates TGF- β -induced cytoskeletal alterations in endothelial cells. *Am J*

- Physiol Physiol* **289**, F816–F825 (2005).
120. Montenegro, M. F. *et al.* Nox4-dependent activation of cofilin mediates VSMC reorientation in response to cyclic stretching. *Free Radic Biol Med* **85**, 288–94 (2015).
 121. Serrander, L. *et al.* NOX4 activity is determined by mRNA levels and reveals a unique pattern of ROS generation. *Biochem J* **406**, 105–14 (2007).
 122. Miyakawa, A. A., Dallan, L. A. O., Lacchini, S., Borin, T. F. & Krieger, J. E. Human saphenous vein organ culture under controlled hemodynamic conditions. *Clinics (Sao Paulo)* **63**, 683–8 (2008).

8. Anexos

8.1 ANEXO 1: Aprovação da CAPPesq

4292/15/119

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

PROJETO DE PESQUISA

Título: TRANSIÇÃO ENDOTÉLIO-MESENQUIMAL DURANTE O REMODELAMENTO DA ARTERIALIZAÇÃO VENOSA: EFEITO DO ESTIRAMENTO MECÂNICO NA PLASTICIDADE ENDOTELIAL.

Pesquisador Responsável: Ayumi Aurea Miyakawa

Versão: 1

Pesquisador Executante: Thaís Girão da Silva

CAAE: 52096115.8.0000.0068

Co-autores: José Eduardo Krieger, Marco C. Harmsen

Finalidade Acadêmica: Doutorado

Orientador: Dra Ayumi Aurea Miyakawa

Instituição: HCFMUSP

Departamento: COMISSÃO CIENTÍFICA DO INCOR

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 13944

Número do Parecer: 1.391.819

Data da Relatoria: 20/01/2016

Apresentação do Projeto: Trata-se de projeto experimental (doutorado da aluna Thaís Girão da Silva sob orientação da Dra Ayumi Miyakawa, com financiamento CNPq) que visa avaliar o fenótipo de transição de células endoteliais no processo de remodelamento vascular patológico associado à reoclusão vascular.

Objetivo da Pesquisa: Caracterizar o processo de transição de fenótipo endotelial/mesenquimal em células endoteliais da safena humana, vias de sinalização envolvidas e a influência do estiramento mecânico; determinar o papel da transição de fenótipo endotelial e de vias de sinalização sobre o remodelamento patológico in vivo (modelo de arterialização venosa em ratos).

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Não há riscos ou benefícios diretos aos pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: Será obtido fragmento de veia safena e colhidos 5 mL de sangue de pacientes submetidos à cirurgia de revascularização, sem interferência nos procedimentos clínico-cirúrgicos dos mesmos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Adequado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Sem pendências.

Situação do Parecer: Aprovado.

Necessita Avaliação da CONEP: Não.

Considerações Finais a critério do CEP: Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: **a)** desenvolver o projeto conforme delineado; **b)** elaborar e apresentar relatórios parciais e final; **c)** apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; **d)** manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; **e)** encaminhar os resultados para

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar

CEP 05403-010 - São Paulo - SP.

55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | cappesq.adm@hc.fm.usp.br

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

publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

São Paulo, 20 de janeiro de 2016

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

COMISSÃO CIENTÍFICA
RECEBIDO
26 / 01 / 2016
Anna Lucia

8.2 ANEXO 2: TCLE aprovado pela CAPPesq

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DA PESQUISA

Título da pesquisa: "Transição endotélio-mesenquimal durante o remodelamento da arterialização venosa: efeito do estiramento mecânico na plasticidade endotelial."

Pesquisador principal: Dra Ayumi Aurea Miyakawa

Pesquisador executante: Thais Girão da Silva

Departamento/ Instituto: Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular/ Instituto do Coração

Convidamos o Sr(a) para participar dessa pesquisa, que tem como objetivo estudar as células endoteliais que constituem a camada interna dos vasos sanguíneos, tais como a veia safena. Este estudo é importante para entender como estas células respondem a diferentes estímulos, como por exemplo ao estiramento celular (em função da pressão sanguínea) e à alguns medicamentos. Com isso pretendemos compreender melhor os mecanismos que obstruem os vasos e, eventualmente, desenvolver alguma terapia no combate à essa doença.

O(a) senhor(a) está sendo submetido a uma cirurgia dos vasos do coração, que faz parte de seu tratamento, em que os médicos vão retirar um segmento da veia safena para realização da ponte. Nossa participação será a de utilizar um pequeno pedaço que sobrar da veia para obtenção de células endoteliais, que serão mantidas em cultura celular para realização dos nossos experimentos. Esse procedimento não interferirá com o resultado de sua cirurgia, pois esse pedaço da veia safena que não fosse utilizado na cirurgia seria descartado. Será, ainda, coletado 1 tubo de 5 ml (aproximadamente 1 colher de chá) de sangue enquanto o(a) senhor(a) estiver no centro cirúrgico, para que nós possamos determinar as características de seu material genético (DNA) e, com isso, associar à eventuais marcadores de estenose (entupimento da veia) obtidos nesse trabalho. Como será coletado sangue de uma veia, o senhor pode sentir um pouco de dor no local da picada e pode aparecer um pequeno hematoma ("pequena mancha roxa") neste local.

Não há benefício direto para o participante desta pesquisa. Trata-se de estudo experimental testando a hipótese de que as células endoteliais podem se diferenciar quando estimuladas mecanicamente (por estiramento celular) e/ ou quimicamente (com drogas como interleucina 1 beta), contribuindo para a oclusão do vaso em algumas revascularizações cardíacas. Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício para a área médica.

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente. Todas as informações pessoais serão mantidas em sigilo total e o senhor(a) receberá uma via desse termo de consentimento.

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

O segmento de veia e o sangue obtidos desta pesquisa serão armazenados no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular no 10º andar de acordo com a resolução 441/2011. As células humanas são amostras raras para a realização de pesquisas, principalmente células de vasos sanguíneos. Deste modo, caso seja consentido, tais células poderão ser utilizadas para estudos nos quais sejam avaliadas diversas características relacionadas a problemas cardíacos, sendo que essa avaliação de características poderá ajudar no entendimento de outras doenças. Portanto, caso seja autorizado pelo(a) senhor(a), poderemos utilizar suas amostras para estudar outras doenças. Nesse caso, um novo pedido de consentimento será feito e toda a pesquisa só será realizada após aprovação do sistema CEP-CONEP.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra Ayumi Aurea Miyakawa, que pode ser encontrada na Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 44, bloco II no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular. Telefone (11) 2661-5183. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 – e-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br.

Fui suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Transição endotélio-mesenquimal durante o remodelamento da arterialização venosa: efeito do estiramento mecânico na plasticidade endotelial."

Eu discuti as informações acima com o pesquisador responsável, a Dra. Ayumi Aurea Miyakawa, ou com a pesquisadora executante Thais Girão da Silva, sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim os objetivos, os procedimentos, os potenciais desconfortos e riscos e as garantias. Concordo voluntariamente em participar deste estudo, assino este termo de consentimento e recebo uma via rubricada pelo pesquisador.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____/____/____

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....)

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

8.3 ANEXO 3: Aprovação do CEUA FMUSP

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que o projeto intitulado “**Transição endotélio-mesenquimal durante o remodelamento da arterialização venosa: efeito do estiramento mecânico na plasticidade endotelial**” protocolo nº 153/15 sob a responsabilidade de **Ayumi Aurea Miyakawa e Thais Girão da Silva**, apresentado pela Comissão Científica - INCOR - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em 21.12.2015.

Sugerimos utilização do tramadol no lugar da dipirona. Não existe literatura veterinária que ateste efeito analgésico da dipirona em roedores.

Vigência do Projeto	Novembro/2017
Espécie/linhagem	Ratos Wistar
Nº de animais	250
Peso/Idade	7 semanas
Sexo	Macho
Origem	Biotério ICB

CEUA-FMUSP, 21 de Dezembro de 2015

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Comissão de Ética no Uso de Animais da FMUSP
e-mail: ceua.fm@usp.br

9. Apêndices

9.1 Apêndice 1: Manuscrito publicado

Clinical Science (2018) 132 437–447
https://doi.org/10.1042/CS20171457

Research Article

Rapamycin activates TGF receptor independently of its ligand: implications for endothelial dysfunction

Ayumi A. Miyakawa^{1,2,3,*}, Thais Girão-Silva^{3,*}, Jose E. Krieger³ and Elazer R. Edelman^{1,2}

¹Cardiovascular Division, Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, U.S.A.; ²Institute for Medical Engineering and Science, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA 02139, U.S.A.; ³Laboratory of Genetics and Molecular Cardiology, Heart Institute (InCor, HCFMUSP), Sao Paulo, SP 054003, Brazil

Correspondence: Ayumi A. Miyakawa (ayumi.miyakawa@incor.usp.br)

Rapamycin, the macrolide immunosuppressant and active pharmaceutical in drug-eluting stents (DES), has a well-recognized antiproliferative action that involves inhibition of the mTOR pathway after binding to the cytosolic protein FKBP12. TGF receptor-type I (TGFRI) spontaneous activation is inhibited by the association with FKBP12. We hypothesized that rapamycin, in addition to inhibition of mTOR signaling, activates TGFRI independent of TGFβ. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were treated with rapamycin (10 nmol/l) and/or TGFβ RI kinase inhibitor (TGFRIi, 100 nmol/l) for 24 h. Rapamycin induced SMAD phosphorylation (SMAD1, SMAD2, and SMAD5) and PAI-1 up-regulation, which was specifically abrogated by SMAD2 knockdown. TGFRIi efficiently blocked phosphorylation of SMAD2, but not SMAD1/5. Interestingly, the inhibitor did not alter cell proliferation arrest induced by rapamycin. Active TGFβ secretion was not affected by the treatment. Neutralizing TGFβ experiments did not influence SMAD2 phosphorylation or PAI-1 expression indicating that activation of this pathway is independent of the ligand. In addition, rapamycin induction of endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT) was potentiated by IL-1β and efficiently blocked by TGFRIi. *In vivo*, the prothrombotic effects of rapamycin and up-regulation of PAI-1 in murine carotid arteries were reduced by TGFRIi treatment. In conclusion, we provide evidence that rapamycin activates TGF receptor independent of its ligand TGFβ, in concert with promotion of PAI-1 expression and changes in endothelial phenotype. These undesirable effects, the prothrombotic state, and activation of EndMT are SMAD2-dependent and independent of the therapeutic rapamycin-induced cell proliferation arrest.

Introduction

Rapamycin, also known as Sirolimus, is a macrolide immunosuppressant that served as the active element in first generation of drug-eluting stents (DES). The success of this device in suppressing neointimal proliferation and preventing clinical restenosis prompted subsequent generations of stents to incorporate rapamycin analogs as their active agent and today DES include zotarolimus, everolimus, and sirolimus as well as sirolimus. The control of proliferative vascular events is classically ascribed to binding of drug to the FK506 binding protein 12 (FKBP12) [1,2]. Rapamycin–FKBP12 complex inhibits mammalian target of rapamycin (mTORC1) signaling promoting cell cycle arrest [1,2]. The DES effect using these pharmacological agents is substantial but also comes at the potential expense of thrombotic risk [3–5]. Though vascular smooth muscle cells are affected first and foremost, there are also effects on endothelial cells that could reduce the native antithrombotic protective elements of intact blood vessels.

*These authors contributed equally to this work.

Received: 15 October 2017
Revised: 12 January 2018
Accepted: 16 January 2018

Accepted Manuscript Online:
17 January 2018
Version of Record published:
16 February 2018

Rapamycin, for example, induces endothelial tissue factor (TF) [6,7] and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) [8–10] expression. These effects are cited as evidence for the prothrombotic potential of the drug—this though is debated [11] and, even if present, is not mechanistically defined. This is the issue we investigated.

PAI-1 is a member of serine protease inhibitor (serpin) family and a major inhibitor of fibrinolysis, the physiological breakdown of blood clots [12,13]. PAI-1 expression is induced by TGF β receptor activation, specifically from receptor TGFRI/ALK5. FKBP12 interacts with TGF receptor-type I (TGFRI) and its spontaneous activation is kept in check by local complexation of FKBP12 [14–17]. Thus, we hypothesized that rapamycin, in addition to its inhibition of mTORC1, activates TGFRI in the absence of TGF β , interfering with endothelial cell health. If true these data could explain the mode, nature and variability of rapamycin-induced effects on ECs and the vessel wall, and a possible means by which to deal with the thrombotic complications of DES.

Methods

Cell culture

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were obtained from Invitrogen and maintained in EGM-2 media (PromoCell, Heidelberg, Germany) supplemented with 2% fetal bovine serum (FBS), 10 U/ml penicillin and 10 μ g/ml streptomycin. Cells were used up to 8th passage. Before cell treatment, medium was changed to EGM-2 supplemented with 1% FBS for 24 h. HUVECs were treated with 10 nmol/l rapamycin (LC Laboratories, Woburn, MA, U.S.A.) and/or 100 μ mol/l TGF β RI kinase inhibitor (TGFRIi, ALK5 inhibitor, Calbiochem, Merck Millipore, Germany) for 24 h. Control cells were treated with 0.1% DMSO vehicle. For long treatment experiments, cells were treated with 10 nmol/l rapamycin and/or 10 ng/ml IL-1 β (PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ, U.S.A.) with or without TGF β RI kinase inhibitor (100 μ mol/l) for 4 days. Medium was refreshed every day.

SMADs silencing

SMAD1, SMAD2, and SMAD5 silencing were performed using small interfering RNA (siRNA) specific for each protein (sc-29483, sc-38374, and sc-38378 respectively). HUVECs were plated at 70% confluence and starved with EGM medium without serum for 16 h. Lipofectamine 2000 (Invitrogen) was used to transfect cells with 40 pmol of siRNA in Opti-MEM I medium (Invitrogen) for 6 h. After this period, cells were washed and EGM-2 fresh medium was replaced. Treatment with rapamycin and/or TGFRI inhibitor was performed 24 h after transfection.

TGF β neutralizing antibody treatment

HUVECs were 1 h previously incubated with 7.5 μ g/ml of TGF β neutralizing antibody (R&D) before rapamycin (10 ng/ml) treatment. TGF β treatment (5 ng/ml) was used as positive control. Cells were lysed after 30 min or 24 h for Western blot evaluation of SMAD phosphorylation or PAI-1 respectively.

Cell activity

HUVEC cultured medium was collected after 30 min or 24 h and TGF β content was measured using TGF-beta 1 Emax ImmunoAssay System according to manufacturer's instructions (Promega, Madison, WI, U.S.A.). All the samples were not submitted to acidification step in order to detect just active TGF β 1. Proliferation assay was performed by BrdU incorporation using ELISA colorimetric assay kit according to manufacturer's instructions (Roche Applied Science, Germany). Expression of critical proteins was determined by immunocytochemistry and Western blot.

Immunocytochemistry

Cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min. After permeabilization (0.1% Nonidet P40 for 15 min), cells were incubated in blocking buffer (1% BSA) for 1 h. Primary antibodies for the following proteins were incubated overnight at 4°C: VE-cadherin (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, U.S.A.), Phalloidin (Life Technologies, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR), Calponin (EMD Millipore, Darmstadt, Germany), PECAM-1 (Abcam, Cambridge, MA, U.S.A.), and SM22 α (Abcam). Secondary antibodies Alexa488 or Alexa555 (Life Technologies, Molecular Probes, Inc.) were incubated for 2 h and nucleus was stained with DAPI 10 μ g/ μ l. Immunocytochemistry were analyzed on Laser Scanning Microscope 510 (Carl Zeiss).

Western blot

Cells were lysed in SDS buffer (60 mM Tris/HCl pH 6.8, 5% glycerol, 2% SDS). Twenty-five to fifty micrograms of cell lysates were run on SDS/polyacrylamide gels, transferred to PVDF membranes (Millipore, Billerica, MA, U.S.A.), and

incubated 1 h in a blocking buffer (5% bovine serum albumin (BSA), 10 mM Tris/HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, and 0.1% Tween 20). Each membrane was incubated overnight against a specific antibody: SMAD2 (Cell Signaling), pSMAD2 (Cell Signaling), SMAD1 (Cell Signaling), SMAD5 (Cell Signaling), pSMAD1/5 (Cell Signaling), PAI-1 (Santa Cruz Inc., Dallas, TX, U.S.A.), VE-cadherin (Cell Signaling), Calponin (Millipore), PECAM1 (Abcam), and SM22 α (Abcam). After incubation with peroxidase conjugated secondary antibodies, detection was performed with enhanced chemiluminescence reagents (GE Healthcare, Sweden). Protein levels of GAPDH (R&D Systems, Minneapolis, MN, U.S.A.) were used to normalize the results.

Experimental animals and animal procedures

C57BL/6 mice (20–30 g) were treated with rapamycin (4 mg/Kg body weight/day) and/or TGF β RI kinase inhibitor (25 mg/Kg body weight/day) by manually restraining the animals and injecting the drug solutions intraperitoneally using a 25- or 27-gauge syringe. After 3 days, the carotid artery was collected for immunohistochemistry or subjected to photochemical thrombosis experiment.

All animal procedures followed institutional guidelines for the care and use of laboratory animals. This study protocol was approved by the committee of animal care of Massachusetts Institute of Technology (# 0409-032-12).

Immunohistochemistry

The carotid segments were perfusion fixed *in situ* via cardiac puncture at 80 mmHg with an initial infusion of saline with 14.8 mM KCl, followed by 4% phosphate-buffered formalin. After 24–48 h, the artery segments were dehydrated in graded ethanol baths, immersed in citrisolv, and embedded in paraplast (Oxford, St Louis, MO, U.S.A.). Transverse sections (3 μ m-thick) of the tissue were affixed onto slides positively charged. The slides were submitted to deparaffinization in xylenes and then rehydrated. Heat-induced antigen retrieval was done with Tris-EDTA buffer (pH 9.0) using pressure cooker. Slides were incubated in blocking buffer (Tris Buffer and 1% casein) for 1 h. PAI-1 (Santa Cruz) antibody was used at 1:50 dilution overnight at 4°C. After wash steps with Tris-buffer, slides were incubated with ALEXA 555 (Molecular Probes) for 2 h and nucleus stained with diamino-2-phenylindole (DAPI) at 10 μ g/ μ l. Immunohistochemistry was analyzed on Laser Scanning Microscope 510 (Carl Zeiss). Images were quantified by IMAGEJ software.

Photochemical thrombosis experiment

Thrombosis in murine arteries followed by a protocol which we have previously described and validated [18]. Mice were anesthetized with a ketamine–xylazine mixture and a Rose Bengal dye solution (10 mg/ml) was injected retro-orbitally into mice at a dosage of 50 mg/kg. The carotid artery of the mouse was then exposed by careful dissection and a flow probe (Transonic, Inc., Ithaca, New York) was placed around the artery, and a 2.0-mW laser with a wavelength of 543 nm (ThorLabs Inc., Newton, New Jersey) was applied to the artery. Blood flow was monitored until an occlusive thrombus was formed that stopped flow for at least 2 min.

Statistical analysis

All data are expressed as mean $\pm$ SEM. Comparison among groups were performed using two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-hoc test for comparison. Student *t* test was used for siRNA experiments, TGF β release, and photochemical thrombosis experiment. Values of *P* < 0.05 were considered statistically significant.

Results

Rapamycin induces TGFRI activation and regulates PAI-1 expression via SMAD2

We evaluated SMAD signaling to determine TGFRI activation by rapamycin. In endothelial cells, TGF β activates SMAD2/3 signaling through ALK5/TGFRI and SMAD1/5/8 pathway through ALK1/TGFRI. Rapamycin was able to activate both types of receptors as indicated by phosphorylation of SMAD2 (Figure 1A) and SMAD1/5 (Figure 1B). The well demonstrated TGF-induced PAI-1 expression was also observed in rapamycin-treated cells and abrogated by SMAD2 knockdown. siRNA to SMAD1 and SMAD5 did not interfere with PAI-1 expression indicating that only SMAD2 signaling is activated in rapamycin-induced PAI-1 expression (Figure 1C). The efficiency of SMADs silencing is represented in Supplementary Figure S1A.

A commercially available TGFRI inhibitor, blocking specifically SMAD2 phosphorylation (Figure 1A and B) and PAI-1 expression (Figure 1D), was used on the following experiments to understand the TGFRI activation by rapamycin better. SMAD2 activation by rapamycin is observed for at least 6 h, and TGFRI inhibitor efficiently blocked

Figure 1. SMAD activation and PAI-1 expression by rapamycin in endothelial cells

Time-course of (A) SMAD-2 phosphorylation and (B) SMAD1/5 phosphorylation by rapamycin in the absence (●) or presence of TGFRII inhibitor (TGFRII) (○). Each point represents mean $\pm$ SEM of four independent experiments. * indicates $P < 0.05$ compared with time 0 of each treatment and # indicates $P < 0.05$ of rapamycin (60 min) vs. rapamycin + TGFRII (60 min). (C) PAI-1 protein expression induced by rapamycin in endothelial cells knockdown for SMAD1, SMAD2, and SMAD5. Each bar represents mean $\pm$ SEM of 6–7 independent experiments; * indicates $P < 0.05$. (D) PAI-1 protein expression induced by rapamycin in the presence of TGFRII for 24 h. Each bar represents mean $\pm$ SEM of 3–5 independent experiments. Black bars represent cells without TGFRII and white bars represent cells with TGFRII; * indicates $P < 0.05$.

its phosphorylation during this time (Supplementary Figure S1B). Indeed, induction of PAI-1 expression by rapamycin and its inhibition by TGFRII can be observed even after 96 h treatment (Supplementary Figure S1C).

Classically, rapamycin is known to inhibit mTORC1 activity and the downstream signaling such as p70S6K [1,2]. Interestingly, cell proliferation arrest induced by rapamycin was not altered by the TGFRII inhibitor (Figure 2A). Similarly, the reduction in p70S6K phosphorylation was maintained in the presence of TGFRII inhibitor (Figure 2B) and SMADs silencing (Figure 2C), suggesting that rapamycin activates two independent pathways to control cell proliferation and cell phenotype.

Figure 2. Cell proliferation arrest induced by rapamycin is not altered by TGFRI inhibitor or SMAD knockdown

(A) Rapamycin inhibits cell proliferation analyzed by BrdU incorporation even in the presence of TGFRI inhibitor for 24 h. Control cells without TGFRIi were considered 100% of BrdU incorporation. p70S6K phosphorylation expression after rapamycin treatment in the presence of (B) TGFRI inhibitor or (C) knockdown SMADs. Each bar represents mean $\pm$ SEM of 3–5 independent experiments; * indicates $P < 0.05$.

Rapamycin induces TGFRI pathway independent of TGF β

To verify if TGF β activation occurs by increased release of active TGF β induced by rapamycin, we performed an ELISA assay to measure TGF β 1 in the cell culture media. There was no difference in active TGF β release in rapamycin-treated cells compared with control after 30 min (Figure 3A) and 24 h (Figure 3B). Additionally, the increase in SMAD2 phosphorylation and PAI-1 expression induced by rapamycin was not affected by neutralizing TGF β antibody (Figure 3C and D). The neutralizing effect of TGF β antibody was demonstrated by reduction in SMAD2 phosphorylation and PAI-1 expression in TGF β treated cells (Figure 3C). These data indicate rapamycin activates TGF receptor independently of TGF β .

Rapamycin induces endothelial-to-mesenchymal transition

TGF β has been implicated in endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT) contributing to fibrosis [19–21] and remodeling after injury [22], therefore we examined EndMT in rapamycin activation of the TGF pathway. Because inflammatory costimulation has been described to efficiently induce EndMT [23], we also performed the study in the presence of IL-1 β . EndMT is characterized by loss of endothelial markers and increased expression of mesenchymal markers [19,24]. Here, we evaluated VE-Cadherin and PECAM-1 as endothelial markers and SM22 and calponin as mesenchymal markers. Although rapamycin has shown a small decrease in VE-Cadherin and PECAM1, it increased the mesenchymal marker SM22 and changed actin fiber pattern from cortical to fiber stress characteristic of mesenchymal and smooth muscle cells (Figure 4). In the presence of IL-1 β , the induction of EndMT by rapamycin was potentiated showing more pronounced decrease in VE-Cadherin and PECAM-1 than in rapamycin-only treated cells. Additionally, rapamycin and IL-1 β treated cells showed induction of calponin expression (Figure 4B and F), which

Figure 3. Rapamycin induces TGFRI pathway independent of TGFβ

Active TGFβ release after rapamycin treatment for (A) 30 min ($n=6$) or (B) 24 h ($n=14$). (C) Western blot for SMAD2 phosphorylation and PAI-1 expression after neutralizing TGFβ experiments. The efficiency of neutralization was demonstrated in the positive control group where pSMAD2 and PAI-1 induction by TGFβ was blocked by the neutralizing TGFβ antibody (D) PAI-1 expression after 24 h of rapamycin treatment in the presence of neutralizing TGFβ. Each bar represents mean $\pm$ SEM of seven independent experiments; * indicates $P<0.05$.

was not observed by the treatment of IL-1β alone (Supplementary Figure S1C). The TGFRIi reverted mesenchymal marker expression in rapamycin and rapamycin combined with IL-1β treated cells but did not prevent the fiber stress pattern of actin organization.

Blockage of TGFRI diminishes rapamycin-induced PAI-1 expression and prevents thrombogenicity *in vivo*

Mice treated with rapamycin exhibited increased carotid arterial PAI-1 expression, which was attenuated by TGFRI inhibitor (Figure 5A and B). Similarly, vessels expressing more PAI-1 were more thrombogenic than vessels with less PAI-1 (Figure 5C and D), demonstrating that TGFRI inhibition prevents the thrombogenicity induced by rapamycin through PAI-1 down-regulation.

Discussion

Rapamycin effects are manifest as a chemotherapeutic agent and when presented in a local sustained and controlled manner as an inhibitor of local proliferative vascular disease. Use in the latter as the active element of DES is accompanied as well by increased thrombogenicity possibly in tune with inhibition of restoration of an intact endothelium. [8,25] Rapamycin increases intracellular calcium which activates protein kinase C-α, promoting disruption of p120 catenin-VE-cadherin and VE-cadherin degradation [26].

Loss of endothelial barrier function is real [26,27] but the mechanisms proposed are indirect and over long time-scales. As DES, for example, release a heavy drug load early after implantation, we wondered if the effects of rapamycin were even more direct. Rapamycin classically inhibits mTOR complexation through binding to a specific binding protein, FKBP12 [4,5]. mTOR is present in all cells and acts in two different protein complexes: mTORC1 and mTORC2. mTORC1 is involved in protein synthesis and cell cycle arrest, while mTORC2 participates in cell

Figure 4. Rapamycin induces endothelial-to-mesenchymal transition, which is potentiated in the presence of IL-1 β . (A–C) Immunocytochemistry of EndMT markers after rapamycin treatment for 96 h in the presence or absence of TGFRI inhibitor. Endothelial markers in green, mesenchymal markers in red, and nuclei in blue (DAPI). (A) Double staining for VE-cadherin and Phalloidin, (B) double staining for PECAM-1 and Calponin, and (C) SM22. Each image is representative of three independent experiments. (D–G) Western blot for EndMT markers: (D) VE-Cadherin, $N=7$; (E) PECAM-1, $N=4$; (F) Calponin, $N=8$; (G) SM22, $N=5$. Each bar represents mean $\pm$ SEM; * indicates $P<0.05$ and ** $P<0.001$.

survival and actin cytoskeleton organization [29]. While inhibition of mTORC1 occurs immediately after binding of rapamycin to FKBP12, blockage of mTORC2 needs prolonged exposure of cells to rapamycin and its effect is controversial [28,30,31]. FKBP12 is a ubiquitous protein and its interaction with TGFRI inhibits basal signaling of the growth factor receptor [14–17]. Fibroblasts from FKBP12 knockout mice showed enhanced activity of TGFRI and inhibition of cell cycle [17]. As FKBP12 is a common component between TGF and rapamycin signaling, we asked if rapamycin could activate TGFRI by FKBP12 displacement from the receptor and by this means alter endothelial phenotype even without the TGF β ligand.

The present work demonstrated that rapamycin phosphorylates SMAD1/5 and SMAD2 in a time-dependent manner in concert with the activation of TGFRI. In addition, rapamycin increases PAI-1 expression and induces EndMT similar to effects described for TGF β . Although SMAD 1, 2, and 5 are activated by rapamycin, only SMAD2 seems to contribute to changes of endothelial phenotype. The implications of activation of SMAD1/5 by rapamycin should be further investigated but the balance of specific SMAD activation of TGF receptor may well explain disparate effects of DES on vascular healing.

Others have shown effects of rapamycin on PAI-1 [8–10]; however, the mechanism underlining this process remains unclear. To our knowledge, the present work is the first to demonstrate that rapamycin induces PAI-1 expression by TGFRI activation in endothelial cells independently of TGF β . Some have reported that rapamycin activates the TGF β pathway by increasing expression and/or activation of TGF β [32,33]. In rat mesangial cells, rapamycin activates latent TGF β and increases pSMAD2 and PAI-1 [33]. The increased oxidative stress after 30 min of rapamycin

Figure 5. Blockage of TGFRI activation decreases rapamycin-induced PAI-1 expression and thrombogenicity *in vivo*
(A) PAI-1 immunohistochemistry in carotid artery of mouse treated with rapamycin and/or TGFRI. Confocal microscopy images at 400 $\times$ original magnification. (B) PAI-1 immunohistochemistry fluorescence intensity quantification. Each bar represents mean $\pm$ SEM of 3–5 animals. Photochemical thrombosis injury in carotid artery of mouse treated with (C) rapamycin without TGFRI or (D) in the presence of TGFRI. (C) Thrombosis in rapamycin-treated mice occurred faster than in nontreated mice. (D) TGFRI inhibitor blocked the prothrombotic effects of rapamycin. Each bar represents mean $\pm$ SEM of 3–6 animals; * indicates $P < 0.05$.

treatment resulted in secretion of active TGF β [33]. The difference of action can be explained by differences in regulation between cell types: depletion of FKBP12 in mesangial cell reduces SMAD2 phosphorylation instead of increases as demonstrated in endothelial cell type.

We are suggesting that rapamycin can activate TGFRI by FKBP12 displacement from the receptor. Indirect action on TGF pathway can also occur, as regulation of accessories receptor like β glycan, endoglin, SARA (SMAD anchor for receptor activation), and SMAD7 [34–36]. Our *in vivo* experiments corroborated activation of TGF pathway by rapamycin, where the increase in PAI-1 expression after drug treatment correlates with increased thrombogenicity and TGFRI inhibitor reduces this effect (Figure 5).

We also show that rapamycin can induce EndMT and affect locally the health of endothelial cells adding further to understand the endothelial toxicity of rapamycin. EndMT, a process where endothelial cells lose their specific markers and morphology and acquire mesenchymal cell-like characteristics, has been implicated in heart valve mesenchyme formation [37], cardiac and renal chronic fibrosis [19–21], and vascular remodeling [22]. The most described regulator of EndMT is TGF β and we demonstrate that rapamycin induces expression of mesenchymal markers in endothelial cells through activation of TGFRI.

EndMT induced by rapamycin showed some aspects distinct from the process induced by TGF β . While both TGF β and rapamycin induced the expression of mesenchymal markers, rapamycin treatment had a slight reduction in endothelial markers. Interestingly, TGFRI inhibitor reverted mesenchymal marker expression but did not prevent the fiber stress pattern of actin. This may be to an additional effect of rapamycin on mTORC2. In fact, it is demonstrated that rapamycin promotes actin stress fibers in HUVEC by activation of mTORC2 [38] and this complex is involved in actin cytoskeleton modulation through regulation of F-actin and actin-related proteins [39]. Though rapamycin does not recapitulate exactly the EndMT process, it is clear that rapamycin drives the endothelial cells to an activated state. Data from literature suggest that different dose of rapamycin results in distinct effect in cells [40–43]. High dose (~ 100 nM) reduces EndMT induction [40,41], and low doses (10–20 nM) promote the mesenchymal transition [42].

This can be in part explained by the existence of two distinct mTOR complexes with different sensitivity to rapamycin treatment.

Normal endothelial function is essential for retention of vascular health, inhibiting thrombus formation, inflammation, and smooth muscle cell proliferation. The incomplete re-endothelialization of stent strut surfaces is a recognized substrate for stent thrombosis, and DES are thought to delay endothelial recovery allowing for persistent fibrin build up around the stent struts [44,45]. We provide evidence that endothelial cells in the presence of rapamycin are dysfunctional and thrombogenic, suggesting that the thrombogenicity of DES is not only from the loss of complete endothelial monolayer but also from a prothrombotic endothelial cell phenotype. We suggest that rapamycin may act by two distinct pathways—one that inhibits mTORC1 and leads to cell cycle arrest, and the other that activates SMAD2 and increases PAI-1 expression and EndMT (Supplementary Figure S2).

Overall, the present study shows that rapamycin activates the TGF β pathway and modify endothelial phenotype to a more thrombotic state independent of TGF β . Understanding the impact of DES on endothelial function is essential to find new approaches that prevent restenosis and maintain the vascular health.

Clinical perspectives

- Rapamycin has a well-recognized antiproliferative action that involves inhibition of the mTORC1 pathway after binding to the cytosolic protein FKBP12. TGFRI spontaneous activation is inhibited by the association with FKBP12. We hypothesized that rapamycin, when interacting with FKBP12, allows TGFRI activation independently of TGF β .
- Our findings have critical basic and applied implications. We demonstrated that rapamycin activates TGF receptor independent of its ligand TGF β , promotes PAI-1 expression, and induces changes in endothelial phenotype. Such profound effects on signaling of ligand-independent binding are in and of itself fascinating. We further showed that these effects were associated with endothelial activation and a thrombogenic state in culture and *in vivo*, are SMAD 2-dependent and independent of the therapeutic rapamycin-induced cell proliferation arrest.
- These findings may then explain the variability in disparate findings in the past, the mechanism of stent thrombosis and a means of obviating these complications in practice.

Acknowledgements

We thank Melissa St. Pierre for performing the surgical procedures of the photochemical thrombosis experiments.

Competing Interests

The authors declare that there are no competing interests associated with the manuscript.

Funding

A.A.M. was supported by the J.P. Lemann Foundation as a Jorge Paulo Lemann Harvard Medical School Cardiovascular Fellow at Brigham & Women's Hospital. T.G.-S. is recipient of fellowship from Sao Paulo Research Foundation (FAPESP 2014/06844-9). J.E.K. is supported in part by grants from Sao Paulo Research Foundation (FAPESP 2013/17368-0) and E.R.E. is supported in part by a grant from the US National Institutes of Health (R01 GM 49039).

Author Contribution

Conception and design: A.A.M. and E.R.E.; Analysis and interpretation: A.A.M., T.G.-S., J.E.K., and E.R.E.; Data collection: A.A.M. and T.G.-S.; Writing the article: A.A.M., T.G.-S., and E.R.E.; Critical revision of the article: A.A.M., T.G.-S., J.E.K., and E.R.E.; Statistical analysis: A.A.M. and T.G.-S.; Obtained funding: A.A.M., J.E.K. and E.R.E.; Overall responsibility: A.A.M. and E.R.E.

Abbreviations

DES, drug-eluting stents; EndMT, endothelial-to-mesenchymal transition; FKBP12, FK506 binding protein 12; HUVEC, human umbilical vein endothelial cells; mTOR, mammalian target of rapamycin; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1; PECAM-1, platelet/endothelial cell adhesion molecule 1; TF, tissue factor; TGFRI, TGF receptor-type I; TGFRII, TGF β RI kinase inhibitor.

9.2 Apêndice 2: EndMT no remodelamento patológico *in vivo*

No momento em que elaboramos o projeto, no início de 2014, não havia comprovação do envolvimento da EndMT no remodelamento patológico promovido pela arterialização venosa. Desse modo, propusemos determinar a participação da EndMT utilizando um modelo de arterialização venosa em rato, em que a veia jugular é conectada com a artéria carótida, amplamente usado em nosso laboratório e descrito abaixo ^{14,57}.

Modelo de arterialização

Foram utilizados ratos *Wistar* machos provenientes do biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e mantidos no biotério do InCor para o procedimento. Os animais foram mantidos com livre acesso a água e comida, temperatura e ciclo claro-escuro controlados. O protocolo de pesquisa nº153/15 foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Medicina (CEUA- FMUSP) (Anexo III). De modo resumido, após certificação da anestesia, a veia jugular externa direita foi dissecada, clampeada e cortada. Mesmo procedimento foi realizado na artéria carótida comum direita. A veia jugular foi conectada à artéria carótida por sutura término-terminal. Após anastomose o fluxo sanguíneo foi restabelecido. Para a analgesia, os animais receberam administração intraperitoneal (IP) de Tramadol (10mg/Kg) e, após 12 horas foram administrados 0,1mg de dipirona (IP) durante 3 dias consecutivos. Para a coleta do material, os animais passaram por eutanásia através de superdose de pentobarbital, seguida por perfusão com solução salina e formaldeído tamponado a 4% para fixação e conservação dos tecidos. Os segmentos venosos foram coletados após 1, 3 e 28 dias para posterior análise imuno-histoquímica.

Marcação para EndMT

No início do projeto, concomitantemente aos experimentos *in vitro*, realizamos as primeiras etapas de padronização da imunofluorescência para detecção dos marcadores de EndMT nos vasos. Como pode ser observado na figura abaixo (Suplementar 1), a marcação para SM22 funcionou bem na veia jugular (Figuras **S1** A-C) e na artéria carótida (Figuras **S1** D-F). No entanto, após

várias tentativas com diferentes condições de recuperação antigênica, titulações de anticorpos e tampões, não conseguimos visualizar a célula endotelial com nenhum dos marcadores utilizados: PECAM-1 (Figuras **S1 A** e **D**), VE-caderina (Figuras **S1 B** e **E**) e fator de von Willebrand (vWF, Figuras **S1 C** e **F**).

Figura suplementar 1: Imunofluorescência para identificação de EndMT em veia jugular (painéis superiores: **A-C**) e artéria carótida (painéis inferiores: **D-F**) de ratos. Todos os tecidos marcaram positivamente para SM22 (em vermelho), mas não obtivemos sucesso na marcação dos endoteliais (em verde): PECAM1 (**A, D**), VE-caderina (**B, E**) e vWF (**C, F**). Microscopia confocal, objetiva de 20 vezes. O asterisco (*) indica a localização do lúmen do vaso.

Esta era uma etapa fundamental, visto que a caracterização da transição só é possível com a dupla marcação para marcadores endoteliais e mesenquimais. À medida que tentávamos padronizar uma boa marcação, Brian C Cooley e colaboradores demonstraram por uma técnica de rastreamento bastante elegante, descrita previamente na introdução dessa tese, a participação da EndMT na restenose pós enxerto venoso ⁵⁶. Desse modo, paramos de investir nessa estratégia.