

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JULIO DE MESQUITA FILHO"

**COMPORTAMENTO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS
SUBMETIDAS A UM MODELO DE HIPERTENSÃO ARTERIAL
*IN VITRO***

THAÍS SILVA PINTO

Prof. Dr. Willian Fernando Zambuzzi

Botucatu – SP

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"

COMPORTAMENTO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS
SUBMETIDAS A UM MODELO DE HIPERTENSÃO ARTERIAL
IN VITRO

THAÍS SILVA PINTO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, *Campus* de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Prof. Dr. Willian Fernando Zambuzzi

Botucatu – SP

2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Pinto, Thais Silva.

Comportamento de células endoteliais submetidas a um
modelo de hipertensão arterial *in vitro* / Thais Silva Pinto.
- Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de
Botucatu

Orientador: Willian Fernando Zambuzzi

Capes: 20800002

1. Células endoteliais. 2. Hipertensão. 3.
Mecanotransdução celular. 4. Cisalhamento.

Palavras-chave: Célula Endotelial; Hipertensão;
Mecanotransdução; *Shear Stress*.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à minha Mãe, meu Pai e meu Irmão, pois o amor que sinto por eles é o que me estabiliza e mantém firme para ir atrás dos meus sonhos. Por me apoiarem e porque sem eles nada seria possível. Sem esquecer do meu querido Padrasto que me trata como filha e também me apoia em toda escolha que faço.

Aos meus amigos e amigas de Taubaté por me permitirem desde a infância dividir algumas das histórias mais fantásticas que vivi.

Aos meus bons amigos da turma 6109R do Bacharel em Farmácia da Fundação Universitária Vida Cristã (Faculdade de Pindamonhangaba), por todos os momentos e aprendizados que vivemos juntos. Em especial para as amigadas que persistem fortemente até hoje.

Às minhas colegas de equipe de futsal da atlética geral de Botucatu por todos os treinos e pelo Inter juntas. Mesmo eu não podendo jogar eu estava lá por vocês!

A todos os membros da república Xêro no Cangote com quem morei nesse período. Pelos momentos de descontração, festinha, café da manhã, faxina e pela Paz que prevalece na casa que me fizeram sentir morar em um verdadeiro Lar.

Aos meus queridos amigos que fiz em Botucatu que se tornaram minha família, sejam os da academia, da farmácia Universo Natural ou de qualquer outra origem, que não permitiram que eu me sentisse sozinha em nenhum momento, sempre me ajudaram como anjos e me proporcionaram momentos incríveis e inesquecíveis.

Aos meus colegas do cursinho pré-universitário Atena. Obrigada por me permitirem fazer parte desse lindo projeto e por compartilharem a paixão pela prática da docência.

Ao professor Dr. Pedro Padilha e ao Dr. José Cavalcante, do Departamento de Química e Bioquímica, pelo auxílio nos experimentos de Proteômica, além de auxiliar na análise dos dados.

Aos colegas e funcionários do departamento de Química e Bioquímica pelas risadas sem fim na cozinha, as comilanças nas confraternizações, pelo café nosso de cada dia e por manter o ambiente sempre tão limpo e organizado.

Aos membros do Laboratório de Bioensaios e Dinâmica Celular (LaBIO) pela convivência durante este período. Vou levar o carinho de vocês por toda minha vida. Em especial ao Anderson, o irmão que o Mestrado me deu de presente, pela nossa forte parceria.

Ao meu orientador, professor Dr. Willian Zambuzzi, por ter me recebido tão bem em seu grupo, por ter me guiado e me encorajado neste período e por todo o apoio e ajuda a todo momento.

A FAPESP pelo apoio financeiro dado a este projeto através dos processos 2017/18349-0 e 2014/22689-3, fundamental para a minha manutenção neste período.

Antes de finalizar, agradeço a todos que demonstraram carinho me incentivando e acreditando em mim durante todo este período, foram cruciais nesse momento em minha vida. Não poderia citar todos os nomes aqui, mas espero que se sintam todos fortemente abraçados.

Por último, o mais importante, agradeço à Deus pela maneira como conduz a minha vida, pela evolução tanto profissional como pessoal que adquiri nesse período e por me contemplar com tantas oportunidades e realizações como essa. Me faltam palavras para expressar tanta alegria e gratidão.

*"Saiba que são suas decisões, e não suas condições,
que determinam seu destino."*

(Tony Robbins)

RESUMO

Mudanças nas forças tensionais do *shear-stress* estão associadas a um repertório de cascatas de sinalização celular, as quais modulam em conjunto o fenótipo vascular tornando o tecido endotelial susceptível a variações patofisiológica e, portanto, compreensão do repertório molecular neste cenário é necessária. Com este propósito, nós submetemos células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) a um circuito de diferentes forças tensionais *in vitro*, considerando os grupos seguintes: 1. condição de fluxo de *shear-stress* fisiológico (nomeado *Normo*); 2. fluxo de *shear-stress* hipertenso (nomeado *Hyper*), e 3. células do grupo 2 foram retornadas para a condição *Normo* (nomeado *Return*). As amostras foram apropriadamente coletadas para seguir em diferentes metodologias. Nossos resultados mostraram um forte envolvimento de c-Src no controle da cascata de mecanotransdução modulando sinalização necessária para o fenótipo de adesão, sobrevivência (PI3K/AKT) e proliferação celulares. Além disso, c-Src parece desenvolver importante papel durante o remodelamento da Matriz Extracelular (MEC), cujo performance de matriz metaloproteinases (MMPs) mostrou mudanças significativas. Além disso, através de análise proteômica, mostramos um forte envolvimento de *Heat Shock Protein 70* (HSP70) nas células estressadas de modo *Hyper*, reduzindo significativamente no grupo *Return*. Esse resultado levou-nos a investigar o proteassoma 20S como uma alternativa proteolítica intracelular para promover o *turnover* dessas proteínas. Surpreendentemente, nossos dados revelaram um significativo aumento na expressão de genes *proteasome subunit α -type* (PSMA) e *β -type* (PSMB), genes que codificam proteínas relacionadas com o *core* catalítico do complexo proteassômico. Adicionalmente, mostramos que vias intracelulares clássicas (Wnt/ β -Catenina, Bax e BCL-2) e genes envolvidos com o metabolismo energético sofreram significativa modulação nas diferentes tensões de cisalhamento aplicadas. Em conjunto, nossos dados reportaram que um modelo *in vitro* de hipertensão é capaz de trazer informações importantes sobre a mecanossensibilidade de células endoteliais. Como padrões de cisalhamento estão associados com mudanças patofisiológicas, como aterosclerose e hipertensão, esses resultados criam novos caminhos para compreender o mecanismo molecular responsável pela mecanotransdução no endotélio e, se forem passíveis de ação medicamentosa, muitos desses alvos devem ser considerados para pesquisas futuras de fase pré-clínica.

Palavras chave: *Shear-stress*; Célula endotelial; Mecanotransdução; Hipertensão.

ABSTRACT

Shear-stress changes are associated with a repertory of signaling cascade, modulating vascular phenotype. As shear stress-related tensional forces might be associated with pathophysiological susceptibility, a more comprehensive molecular map needs to be addressed. Thus, we subjected human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) to a circuit of different tensional forces in vitro considering the following three groups: one in a physiological blood flow shear-stress condition (named *Normo*), another in which these cells followed to a hypertensive blood flow shear-stress (named *Hyper*), and finally one that these hyper-stressed cells were returned to *Normo* condition (named *Return*). The samples were properly collected to allow different methodologies analysis. Our data showed a pivotal involvement of c-Src on driving the mechanotransduction cascade by modulating signaling related with adhesion, survival (PI3K/Akt) and proliferative phenotype. Moreover, c-Src seems to develop important role during Extracellular Matrix (ECM) remodeling, which showed significative changes. Additionally, proteomic analysis showed strong involvement of Heat Shock Protein 70 (HSP70) in the hypertensive-stressed cells; it being significantly decreased in *Return* phenotype. This result prompted us to investigate 20S proteasome as an intracellular proteolytic alternative to promote the turnover of those proteins. Surprisingly, our data reveled significant over expression of sets of proteasome subunit α -type (PSMA) and proteasome subunit β -type (PSMB) genes (encoding proteins related with catalytic core of proteasome). Besides, constituents of classical intracellular pathways - for example Wnt/ β -Catenina, Bax and BCL-2, including genes involved with energetic metabolism, also suffered strong modulation on different model pressure. Altogether, our data reported that an *in vitro* hypertension model can bring a lot of insights about the mechanosensitivity in endothelial cells. Since shear patterns are associated with pathophysiologic changes, as well atherosclerosis and hypertension, these results paved new roads to understand the molecular mechanism in mechanotransduction driving in endothelium, and if drugable, many of these targets should be considered for future pre-clinical research.

Key words: Shear-stress; Endothelial cell; Mechanotransduction; Hypertension.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
O endotélio e o fluxo sanguíneo.....	1
Hipertensão Arterial Sistêmica	5
Mecanotransdução Endotelial	7
Modelo <i>shear stress</i>	9
2. OBJETIVOS	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS	12
Cultivo celular	12
Tensão de Cisalhamento (<i>Shear-stress</i>)	12
Extração de mRNA e análise por RT-qPCR.....	15
Eletroforese e Western Blotting.....	19
Análise das Bandas de Proteína por LC-MS/MS	20
Microscopia Confocal de Fluorescência	21
Zimografia	22
Análise estatística	23
4. RESULTADOS	24
Reprogramação da maquinaria molecular relacionada com sobrevivência e adesão	24
c-Src desencadeia sinais de sobrevivência e proliferação	26
Genes relacionados com a permeabilidade mitocondrial e metabolismo energético apresentaram estímulo mecanossensível.....	31
Cenário relacionado com o remodelamento da MEC (Matriz Extracelular) é rigorosamente modulado: possível papel da c-Src na orquestra de sinais.....	33
Estímulo mecânico hipertenso desencadeou aumento na expressão do gene NFkB e intensa modulação nos constituintes da via Wnt/ β -Catenina.....	36
HSPs (<i>Heat Shock Proteins</i>) foram identificadas em resposta ao estresse hipertenso <i>in vitro</i>	37
Genes relacionados com o proteassoma-20S foram altamente expressos e sugerem <i>turnover</i> de proteínas.....	43

5. DISCUSSÃO	45
6. CONSTATAÇÕES	54
7. CONCLUSÃO	55
9. REFERÊNCIAS:.....	56
10. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO PERÍODO.....	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Tensões mecânicas exercidas na parede do vaso. O esquema do vaso sanguíneo ilustra a localização da célula endotelial (*endothelial cell*) e da célula muscular lisa (*smooth muscle cell*), bem como o sentido do fluxo sanguíneo (*blood flow*) representado pela flecha mais grossa, e as tensões em que a pressão (p) é normal à parede do vaso, resultando em estiramento circunferencial da parede do vaso, e o *shear-stress* (τ) ou tensão de cisalhamento paralelo à parede do vaso e longitudinal no sentido do fluxo sanguíneo. **Fonte:** (Hahn & Schwartz, 2009).3

Figura 2: Fluxo sanguíneo laminar e fluxo sanguíneo perturbado. O desenho do vaso sanguíneo esclarece a diferença entre fluxo laminar regular uniforme do fluxo perturbado irregular, sendo este último geralmente situado em locais de bifurcações e associado com resposta inflamatória, o que aumenta a susceptibilidade a complicações cardiovasculares em determinadas circunstâncias específicas. **Fonte:** (T. Collins & Cybulsky, 2001). 4

Figura 3: Um modelo *in vitro* para estudar a mecanotransdução em células endoteliais. Células Endoteliais de Veia Umbilical Humana (HUVECs; passagem < 10) (a), em triplicata, foram semeadas na periferia da placa de 100-mm modificada para cultura e submetidas ao *shear-stress* mimetizando condições fisiológicas (Normotensão; nomeado como “Normotensive”) durante 24h (b), após esse período as amostras foram coletadas. Posteriormente, as culturas estressadas de maneira normotensa que permaneceram no modelo foram submetidas à elevada força tensional (condição hipertensa; nomeada como “Hypertensive”) por 24h (c), então as amostras foram coletadas para análise biológica. Finalmente, as células estressadas de modo “Normo” e hipertenso que permaneceram no agitador foram retornadas para a tensão fisiológica (nomeada de “Return”), e mantidas por 24h (d). Para gerar condições mecânicas, nós utilizamos um agitador orbital como o esquematizado. O modelo *in vitro* explorado aqui foi proposto anteriormente por dela Paz et al. (2012), com poucas modificações.....14

Figura 4. Rearranjo do citoesqueleto de células endoteliais e sinalização de sobrevivência são mecanismos adaptativos às diferentes forças de tensões. Primeiramente, o fenótipo das células foi avaliado medindo os transcritos de PI3K (a), AKT (b), ITGB1 (Integrina- β 1) (c) e CFL1 (Cofilina) (d), e depois normalizados com o perfil mRNA do GAPDH. PI3K também foi avaliada por microscopia de imunofluorescência confocal (e). Posteriormente, os mecanismos de adesão foram avaliados medindo a fosforilação de FAK em Y397 (f,g) e a distribuição de FAK total na célula por abordagem de imunofluorescência (h). Como FAK libera sinais para o rearranjo do citoesqueleto, nós avaliamos a fosforilação de outros constituintes da sinalização como a proteína RAC (i,j) e Cofilina (k,l). Por último, a fosforilação de PP2A, uma Ser/Thr fosfatase, também foi medida (m,n). O valor obtido para a condição de *Normo* foi considerado 1 e os valores relativos obtidos para *Hyper* ou *Return* são mostrados em *fold-changes*. As diferenças foram consideradas significativas quando * $p < 0.04$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0002$,

**** $p < 0.0001$ quando comparado com o grupo controle (*Normo*); e * $p < 0.04$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0002$, **** $p < 0.0001$ quando comparado com o grupo *Hyper*..... 25

Figura 5. Mecanotransdução requer Src carreando respostas adaptativas. Afim de avaliar o envolvimento de Src, o modelo *in vitro* foi realizado e as amostras coletadas como mencionado previamente em detalhe. Primeiramente, o perfil de transcritos de Src foi medido por qPCR, e normalizados pelo GAPDH (a). Análise por Western Blot dos lisados de HUVECs para Src são mostrados (b,c). Aqui, o conteúdo de Src foi normalizado pela β -actina (b,c). Diferenças foram consideradas significantes quando * $p < 0.04$, *** $p < 0.0002$, **** $p < 0.0001$ quando comparado com o controle (*Normo*); e **** $p < 0.0001$ quando comparado com a condição *Hyper*.27

Figura 6. Src parece modular o fenótipo relacionado com proliferação em resposta ao cenário de mecanotransdução. Primeiramente, os seguintes genes relacionados à proliferação foram avaliados pela tecnologia qPCR: VEGFR1 (a), TGF β 1 (b), CDK2 (c) e CDK4 (d). Os gráficos nos trazem a diferença do perfil de transcritos normalizados pelo GAPDH. Uma estimativa do número de células é mostrada submetendo as células viáveis e aderidas à coloração de DAPI (e). Depois disso, afim de avaliar se Src está envolvida com esse fenótipo, as células foram tratadas com PP1 e submetidas igualmente ao modelo *shear-stress* desse estudo. Nossos resultados mostraram um efeito bifásico de Src, interferindo principalmente na expressão gênica de CDK2 (f,g). Diferenças foram consideradas significantes quando * $p < 0.04$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0002$, **** $p < 0.0001$ quando comparadas com o grupo controle (*Normo*); e ** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ quando comparada com o grupo *Hyper*. Nos gráficos f e g, onde analisamos o papel de Src, o tratamento com PP1 também foi considerado e a significância foi mostrada quando * $p < 0,04$ 29

Figura 7. Membros MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinase) foram avaliados por qPCR e immunoblotting. Perfis de transcritos de MAPKs ERK (a), P38 (b) e JNK (c) foram mostrados. P38 também foi avaliado considerando o conteúdo proteico (d), normalizado pelo GAPDH (*housekeeping gene*). Diferenças foram consideradas significantes quando **** $p < 0,0001$30

Figura 8. Perfil de expressão gênica de constituintes relacionados com sobrevivência e morte celulares. O resultado da análise por q-PCR de BCL-2 (a) e BAX (b) foram demonstrados, normalizados pelo GAPDH. A razão entre o gene BAX e BCL-2 também foi realizada considerando a expressão de ambos (c). Diferenças foram consideradas significantes quando * $p < 0.04$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0002$ quando comparadas com o grupo controle (*Normo*); e ** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ quando comparada com o grupo *Hyper*.30

Figura 9. Src modula Cofilina e BCL-2 de maneira bifásica. Expressão gênica foi realizada com culturas de HUVECs tratadas ou não com PP1 (5 μ M), um inibidor da proteína c-Src. RT-qPCR mostrou um efeito bifásico da ação de Src na expressão gênica de CFL1, que aumentou em resposta à condição *Hyper* na presença de PP1 (a), mas um efeito oposto foi observado nas células do grupo *Return* (b). Essa modulação bifásica de Src na expressão gênica também foi observada no gene anti-apoptótico BCL-2 (c,d). Diferenças foram consideradas

significantes quando $**p < 0,001$ quando comparado com os grupos controle *Hyper* e controle *Return*.31

Figura 10. Modelo de hipertensão *in vitro* desencadeia resposta em genes relacionados com a permeabilidade mitocondrial e metabolismo energético. Nos ensaios de expressão gênica por RT-qPCR foram observados estímulos nos genes codificantes dos canais aniônicos dependentes de voltagem, onde VDAC1 teve um aumento nos grupos *Hyper* e *Return* (a), VDAC2 reduziu a expressão em ambos os grupos (b) e VDAC3 teve um significativo aumento apenas no grupo *Hyper* (c). Análise da expressão gênica de constituintes de vias metabólicas energéticas revelou diferenças com um aumento significativo dos transcritos nas células do grupo *Hyper* de LDHA (d) e LDHB que elevou cerca de 80 vezes (e), enquanto que o gene GPI teve um aumento bastante expressivo de cerca de 500 vezes em ambos os grupos *Hyper* e *Return* (f), assim como CS (g) e PDHA1 (h) de forma não tão expressiva, mas com significância estatística, e o gene PDHB teve diferença no grupo *Return* com uma redução (i). As diferenças foram consideradas significativas quando $*p < 0,04$, $**p < 0,001$, $***p < 0,0002$, $****p < 0,0001$ quando comparado com o grupo controle (*Normo*); e $*p < 0,04$, $**p < 0,001$, $***p < 0,0002$, $****p < 0,0001$ quando comparado com o grupo *Hyper*.32

Figura 11. Remodelamento da MEC em resposta à mecanotransdução em células endoteliais. Para avaliar o remodelamento da MEC, nós investigamos a expressão de MMPs 2 (b) e 9 (c), bem como de seus inibidores TIMPs 1 (d), 2 (e) e RECK (f). Além disso, o gene colágeno também foi avaliado (a). A atividade das MMPs também foi investigada pela técnica de zimografia (g-m). As diferenças foram consideradas significativas quando $*p < 0,04$, $**p < 0,001$, $***p < 0,0002$, $****p < 0,0001$ quando comparado com o grupo controle (*Normo*); e $*p < 0,04$, $**p < 0,001$, $***p < 0,0002$, $****p < 0,0001$ quando comparado com o grupo *Hyper*.34

Figura 12. Duplo efeito de Src na modulação dos genes relacionados com a remodelação de MEC. Para considerar a avaliação se Src modula genes codificantes dos membros da MEC responsáveis pelo remodelamento da maquinaria, o modelo *in vitro* de mecanotransdução foi reproduzido na presença de PP1 (5 μ M), um inibidor de Src. A prova do efeito bifásico de Src mostrado pelo Colágeno (COL1A1) (a,b), MMP2 (c,d) e MMP9 (e,f), nos grupos *Hyper* e *Return* respectivamente. Diferenças foram consideradas significativas quando $*p < 0,04$, $**p < 0,001$ quando comparado com o grupo controle *Hyper* e controle *Return*.35

Figura 13. Análise de expressão gênica do gene NFkB e dos integrantes da via Wnt/ β -Catenina. Com o intuito de avaliar o perfil de transcrição de NFkB, nós realizamos a técnica de PCR tempo real com primer específico para NFkB, o gene de referência utilizado foi o GAPDH (*housekeeping*). O mesmo foi realizado com os genes dos integrantes da via de Wnt/ β -Catenina, Wnt (b), LRP5 (c), GSK-3 β (d) e β -Catenina (e). As diferenças foram consideradas significativas quando $*p < 0,04$, $**p < 0,001$, $***p < 0,0002$, $****p < 0,0001$ quando comparado com o grupo controle (*Normo*); e $**p < 0,001$, $***p < 0,0002$ quando comparado com o grupo *Hyper*.37

Figura 14. Mecanotransdução requer *Heat Shock Proteins* (HSPs). Lizados de células tensionadas foram aplicados em eletroforese no SDS-PAGE e as proteínas eletroforéticas mostraram uma diferença significativa no conteúdo de proteínas entre 50-75 kDa no grupo *Hyper* (a), sendo significativamente reduzido no grupo *Return*. Com o intuito de avaliar a constituição dessas bandas (marcadas em amarelo), as proteínas foram processadas para permitir análise proteômica (veja Tabelas 2-5), que evidenciaram forte envolvimento de HSP70. Então, esses resultados foram validados marcando com anticorpo específico para HSP70 conjugado com FITC e depois utilizando microscopia confocal para adquirir as imagens (b). Finalmente, os genes codificantes de HSP40 (c), HSP70 (d), e HSP90 (e) também foram avaliados. Diferenças significativas foram consideradas quando $**p<0.001$, $***p<0.0002$ quando comparado com o grupo controle (*Normo*); e $**p<0.001$, $***p<0.0002$ quando comparado com o grupo *Hyper*.38

Figura 15. Genes relacionados com proteassoma 20S e um possível *turnover* de proteínas. Esquema da maquinaria do proteassoma 20S envolvendo ubiquitinação e os membros do *core* catalítico (a). Expressão gênica por RT-qPCR revelou forte relação da mecanotransdução com proteassoma 20S, uma vez que o gene UBX1 foi significativamente elevado quanto a sua expressão no grupo *Hyper* e *Return* (b), enquanto que todos os genes da família PSMA e PSMB foram alterados em resposta a condição hipertensa (c-h), sendo que tanto o gene PSMA3 quanto PSMB3 foram concomitantemente aumentados no grupo *Return* (c,f). Diferenças foram consideradas significantes quando $*p<0.04$, $**p<0.001$, $***p<0.0002$, $****p<0.0001$ quando comparado com grupo o controle (*Normo*); e $**p<0.001$, $****p<0.0001$ quando comparado com o grupo *Hyper*. 44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequências dos *primers* de expressão e condições do ciclo qPCR.16

Tabela 2. LC-MS/MS: Banda 1 = *spot* de proteínas de Células Endoteliais de Veia Umbilical Humana (*variando de 50-75kDa*); *pI* = ponto Isoelétrico; *MM* = massa molecular. **Fonte:** UniProt. 39

Tabela 3. LC-MS/MS: Banda 2= *spot* de proteínas de Células Endoteliais de Veia Umbilical Humana (*variando de 50-75kDa*); *pI*= ponto Isoelétrico; *MM* = massa molecular. **Fonte:** UniProt. 40

Tabela 4. LC-MS/MS: Banda 3= *spot* de proteínas de Células Endoteliais de Veia Umbilical Humana (*variando de 50-75kDa*); *pI*= ponto Isoelétrico; *MM* = massa molecular. **Fonte:** UniProt.41

Tabela 5. LC-MS/MS: Banda 4 = *spot* de proteínas de Células Endoteliais de Veia Umbilical Humana (*variando de 50-75kDa*); *pI*= ponto Isoelétrico; *MM* = massa molecular. **Fonte:** UniProt. 42

LISTA DE ABREVIACÕES

- **ACN** – Acetonitrila.
- **AKT1** - Proteína serina/treonina quinase RAC alfa.
- **AmBic** – Bicarbonato de Amônio.
- **ANOVA** - Análise de Variância.
- **BAX** - Proteína X associada a Bcl-2.
- **BCL2** - Linfoma de células B 2.
- **BSA** – Albumina de soro bovino.
- **CaCl₂** – Cloreto de Cálcio.
- **CDK2** - Quinase 2 dependente de ciclina.
- **CDK4** - Quinase 4 dependente de ciclina.
- **CFL1** – Cofilina 1.
- **COL1A1** - Cadeia Alpha 1 de Colágeno Tipo I.
- **CS** – Citrato Sintase.
- **CTNNB1** – Beta Catenina 1.
- **DAPI** - 4, 6-diamidino-2-fenilindole.
- **DNA** – Ácido desoxirribonucleico
- **DTT** - DL-Ditiotreitol.
- **ECL** – Realce de quimiluminescência.
- **EGTA** - Ácido egtálico.
- **eNOS** – Óxido Nítrico Sintase Endotelial.
- **ERK** - Quinases reguladas por sinal extracelular.
- **EROS** - Espécies reativas de oxigênio.
- **FAK** - Quinase de adesão focal.
- **GAPDH** - Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase.
- **GPI** – Fosfo-glicose-isomerase.
- **GSK3B** - Glicogênio sintase quinase 3 beta.
- **HCl** – Ácido Clorídrico.
- **HSP40** - Proteína de choque térmico 40 kDa.
- **HSP70** - Proteína de choque térmico 70 kDa.
- **HSP90** - Proteína de choque térmico 90 kDa.
- **HUVEC** – Célula Endotelial de Veia Umbilical Humana.
- **IAA** – Iodoacetamida.
- **ITGB1** – Integrina subunidade beta 1.
- **JNK** - c-Jun quinases terminais N.
- **LC** – Cromatografia líquida.
- **LDHA** – Lactato-desidrogenase A.
- **LDHB** – Lactato-desidrogenase B.
- **LRP5** - Proteína relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade 5.
- **MAPK** - Proteína quinase ativada por mitógeno.
- **MEC** – Matriz Extracelular.
- **MMP2** - Metaloproteinase de matriz 2.
- **MMP9** - Metaloproteinase de matriz 9.
- **MM** – Massa molecular.
- **MS** - Espectrometria de massas.
- **MW** – Peso molecular.
- **NaCl** – Cloreto de Sódio.
- **NaF** – Fluoreto de Sódio.
- **NFKB1** – Fator de transcrição nuclear kappa B.
- **P38** - Proteína quinase ativada por mitógeno p38.
- **PBS** - Tampão fosfato-salino.
- **PCR** - Reação de cadeia polimerase.
- **PDHA1** – Piruvato-Desidrogenase E1 Subunidade α 1.
- **PDHB** – Piruvato-Desidrogenase E1 Subunidade β .
- **PI** – Ponto isoelétrico
- **PI3K** - Fosfatidilinositol 3-quinases.
- **PP1** - Inibidor seletivo da tirosina quinase da família Src.
- **PP2A** – Proteína fosfatase 1.
- **PSMA1** - Subunidade do proteassoma α tipo 1.
- **PSMA2** - Subunidade do proteassoma α tipo 2.
- **PSMA3** - Subunidade do proteassoma α tipo 3.
- **PSMB1** - Subunidade do proteassoma β tipo 1.
- **PSMB2** - Subunidade do proteassoma β tipo 2.
- **PSMB3** - Subunidade do proteassoma β tipo 3.
- **PVDF** - Fluoreto de polivinilideno.
- **RAC** - Substrato de toxina botulínica C3 relacionado a Ras 1.
- **RECK** – *Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motif*.
- **RNA** – Ácido ribonucleico
- **RPM** – Rotação por minuto.
- **S** – Serina.
- **SDS** – Dodecil sulfato de sódio.
- **SRC** - Proteína tirosina quinase Src.
- **TBS** – Tampão Tris Salina.
- **TGFB1** - Fator de crescimento transformador beta 1.
- **TIMP1** - Inibidor de metalopetidase TIMP 1.
- **TIMP2** - Inibidor da metalopetidase TIMP 2
- **UBX1** - Proteína contendo um domínio UBX 1.
- **VDAC1** - canais iônicos dependentes de voltagem 1
- **VDAC2** - canais iônicos dependentes de voltagem 2
- **VDAC3** - canais iônicos dependentes de voltagem 3
- **VEGFR1** - Receptor do fator de crescimento endotelial vascular 1.
- **WNT** – Ligante Wnt.
- **Y** – Tirosina (resíduo de aminoácido).

1. INTRODUÇÃO

Eventos biológicos têm sido propostos por diferentes modelos experimentais, dos quais animais de experimentação são propostos a fim de conhecê-los. Muito tem sido feito acerca da padronização de metodologias capazes de oferecer ferramentas alternativas ao uso de animais de experimentação, sobretudo buscando sucesso como métodos preditivos de respostas sistêmicas. Neste contexto, o cultivo de células, embora com importantes limitações, oferece capacidade de análise celular, buscando compreender sua contextualização através de mudanças fenotípicas, onde a bioquímica de macromoléculas satisfaz importante função. Neste cenário, diferentes metodologias são ofertadas em suma ao progresso da biotecnologia aplicada à biologia celular e molecular.

O endotélio é composto por células residentes comprometidas com a biologia vascular, onde células endoteliais têm sido listadas em diferentes condições fisiopatológicas e, desta maneira, metodologias *in vitro* capazes de mimetizar respostas sistêmicas contribuirão com a compreensão da biologia vascular, interpretando mecanismos biológicos em diferentes condições, como mineralizações ectópicas e hipertensão. Com essa proposta, essa dissertação buscou desenvolver uma metodologia preditiva *in vitro*, bem como avaliar potenciais respostas moleculares que governam o comportamento celular em resposta ao circuito tensional de shear-stress.

O endotélio e o fluxo sanguíneo

A pressão do fluxo sanguíneo realiza um importante papel na manutenção da homeostase vascular, onde as células endoteliais, que revestem a superfície luminal (**Figura**

1), são constantemente expostas às tensões mecânicas e, dentre elas, encontra-se o *shear-stress* ou Tensão de Cisalhamento, cuja característica é a força paralela e o componente tangencial de forças mecânicas no sentido do fluxo sanguíneo (**Figura 1**), originado pelas forças hemodinâmicas (dela Paz, Walshe, Leach, Saint-Geniez, & D'Amore, 2012a); esses mecanismos são importantes no tocante à liberação de fatores de relaxamento vascular, como o óxido nítrico (NO), desencadeando uma cascata de reações subjacentes às células musculares lisas vasculares por hiperpolarização, principalmente desencadeado por fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (X. Wang & Khalil, 2018). O endotélio possui funções importantes na regulação da pressão sanguínea, bem como do suprimento sanguíneo nos tecidos, na angiogênese e remodelamento vascular, além de contribuir com resposta inflamatória e resposta imune do organismo (Ando & Yamamoto, 2011).

O endotélio compreende uma camada de células endoteliais que revestem todos os vasos sanguíneos, seja arterial ou venoso, e atuam de maneiras autócrina, parácrina e endócrina, as quais afetam o sistema cardiovascular com o intuito de realizar a manutenção da homeostase desse sistema (Triggle & Ding, 2011). Nas últimas décadas, estudos revelaram que, além do "Nitric Oxide" (NO), existem outros constituintes derivados do endotélio, assim como processos de regulação que também dependem do endotélio, que desempenham funções essenciais na manutenção do balanço que deve existir entre a vasoconstrição e vasodilatação, exemplos de vasoconstritores têm-se os peptídeos endotelina-1 e angiotensina II, e de vasodilatadores, além do NO produzido pela enzima Óxido Nítrico Sintase endotelial (eNOS), a prostaciclina (Triggle & Ding, 2011).

Existem algumas atividades extremamente importantes do endotélio vascular como o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos a partir de vasos existentes - um

processo chamado de angiogênese – que ocorre no desenvolvimento normal, mas também ocorre em condições patológicas que envolvem reparo tecidual, regeneração de órgãos e formação e/ou aumento de tumores (Mentzer & Konerding, 2014). A rede de vasos sanguíneos do sistema cardiovascular dos vertebrados fornece oxigênio e nutrientes para todos os tecidos, um minucioso processo necessário para atender suas altas demandas metabólicas (Hahn & Schwartz, 2009). Portanto as forças mecânicas que exercem tensões principalmente nas células endoteliais são importantes no sistema cardiovascular por agir com reguladores da fisiologia e patologia vascular (Givens & Tzima, 2016).

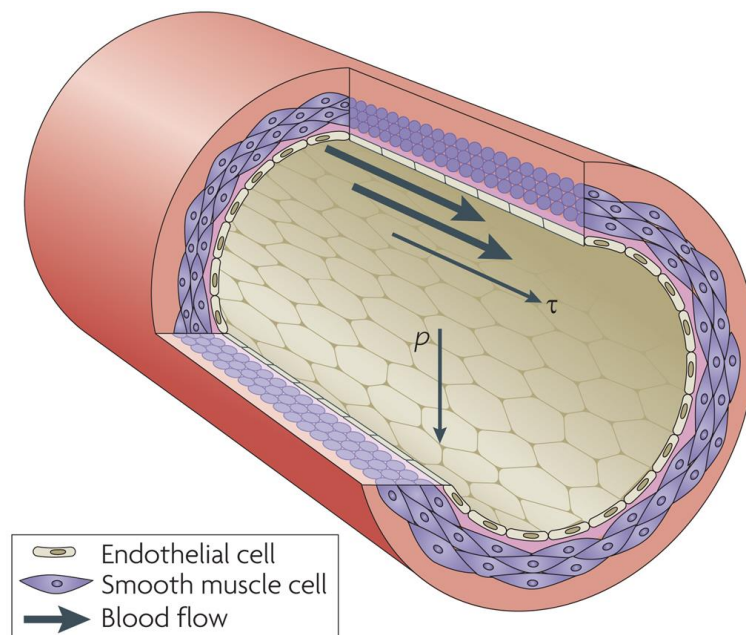


Figura 1: Tensões mecânicas exercidas na parede do vaso. O esquema do vaso sanguíneo ilustra a localização da célula endotelial (*endothelial cell*) e da célula muscular lisa (*smooth muscle cell*), bem como o sentido do fluxo sanguíneo (*blood flow*) representado pela flecha mais grossa, e as tensões em que a pressão (p) é normal à parede do vaso, resultando em estiramento circunferencial da parede do vaso, e o *shear-stress* (τ) ou tensão de cisalhamento paralelo à parede do vaso e longitudinal no sentido do fluxo sanguíneo. **Fonte:** (Hahn & Schwartz, 2009).

A célula endotelial é influenciada diretamente pelo *shear-stress* e é capaz de se adaptar a essa tensão (Ramasri Sathanoori et al., 2017), além de perceber e responder diferencialmente aos padrões de fluxo exclusivos do seu microambiente, pois as mesmas possuem muitos mecanossensores que estão presentes na superfície apical, juncional e basal (Givens & Tzima, 2016). O fluxo sanguíneo possui diferentes padrões que se enquadram em duas grandes categorias, o fluxo laminar (normal) e o fluxo perturbado (irregular), que são determinados pela geometria do vaso e dão origem a perfis de expressão gênica diferentes (Givens & Tzima, 2016). O fluxo sanguíneo irregular é algo inevitável em locais de ramificações do vaso (**Figura 2**) e o mesmo está relacionado com uma resposta inflamatória local que pode se agravar em determinadas classes de indivíduos (como diabéticos, fumantes, obesos e sedentários) e progredir para a formação de placas ateroscleróticas (Hahn & Schwartz, 2009), que é uma patologia cardiovascular, que pode debilitar o paciente e aumentar as chances de acidente vascular cerebral e infarto do miocárdio (Givens & Tzima, 2016) e que pode ainda ser agravada por um quadro de pressão arterial elevada – a hipertensão (Poulter, Prabhakaran, & Caulfield, 2015).

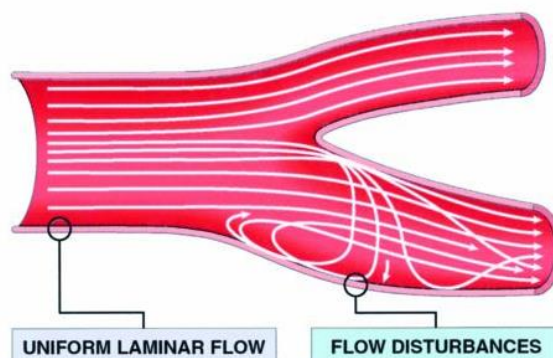


Figura 2: Fluxo sanguíneo laminar e fluxo sanguíneo perturbado. O desenho do vaso sanguíneo esclarece a diferença entre fluxo laminar regular uniforme do fluxo perturbado irregular, sendo este

último geralmente situado em locais de bifurcações e associado com resposta inflamatória, o que aumenta a susceptibilidade a complicações cardiovasculares em determinadas circunstâncias específicas. **Fonte:** (T. Collins & Cybulsky, 2001).

Hipertensão Arterial Sistêmica

Conforme abordado, algumas doenças multifatoriais, bem como a hipertensão e a aterosclerose, são desencadeadas por fluxo sanguíneo perturbado e por padrões inflamatórios, que envolvem alterações no tônus vascular e estão associados com um repertório de cascata de sinalização modulando o fenótipo vascular, os quais prejudicam a resposta adaptativa endotelial e geralmente estão acompanhados de remodelamento vascular e rearranjo de numerosos componentes da parede do vaso (X. Wang & Khalil, 2018), o que compromete ainda mais o fluxo fisiológico, sendo isso relacionado com o aumento do risco de lesões ateroscleróticas (C. Wang, Baker, Chen, & Schwartz, 2013). Essas alterações nas forças mecânicas no vaso podem induzir o rearranjo da parede, bem como das válvulas venosas, e, por poder desencadear inflamação, podem conturbar alguns mecanismos importantes permeando várias patologias (incluindo veia varicosa e placa aterosclerótica) que podem desencadear eventos cardiovasculares capazes de debilitar o paciente (Chiu & Chien, 2011).

A hipertensão arterial sistêmica, que se caracteriza pela elevada pressão arterial seja a sistólica ou a diastólica, ou ambas, se não tratada corretamente pode progredir para um contínuo aumento da pressão sanguínea (crônico) podendo culminar em um estado resistente à terapia devido a danos vasculares e renais associados (Saiz et al., 2017). De acordo com a Organização Mundial da Saúde, a hipertensão arterial é um importante fator de risco que contribui para a mortalidade e invalidez em todo o mundo, afetando mais de 1

bilhão de pessoas, levando à cerca de 9,4 milhões de mortes por ano (Ferdinand & Nasser, 2017) e que só no ano de 2010 causou cerca de 130 milhões de casos de invalidez (Saiz et al., 2017), o que a torna um grave problema de saúde pública.

Em triagens clínicas, a pressão sanguínea é aferida baseando-se na classificação do Programa Nacional de Educação sobre Pressão Alta, estabelecendo como o normal uma pressão de 120 mmHg e 80 mmHg para pressão sistólica e diastólica, respectivamente (Programa Nacional de Educação sobre Pressão Alta 2004). A hipertensão possui algumas subclassificações como hipertensão primária (essencial) e secundária, sendo que a secundária se caracteriza por geralmente se iniciar na fase mais nova da vida, não possuir história familiar e possuir uma causa clara (como uma desordem renal ou endócrina, ou então um desencadeador iatrogênico, como o uso de contraceptivo oral), enquanto que a hipertensão primária (essencial) geralmente surge na meia idade ou na fase idosa como resultado da influência mútua do estilo de vida e de fatores genéticos (Poulter et al., 2015).

Sendo então uma doença multifatorial e com subclassificações, a hipertensão é uma enfermidade difícil de ser definida e, embora já tenham se passado décadas de estudo, pesquisa e prática clínica, sua patogenia continua incompleta ou não inteiramente esclarecida, o que frequentemente impede que haja um controle e um tratamento adequado do paciente com hipertensão (Currie & Delles, 2017).

Estudos prospectivos têm reportado a associação entre a pressão sanguínea e performance vascular e, de fato, a pressão arterial controlada reduz o risco de doença cardiovascular e morte (Ettehad et al., 2016). Portanto, o controle da pressão sanguínea tem sido base tanto da prevenção primária como secundária de eventos cardiovasculares, além de ser o foco do tratamento (James et al., 2014). Por sua vez, a hipertensão e oscilações na

pressão arterial são responsáveis por muitas mudanças adversas no corpo, afetando órgãos internos (por exemplo, os rins) e levando a hipertrofia do ventrículo esquerdo, remodelamento arterial forçado e mudanças na performance da parede do vaso, tornando-se uma questão importante a ser abordada experimentalmente para desvendar os mecanismos moleculares relacionados às forças hemodinâmicas envolvidos com o desenvolvimento dessas doenças cardiovasculares e suas complicações (Trojanek, 2015).

Mecanotransdução Endotelial

Todas essas mudanças sistêmicas ocorrem, pois, a célula endotelial é capaz de responder, não só à fatores químicos (como hormônios e citocinas), mas também à fatores hemodinâmicos (como já abordado, o *shear stress*, a força mecânica tangencial e paralela à parede do vaso causada pela pressão do fluxo sanguíneo) que podem desencadear uma mecanotransdução e mecanismos moleculares modificando seu microambiente para manter a homeostase do sistema circulatório (Ando & Yamamoto, 2011). Existem várias etapas da mecanotransdução relacionada ao *shear-stress*, começando com a distorção física da superfície da célula e culminando com a cascata de sinalização bioquímica (Peter F Davies, 2009). Nas últimas décadas, muitas percepções foram levantadas relacionadas com a mecanossinalização nas células endoteliais causada pelo *shear-stress*, bem como seus mecanossensores relacionados com a tensão de cisalhamento, sendo que esses sensores geralmente são uma estrutura celular primária ou uma proteína que sente uma força física mecânica, levando à uma cascata de vias de sinalizações bioquímicas (Givens & Tzima, 2016).

A resposta e adaptação da célula endotelial ao fluxo tem sido vastamente estudada e pesquisada em modelos *in vitro*, e os mais diferentes modelos de estudo já

trazem informações de que há respostas iniciais da célula endotelial, como influxo de Ca^{+2} e K^{+} , produção de óxido nítrico e de espécies reativas de oxigênio (EROS), então depois há ativação de MAP Kinases, eNOS e Akt, além da descoberta de que a tensão de cisalhamento ativa Integrinas nessas células (Givens & Tzima, 2016).

Considerando a sinalização da mecanotransdução, as cascatas intracelulares envolvem moléculas baseadas em mensageiros e proteínas de sinalização, mecanotransdutores requeridos para a condução dos sinais gerados pela tensão, que controlam, concomitantemente, funções endoteliais essenciais, como expressão gênica, proliferação, migração, morte, permeabilidade, trombogenicidade e inflamação (Givens & Tzima, 2016; Liu et al., 2015).

O endotélio é um tecido funcional integrado do sistema circulatório, que é continuamente remodelado em resposta a vários estressantes, como o tabagismo e a hipercolesterolemia, resultando em mudanças significativas na pressão arterial. Além do mais, a superfície do vaso é exposta à fluxos sanguíneos variados e embora seja sabido que o fluxo sanguíneo leva à ativação de genes mecanossensitivos em células endoteliais (Abe & Berk, 2014), há interesse na compreensão geral da sinalização capaz de conduzir essa resposta adaptativa. Nesse contexto, para manter a homeostase da parede do vaso, as células endoteliais produzem alto nível de proteínas de estresse, conhecidas como HSP (*Heat Shock Protein*), que são listadas para proteger o vaso contra danos durante este estresse hemodinâmico (Xu & Wick, 1996), uma vez que os HSPs são chaperonas capazes de prevenir danos e realizar reparo celular após lesões (Morimoto, 1993; Xu & Wick, 1996). Está claro que o entendimento da mecanossinalização em células endoteliais pode contribuir com propostas farmacológicas específicas.

Modelo *shear stress*

Para expandir as metodologias com o intuito de estudar todos esses aspectos, vários modelos experimentais *in vitro* têm sido propostos e com a finalidade de reduzir alguns vieses, alguns parâmetros são considerados para posteriormente serem adaptados às condições das metodologias *in vitro*, como àqueles propostos na fórmula para calcular o *shear-stress in vivo*, $\tau = 4\mu Q / \pi r^3$ - onde μ é a viscosidade do sangue, Q é o volume do sangue, π é a razão entre a circunferência de um círculo, r é o raio do vaso sanguíneo e τ é a intensidade do fluxo (*shear stress*) (Ando & Yamamoto, 2011) - e o valor da pressão do fluxo sanguíneo arterial fisiológico que se encontra entre 0,6 e 4 Pa (R. Sathanoori et al., 2015). Tem sido bastante útil sugerir modelos *in vitro* em células endoteliais por mimetizar o fluxo sanguíneo fisiológico e apoiar estudos preliminares para traçar um quadro importante do repertório molecular necessário em resposta ao estresse mecânico (R. Sathanoori et al., 2015).

Embora o paradigma de sinalização para a mecanotransdução com o *shear-stress* transitório tenha sido bem delineado, ainda há aspectos que precisam de mais investigação. Considerando o que foi mencionado acima e o fato de os padrões de *shear-stress* estarem associados com mudanças patofisiológicas, nós propusemos um modelo de mecanotransdução *in vitro* submetendo células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs) à diferentes forças de tensão.

Resumindo, nossos resultados mostraram um envolvimento principal da c-Src na condução da mecanotransdução na célula endotelial, forte modulações em várias vias de sinalização intracelular envolvidas com atividades de sobrevivência, proliferação, morte e outras, enquanto a HSP70 apresentou um envolvimento diferencial, talvez modulando o turnover baseado pelo proteassoma 20S e, se forem passíveis de ação medicamentosa,

talvez estas moléculas possam ser novos alvos para otimização do tratamento farmacológico.

A mecanossinalização originada quando se estabelece uma patologia como a hipertensão - uma doença multifatorial, variável e com elevada complexidade - ainda não é totalmente elucidada e, portanto, estudar a contextualização bioquímica presente nessa situação pode aprofundar nossa compreensão da fisiopatologia da hipertensão e influenciar o manejo de possíveis candidatos à biomarcadores do endotélio e à alvos terapêuticos.

2. OBJETIVOS

Partindo desse contexto, o nosso objetivo geral foi compreender os efeitos da tensão de cisalhamento em um modelo de hipertensão e oscilações de pressão em células endoteliais (HUVEC) *in vitro*, bem como desenvolver um novo modelo de estudo baseando-se em estudos prévios, como o que foi proposto por dela Paz et al. 2012, para assim especificamente avaliar o efeito dessas tensões em constituintes envolvidos com vias celulares distintas a partir do perfil de proteínas, da matriz extracelular e de expressão de genes.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Cultivo celular

Foi utilizada nesse estudo a linhagem celular HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) em triplicata, $n=3$ (passagens < 10). As células endoteliais foram cultivadas em meio de cultura RPMI (Nutricell, Campinas, SP, Brasil) suplementado com Penicilina (100 U/mL) e Estreptomicina (100 mg/mL) e 10% de soro fetal bovino, mantidas a 37°C e 5% de CO₂. As HUVECs foram cultivadas na área periférica das placas de Petri 100-mm modificadas para cultura (**Figura 3**) até semi-confluência. As placas de Petri modificadas foram feitas colando a base de placas de cultura de 60-mm no centro das placas de 100-mm usando silicone medicinal, posteriormente as mesmas foram esterilizadas utilizando luz UV por 30 minutos. Para investigar o papel da c-Src na mecanotransdução de células endoteliais, realizamos o modelo de *shear-stress* exatamente como descrito, utilizando agora meio contendo PP1 (5 µM), um conhecido inibidor de c-Src, que foi substituído a cada 24 horas, quando os grupos propostos inicialmente das células endoteliais em situação de estresse foram coletados.

Tensão de Cisalhamento (*Shear-stress*)

Monocamada confluentes de HUVECs cresceram restritamente na área periférica das placas de Petri modificadas para cultura e foram submetidas à várias forças tensionais induzidas pelo fluxo de cisalhamento orbital exercido pelo meio de cultura utilizado para tratar as células, que ao percorrer sobre as mesmas (conforme a rotação do *shaker*) mimetiza o fluxo sanguíneo dentro de um vaso, isso a 37°C na presença de CO₂ usando um agitador orbital (Scilogex, Rocky Hill, Connecticut, EUA) posicionadas dentro da incubadora de cultivo

celular, como já proposto por outros autores (Abe & Berk, 2014; dela Paz, Walshe, Leach, Saint-Geniez, & D'Amore, 2012b). É importante ressaltar que a tensão de cisalhamento em cada monocamada foi calculada aproximadamente como o *shear-stress* máximo da parede: $\tau_{max} = \alpha \sqrt{\rho \eta} (2\pi)^3$, em que τ_{max} (Pascal) é o *shear-stress*, α é o raio da rotação orbital (12 cm), ρ é a densidade do meio de cultura (937,5 kg/m³), η é a viscosidade do meio de cultura (7,5x10⁻⁴ Pa.s) e e é a frequência de rotação. Usando esta equação, uma tensão de cisalhamento de ~ 3 Pa é alcançada em uma frequência de rotação de 100 rpm, valor esse que se encontra dentro do intervalo de *shear-stress* arterial fisiológico (~1 a 4 Pa – Normotensão). A partir desse mesmo cálculo, uma rotação de 200 rpm (~9 Pa – Hipertensão) foi aplicada para potencializar o *shear-stress* e estabelecer um segundo estímulo no modelo, o modelo de hipertensão *in vitro*.

Portanto, as HUVECs foram mantidas nesse modelo por 72h, sendo submetidas primeiramente ao modelo de normotensão (durante 24h), após esse período as células estressadas de modo fisiológico/normotenso ("*Normotensive*") foram coletadas, outras placas para compor os demais grupos permaneceram no agitador, porém a rotação do agitador orbital foi elevada para o modelo de hipertensão por mais 24h, as células estressadas de modo hipertenso foram coletadas ("*Hipertensive*"), permanecendo ainda outras placas no agitador para compor o último grupo em que a rotação do agitador orbital foi retornada para o modelo de normotensão fisiológica ("*Return*") por mais 24h (**Figura 3**). As amostras de cada grupo foram coletadas e armazenadas adequadamente em *biofreezer* a -80°C para posteriormente seguir com a análise molecular.

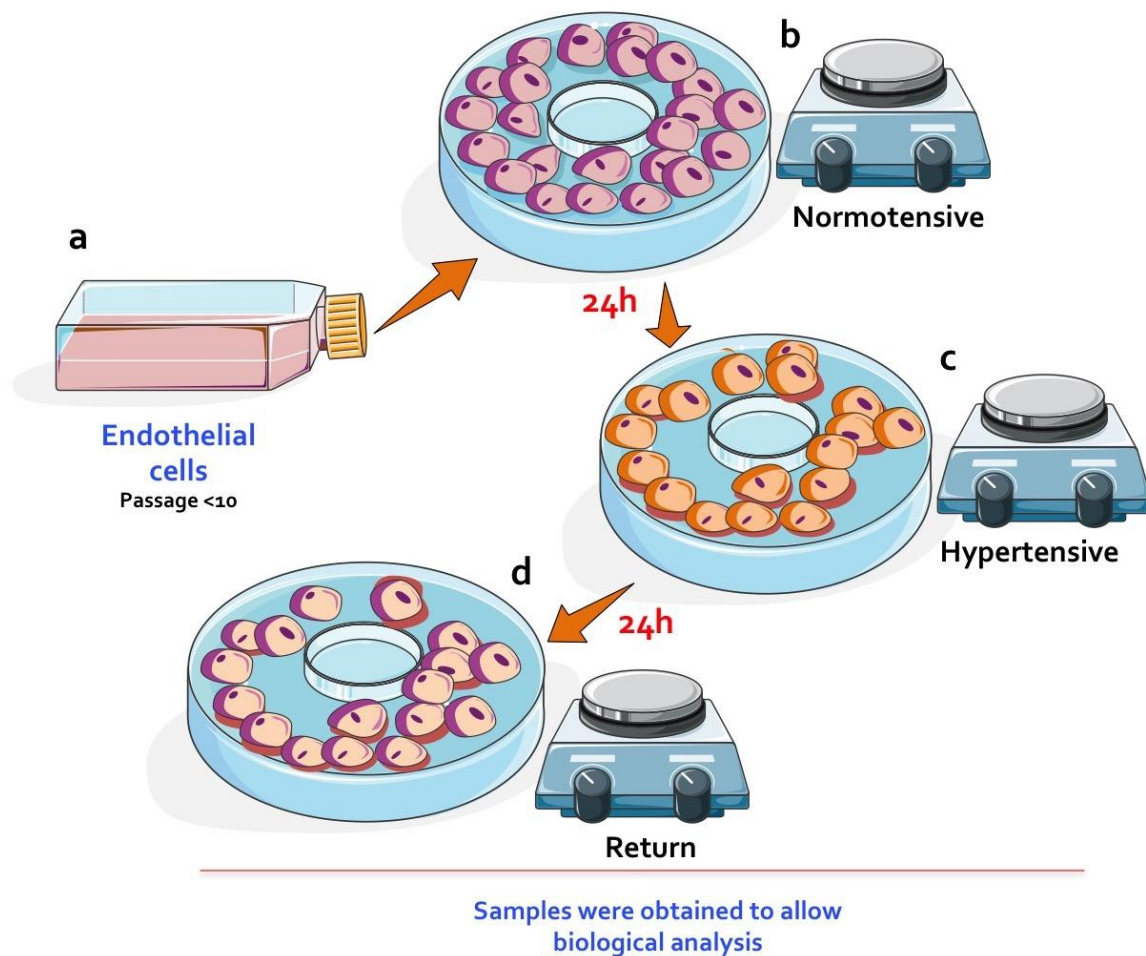


Figura 3: Um modelo *in vitro* para estudar a mecanotransdução em células endoteliais. Células Endoteliais de Veia Umbilical Humana (HUVECs; passagem < 10) (a), em triplicata, foram semeadas na periferia da placa de 100-mm modificada para cultura e submetidas ao *shear-stress* mimetizando condições fisiológicas (Normotensão; nomeado como "*Normotensive*") durante 24h (b), após esse período as amostras foram coletadas. Posteriormente, as culturas estressadas de maneira normotensa que permaneceram no modelo foram submetidas à elevada força tensional (condição hipertensa; nomeada como "*Hypertensive*") por 24h (c), então as amostras foram coletadas para análise biológica. Finalmente, as células estressadas de modo *Normo* e hipertenso que permaneceram no agitador foram retornadas para a tensão fisiológica (nomeada de "*Return*"), e mantidas por 24h (d). Para gerar condições mecânicas, nós utilizamos um agitador orbital como o esquematizado. O modelo *in vitro* explorado aqui foi proposto anteriormente por dela Paz et al. (2012), com poucas modificações.

Extração de mRNA e análise por RT-qPCR

As células submetidas ao modelo descrito foram coletadas e o RNA total apropriadamente extraído utilizando Reagente Ambion TriZOL (Life Sciences – Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) e tratadas com DNase I (Invitrogen, Carls-band, CA, USA). A síntese de cDNA foi realizada com o Kit de Transcrição Reversa cDNA de Alta Capacidade (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) de acordo com a instrução do fornecedor. O PCR tempo real foi realizado em um total de 10 µL, contendo PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix 2x (5 µL) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 0,4 µM de cada primer, 50 ng de cDNA e H₂O livre de nuclease. Os resultados foram expressos como quantidades relativas dos transcritos usando GAPDH e ACTB como gene de referência (gene *housekeeping*), usando o método do *cycle threshold* (ct). *Primers* e detalhes estão descritos na **Tabela 1**.

Tabela 1. Sequências dos *primers* de expressão e condições do ciclo qPCR.

Gene	Primer	5'-3' Sequência	Condições de Reação
AKT	Forward 1	CAGCGCGGCCCCGAAGGAC	95°C - 3s; 55°C - 8s; 72°C - 20s
	Forward 2	GGACTCCCGTTTGCGCCAGT	
	Reverse	GACGCTCACGCGCTCCTCTC	
ERK	Forward 1	AACAGGCTCTGGCCCACCCAT	95°C - 3s; 55°C - 8s; 72°C - 20s
	Forward 2	CGCCCCCTCCAAACGGCTCAA	
	Reverse	GCAGCGCCTCCCTTGCTAGA	
JNK	Forward 1	AAAGGTGGTGTGTTTGTTCAGGT	95°C - 3s; 55°C - 8s; 72°C - 20s
	Forward 2	TGGATTTATGGTCTGTGGGGTGCA	
	Reverse	TGATGATGGATGCTGAGAGCCATTG	
P38	Forward	GAGAACTGCGGTTACTTA	95°C - 3s; 55°C - 8s; 72°C - 20s
	Reverse	ATGGGTCACCAGATACACAT	
MMP2	Forward	AGCTCCCGGAAAAGATTGATG	95°C - 3s; 55°C - 8s; 72°C - 20s
	Reverse	CAGGGTGCTGGCTGAGTAGAT	
MMP9	Forward	CACGCACGACGTCTTCCA	95°C - 3s; 55°C - 8s; 72°C - 20s
	Reverse	AAGCGGTCCTGGCAGAAAT	
TIMP1	Forward	CCGCAGCGAGGAGTTTCTC	95°C - 3s; 55°C - 8s; 72°C - 20s
	Reverse	GAGCTAAGCTCAGGCTGTTCCA	
TIMP2	Forward	CGACATTTATGGCAACCCTATCA	95°C - 3s; 55°C - 8s; 72°C - 20s
	Reverse	GGGCCGTGTAGATAAACTCTATATCC	
RECK	Forward	TGCAAGCAGGCATCTTCAA	95°C - 3s; 55°C - 8s; 72°C - 20s
	Reverse	ACCGAGCCCATTTCATTTCTG	
TGFB1	Forward	CAACGAAATCTATGACAAGTTCAAGCAG	95°C - 3s; 55°C - 8s; 72°C - 20s
	Reverse	CTTCTCGGAGCTCTGATGTG	
PI3K	Forward	ACTCTCAGCAGGCAAAGACC	95°C - 3s; 55°C - 8s; 72°C - 20s
	Reverse	ATTCAAGTTCAATTGCAGAAGGAG	
COL1A1	Forward	AACCAAGGCTGCAACCTGGA	95°C - 3s; 55°C - 8s; 72°C - 20s
	Reverse	GGCTGAGTAGGGTACACGCAGG	
VEGFR1	Forward	CAGGCCAGTTTCTGCCATT	95°C - 3s; 55°C - 8s; 72°C - 20s
	Reverse	TTCCAGCTCAGCGTGGTCGTA	
CDK2	Forward	CTTTGCTGAGATGGTGAATCG	95°C - 3s; 55°C - 8s; 72°C - 20s
	Reverse	GCCTCCAGATTCTCATGC	
CDK4	Forward	CTCTAGCTTGCGGCCTG	95°C - 3s; 55°C - 8s; 72°C - 20s
	Reverse	GCAGGGATACATCTCGAGGC	
CFL1	Forward	TGTGCGGCTCCTACTAAACG	95°C - 3s; 55°C - 8s; 72°C - 20s
	Reverse	TCCTTGACCTCCTCGTAGCA	
BCI-2	Forward	AAGAGCAGACGGCTGGAAAAAGG	95°C - 3s; 55°C - 8s; 72°C - 20s
	Reverse	GGGCAAAGAAATGCAAGTGAATG	
ITGB1	Forward	GCCGCGCGGAAAAGATGAA	95°C - 3s; 55°C -

	Reverse	TGCTGTTCTTTTGCTACGGT	8s; 72°C - 20s
SRC	Forward	CAACACAGAGGGAGACTGGT	95°C - 3s; 55°C - 8s; 72°C - 20s
	Reverse	AGCTTCTTCATGACCTGGGC	
WNT	Forward	CCTTGCGCTCCCTGGATAAA	95°C - 3s; 55°C - 8s; 72°C - 20s
	Reverse	TGTTGGGTTTCATGGCAGGTT	
GSK ₃ B	Forward	GACTAAGGTCTTCCGACCCC	95°C - 3s; 55°C - 8s; 72°C - 20s
	Reverse	TTAGCATCTGACGCTGCTGT	
CTNNB1	Forward	TCCACCAGTTGCCTTTATCA	95°C - 3s; 55°C - 8s; 72°C - 20s
	Reverse	CTGAGAACTTGTCCGATGC	
LRP5	Forward	GACCCAGCCCTTTGTTTTGAC	95°C - 3s; 55°C - 8s; 72°C - 20s
	Reverse	TGTGGACGTTGATGGTATTGGT	
BAX	Forward	CATGTTTTCTGACGGCAACTT	95°C - 3s; 55°C - 8s; 72°C - 20s
	Reverse	CCAGATCACGCCATTTTAC	
NFkB1	Forward	TGCAGCAGACCAAGGAGATG	95°C - 3s; 55°C - 8s; 72°C - 20s
	Reverse	TGCATTGGGGGCTTTACTGT	
UBX1	Forward	CCTCCTTCTCGTCACACACC	95°C - 3s; 55°C - 8s; 72°C - 20s
	Reverse	GGCAGCAGAACCAGATCCTT	
PSMA1	Forward	ACTCCCGCAGACTTCTCTGT	95°C - 3s; 55°C - 8s; 72°C - 20s
	Reverse	AGGCACGCAGACCATGTTTA	
PSMA2	Forward	CCCCGTCCGTGGGAATTAAA	95°C - 3s; 55°C - 8s; 72°C - 20s
	Reverse	ATGGACGAACACCACCTGAC	
PSMA3	Forward	GACCTTTTGCTGCAGTGTG	95°C - 3s; 55°C - 8s; 72°C - 20s
	Reverse	GCACAGCCCCAATAACCGTA	
PSMB1	Forward	GAGACTTGGGGATGGAACCG	95°C - 3s; 55°C - 8s; 72°C - 20s
	Reverse	GTCTCCATGAAAACCGCTGC	
PSMB2	Forward	AGTACCTCATCGATCATGACAAG	95°C - 3s; 55°C - 8s; 72°C - 20s
	Reverse	TTCGAACACTGAAGGTTGGC	
PSMB3	Forward	TGAGTTGAAGGAAGGTCGGC	95°C - 3s; 55°C - 8s; 72°C - 20s
	Reverse	TGGACAATGACTCCCATGCC	
HSP40	Forward	GAAACCAAGGTAAGCGACGG	95°C - 3s; 55°C - 8s; 72°C - 20s
	Reverse	TGTCATGTGGATGCTGCCTT	
HSP70	Forward	CATTGTGCTCTAAAGCCGCC	95°C - 3s; 55°C - 8s; 72°C - 20s
	Reverse	AATCCTGTAGGCCACTGCAC	
HSP90	Forward	GCCCGTCGCTATATAAGGCA	95°C - 3s; 55°C - 8s; 72°C - 20s
	Reverse	TATCTGCACCAGCCTGCAAA	
GAPDH	Forward	AGGCCGGTGCTGAGTATGTC	95°C - 3s; 55°C - 8s; 72°C - 20s
	Reverse	TGCCTGCTTCCACCTTCT	
ACTB	Forward	ACAGAGCCTCGCCTTTGC	95°C - 3s; 55°C - 8s; 72°C - 20s
	Reverse	GCGGCGATATCATCATCC	
GPI	Forward	CGGAATTCCATGGTAGCTCTCTGCAGCCT	95°C - 3s; 55°C - 8s; 72°C - 20s
	Reverse	CCCTCGAGGTTATTGGACTCTGGCCTCGC	
PDHA1	Forward	TCTGGCGCTGATACCCAATG	95°C - 3s; 55°C -

	Reverse	CCTCTTGAGCACACCGACTT	8s; 72°C - 20s
PDHB	Forward	GATGAGAAGGTATTTCTGCT	95°C - 3s; 55°C - 8s; 72°C - 20s
	Reverse	GAGAAATTGAAGGTCATAAA	
CS	Forward	GATTGTGCCCAATGTCCTCT	95°C - 3s; 55°C - 8s; 72°C - 20s
	Reverse	TTCATCTCCGTCATGCCATA	
VDAC ₁	Forward	CACCACGTATGCCGATCTTG	95°C - 3s; 55°C - 8s; 72°C - 20s
	Reverse	TGCTTGAAATTCCAGTCC	
VDAC ₂	Forward	CACCTCATATGCTGACCTTGGC	95°C - 3s; 55°C - 8s; 72°C - 20s
	Reverse	AGCCTCCAACCTCCAGGGC	
VDAC ₃	Forward	CACCACACCAACGTACTGTG	95°C - 3s; 55°C - 8s; 72°C - 20s
	Reverse	AGCTTCCAGTTCAAATCC	
LDHA	Forward	TTGGTCCAGCGTAACGTGAAC	95°C - 3s; 55°C - 8s; 72°C - 20s
	Reverse	CCAGGATGTGTAGCCTTTGAG	
LDHB	Forward	AGTCAGTCTGCCAAGTCATTC	95°C - 3s; 55°C - 8s; 72°C - 20s
	Reverse	AAGTTTCCATTTTAGGGGTTCTTC	

Eletoforese e Western Blotting

As culturas de HUVECs submetidas ao modelo de hipertensão *in vitro* foram coletadas e a extração de proteínas foi obtida usando tampão de lise [50mM Tris [tris(hidroximetil) aminometano]–HCl [pH 7,4], Tween-20 a 1%, deoxicolato de sódio 0,25%, NaCl 150 mM, ácido etilenoglicol tetraacético 1 mM (EGTA), O-Vanadato 1mM, NaF 1 mM, e inibidor de protease [aprotinina 1 mg/mL, leupeptina 10 mg/mL, e 1 mM 4-(2-amino-etil)-benzolsulfonil-fluoreto-cloridrato] (de Souza Queiroz et al., 2007). A concentração de proteínas foi determinada usando o método de Lowry (Hartree, 1972) depois de clarificar por centrifugação e permanecerem por 2h no gelo. A concentração das amostras foram normalizadas adicionando um determinado volume de tampão de amostra de 2-Dodecil Sulfato de Sódio (SDS 2%), 60 mM Tris-HCl (pH 6.8), 5% de β -Mercaptoetanol, 0,01% azul de bromofenol, e 10% de glicerol, foi adicionado às amostras e fervidas por 5 minutos a 95°C.

Alíquotas das amostras (75-100 μ g/poço) foram aplicadas no gel SDS-PAGE (10%) para realizar a corrida de Eletoforese e então corar o gel com *Comassie Blue* (para identificar o fracionamento das proteínas baseado no peso molecular e fazer análise proteômica) ou então transferir as proteínas para membranas de PVDF (Millipore, USA), para realizar o Western Blotting, tais membranas foram bloqueadas com solução de bloqueio 5% (leite desnatado dissolvido em Tampão Salina Tris [TBS] com Tween-20 [0,05%]) e encubada overnight com anticorpo primário apropriado a diluição de 1:1000 a 4°C. Depois de lavadas três vezes em TBS-Tween-20 (0,05%), as membranas foram encubadas com seus respectivos anticorpos secundários, diluição 1:2000 (em ensaios de *immunoblotting*), diluídos em tampão bloqueio, durante 1h. Tecnicamente, quando foi necessário investigar mais do que uma proteína na mesma membrana, foi realizado *stripping* das membranas, como recomendado

pela Abcam (Cambridge, MA, USA), uma atenção especial para evitar contaminação com traços de β -mercaptoetanol, pois isso pode danificar a conformação dos anticorpos. Proteínas imunorreativas foram detectadas por quimiluminescência (ECL) e analisadas pela quantificação utilizando o software ImageJ.

Análise de Proteínas por LC-MS/MS

Análises das bandas de proteínas por LC-MS/MS foi realizada para determinar o conjunto de proteínas envolvidas nas diferentes forças de tensão propostas nesse estudo. As proteínas foram extraídas dos géis utilizando uma lâmina de bisturi cortando em segmentos de aproximadamente 1 mm³ e transferidas para tubos de 2,0 mL contendo 200 μ L de ácido acético a 5% (v/v) e armazenados a -4°C até o passo seguinte. Posteriormente, os segmentos de gel foram lavados no mínimo por três vezes, em uma solução contendo acetonitrila (ACN) 50% (v/v) e bicarbonato de amônio (AmBic) 25mM por 30 min. Depois, os mesmos foram desidratados duas vezes em ACN 100% por 10 min. Ao final da segunda desidratação, a ACN foi removida e o resíduo remanescente deixado evaporar em temperatura ambiente. Depois de desidratados, os spots foram submetidos à redução com DTT 20 mM em AmBic 50 mM incubados por 40 min a 56°C. O excesso de líquido foi removido e substituído por IAA (Iodoacetamida) 55 mM em AmBic 50 mM. Após 30 min no escuro, em temperatura ambiente, o líquido foi removido, os fragmentos foram lavados em AmBic 25 mM e em seguida desidratados em ACN 100%. A ACN foi descartada e o resíduo remanescente no gel foi deixado evaporar em temperatura ambiente. Para a digestão das proteínas, os fragmentos de gel foram reidratados em 15 μ L de solução contendo 150 ng de tripsina (Trypsin Gold Mass Spectrometry, Promega, Madison, WI, EUA) em AmBic 25 mM por 15

min para que a tripsina pudesse penetrar no gel. Em seguida, adicionaram-se 50 µL de AmBic 25 mM para total cobertura dos spots e incubou-se a 37°C por 14h. Ao fim de 14h, a ação da tripsina foi interrompida pela adição de 15 µL de solução bloqueadora (ACN 50% v/v e ácido fórmico 5% v/v). Os peptídeos foram eluídos da acrilamida com duas lavagens de 15 min com solução de eluição A (ACN 50% v/v e ácido fórmico 1% v/v), uma lavagem de 15 min com solução de eluição B (metanol 60% v/v e ácido fórmico 1% v/v) e mais duas lavagens com ACN 100%, a 45°C sob sonicação em banho (Ultracleaner 1600^a, Unique, Brasil) com 40 Khz de frequência fixa e potência de 30 W. A solução contendo os peptídeos extraídos foi submetida a secagem em concentrador a vácuo (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) em temperatura ambiente, por 2-3h e armazenada a -20°C até a realização do sequenciamento como descrito por Shevchenko et al. (Shevchenko, Tomas, Havlis, Olsen, & Mann, 2006). A análise dos peptídeos trípticos foi realizada no sistema nanoACQUITY UPLC (Waters, Milliford, USA) acoplado ao espectrômetro de massas Xevo Q-TOF G2 (Waters, Milliford, USA), etapa feita em colaboração.

As proteínas foram identificadas por sua homologia com proteínas no banco de dados UniProt (Universal Protein Resource); a espécie utilizada foi a série "Homo sapiens" (UniProt, 2017) (Universal Protein Resource [UniProt]).

Microscopia Confocal de Fluorescência

Para a análise de microscopia confocal de fluorescência, as células foram cultivadas sobre lamínulas de vidro introduzidas nas placas para cultura modificadas do modelo em estudo. As placas contendo as lamínulas com as células aderidas foram submetidas ao *shear-stress* conforme o método descrito, as lamínulas foram então lavadas

com PBS, fixadas em Paraformaldeído tampão fosfato (4% v/v), permanecendo desde a primeira coleta (To =Tempo inicial) até o final do modelo de *shear-stress* (72h), até que todos os grupos tivessem sido coletados, e então foram permeabilizadas em tampão fosfato contendo Triton-X 100 0,2%, Saponina 0,1% e BSA 1% a 37°C por 1h. As células foram encubadas por 60 minutos no anticorpo primário, lavadas apropriadamente com PBS e então encubadas em seus respectivos anticorpos secundários Alexa Fluor 488 (10 µg/mL, Invitrogen/*MolecularProbes*, EUA). As lamínulas contendo células marcadas com sondas foram lavadas e montadas em lâminas de vidro usando cola *Fluorosiold* com DAPI (Sigma-Aldrich Corporation, St Louis, MO, EUA) e então visualizadas em um microscópio confocal a laser invertido (Leica TCS SP5, Allendale, EUA).

Zimografia

O meio de cultura utilizado no tratamento das células foi coletado em tubos de 2,0 mL para cada grupo, em seguida foi centrifugado à 14000 rpm por 15 min e a concentração proteica determinada pelo método de Lowry (Hartree, 1972). A atividade gelatinolítica das amostras foi avaliada pelo fracionamento das metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9) aplicando as amostras com concentração normalizada com o tampão de amostra (sem β -Mercaptoetanol) em gel de poliacrilamida 12% contendo 4% de gelatina. Após o fracionamento por eletroforese, as MMPs foram renaturadas ao inserir o gel em solução aquosa de Triton X-100 (2% m/v) e incubá-lo por 18h em tampão de proteólise (Tris-CaCl₂) a 37°C. Posteriormente o gel foi corado com solução corante de Coomassie Blue R-250 0,05% por 3 h e depois descorado para aparição das bandas onde ocorreu ação

gelatinolítica, para então prosseguir com a quantificação e análise das mesmas (Lefebvre, Peeters-Joris, & Vaes, 1991) através do software ImageJ.

Análise estatística

Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM). As análises estatísticas foram realizadas por meio de análise de variância (unidirecional, ANOVA) combinada com pós-teste de correção de Bonferroni adequado, ou análise não paramétrica. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. O software utilizado foi o GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, EUA).

4. RESULTADOS

A fim de avaliar o mecanismo molecular sob mecanotransdução em células endoteliais, nós aplicamos um fluxo experimental *in vitro* submetendo culturas semi-confluentes de células endoteliais a um circuito com forças tensionais diferentes geradas por um agitador orbital (veja **Figura 3**).

Reprogramação da maquinaria molecular relacionada com sobrevivência e adesão celulares

Sinalização envolvida com sobrevivência e adesão acoplam vias importantes para sustentar a viabilidade celular. Primeiramente, foi identificado o comportamento dos genes PI3K, Akt, Integrina- β 1 e Cofilina nesse desenho experimental proposto. PI3K foi altamente expresso nas células endoteliais estressadas de modo hipertenso (*Hyper* = “Hipertensive”), quando comparada com àquelas sob condições *Normo* (“Normotensive”, o grupo controle) ($p > 0,05$); enquanto no grupo *Return* um significativo aumento na expressão desse gene foi necessário, atingindo cerca de 50 vezes quando comparado com as células do grupo *Normo* (**Figura 4a**). A distribuição de PI3K foi também avaliada utilizando a microscopia confocal (**Figura 4e**). Além disso, o gene AKT1 teve sua expressão elevada tanto no grupo *Hyper* como no *Return* (**Figura 4b**). Observamos uma redução na expressão do gene ITGB1 (Integrina- β 1) nos grupos *Hyper* e *Return* em comparação com as células em condição *Normo* (**Figura 4c**). E ainda, a expressão do gene da Cofilina (CFL1) foi significativamente reduzida em resposta ao estresse hipertenso (**Figura 4d**).

A maquinaria relacionada com adesão celular foi melhor abordada pela avaliação dos perfis de fosforilação da FAK (Figura 4m,n), RAC (Figura 4i,j) e Cofilina (Figura 4k,l). Especificamente, a fosforilação de FAK em Y397 foi significativamente reduzida tanto no grupo *Hyper* como no grupo *Return* (Figura 4f,g), concomitante com um perfil bastante similar da fosforilação de PP2A em Y307 (Figura 4m,n). A distribuição de FAK também foi validada pela análise de microscopia confocal (Figura 4h). Por sua vez, a fosforilação de Rac1 em Ser71 foi altamente modulada nas células do grupo *Hyper*, com um forte aumento nas células do grupo *Return* (Fig. 4i,j). A fosforilação da Cofilina em Ser3 foi dinamicamente modulada, sendo significativamente mais fosforilada nas células *Return* (cerca de 3 vezes) (Figura 4k,l).

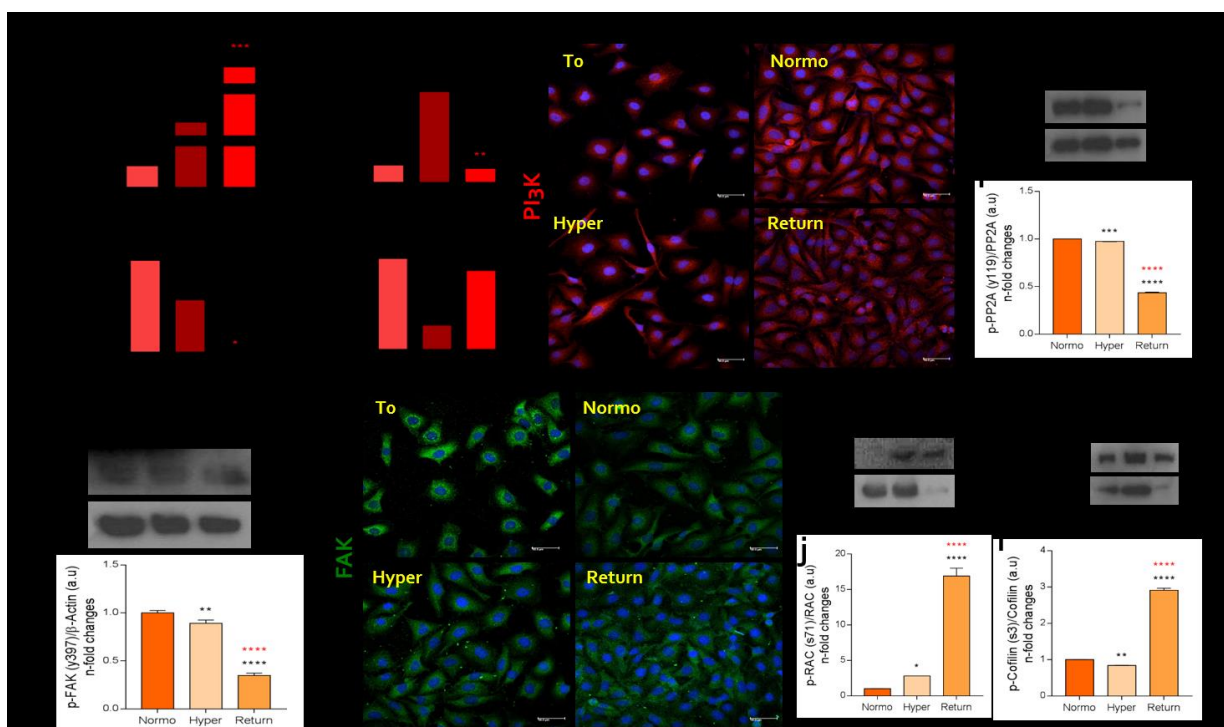


Figura 4. Rearranjo do citoesqueleto de células endoteliais e sinalização de sobrevivência são mecanismos adaptativos às diferentes forças de tensões. Primeiramente, o fenótipo das células foi avaliado medindo os transcritos de PI3K (a), AKT (b), ITGB1 (Integrina-β1) (c) e CFL1

(Cofilina) (d), e depois normalizados com o perfil mRNA do GAPDH. PI3K também foi avaliada por microscopia de imunofluorescência confocal, incluindo um grupo "To" que é o tempo inicial, antes das células serem submetidas ao circuito (e). Posteriormente, os mecanismos de adesão foram avaliados medindo a fosforilação de FAK em Y397 (f,g) e a distribuição de FAK total na célula por abordagem de imunofluorescência (h). Como FAK libera sinais para o rearranjo do citoesqueleto, nós avaliamos a fosforilação de outros constituintes da sinalização como a proteína RAC (i,j) e Cofilina (k,l). Por último, a fosforilação de PP2A, uma Ser/Thr fosfatase, também foi medida (m,n). O valor obtido para a condição de *Normo* foi considerado 1 e os valores relativos obtidos para *Hyper* ou *Return* são mostrados em *fold-changes*. As diferenças foram consideradas significativas quando *p<0.04, **p<0.001, ***p<0.0002, ****p<0.0001 quando comparado com o grupo controle (*Normo*); e *p<0.04, **p<0.001, ***p<0.0002, ****p<0.0001 quando comparado com o grupo *Hyper*.

c-Src desencadeia sinais de sobrevivência e proliferação

Como a quinase c-Src está relacionada com mecanismos de sobrevivência, governando a viabilidade de células eucarióticas, nós decidimos avaliar se estes estão envolvidos com o fenótipo hipertenso. Primeiramente, nossos dados mostraram que há um requerimento de c-Src em ambos os grupos, *Hyper* e *Return* (**Figura 5**). Embora o conteúdo de c-Src (proteína) estivesse maior nas células do grupo *Hyper* comprado aos demais (**Figura 5b,c**), as células do grupo *Return* apresentaram menor conteúdo desta quinase (**Figura 5b,c**). Além disso, o perfil de transcrição de c-Src também foi medido e, independente das condições *Hyper* e *Return*, ambos os fenótipos mostraram um significativo aumento na expressão gênica de c-Src, alcançando cerca de 60 vezes quando comparado com as culturas sob condições de *Normo* (culturas de referência fisiológicas) (**Figura 5a**).

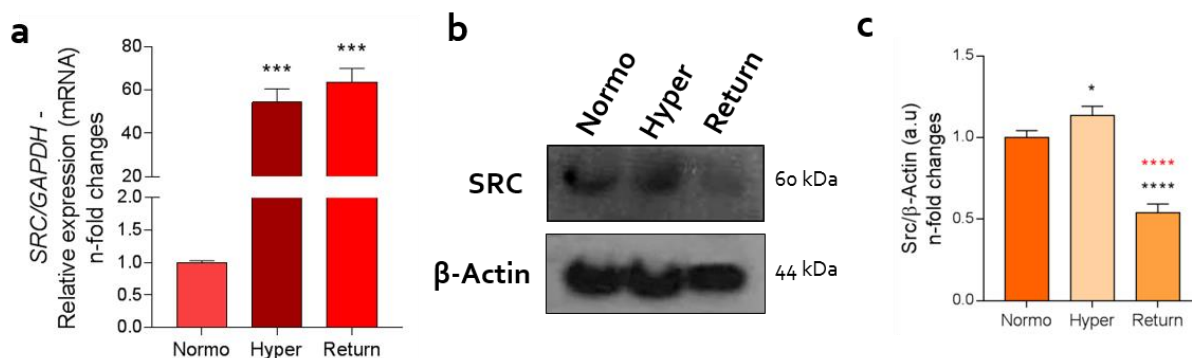


Figura 5. Mecanotransdução requer Src carreando respostas adaptativas. Afim de avaliar o envolvimento de Src, o modelo *in vitro* foi realizado e as amostras coletadas como mencionado previamente em detalhe. Primeiramente, o perfil de transcritos de Src foi medido por qPCR, e normalizados pelo GAPDH (a). Análise por Western Blot dos lisados de HUVECs para Src são mostrados (b,c). Aqui, o conteúdo de Src foi normalizado pela β-actina (b,c). Diferenças foram consideradas significantes quando * $p < 0.04$, *** $p < 0.0002$, **** $p < 0.0001$ quando comparado com o controle (Normo); e **** $p < 0.0001$ quando comparado com a condição Hyper.

Além disso, o fenótipo proliferativo foi medido avaliando os genes CDK2 e CDK4, bem como VEGFR1 e TGFβ1 (constituintes capazes de desencadear sinais de crescimento celular). Nossos resultados mostraram um significativo aumento na expressão do gene de VEGFR1 em ambas culturas Hyper e Return, atingindo cerca de 20 vezes quando comparado com as culturas Normo (**Figura 6a**), enquanto o gene TGFβ1 foi cerca de 8 vezes maior no grupo Return (**Figura 6b**), mas sem significância nas culturas Hyper, quando ambos os grupos foram comparados com o grupo controle. Surpreendentemente, ambos genes CDKs foram significativamente maiores em ambas condições Hyper e Return do que o grupo controle ($p < 0,05$) – Gene CDK2 foi cerca de 10 e 25 vezes aumentado em resposta às condições Hyper e Return, respectivamente (**Figura 6c**), enquanto o comportamento do gene CDK4 atingiu cerca de 10 vezes para ambos os grupos (quando comparado à condição controle, $p < 0,05$;

Figura 6d). Complementarmente, a coloração com DAPI nos traz um entendimento panorâmico desse propósito, uma vez que é possível identificar a quantidade de células em resposta às 4 condições avaliadas na microscopia de fluorescência nesse estudo (**Figura 6e**).

Importante observar que c-Src parece realizar um efeito bifásico na atividade do gene CDK2 considerando as condições *Hyper* e *Return* (**Figura 6f,g**), uma vez que, quando c-Src foi inibida com PP1 (inibição química), o perfil de transcritos de CDK2 foi significativamente reduzido ($p < 0,05$) na condição hipertensiva. Entretanto, quando as células estressadas de modo hipertenso foram retornadas para a condição fisiológica (*Return*), as células tratadas com PP1 apresentaram um significativo aumento na expressão de CDK2 (cerca de 40 vezes), sugerindo rotas alternativas (**Figura 6g**), mas aparentemente independente das MAPKs (**Figura 7**).

A expressão gênica de BAX, um constituinte pró-apoptótico por estresse mitocondrial, demonstrou um significativo aumento no grupo *Return* (**Figura 8b**), enquanto que o gene BCL-2, um membro anti-apoptótico, demonstrou significativo aumento no grupo *Hyper* (**Figura 8a**), além disso, com esses dois resultados um terceiro gráfico foi gerado da razão de BAX / BCL-2 (**Figura 8c**) que nos indica uma “leve tendência” de estímulo à apoptose celular, no caso em nível de expressão gênica. Nesse cenário, nós também reportamos esse efeito bifásico nos genes Cofilina (**Figura 9a,b**) e BCL-2 (**Figura 9c,d**), reforçando c-Src como papel pivô no mecanismo de sobrevivência, principalmente nas células estressadas de modo hipertenso.

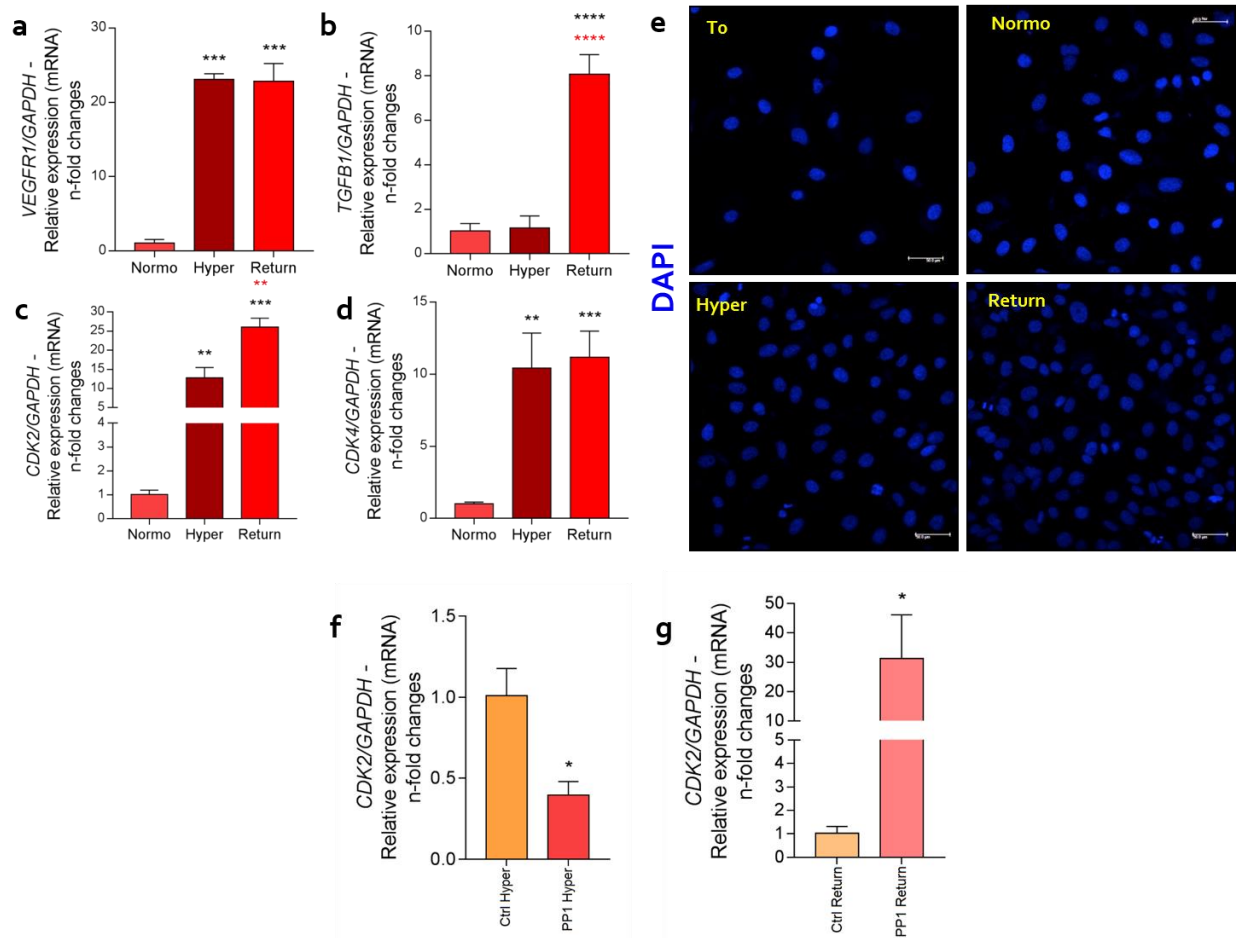


Figura 6. Src parece modular o fenótipo relacionado com proliferação em resposta ao cenário de mecanotransdução. Primeiramente, os seguintes genes relacionados à proliferação foram avaliados pela tecnologia qPCR: VEGFR1 (a), TGFβ1 (b), CDK2 (c) e CDK4 (d). Os gráficos nos trazem a diferença do perfil de transcritos normalizados pelo GAPDH. Uma estimativa do número de células é mostrada submetendo as células viáveis e aderidas à coloração de DAPI (e). Depois disso, afim de avaliar se Src está envolvida com esse fenótipo, as células foram tratadas com PP1 e submetidas igualmente ao modelo *shear-stress* desse estudo. Nossos resultados mostraram um efeito bifásico de Src, interferindo principalmente na expressão gênica de CDK2 (f,g). Diferenças foram consideradas significantes quando * $p < 0.04$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0002$, **** $p < 0.0001$ quando comparadas com o grupo controle (Normo); e ** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ quando comparada com o grupo Hyper. Nos gráficos f e g, onde analisamos o papel de Src, o tratamento com PP1 também foi considerado e a significância foi mostrada quando * $p < 0.04$.

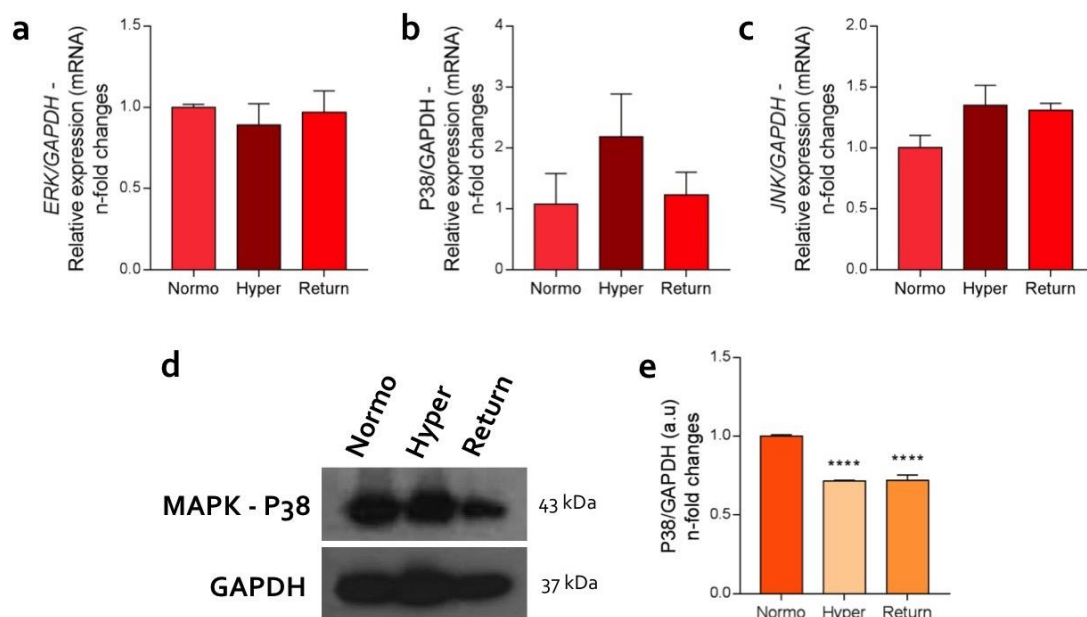


Figura 7. Membros MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinase) foram avaliados por qPCR e immunoblotting. Perfis de transcritos de MAPKs ERK (a), P38 (b) e JNK (c) foram mostrados. P38 também foi avaliado considerando o conteúdo proteico (d), normalizado pelo GAPDH (*housekeeping gene*). Diferenças foram consideradas significantes quando **** $p < 0,0001$.

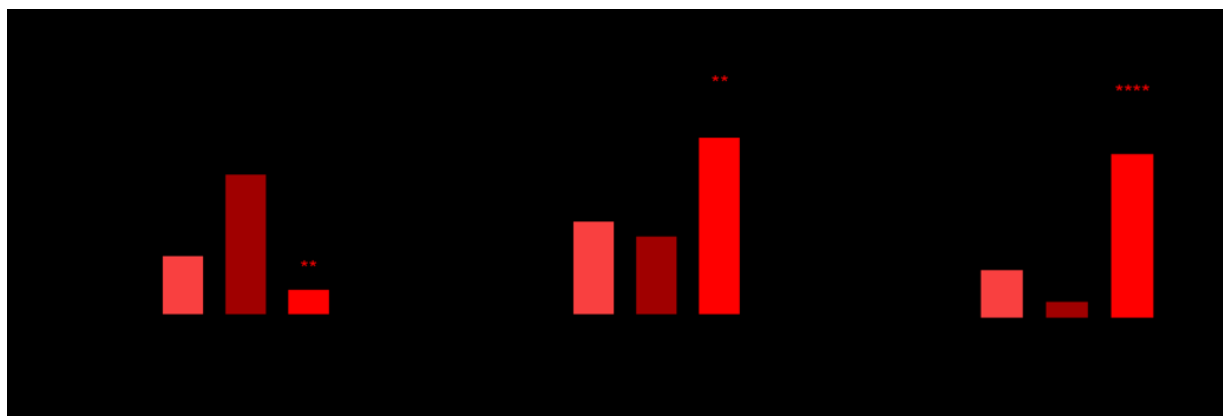


Figura 8. Perfil de expressão gênica de constituintes relacionados com sobrevivência e morte celulares. O resultado da análise por q-PCR de BCL-2 (a) e BAX (b) foram demonstrados, normalizados pelo GAPDH. A razão entre o gene BAX e BCL-2 também foi realizada considerando a expressão de ambos (c). Diferenças foram consideradas significantes quando * $p < 0,04$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0002$ quando comparadas com o grupo controle (Normo); e ** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ quando comparada com o grupo Hyper.



Figura 9. Src modula Cofilina e BCL-2 de maneira bifásica. Expressão gênica foi realizada com culturas de HUVECs tratadas ou não com PP1 (5 μ M), um inibidor da proteína c-Src. RT-qPCR mostrou um efeito bifásico da ação de Src na expressão gênica de CFL1, que aumentou em resposta à condição *Hyper* na presença de PP1 (**a**), mas um efeito oposto foi observado nas células do grupo *Return* (**b**). Essa modulação bifásica de Src na expressão gênica também foi observada no gene anti-apoptótico BCL-2 (**c,d**). Diferenças foram consideradas significantes quando $**p < 0,001$ quando comparado com os grupos controle *Hyper* e controle *Return*.

Genes relacionados com a permeabilidade mitocondrial e metabolismo energético apresentaram estímulo mecanossensível

Constituintes com papel na permeabilidade da membrana externa mitocondrial, como os genes VDAC1, VDAC2 e VDAC3 (**Figura 10a,b,c**) foram avaliados e demonstraram respostas frente aos estímulos mecânicos com um aumento na expressão de VDAC1 em ambos os grupos *Hyper* e *Return* (**Figura 10a**), enquanto que VDAC2 teve uma diminuição nos mesmos grupos (**Figura 10b**) e VDAC3 aumentou significativamente apenas nas células do grupo *Hyper* (**Figura 10c**). A mitocôndria exerce importante papel no metabolismo energético celular, tornando-se relevante avaliar esse cenário frente ao modelo proposto, algo que revelou sofrer forte modulação em seu fenótipo, diante das variações tensionais avaliadas, observadas aqui pelos genes codificantes das enzimas metabólicas Lactato-desidrogenase (**Figura 10d,e**), Fosfo-glicose-isomerase (**Figura 10f**), Citrato-sintase (**Figura**

10g) e Piruvato-desidrogenase (Figura 10h,i), onde há um significativo aumento na expressão gênica nas células do grupo hipertenso de todos estes genes e também no grupo *Return* dos genes GPI, CS e PDHA (Figura 10f,g,h), exceto o gene PDHB em que não há diferenças no grupo *Hyper* e que houve redução significativa no grupo *Return* (Figura 10i).

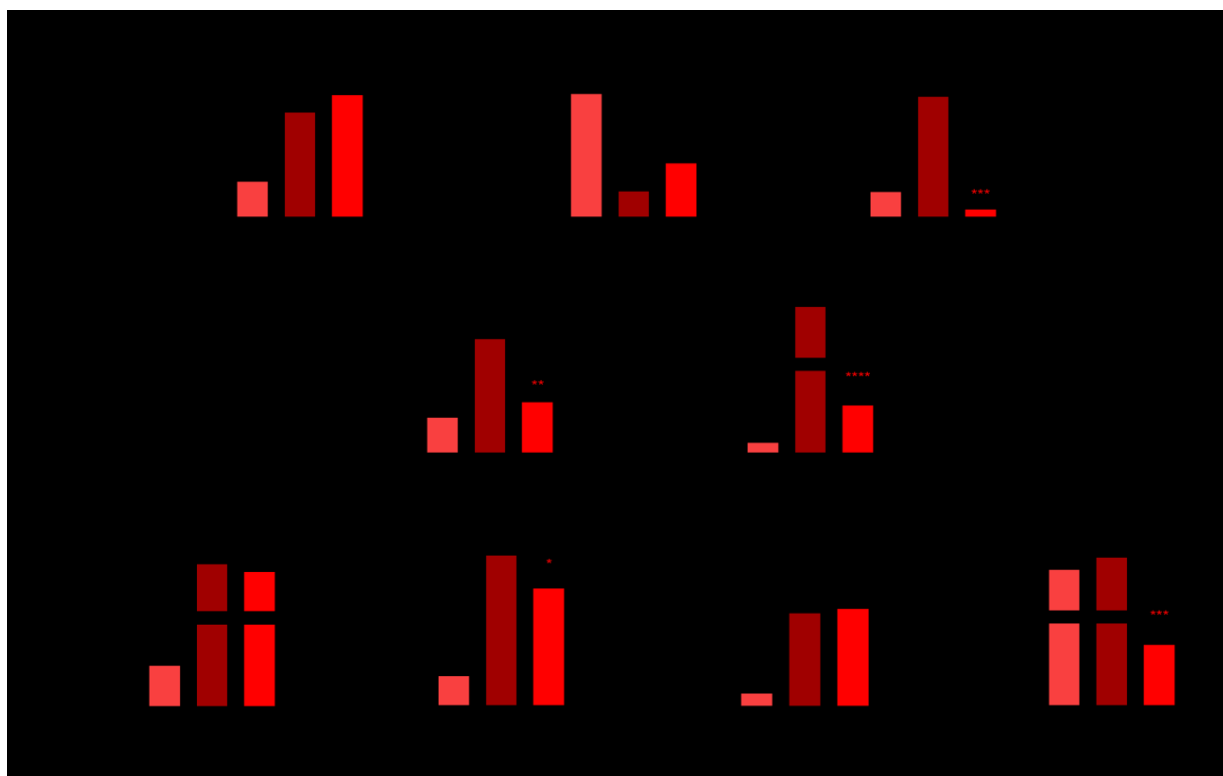


Figura 10. Modelo de hipertensão *in vitro* desencadeia resposta em genes relacionados com a permeabilidade mitocondrial e metabolismo energético. Nos ensaios de expressão gênica por RT-qPCR foram observados estímulos nos genes codificantes dos canais aniônicos dependentes de voltagem, onde VDAC1 teve um aumento nos grupos *Hyper* e *Return* (a), VDAC2 reduziu a expressão em ambos os grupos (b) e VDAC3 teve um significativo aumento apenas no grupo *Hyper* (c). Análise da expressão gênica de constituintes de vias metabólicas energéticas revelou diferenças com um aumento significativo dos transcritos nas células do grupo *Hyper* de LDHA (d) e LDHB que elevou cerca de 80 vezes (e), enquanto que o gene GPI teve um aumento bastante expressivo de cerca de 500 vezes em ambos os grupos *Hyper* e *Return* (f), assim como CS (g) e PDHA1 (h) de forma não tão expressiva, mas com significância estatística, e o gene PDHB teve diferença no grupo *Return* com uma redução (i). As diferenças foram consideradas significativas quando * $p < 0.04$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0002$, **** $p < 0.0001$ quando comparado com o grupo controle (*Normo*); e * $p < 0.04$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0002$, **** $p < 0.0001$ quando comparado com o grupo *Hyper*.

Cenário relacionado com o remodelamento da MEC (Matriz Extracelular) é rigorosamente modulado: possível papel de c-Src

Os componentes da Matriz Extracelular (MEC) são decisivos para dar suporte à adesão celular e o seu remodelamento compromete a viabilidade das células. A **Figura 11** traz um panorama do remodelamento da MEC. Importante ressaltar que o gene Colágeno - COL1A1 - foi significativamente aumentado quanto a sua expressão gênica no grupo *Hyper* enquanto que no grupo *Return* o mesmo foi significativamente diminuído (**Figura 11a**). Além do mais, nossos resultados sugerem um aumento no remodelamento da MEC nas células do grupo *Return*, já que a atividade tanto da MMP2 como MMP9 foi aumentada com significância (**Figura 11g-m**), enquanto que ambos os genes MMP2 e MMP9 tiveram sua expressão reduzida (**Figura 11b,c**), sugerindo um *feedback* negativo direto. Essas atividades elevadas das MMPs nas HUVECs do grupo *Return* parecem ser reguladas também pelo baixo envolvimento dos inibidores relacionados às MMPs endógenos, TIMPs (**Figura 11d-f**).

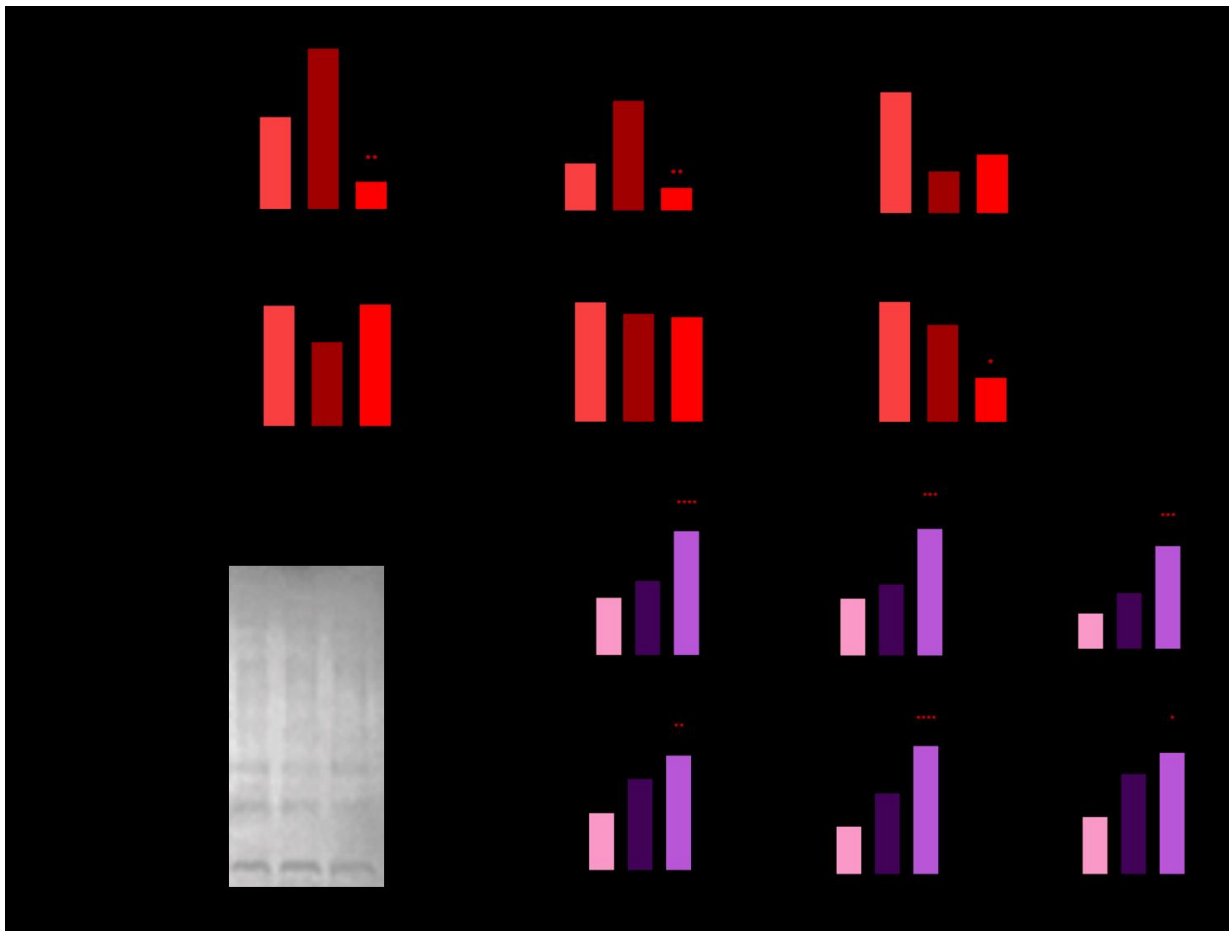


Figura 11. Remodelamento da MEC em resposta à mecanotransdução em células endoteliais. Para avaliar o remodelamento da MEC, nós investigamos a expressão de MMPs 2 (b) e 9 (c), bem como de seus inibidores TIMPs 1 (d), 2 (e) e RECK (f). Além disso, o gene colágeno também foi avaliado (a). A atividade das MMPs também foi investigada pela técnica de zimografia (g-m). As diferenças foram consideradas significantes quando * $p < 0.04$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0002$, **** $p < 0.0001$ quando comparado com o grupo controle (*Normo*); e * $p < 0.04$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0002$, **** $p < 0.0001$ quando comparado com o grupo *Hyper*.

Afim de estender o estudo no papel da c-Src neste contexto, nós tratamos as células endoteliais submetidas às condições *Hyper* e *Return* com PP1 (um conhecido inibidor de c-Src). Novamente, nossos resultados mostraram um efeito bifásico de c-Src em ambas condições experimentais – enquanto inibidor de c-Src promoveu um aumento da expressão gênica de Colágeno (Col1A1 gene) na condição hipertensa, isso foi significativamente

reduzido quando essas células retornaram para a condição fisiológica (*Return*) (**Figura 12a,b**). Embora sem diferença estatística e considerando essa mesma estratégia experimental, a transcrição gênica de MMP2 foi maior nas células onde a proteína c-Src teve sua atividade inibida e reduzida no grupo *Return* (**Figura 12c-d**). Concomitantemente, o gene MMP9 foi reduzido nas células tratadas com inibidor de c-Src no grupo *Hyper* (**Figura 12e**), enquanto que no grupo *Return* foi significativamente elevado na mesma condição (**Figura 12f**).

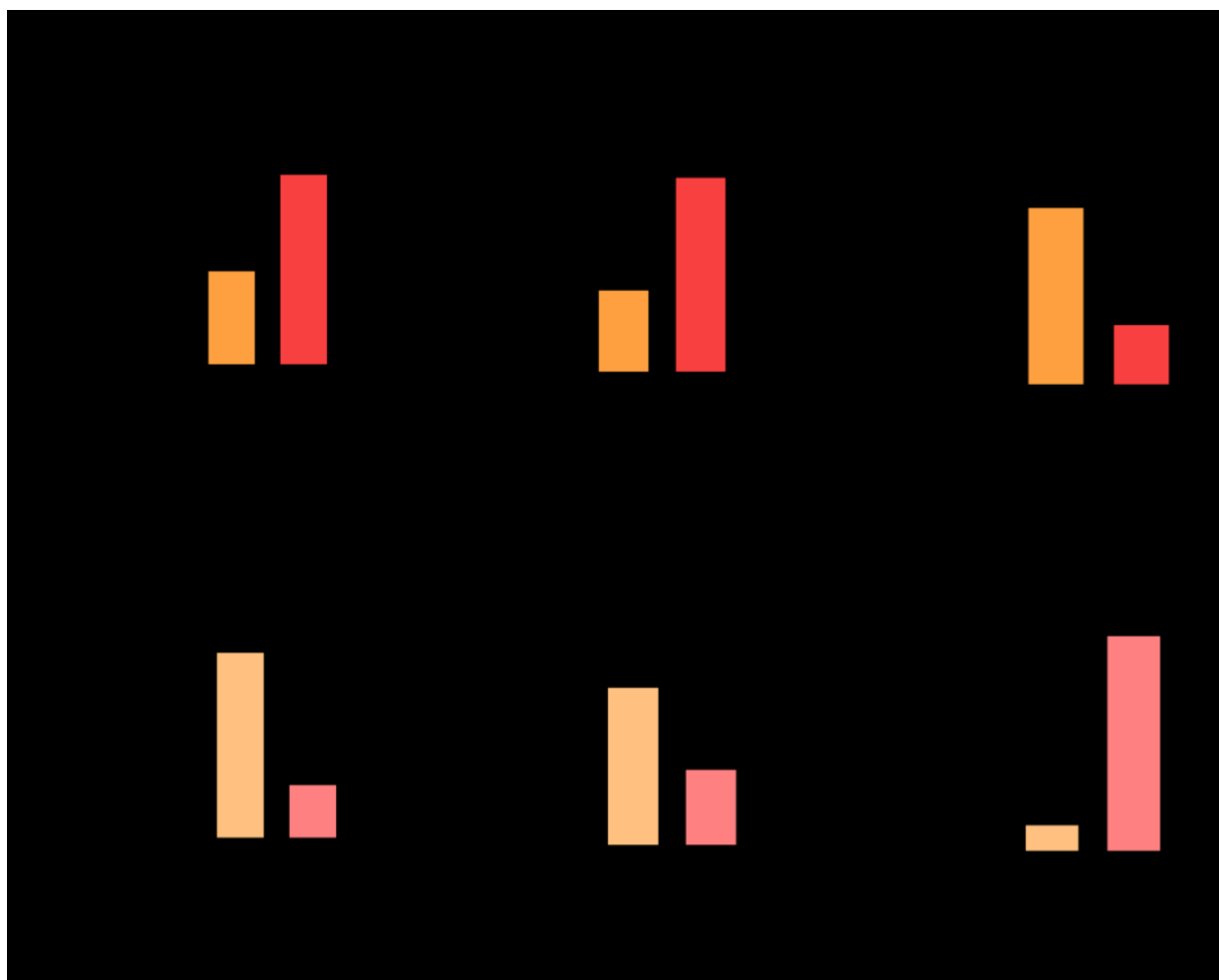


Figura 12. Duplo efeito de Src na modulação dos genes relacionados com à remodelação de MEC. Para considerar a avaliação se Src modula genes codificantes dos membros da MEC responsáveis pelo remodelamento da maquinaria, o modelo *in vitro* de mecanotransdução foi reproduzido na presença de PP1 (5μM), um inibidor de Src. A prova do efeito bifásico de Src mostrado pelo Colágeno (COL1A1) (a,b), MMP2 (c,d) e MMP9 (e,f), nos grupos *Hyper* e *Return* respectivamente. Diferenças foram consideradas significantes quando * $p < 0.04$, ** $p < 0.001$ quando comparado com o grupo controle *Hyper* e controle *Return*.

Estímulo mecânico hipertenso desencadeia aumento na expressão do gene NFkB e intensa modulação nos membros da via Wnt/ β -Catenina

Foi realizada a análise da expressão do gene NFkB e dos genes da via Wnt/ β -Catenina através da técnica de RT-qPCR. A análise quantitativa da amplificação demonstrou um significativo aumento do gene NFkB no grupo das células que foram estressadas de modo hipertenso, sendo um aumento de cerca de 50 vezes no grupo *Hyper* em relação ao controle (*Normo*) e reduzindo novamente no grupo *Return* (**Figura 13a**). Em nota, NFkB é um fator de transcrição importante em várias atividades celulares e que tem forte envolvimento com as vias de sinalização relacionadas com inflamação. Todos os genes da via de Wnt/ β -Catenina que foram conduzidos para a análise de qPCR sofreram forte modulação na sua expressão gênica nas diferentes variações de cisalhamento (**Figura 13b-e**), a enfatizar a expressão do gene Wnt que elevou cerca de 200 vezes no grupo *Hyper* (**Figura 13b**), sendo esta uma importante via de sinalização intracelular em grande parte das atividades da célula, bem como atividade de migração e de adesão celular.

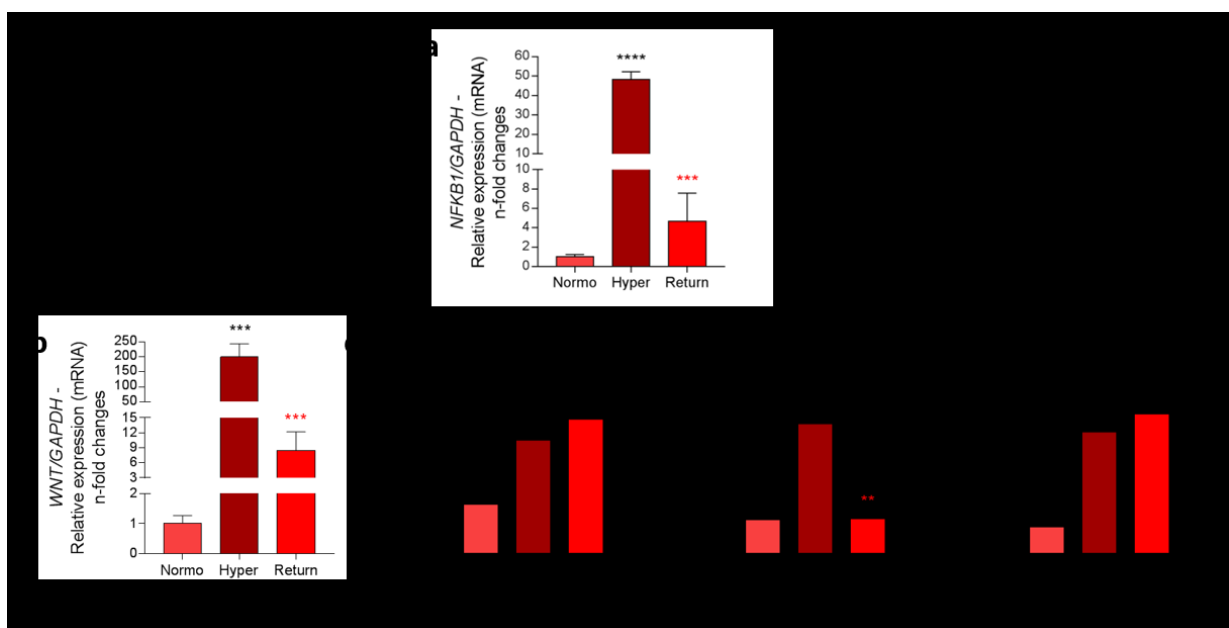


Figura 13. Análise de expressão gênica do gene NFkB e dos integrantes da via Wnt/ β -Catenina. Com o intuito de avaliar o perfil de transcrição de NFkB, nós realizamos a técnica de PCR tempo real com primer específico para NFkB, o gene de referência utilizado foi o GAPDH (*housekeeping*). O mesmo foi realizado com os genes dos integrantes da via de Wnt/ β -Catenina, Wnt (b), LRP5 (c), GSK-3 β (d) e β -Catenina (e). As diferenças foram consideradas significantes quando * $p < 0.04$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0002$, **** $p < 0.0001$ quando comparado com o grupo controle (*Normo*); e ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0002$ quando comparado com o grupo *Hyper*.

HSPs (*Heat Shock Proteins*) foram identificadas em resposta ao estresse hipertenso *in vitro*

Posteriormente, *pools* de proteínas obtidas a partir de células desafiadas nos diferentes grupos listados aqui foram submetidos ao método de SDS-PAGE para realizar o fracionamento de proteínas respeitando seu peso molecular (MW). Os géis eletroforéticos mostraram que há diferença na intensidade e quantidade de bandas, sobretudo referente à banda apresentada entre os pesos moleculares de 50-75 kDa (**Figura 14a**). Importante mencionar que foi considerado os seguintes 4 grupos: 1. To (Tempo zero): células endoteliais ressuspendidas em condições normais; 2. Normo: mimetizando a pressão do fluxo sanguíneo fisiológico; 3. Hyper: mimetizando o fluxo sanguíneo hipertenso; 4. Return: Células estressadas de modo hipertenso que foram retornadas à condição fisiológica.

Depois, afim de avaliar o conteúdo dessas bandas, as mesmas foram tecnicamente cortadas do gel e então processadas para posterior análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas e nossos resultados revelaram um forte envolvimento de chaperonas (**Tabelas 2-5**) e que foi significativamente diminuída no grupo *Return*. Complementarmente, essas descobertas foram validadas submetendo as células à microscopia de fluorescência, onde a proteína HSP70 foi marcada utilizando um anticorpo específico (**Figura 13b**).

Além disso, genes HSPs também foram avaliados medindo o seu perfil de transcrição. Nossos dados mostraram um forte envolvimento de HSP40, que foi altamente expressa (aproximadamente 150 vezes) nas células do grupo *Return* (Figura 14c), enquanto que HSPs 70 e 90 foram reduzidas (Figura 14d,e).

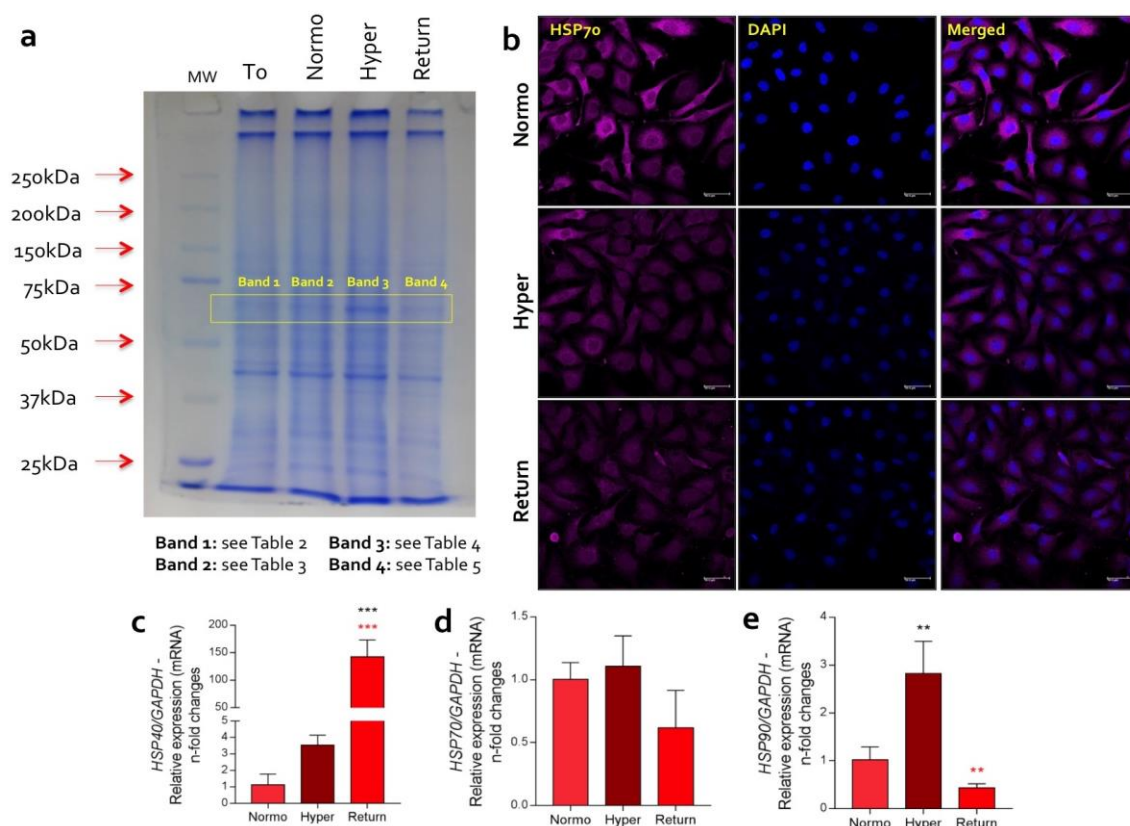


Figura 14. Mecanotransdução requer Heat Shock Proteins (HSPs). Lizados de células tensionadas foram aplicados em eletroforese no SDS-PAGE e as proteínas eletroforéticas mostraram uma diferença significativa no conteúdo de proteínas entre 50-75 kDa no grupo *Hyper* (a), sendo significativamente reduzido no grupo *Return*. Com o intuito de avaliar a constituição dessas bandas (marcadas em amarelo), as proteínas foram processadas para permitir análise proteômica (veja Tabelas 2-5), que evidenciaram forte envolvimento de HSP70. Então, esses resultados foram validados marcando com anticorpo específico para HSP70 conjugado com FITC e depois utilizando microscopia confocal para adquirir as imagens (b). Finalmente, os genes codificantes de HSP40 (c), HSP70 (d), e HSP90 (e) também foram avaliados. Diferenças significativas foram consideradas quando $**p < 0.001$, $***p < 0.0002$ quando comparado com o grupo controle (*Normo*); e $**p < 0.001$, $***p < 0.0002$ quando comparado com o grupo *Hyper*.

Tabela 2. Espectrometria de Massas com proteínas obtidas por análises de cromatografia líquida usando Células Endoteliais Humanas.

Banda Gel	Acesso	Código	Score	pI/MM teórico (kDa)	Cobertura (%)	Função Molecular
Banda 1	P111142	HSP7C_HUMAN	6045.208	5.60/66.389	33.45	Chaperona Molecular: sistema de controle de qualidade de proteína, assegurando o dobramento correto de proteínas, o re-dobramento de proteínas mal dobradas e o controle do direcionamento de proteínas para posterior degradação.
	P54652	HSP72_HUMAN	2287.984	5.55/69.977	12.99	Chaperona molecular implicada em uma ampla variedade de processos celulares, incluindo proteção do proteoma contra o estresse, dobramento e transporte de polipeptídeos recém sintetizados, ativação de proteólise de proteínas mal dobradas e a formação e dissociação de complexos proteicos.
	P34931	HS71L_HUMAN	1359.396	5.75/70.331	13.1	Chaperona molecular: proteção do proteoma contra o estresse, dobramento e transporte de polipeptídeos recém-sintetizados, ativação de proteólise de proteínas mal dobradas e formação e dissociação de complexos protéicos.
	PoDMV9	HS71B_HUMAN	1332.666	5.48/69.878	18.25	Chaperona Molecular: sistema de controle de qualidade de proteína, assegurando o dobramento correto de proteínas, o re-dobramento de proteínas mal dobradas e o controle do direcionamento de proteínas para posterior degradação.
	PoDMV8	HS71A_HUMAN	1332.666	5.48/69.878	18.25	Chaperona molecular implicada em uma ampla variedade de processos celulares, incluindo proteção do proteoma contra o estresse, dobramento e transporte de polipeptídeos recém sintetizados, ativação de proteólise de proteínas mal dobradas e a formação e dissociação de complexos proteicos.

Tabela 2. LC-MS/MS: Banda 1 = *spot* de proteínas de Células Endoteliais de Veia Umbilical Humana (*variando de 50-75kDa*); pI = ponto Isoelétrico; MM = massa molecular. **Fonte:** UniProt.

Tabela 3. Espectrometria de Massas com proteínas obtidas por análises de cromatografia líquida usando Células Endoteliais Humanas.

Banda Gel	Acesso	Código	Score	pI/MM teórico (kDa)	Cobertura (%)	Função Molecular
Banda 2	P11142	HSP7C_HUMAN	5346.696	5.37/70.723	36.69	Chaperona molecular implicada em uma ampla variedade de processos celulares, incluindo proteção do proteoma contra o estresse, dobramento e transporte de polipeptídeos recém sintetizados, ativação de proteólise de proteínas mal dobradas e a formação e dissociação de complexos proteicos.
	F8VX09	F8VX09_HUMAN	1962.9	5.10/74.530	46.67	Atividade GTPase; Ligação de GTP; Constituinte estrutural do citoesqueleto: ação de uma molécula que contribui para a integridade estrutural de uma estrutura do citoesqueleto.
	PoDMV9	HS71B_HUMAN	1790.313	5.48/69.878	22.78	Chaperona Molecular: sistema de controle de qualidade de proteína, garantindo o dobramento correto de proteínas, o re-dobramento de proteínas mal dobradas e o controle do direcionamento de proteínas para posterior degradação.
	PoDMV8	HS71B_HUMAN	1790.313	5.48/69.878	22.78	Chaperona molecular: proteção do proteoma contra o estresse, dobramento e transporte de polipeptídeos recém-sintetizados, ativação de proteólise de proteínas mal dobradas e formação e dissociação de complexos proteicos.

Tabela 3. LC-MS/MS: Banda 2= *spot* de proteínas de Células Endoteliais de Veia Umbilical Humana (*variando de 50-75kDa*); pI= ponto Isoelétrico; MM = massa molecular. **Fonte:** UniProt.

Tabela 4. Espectrometria de Massas com proteínas obtidas por análises de cromatografia líquida usando Células Endoteliais Humanas.

Banda Gel	Acesso	Código	Score	pI/MM teórico (kDa)	Cobertura (%)	Função Molecular
Banda 3	P11142	HSP7C_HUMAN	3435.469	5.37/70.723	33.75	Chaperona molecular implicada em uma ampla variedade de processos celulares, incluindo proteção do proteoma contra o estresse, dobramento e transporte de polipeptídeos recém sintetizados, ativação de proteólise de proteínas mal dobradas e a formação e dissociação de complexos proteicos.
	P54652	HSP72_HUMAN	1046.138	5.55/69.977	15.18	Chaperona Molecular: sistema de controle de qualidade de proteína, garantindo o dobramento correto de proteínas, o re-dobramento de proteínas mal dobradas e o controle do direcionamento de proteínas para posterior degradação.
	P34931	HS71L_HUMAN	1359.396	5.75/70.331	13.1	Chaperona molecular: proteção do proteoma contra o estresse, dobramento e transporte de polipeptídeos recém-sintetizados, ativação de proteólise de proteínas mal dobradas e formação e dissociação de complexos protéicos.
	PoDMV9	HS71B_HUMAN	1482.939	5.48/69.878	24.96	Chaperona Molecular: sistema de controle de qualidade de proteína, garantindo o dobramento correto de proteínas, o re-dobramento de proteínas mal dobradas e o controle do direcionamento de proteínas para posterior degradação.
	PoDMV8	HS71A_HUMAN	1482.939	5.48/69.878	24.96	Chaperona molecular: proteção do proteoma contra o estresse, dobramento e transporte de polipeptídeos recém-sintetizados, ativação de proteólise de proteínas mal dobradas e formação e dissociação de complexos protéicos.
	P34931	HS71L_HUMAN	1302.379	5.75/70.331	14.66	Chaperona Molecular: sistema de controle de qualidade de proteína, garantindo o dobramento correto de proteínas, o re-dobramento de proteínas mal dobradas e o controle do direcionamento de proteínas para posterior degradação.

Tabela 4. LC-MS/MS: Banda 3= *spot* de proteínas de Células Endoteliais de Veia Umbilical Humana (*variando de 50-75kDa*); pI= ponto Isoelétrico; MM = massa molecular. **Fonte:** UniProt.

Tabela 5. Espectrometria de Massas com proteínas obtidas por análises de cromatografia líquida usando Células Endoteliais Humanas.

Banda Gel	Acesso	Código	Score	pI/MM teórico (kDa)	Cobertura (%)	Função Molecular
Banda 4	P11142	HSP7C_HUMAN	1160.497	5.37/70.723	19.35	Chaperona Molecular: sistema de controle de qualidade de proteína, garantindo o dobramento correto de proteínas, o re-dobramento de proteínas mal dobradas e o controle do direcionamento de proteínas para posterior degradação.
	P54652	HSP72_HUMAN	1046.138	5.55/69.977	8.92	Chaperona molecular: proteção do proteoma contra o estresse, dobramento e transporte de polipeptídeos recém-sintetizados, ativação de proteólise de proteínas mal dobradas e formação e dissociação de complexos proteicos.
	PoDMV8	HS71A_HUMAN	1005.3	5.48/69.878	16.07	Chaperona Molecular: sistema de controle de qualidade de proteína, garantindo o dobramento correto de proteínas, o re-dobramento de proteínas mal dobradas e o controle do direcionamento de proteínas para posterior degradação.
	PoDMV9	HS71B_HUMAN	1003.433	5.48/69.878	14.66	Chaperona molecular: proteção do proteoma contra o estresse, dobramento e transporte de polipeptídeos recém-sintetizados, ativação de proteólise de proteínas mal dobradas e formação e dissociação de complexos proteicos.
	P17066	HSP76_HUMAN	896.5731	5.81/70.984	7.47	Chaperona Molecular: sistema de controle de qualidade de proteína, garantindo o dobramento correto de proteínas, o re-dobramento de proteínas mal dobradas e o controle do direcionamento de proteínas para posterior degradação.

Tabela 5. LC-MS/MS: Banda 4 = *spot* de proteínas de Células Endoteliais de Veia Umbilical Humana (*variando de 50-75kDa*); pI= ponto Isoelétrico; MM = massa molecular. **Fonte:** UniProt.

Genes relacionados com o proteassoma-20S foram altamente expressos e sugerem *turnover* de proteínas em resposta ao shear-stress

Por último, como a **Figura 14** mostra claramente uma significativa redução no conteúdo de proteínas no grupo *Return*, observado pela queda na intensidade das bandas no gel, então nós decidimos avaliar os genes relacionados com o Proteassoma 20S (*core* catalítico) analisando por qPCR (**Figura 15a**). Nossos dados sugerem uma forte relação com o proteassoma 20S, uma vez que o gene da ubiquitina (UBX1) alcançou significância de cerca de 50 e 30 vezes nos grupos *Hyper* e *Return*, respectivamente (**Figura 15b**). A expressão de todos os genes PSMA e PSMB foram significativamente elevados no grupo *Hyper* (**Figura 15c-h**), enquanto que PSMA₃, PSMB₁ e PSMB₃ também tiveram a expressão gênica elevada no grupo *Return* (**Figura 15e,f,h**).

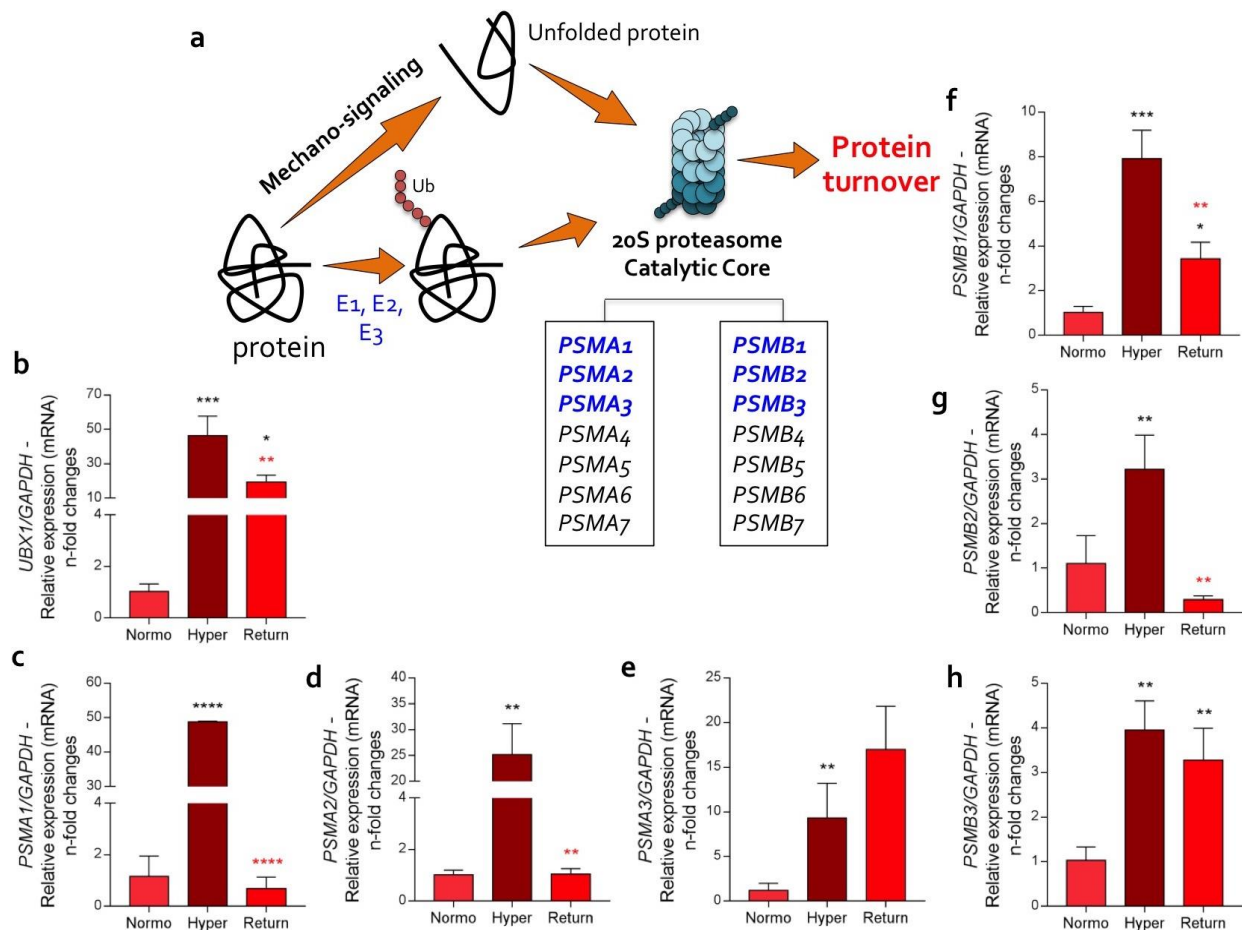


Figura 15. Genes relacionados com proteassoma 20S e um possível turnover de proteínas. Esquema da maquinaria do proteassoma 20S envolvendo ubiquitinação e os membros do core catalítico (a). Expressão gênica por RT-qPCR revelou forte relação da mecanotransdução com proteassoma 20S, uma vez que o gene *UBX1* foi significativamente elevado quanto a sua expressão no grupo *Hyper* e *Return* (b), enquanto que todos os genes da família PSMA e PSMB foram alterados em resposta a condição hipertensa (c-h), sendo que tanto o gene *PSMA3* quanto *PSMB3* foram concomitantemente aumentados no grupo *Return* (c,f). Diferenças foram consideradas significantes quando * $p < 0.04$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0002$, **** $p < 0.0001$ quando comparado com grupo o controle (*Normo*); e ** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ quando comparado com o grupo *Hyper*.

5. DISCUSSÃO

Vários modelos têm sido propostos para estudar a mecanossinalização em células endoteliais (Chatterjee & Fisher, 2014; P F Davies, 1995; P F Davies, Robotewskyj, & Griem, 1994), onde células são submetidas às forças de *shear-stress* laminar controladas (Vara et al., 2008) e as respostas podem ser monitoradas por expressão gênica (Chu & Peters, 2008; Resnick & Gimbrone, 1995) e mecanismo translacional proteico (Paniagua, Bryant, & Panza, 2001), além de cascatas de fosforilações, onde estas proteínas alcançam níveis de atividade diversos, através de modificações tridimensionais. Aqui, afim de entender uma parte do mecanismo molecular requerido em resposta a pressão sanguínea, uma metodologia *in vitro* foi proposta reproduzindo modelo proposto por de la Paz et al. (de la Paz et al. 2012) e alternativamente uma mudança incremental na tensão de cisalhamento pôde ser feita. Assim, nós submetemos células endoteliais à diferentes forças tensionais mimetizando condições fisiológicas (*Normo*) e de hipertensão (*Hyper*). Além disso, com o intuito de avaliar algumas consequências moleculares da hipertensão e das oscilações de pressão no fenótipo celular endotelial, as células que haviam sido submetidas à condição de hipertensão foram retornadas para a condição fisiológica (*Return*). Destaca-se ainda a necessidade de estabelecer modelos experimentais que mimetizem aspectos fisiológicos, servindo-nos como modelo experimental alternativo àquele praticado com o uso de animais de experimentação. Neste sentido, propomos que o modelo em análise mimetiza condições técnicas necessárias ao estudo molecular adaptativo das tensões de cisalhamento.

Nossos resultados iniciais revelaram significativo envolvimento de um mecanismo relacionado com a sinalização de sobrevivência, exigindo a via PI3K/Akt, onde c-Src realiza um papel fundamental (Zambuzzi, Milani, & Teti, 2010). O *shear-stress* é conhecido por ativar numerosas moléculas de sinalização intracelular, incluindo tirosinas quinases (em particular a

c-Src), proteínas G, PI3K, MAPKs como Erk 1/2 e JNK (Davis, Cai, Drummond, & Harrison, 2001). A proteína Src desenvolve papéis importantes em múltiplos processos celulares com desfechos fisiológicos, que incluem proliferação e sobrevivência celulares e vasoproteção (Wu et al., 2004). Adicionalmente, c-Src está associada com a angiogênese e estudos têm sido associado a regulação de diferentes funções celulares como crescimento e proliferação por meio da via de sinalização de PI3K/Akt, como reportado anteriormente. Além disso, afirma-se ainda que sua diminuição pode reduzir a proliferação, migração e a função angiogênica e, assim, atenuar a atividade de formação vascular (Yuan et al., 2017). Estudos evidenciam também que a proteína c-Src pode estar envolvida na disfunção endotelial presente na pré-eclampsia, um distúrbio específico da gravidez caracterizado principalmente pela hipertensão e uma das principais causas de morbidade e mortalidade materna, relacionando tal fato com a redução dessa proteína (Yuan et al., 2017). Afirma-se ainda seu papel crucial na atividade de eNOS (óxido nítrico sintase endotelial) responsável pela produção de óxido nítrico (NO), cuja expressão gênica e codificação proteica estão elevadas em resposta ao *shear-stress*, mecanismos dependentes da ativação de c-Src (Davis et al., 2001).

Para entender o papel da c-Src na mecanotransdução adaptativa de células endoteliais, nós usamos uma concentração sub-tóxica de PP1 (5µM), um conhecido inibidor químico da enzima c-Src. (Fernandes et al., 2018). Nossos dados claramente mostraram que c-Src é capaz de carrear vias de sinalização responsáveis pela sobrevivência e proliferação celular, principalmente considerando a ativação do gene CDK2, onde c-Src parece desempenhar papel importante de maneira bifásica, considerando tanto a condição no grupo *Hyper* como no *Return*. É cabível mencionar que alterações no *shear-stress* hemodinâmico interferem na proliferação e rotatividade da célula endotelial, pois relata-se que em situações

de fluxo perturbado e irregular, onde há aumento da pressão, ocorre um estímulo nos genes como TGF- β 1, CDK2 e CDK4, situação não encontrada quando o fluxo é regular e estável (Akimoto, Mitsumata, Sasaguri, & Yoshida, 2000), corroborando com os nossos resultados, mostrados na **Figura 6**.

Nesse contexto de mecanotransdução, nossos resultados mostraram que c-Src administra o sinal após a ativação do complexo supramolecular integrina/FAK (Geiger, Bershadsky, Pankov, & Yamada, 2001), proximais à membrana plasmática, culminando com a sinalização de PI3K/Akt e, assim, interferindo no estímulo de sobrevivência e rearranjo do citoesqueleto, aqui necessário para mecanismos de adaptação celular em processos de adesão através de alterações morfológicas. A integrina compreende uma família de proteínas diméricas capazes de estabelecer uma conexão entre a matriz extracelular (MEC) e o citoesqueleto, o que a torna uma forte candidata como mecanosensor em células endoteliais sob resposta ao *shear-stress* (apesar de sua ativação parecer ser dependente de estímulo bioquímico) além de formar novas interações com a MEC, interações essas necessárias para a ativação de importantes cascatas de sinalização, onde inclusive NFkB está envolvido (Givens & Tzima, 2016). Através de uma metodologia de interrupção experimental do fluxo, Chatterjee et al (2012) mostrou que a despolarização levou à ativação de fosfatidilinosítideo-3-quinase (PI3K) e proteína quinase B (Akt) (Chatterjee et al., 2012), reforçando a importância de sinalização de sobrevivência nessas células estressadas. Interessante que o fluxo de cisalhamento também ativa a enzima óxido nítrico sintase (eNOS) através da via PI3K/Akt, levando a um aumento na produção de óxido nítrico (NO), constituinte importante na regulação do fluxo sanguíneo e tônus vascular (Huang, Chen, & Wang, 2009). Assim, nos parece obvio considerar a enzima eNOS como importante proteína

moduladora do processo de adaptação celular ao *shear-stress*, posicionando downstream à sinalizações clássicas envolvendo Akt e Src.

Essas forças mecânicas de cisalhamento são transmitidas intracelularmente pelas integrinas, cujo sinal chega ao citoesqueleto sendo distribuídas para microfilamentos de actina, microtúbulos e filamentos intermediários (Chatterjee & Fisher, 2014). A esse respeito, um estudo anterior concluiu que a integrina $\alpha V\beta_3$ é uma das principais integrinas sensíveis ao fluxo nas células endoteliais (Jalali et al., 2001). Corroborando com esses achados, nosso estudo mostra que a mecanotransdução da célula endotelial requer intenso rearranjo do citoesqueleto através da fosforilação transiente de Rac1 (Ser71), proteína da qual estudos demonstram sua ativação espaço-temporal a partir dos 5 minutos de exposição ao *shear-stress* sendo essa ativação necessária para o alinhamento de células endoteliais na direção do fluxo (Givens & Tzima, 2016), e de Cofilina (Ser3). Nesse cenário, o rearranjo do citoesqueleto pode transmitir forças tensionais que são geradas por vários microdomínios celulares e proteínas membranares para outras partes da célula ou para a matriz extracelular e células vizinhas. Juntos, esses microdomínios são definidos como mecanossomo, contendo PECAM, VEGFR e VE-Caderina (Bidwell & Pavalko, 2010; Pavalko et al., 2003). Esses mecanossomos carregam sinais entre a matriz extracelular (MEC) e o metabolismo intracelular, modificando fenótipo destas células.

Neste cenário, nossos resultados mostraram que ocorre intenso remodelamento da MEC em resposta ao circuito de forças tensionais de *shear-stress*, destacando dependência de c-Src na modulação dos genes das MMPs. O rearranjo da MEC, através da atividade das MMPs, está relacionado com funções importantes da célula, como proliferação e migração, necessitando de vias de sinalização celulares capazes de reger o rearranjo do citoesqueleto (X. Wang & Khalil, 2018). Neste contexto ainda, sabe-se que o *shear-stress*

estimula a ativação de integrinas endoteliais que estabelecem novas conexões com a MEC (Tzima, del Pozo, Shattil, Chien, & Schwartz, 2001), atividade da qual direciona o rearranjo de proteínas de adesão focal (C. Collins & Tzima, 2013), além de que as células endoteliais quando expostas à tensão de cisalhamento ocorre um aumento da velocidade de migração (Shiu et al., 2004), provavelmente necessitando da atividade de MMPs. MMPs são produzidas por múltiplos tecidos e células, incluindo a célula endotelial, e estudos reportam seu importante papel no endotélio vascular, sobretudo na angiogênese, que requer a degradação da membrana basal vascular e remodelamento da MEC para permitir que a célula endotelial migre dentre os tecidos, alcançando diferentes tipos celulares (X. Wang & Khalil, 2018). O envolvimento das MMPs no quadro aterosclerótico também é relatado, uma vez que fora observado aumento em sua expressão na placa aterosclerótica, e a ativação de MMPs parece facilitar a aterogênese, agregação plaquetária e desestabilização de plaquetas e, por estarem envolvidas em muitos processos vasculares e biológicos, as MMPs poderiam ser biomarcadores importantes para doenças cardiovasculares (X. Wang & Khalil, 2018). A título de curiosidade os inibidores endógenos de MMPs, TIMP1 e TIMP2, já foram relatados em estudos que não demonstraram relação com a hipertensão (Basu et al., 2013).

Diante do que foi observado na modulação da expressão gênica, frente ao modelo apresentado, de constituintes anti e pró apoptóticos (BCL-2 e Bax respectivamente - **Figura 8**), que são genes que codificam proteínas atuantes na membrana externa da mitocôndria (Suhaili, Karimian, Stellato, & Lee, 2017), tornou-se relevante avaliar como se portavam genes codificantes de constituintes estruturais com papel na permeabilidade da membrana externa mitocondrial, como os genes VDAC1, VDAC2 e VDAC3 (**Figura 10a,b,c**). Por sua vez, BAX pode interagir e induzir a abertura de canais VDACs aumentando a permeabilidade da membrana externa da mitocôndria (Shi et al., 2003), os genes desses

canais aniônicos dependentes de voltagem também demonstraram responder ao estímulo mecânico do fluxo de cisalhamento no modelo apresentado, sendo que quando abertos os mesmos desencadeiam a liberação de produtos mitocondriais e EROS (espécies reativas de oxigênio) que podem causar estresse oxidativo e que a longo prazo está relacionado com inflamação crônica (Fang, Maldonado, States, & States, 2018). As mitocôndrias têm papel crítico no estresse oxidativo e destaca-se que a sobrevivência das células endoteliais pode ser afetada pela abertura destes canais de transição de permeabilidade mitocondrial ou pelas vias mitocondriais de apoptose (Davidson & Duchon, 2007).

Somado ao que foi encontrado, como a mitocôndria exerce papel crucial no metabolismo energético de muitas células, tornou-se interessante avaliar esse parâmetro frente aos mecanismos de adaptação celular em resposta ao modelo de hipertensão *in vitro*, avaliando assim os genes envolvidos com as vias metabólicas intracelulares, e surpreendentemente todos os genes dessas vias que foram avaliados quanto a sua expressão por RT-qPCR sofreram alguma modulação. Pôde-se observar um aumento significativo no gene codificante da enzima Lactato-desidrogenase (cerca de 80 vezes no grupo *Hyper*), resultado que pode corroborar com a informação de que o endotélio obtém grande parte da sua energia, no metabolismo da glicose, por meio da via glicolítica anaeróbica (Davidson & Duchon, 2007), e que o papel principal da mitocôndria nas células endoteliais está intimamente ligado com a formação de NO e não com a geração de ATP (Quintero, Colombo, Godfrey, & Moncada, 2006).

A importância de se analisar o comportamento das mitocôndrias e do metabolismo energético nas células endoteliais, frente as doenças cardiovasculares, tem base na contribuição destes para a fisiopatologia endotelial, por exemplo, em relação a formação de NO e EROS, regulação da dinâmica da sinalização de cálcio intracelular, além

do papel das mitocôndrias das células endoteliais como sensores dos níveis de oxigênio local que passam a desencadear uma comunicação parácrina desta informação com os cardiomiócitos, bem como modular a resposta vasodilatadora (mediada pelo NO já comentado aqui) (Davidson & Duchon, 2007).

Em áreas de fluxo normal, conhecido como fluxo contínuo laminar, cascatas de sinalização de cisalhamento culminam com a redução na expressão de NFkB, seguido de transcrição de genes chamados de “ateroprotetores” dependentes de Erk5 (Hahn & Schwartz, 2009; Parmar et al., 2006), porém em áreas de fluxo conturbado, NFkB e outras sinalizações inflamatórias são aumentadas, sendo que a inflamação endotelial a longo prazo estimula a expressão de moléculas de adesão inflamatória desencadeando recrutamento de monócitos para o endotélio inflamado, iniciando a aterogênese (formação de placa aterosclerótica) (Chatzizisis et al., 2007).

Importante, já está bem relacionado à associação de HSPs (*Heat Shock Proteins*) com hipertensão transiente (Molvarec et al., 2006). Embora ambas HSP60 e HSP70 tenham sido encontradas no plasma de indivíduos saudáveis (Lewthwaite, Owen, Coates, Henderson, & Steptoe, 2002; Pockley, Bulmer, Hanks, & Wright, 1999; Pockley, Shepherd, & Corton, 1998), estas têm sido relacionadas também com pré-eclampsia e pré-eclâmpsia sobreposta (Molvarec et al., 2006). Como esperado, a análise proteômica revelou um forte envolvimento de HSP70 no nosso modelo de mecanotransdução, sendo isso maior quando considerando a condição de hipertensão do que outras condições. Isso corrobora com outros estudos, onde se tem realizado pesquisas para determinar o papel de HSP70 durante a patogênese da hipertensão (Xu, Li, Holbrook, & Udelsman, 1995). A maioria dos nossos conhecimentos sobre o papel da HSP70 vem de metodologias *in vitro*. Na vasculatura, a HSP70 desempenha papéis gerais, como a assistência no enovelamento de proteínas e

também a proliferação celular, durante a fase de síntese do ciclo celular (Morimoto, 1993; Sorger, 1991). Portanto, é possível que HSP70 contribua com o *status* proliferativo otimizando a ação de c-Src, como já discutido antes, sendo assim um importante mecanismo de proteção à estressores ambientais, como as forças tensionais. Aqui, a elevada expressão do gene HSP70 é um parâmetro adequado para afirmar sua validação como modelo *in vitro* para estudar a mecanotransdução de células endoteliais.

Mesmo com este avanço destacando o envolvimento de HSPs em resposta à mecanotransdução de sinais, pouco se sabe sobre o comportamento de HSP70 como um mecanotransdutor. Embora HSP70 seja altamente expressa em resposta à condição de hipertensão, seu conteúdo foi reduzido significativamente quando as células que haviam sido estressadas de modo hipertenso voltaram para a condição fisiológica (grupo *Return*), algo observado no conteúdo como um todo pela intensidade das bandas do grupo *Return* (**Figura 13a**). De modo geral, estas afirmações nos levaram a sugerir uma atividade potencial do proteassoma na modulação do *turnover* da HSP70. Pesquisadores demonstraram que o *shear-stress* induz a ativação da eNOS na célula endotelial, enzima que sintetiza o NO em resposta à intensidade do fluxo (Paniagua et al., 2001), o NO por sua vez, pode interagir com um resíduo de Cisteína susceptível, resultando em uma S-nitrosilação que então modula a sinalização intracelular e atividade enzimática (Huang et al., 2009). Interessante que dentre as proteínas que sofrem S-nitrosilação na célula endotelial sob fluxo de cisalhamento se encontra a HSP70 (Huang et al., 2009). Ainda não se sabe se essa modulação pós-traducional, S-nitrosilação, de HSP70 exerce um efeito protetor sobre as células endoteliais. Porém esses aspectos aproximam a relação do papel da HSP70 sobre o sistema cardiovascular, ainda mais ao considerar a afirmação de que HSP70 protege o miocárdio da lesão isquêmica (Huang et al., 2009).

De fato, nós mostramos nesse estudo o forte envolvimento de genes relacionados com o proteassoma 20S (*core* catalítico) nesse fenótipo de mecanoestresse e esses dados sugerem o envolvimento desses genes no direcionamento do *turnover* de proteínas exigido pelo fenótipo de mecanoestresse (Latham, Sekhar, & Kay, 2014). Vale notar que, em células eucarióticas, proteassomas são complexos de proteases altamente conservados e eliminam proteínas indesejadas que são marcadas por cadeias de poli-ubiquitina para degradação (Ben-Nissan & Sharon, 2014; Gu & Enenkel, 2014; Kunjappu & Hochstrasser, 2014). Considerando HSPs como chaperonas importantes capazes de garantir o correto enovelamento de proteínas (Clerico, Tilitsky, Meng, & Gierasch, 2015; Mattoo & Goloubinoff, 2014; Saibil, 2013), este *turnover* proposto deve ser estritamente regulado no metabolismo celular endotelial. Levando esses resultados em consideração, uma limitação deste estudo não foi considerar um ensaio funcional para melhor concluir sobre a eficiência do proteassoma no quadro de mecanotransdução.

6. CONSTATAÇÕES

1. O *shear-stress* e suas variações modulam a reprogramação da maquinaria relacionada com sobrevivência e adesão;
2. Pôde-se observar um forte envolvimento da proteína c-Src em regência à sinais de sobrevivência e proliferação;
3. Genes envolvidos com a permeabilidade mitocondrial, bem como os envolvidos com metabolismo energético, respondem diferentemente aos estímulos mecânicos;
4. Nota-se que no cenário relacionado com o remodelamento da MEC ocorre uma rigorosa modulação de seus componentes com um possível papel de c-Src kinase;
5. Os genes Wnt, β -Catenina e NFkB são mecanossensíveis e potenciais biomarcadores do processo;
6. HSPs (*Heat Shock Proteins*) respondem ao estresse hipertenso *in vitro*;
7. No modelo *in vitro* proposto, os genes relacionados com o proteassoma-20S são altamente expressos e sugerem *turnover* de proteínas.

7. CONCLUSÃO

Embora a contextualização bioquímica da hipertensão e outras doenças cardiovasculares seja um grande desafio a ser elucidado e terapeuticamente modulado, vários estudos têm feito contribuições positivas, trazendo descobertas que colaboram para um melhor entendimento da doença, sobretudo no âmbito molecular. Neste contexto, nossos resultados mostram que a adaptação da célula endotelial ao circuito tensional de cisalhamento requer mecanismos intracelulares importantes como a prevalência de vias de sobrevivência e *turnover* de proteínas, onde chaperonas e Src parecem desenvolver papéis fundamentais. Em suma, nossos resultados pavimentam novas compreensões e esclarecem parte da sinalização celular responsável pela mecanossensibilidade nas células endoteliais, além de trazer uma possível validação de uma nova metodologia de estudo sobre o endotélio e as doenças cardiovasculares.

9. REFERÊNCIAS:

- Abe, J., & Berk, B. C. (2014). Novel mechanisms of endothelial mechanotransduction. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 34(11), 2378–2386. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.303428>
- Akimoto, S., Mitsumata, M., Sasaguri, T., & Yoshida, Y. (2000). Laminar shear stress inhibits vascular endothelial cell proliferation by inducing cyclin-dependent kinase inhibitor p21(Sdi1/Cip1/Waf1). *Circulation Research*, 86(2), 185–190.
- Ando, J., & Yamamoto, K. (2011). Effects of shear stress and stretch on endothelial function. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(5), 1389–1403. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3361>
- Basu, R., Lee, J., Morton, J. S., Takawale, A., Fan, D., Kandalam, V., ... Kassiri, Z. (2013). TIMP3 is the primary TIMP to regulate agonist-induced vascular remodelling and hypertension. *Cardiovascular Research*, 98(3), 360–371. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvt067>
- Ben-Nissan, G., & Sharon, M. (2014). Regulating the 20S proteasome ubiquitin-independent degradation pathway. *Biomolecules*, 4(3), 862–884. <https://doi.org/10.3390/biom4030862>
- Bidwell, J. P., & Pavalko, F. M. (2010). The Load-Bearing Mechanosome Revisited. *Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism*, 8(4), 213–223. <https://doi.org/10.1007/s12018-010-9075-1>
- Chatterjee, S., Browning, E. A., Hong, N., DeBolt, K., Sorokina, E. M., Liu, W., ... Fisher, A. B. (2012). Membrane depolarization is the trigger for PI3K/Akt activation and leads to the generation of ROS. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 302(1), H105–114. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00298.2011>
- Chatterjee, S., & Fisher, A. B. (2014). Mechanotransduction in the endothelium: role of membrane proteins and reactive oxygen species in sensing, transduction, and transmission of the signal with altered blood flow. *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(6), 899–913. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5624>
- Chatzizisis, Y. S., Coskun, A. U., Jonas, M., Edelman, E. R., Feldman, C. L., & Stone, P. H. (2007). Role of endothelial shear stress in the natural history of coronary atherosclerosis and vascular remodeling: molecular, cellular, and vascular behavior. *Journal of the American College of Cardiology*, 49(25), 2379–2393. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2007.02.059>
- Chiu, J.-J., & Chien, S. (2011). Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives. *Physiological Reviews*, 91(1), 327–387. <https://doi.org/10.1152/physrev.00047.2009>
- Chu, T. J., & Peters, D. G. (2008). Serial analysis of the vascular endothelial transcriptome under static and shear stress conditions. *Physiological Genomics*, 34(2), 185–192. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.90201.2008>
- Clerico, E. M., Tilitsky, J. M., Meng, W., & Gierasch, L. M. (2015). How hsp70 molecular machines interact with their substrates to mediate diverse physiological functions. *Journal of Molecular Biology*, 427(7), 1575–1588. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.02.004>
- Collins, C., & Tzima, E. (2013). RhoA goes GLOBAL. *Small GTPases*, 4(2), 123–126. <https://doi.org/10.4161/sgtp.24190>
- Collins, T., & Cybulsky, M. I. (2001). NF-κB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *Journal of Clinical Investigation*, 107(3), 255–264. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC199202/>
- Currie, G., & Delles, C. (2017). The Future of “Omics” in Hypertension. *Canadian Journal of Cardiology*, 33(5), 601–610. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2016.11.023>
- Davidson, S. M., & Duchon, M. R. (2007). Endothelial mitochondria: contributing to vascular function and disease. *Circulation Research*, 100(8), 1128–1141. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000261970.18328.1d>
- Davies, P. F. (1995). Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiological Reviews*, 75(3), 519–560. <https://doi.org/10.1152/physrev.1995.75.3.519>
- Davies, P. F. (2009). Hemodynamic shear stress and the endothelium in cardiovascular

- pathophysiology. *Nature Clinical Practice. Cardiovascular Medicine*, 6(1), 16–26. <https://doi.org/10.1038/ncpcardio1397>
- Davies, P. F., Robotewskyj, A., & Griem, M. L. (1994). Quantitative studies of endothelial cell adhesion. Directional remodeling of focal adhesion sites in response to flow forces. *The Journal of Clinical Investigation*, 93(5), 2031–2038. <https://doi.org/10.1172/JCI117197>
- Davis, M. E., Cai, H., Drummond, G. R., & Harrison, D. G. (2001). Shear stress regulates endothelial nitric oxide synthase expression through c-Src by divergent signaling pathways. *Circulation Research*, 89(11), 1073–1080. <https://doi.org/10.1161/hh2301.100806>
- de Souza Queiroz, K. C., Zambuzzi, W. F., Santos de Souza, A. C., da Silva, R. A., Machado, D., Justo, G. Z., ... Ferreira, C. V. (2007). A possible anti-proliferative and anti-metastatic effect of irradiated riboflavin in solid tumours. *Cancer Letters*, 258(1), 126–134. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2007.08.024>
- dela Paz, N. G., Walshe, T. E., Leach, L. L., Saint-Geniez, M., & D'Amore, P. A. (2012a). Role of shear-stress-induced VEGF expression in endothelial cell survival. *Journal of Cell Science*, 125(Pt 4), 831–843. <https://doi.org/10.1242/jcs.084301>
- dela Paz, N. G., Walshe, T. E., Leach, L. L., Saint-Geniez, M., & D'Amore, P. A. (2012b). Role of shear-stress-induced VEGF expression in endothelial cell survival. *Journal of Cell Science*, 125(4), 831–843. <https://doi.org/10.1242/jcs.084301>
- Ettehad, D., Emdin, C. A., Kiran, A., Anderson, S. G., Callender, T., Emberson, J., ... Rahimi, K. (2016). Blood pressure lowering for prevention of cardiovascular disease and death: A systematic review and meta-analysis. *The Lancet*, 387(10022), 957–967. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01225-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01225-8)
- Fang, D., Maldonado, E. N., States, U., & States, U. (2018). VDAC Regulation: A Mitochondrial Target to Stop Cell Proliferation. *Advances in Cancer Research*, 1–25. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2018.02.002>
- Ferdinand, K. C., & Nasser, S. A. (2017). Management of Essential Hypertension. *Cardiology Clinics*, 35(2), 231–246. <https://doi.org/10.1016/j.ccl.2016.12.005>
- Fernandes, C. J. C., Bezerra, F., Ferreira, M. R., Andrade, A. F. C., Pinto, T. S., & Zambuzzi, W. F. (2018). Nano hydroxyapatite-blasted titanium surface creates a biointerface able to govern Src-dependent osteoblast metabolism as prerequisite to ECM remodeling. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 163, 321–328. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.12.049>
- Geiger, B., Bershadsky, A., Pankov, R., & Yamada, K. M. (2001). Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2(11), 793–805. <https://doi.org/10.1038/35099066>
- Givens, C., & Tzima, E. (2016). Endothelial Mechanosignaling: Does One Sensor Fit All? *Antioxidants & Redox Signaling*, 25(7), 373–388. <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6493>
- Gu, Z. C., & Enenkel, C. (2014). Proteasome assembly. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 71(24), 4729–4745. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1699-8>
- Hahn, C., & Schwartz, M. A. (2009). Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(1), 53–62.
- Hartree, E. F. (1972). Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry*, 48(2), 422–427.
- Huang, B., Chen, S. C., & Wang, D. L. (2009). Shear flow increases S-nitrosylation of proteins in endothelial cells. *Cardiovascular Research*, 83(3), 536–546. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvp154>
- Jalali, S., del Pozo, M. A., Chen, K., Miao, H., Li, Y., Schwartz, M. A., ... Chien, S. (2001). Integrin-mediated mechanotransduction requires its dynamic interaction with specific extracellular matrix (ECM) ligands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(3), 1042–1046. <https://doi.org/10.1073/pnas.031562998>
- James, P. A., Oparil, S., Carter, B. L., Cushman, W. C., Dennison-Himmelfarb, C., Handler, J., ... Ortiz, E. (2014). 2014 Evidence-Based Guideline for the Management of High Blood Pressure in Adults. *Jama*, 311(5), 507. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.284427>
- Kunjappu, M. J., & Hochstrasser, M. (2014). Assembly of the 20S proteasome. *Biochimica et*

- Biophysica Acta*, 1843(1), 2–12. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.03.008>
- Latham, M. P., Sekhar, A., & Kay, L. E. (2014). Understanding the mechanism of proteasome 20S core particle gating. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(15), 5532–5537. <https://doi.org/10.1073/pnas.1322079111>
- Lefebvre, V., Peeters-Joris, C., & Vaes, G. (1991). Production of gelatin-degrading matrix metalloproteinases ('type IV collagenases') and inhibitors by articular chondrocytes during their dedifferentiation by serial subcultures and under stimulation by interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1094(1), 8–18.
- Lewthwaite, J., Owen, N., Coates, A., Henderson, B., & Steptoe, A. (2002). Circulating human heat shock protein 60 in the plasma of British civil servants: relationship to physiological and psychosocial stress. *Circulation*, 106(2), 196–201.
- Liu, J., Bi, X., Chen, T., Zhang, Q., Wang, S.-X., Chiu, J.-J., ... Jiang, F. (2015). Shear stress regulates endothelial cell autophagy via redox regulation and Sirt1 expression. *Cell Death & Disease*, 6, e1827. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.193>
- Mattoo, R. U. H., & Goloubinoff, P. (2014). Molecular chaperones are nanomachines that catalytically unfold misfolded and alternatively folded proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 71(17), 3311–3325. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1627-y>
- Mentzer, S. J., & Konerding, M. A. (2014). Intussusceptive angiogenesis: expansion and remodeling of microvascular networks. *Angiogenesis*, 17(3), 499–509. <https://doi.org/10.1007/s10456-014-9428-3>
- Molvarec, A., Prohaszka, Z., Nagy, B., Szalay, J., Fust, G., Karadi, I., & Rigo, J. J. (2006). Association of elevated serum heat-shock protein 70 concentration with transient hypertension of pregnancy, preeclampsia and superimposed preeclampsia: a case-control study. *Journal of Human Hypertension*, 20(10), 780–786. <https://doi.org/10.1038/sj.jhh.1002060>
- Morimoto, R. I. (1993). Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science (New York, N.Y.)*, 259(5100), 1409–1410.
- National High Blood Pressure Education Program. The seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. (2004). Retrieved February 18, 2018, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9630/>
- Paniagua, O. A., Bryant, M. B., & Panza, J. A. (2001). Role of endothelial nitric oxide in shear stress-induced vasodilation of human microvasculature: diminished activity in hypertensive and hypercholesterolemic patients. *Circulation*, 103(13), 1752–1758.
- Parmar, K. M., Larman, H. B., Dai, G., Zhang, Y., Wang, E. T., Moorthy, S. N., ... Garcia-Cardena, G. (2006). Integration of flow-dependent endothelial phenotypes by Kruppel-like factor 2. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(1), 49–58. <https://doi.org/10.1172/JCI124787>
- Pavalko, F. M., Norvell, S. M., Burr, D. B., Turner, C. H., Duncan, R. L., & Bidwell, J. P. (2003). A model for mechanotransduction in bone cells: the load-bearing mechanosomes. *Journal of Cellular Biochemistry*, 88(1), 104–112. <https://doi.org/10.1002/jcb.10284>
- Pockley, A. G., Bulmer, J., Hanks, B. M., & Wright, B. H. (1999). Identification of human heat shock protein 60 (Hsp60) and anti-Hsp60 antibodies in the peripheral circulation of normal individuals. *Cell Stress & Chaperones*, 4(1), 29–35. <https://doi.org/10.1054/csac.1998.0121>
- Pockley, A. G., Shepherd, J., & Corton, J. M. (1998). Detection of heat shock protein 70 (Hsp70) and anti-Hsp70 antibodies in the serum of normal individuals. *Immunological Investigations*, 27(6), 367–377.
- Poulter, N. R., Prabhakaran, D., & Caulfield, M. (2015). Hypertension. *The Lancet*, 386(9995), 801–812. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61468-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61468-9)
- Quintero, M., Colombo, S. L., Godfrey, A., & Moncada, S. (2006). Mitochondria as signaling organelles in the vascular endothelium, 103(14).
- Resnick, N., & Gimbrone, M. A. J. (1995). Hemodynamic forces are complex regulators of endothelial gene expression. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 9(10), 874–882.
- Saibil, H. (2013). Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nature*

- Reviews. Molecular Cell Biology*, 14(10), 630–642. <https://doi.org/10.1038/nrm3658>
- Saiz, L., Gorricho, J., Garjón, J., Celaya, M., Muruzábal, L., Malón, M., ... López, A. (2017). Blood pressure targets for the treatment of people with hypertension and cardiovascular disease (Review). *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (10). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD010315.pub2>. www.cochranelibrary.com
- Sathanoori, R., Bryl-Gorecka, P., Müller, C. E., Erb, L., Weisman, G. A., Olde, B., & Erlinge, D. (2017). P2Y(2) receptor modulates shear stress-induced cell alignment and actin stress fibers in human umbilical vein endothelial cells. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 74(4), 731–746. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2365-0>
- Sathanoori, R., Rosi, F., Gu, B. J., Wiley, J. S., Müller, C. E., Olde, B., & Erlinge, D. (2015). Shear stress modulates endothelial KLF2 through activation of P2X4. *Purinergic Signalling*, 11(1), 139–153. <https://doi.org/10.1007/s11302-014-9442-3>
- Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J. V., & Mann, M. (2006). In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols*, 1(6), 2856–2860. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.468>
- Shi, Y., Chen, J., Weng, C., Chen, R., Zheng, Y., Chen, Q., & Tang, H. (2003). Identification of the protein-protein contact site and interaction mode of human VDAC1 with Bcl-2 family proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 305(4), 989–996.
- Shiu, Y.-T., Li, S., Marganski, W. A., Usami, S., Schwartz, M. A., Wang, Y.-L., ... Chien, S. (2004). Rho mediates the shear-enhancement of endothelial cell migration and traction force generation. *Biophysical Journal*, 86(4), 2558–2565. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(04\)74311-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(04)74311-8)
- Sorger, P. K. (1991). Heat shock factor and the heat shock response. *Cell*, 65(3), 363–366.
- Suhaili, S. H., Karimian, H., Stellato, M., & Lee, T. (2017). Mitochondrial outer membrane permeabilization: a focus on the role of mitochondrial membrane structural organization, 443–457. <https://doi.org/10.1007/s12551-017-0308-0>
- Triggle, C. R., & Ding, H. (2011). The endothelium in compliance and resistance vessels. *Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)*, 3, 730–744.
- Trojanek, J. B. (2015). [Role of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in hypertension. Pathogenesis of hypertension and obesity]. *Postępy biochemii*, 61(4), 356–363.
- Tzima, E., del Pozo, M. A., Shattil, S. J., Chien, S., & Schwartz, M. A. (2001). Activation of integrins in endothelial cells by fluid shear stress mediates Rho-dependent cytoskeletal alignment. *The EMBO Journal*, 20(17), 4639–4647. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.17.4639>
- Universal Protein Resource (UniProt) (2017). (n.d.-a). Retrieved December 6, 2017, from <https://www.uniprot.org/>
- Universal Protein Resource (UniProt) (2017). (n.d.-b). Retrieved August 9, 2017, from <https://www.uniprot.org/>
- Vara, D. S., Punshon, G., Sales, K. M., Sarkar, S., Hamilton, G., & Seifalian, A. M. (2008). Endothelial cell retention on a viscoelastic nanocomposite vascular conduit is improved by exposure to shear stress preconditioning prior to physiological flow. *Artificial Organs*, 32(12), 977–981. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1594.2008.00659.x>
- Wang, C., Baker, B. M., Chen, C. S., & Schwartz, M. A. (2013). Endothelial cell sensing of flow direction. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33(9), 2130–2136. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.301826>
- Wang, X., & Khalil, R. A. (2018). *Matrix Metalloproteinases, Vascular Remodeling, and Vascular Disease. Vascular Pharmacology: Cytoskeleton and Extracellular Matrix* (1st ed., Vol. 81). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2017.08.002>
- Wu, R.-C., Qin, J., Yi, P., Wong, J., Tsai, S. Y., Tsai, M.-J., & O'Malley, B. W. (2004). Selective phosphorylations of the SRC-3/AIB1 coactivator integrate genomic responses to multiple cellular signaling pathways. *Molecular Cell*, 15(6), 937–949. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.08.019>
- Xu, Q., Li, D. G., Holbrook, N. J., & Udelsman, R. (1995). Acute hypertension induces heat-shock protein 70 gene expression in rat aorta. *Circulation*, 92(5), 1223–1229.
- Xu, Q., & Wick, G. (1996). The role of heat shock proteins in protection and pathophysiology of the

- arterial wall. *Molecular Medicine Today*, 2(9), 372–379.
- Yuan, Y., Shan, N., Tan, B., Deng, Q., Liu, Y., Wang, H., ... Qi, H. (2017). SRC-3 Plays a Critical Role in Human Umbilical Vein Endothelial Cells by Regulating the PI3K/Akt/mTOR Pathway in Preeclampsia. *Reproductive Sciences*, (1), 193371911772581. <https://doi.org/10.1177/1933719117725818>
- Zambuzzi, W. F., Milani, R., & Teti, A. (2010). Expanding the role of Src and protein-tyrosine phosphatases balance in modulating osteoblast metabolism: lessons from mice. *Biochimie*, 92(4), 327–332. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.01.002>

10. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO PERÍODO

Disciplinas

- Biologia Celular
- Bioquímica Avançada
- Biologia Molecular
- Farmacologia do Endotélio Vascular
- Química Metabólica da Célula: Carboidratos
- Sinalização Celular
- Seminários II
- Citometria de Fluxo: Teoria, Aplicações e Análise de Dados
- Metodologias Avançadas e Aplicadas em Tecidos Mineralizados
- Tópicos Especiais em Biotecnologia: 3D-Printing: Medical Applications
- Bases e Atualizações em Farmacologia e Biotecnologia
- Metabolismo Energético

Cursos

- Especialização em Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (Instituto de Ciência, Tecnologia e Qualidade)
- Manipulação Molecular em Softwares (Núcleo de Aprimoramento Científico)
- III Curso de Extensão Universitária Sobre Própolis (Instituto de Biociências UNESP)

Congressos

- VI Congresso de Biociências
- 46ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular
- Simpósio Internacional Fronteiras de Conhecimentos em microRNA e RNA
- III Workbiotech: Workshop da Pós-Graduação em Biotecnologia & II Symposium on Cellular Dynamics: Building Insights and Breaking Boundaries
- Web of Bioprocess
- XIX Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular
- Workshop Desafios e Estratégias em Pesquisas com microRNAs e CRISPR/Cas9
- 47ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular
- I Simpósio de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia
- IV Workbiotech: Workshop de Biotecnologia

Resumos em Eventos

- Epigenetic Machinery Disrupts GSK3 β /Catenin Signaling-Based TIMP-1 Expression in Mechanically-Stressed Primary Smooth Muscle Cells (SILVA, A.R, PINTO, T.S., FERNANDES, C.J.C, FELTRAN, G.S, ANDRADE, A.F, ZAMBUZZI, W.F, GOMES, A.M.). 46ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular.
- An In Vitro Model For Studying Intermittent Hypertension Reveals An Intracellular Picture Concomitant To ECM Remodeling In Endothelial Cells (PINTO, T.S., SILVA,

- R.A., FERNANDES, C.J.C., GOMES, A.M., ZAMBUZZI, W.F.). 47ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular.
- Hypertension-Mimicking Shear Stress Requires A Reprogramming Of Adhesion, Proliferation And Survival-Related Genes In Endothelial Cells (PINTO, T.S., SILVA, R.A., FERNANDES, C.J.C., GOMES, A.M., ZAMBUZZI, W.F.). XIX Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular.
 - Cytoskeleton Rearrangement As A Prerequisite For Maintaining Essential Intracellular Pathways In Mechanically-Stressed Endothelial Cells (GOMES, A. M., SILVA, R. A., FERNANDES, C. J. C., PINTO, T. S., ZAMBUZZI, W. F.). 47ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular.
 - Maquinaria Epigenética Interfere Na Expressão de TIMP-1 Modulada Pela Via GSK3 β / β -Catenin Em Células de Músculo Liso Primário Mecanicamente Estressadas (SILVA, A.R, PINTO,T.S, FERNANDES, C.J.C, FELTRAN, G.S, GOMES, A.M., ANDRADE, A.F, ZAMBUZZI, W.F.). VI Congresso de Biociências.
 - Shear Stress Modulates Cytoskeleton and Extracellular Matrix proteins in an in vitro Hypertension model” (PINTO, T.S., SILVA, R.A., FERNANDES, C.J.C., GOMES, A.M., ZAMBUZZI, W.F.). III Workbiotech: Workshop da Pós-Graduação em Biotecnologia & II Symposium on Cellular Dynamics: Building Insights and Breaking Boundaries.
 - An In Vitro Hypertension Model Modulates Pathways Involved With Adhesion And ECM Remodeling In Endothelial Cells (PINTO, T.S., SILVA, R.A., FERNANDES, C.J.C., GOMES, A.M., ZAMBUZZI, W.F.). I Simpósio de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.
 - Shear Stress Em Um Modelo de Hipertensão In Vitro Desencadeia Respostas em Vias de Sobrevivência (PINTO, T.S., SILVA, R.A., FERNANDES, C.J.C., GOMES, A.M., ZAMBUZZI, W.F.). IV Workshop de Biotecnologia – WorkBiotech.

Artigos em R1

- Mariana Issler Pinheiro Machado, Anderson Moreira Gomes, Marcel Ferreira Rodrigues, **Thais Silva Pinto**, Fábio J. Bezerra, Willian Fernando Zambuzzi. Cobalt-chromium-enriched medium ameliorates shear-stressed endothelial cell performance Journal of Trace Elements in Medicine and Biology.

Artigos Publicados

- c-Src kinase contributes on endothelial cells mechanotransduction in a heat shock protein 70-dependent turnover manner. JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY, 2018. **PINTO, T. S.**; SILVA, R.A. ; FERNANDES, C. J. C. ; GOMES, A. M. ; VIEIRA, J. C. S. ; PADILHA, P. M. ; ZAMBUZZI, W. F. .
- Nano hydroxyapatite-blasted titanium surface creates a biointerface able to govern Src-dependent osteoblast metabolism as prerequisite to ECM remodeling. COLLOIDS AND SURFACES B-BIOINTERFACES **JCR**, 2017. FERNANDES, C. J. C.; BEZERRA, F. ; FERREIRA, M. R. ; ANDRADE, A. F.C. ; **PINTO, T. S.** ; ZAMBUZZI, W. F.

