

Renata Silverio de Barros

**DESDIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS DA MUSCULATURA LISA
VASCULAR NO DESENVOLVIMENTO DA ATEROSCLEROSE:
papel da sinalização de BMP**

Dissertação apresentada à Sociedade
Beneficente Israelita Brasileira Albert Einstein
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências da Saúde.

São Paulo

2017

Renata Silverio de Barros

**DESDIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS DA MUSCULATURA LISA
VASCULAR NO DESENVOLVIMENTO DA ATEROSCLEROSE:
papel da sinalização de BMP**

Dissertação apresentada à Sociedade Beneficente Israelita Brasileira Albert Einstein para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Holthausen Campos

São Paulo

2017

B277d

Barros, Renata Silverio de

Desdiferenciação de células da musculatura lisa vascular no desenvolvimento da aterosclerose : papel da sinalização de BMP / Renata Silverio de Barros. -- São Paulo, 2017.

xv, 50 f., il.

Dissertação (Mestrado) – Sociedade Beneficente Israelita Brasileira Albert Einstein. Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Título em inglês: *Dedifferentiation of vascular smooth muscle cells: the role of BMP signaling in the development of atherosclerosis.*

1. Músculo liso vascular. 2. Diferenciação celular. 3. Gremlin. 4. Proteínas morfogenéticas ósseas. 5. Aterosclerose.

NLM – WG 550

SOCIEDADE BENEFICENTE ISRAELITA BRASILEIRA ALBERT EINSTEIN

Coordenador do Curso de Pós-Graduação: Prof. Dr. Luiz Vicente Rizzo

Renata Silverio de Barros

**DESDIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS DA MUSCULATURA LISA
VASCULAR NO DESENVOLVIMENTO DA ATHEROSCLEROSE: papel da
sinalização de BMP**

Presidente da banca: Prof. Dr. Alexandre Holthausen Campos

BANCA EXAMINADORA

Membros titulares:

Dr. Alex Yuri Simões Sato

Dr. Ricardo Weinlich

Prof. Dr. Pedro Alves Lemos Neto

Membros suplentes:

Profa. Dra. Anna Carla Renata Krepel Goldberg

Prof. Dr. Marcel Liberman

Aprovada em: 06/10/2017.

Dedicatória

À minha filha Catarina, tudo que faço é por você, que ilumina minha vida todos os dias com seu sorriso doce.

Ao meu marido Gabriel, obrigada por estar sempre presente e me apoiar em todas as minhas escolhas.

Aos meus pais, Dulce e Roberto, que são pessoas especiais que me guiaram para conquistar tudo o que sempre quis: amo vocês.

Aos meus queridos irmãos, Roberta e Ricardo.

À minha querida e sempre amada avó Preciosa (*in memoriam*), exemplo de vida, batalhadora e cheia de ensinamentos. Obrigada por tudo.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Dr. Alexandre Holthausen Campos. Médico e pesquisador excelente. Exemplo de pessoa honesta e justa. Obrigada pela paciência, disponibilidade e por todos os ensinamentos ao longo desses anos.

À Dra. Anna Carla Goldberg, por todos os conselhos tanto profissionais como pessoais, fundamentais para eu voltar para o laboratório após minha licença maternidade.

Ao meu grupo de pesquisa, Ana Paula Freitas do Rosário e Grazielle Suhett por toda ajuda prestada.

À minha querida amiga Fernanda Vieira Paladino. Sem dúvidas você fez todos os meus dias neste laboratório muito melhores e mais divertidos! Obrigada pela amizade!

Ao meu amigo Dr. Alex Yuri Simões Sato. Sem dúvidas cheguei até aqui porque você me incentivou muito. Obrigada pelos ensinamentos no início do mestrado.

Agradeço a toda equipe do Centro de Experimentação Técnica em Cirurgia (CETEC) por toda ajuda prestada com a criação e manipulação dos animais, principalmente a Luciana Cintra, Amanda Scaramella e Nathália Emídio.

Ao setor de estatística do Hospital Israelita Albert Einstein por todo apoio prestado, principalmente à Sandra Regina Malagutti.

A Deus, por sempre guiar meu caminho.

Agradeço a todos que de alguma forma me auxiliaram para concluir este trabalho.

Agradecimentos especiais

À FAPESP (Processo 2014/16461-0) pelo
financiamento concedido para a execução
deste trabalho.

Sumário

Dedicatória	v
Agradecimentos.....	vi
Agradecimentos especiais.....	vii
Lista de figuras	x
Lista de tabelas	xi
Lista de abreviaturas	xiii
Resumo	xiv
1 INTRODUÇÃO	2
1.1 Estrutura vascular.....	2
1.2 Aterosclerose.....	2
1.3 Células musculares lisas vasculares e estado de diferenciação	5
1.4 Proteína morfogenética óssea e seu antagonista Gremlin	7
1.5 Objetivos.....	9
2 MÉTODOS	10
2.1 Estratégias de ação.....	14
2.2 Aspectos éticos	14
3 RESULTADOS	15
3.1 Análise histológica de secções de aorta de camundongos alimentados por 8 e 16 semanas de dieta	15
3.2 Caracterização da diferenciação das células musculares lisas vasculares dos animais alimentados por 8 semanas de dieta.....	19
3.2.1 Análise do estado de diferenciação das células musculares lisas vasculares por reação em cadeia da polimerase quantitativa	19
3.2.2 Análise do estado de diferenciação das células musculares lisas vasculares por qPCR (16 semanas de dieta)	20
3.2.3 Análise da diferenciação das células musculares lisas vasculares por imuno-histoquímica (8 semanas).....	22
3.2.4 Análise da diferenciação das células musculares lisas vasculares por imuno-histoquímica (16 semanas).....	27
3.3 Avaliação do fenótipo das células musculares lisas vasculares (protocolo de 8 semanas de dieta) após manipulação da sinalização de proteínas morfogenéticas ósseas	31

3.3.1 Cadeia Pesada de Miosina.....	32
3.3.2 Calponina	33
3.3.3 SM22 alfa	34
3.3.4 Alfa actina.....	35
3.4 Avaliação do fenótipo das células musculares lisas vasculares (protocolo de 16 semanas de dieta) após manipulação da sinalização de proteínas morfogenéticas ósseas	37
4 DISCUSSÃO	40
4.1 Limitações	46
5 CONCLUSÕES	47
6 REFERÊNCIAS	48
Abstract	

Lista de figuras

Figura 1. Estágios do desenvolvimento das lesões ateroscleróticas	4
Figura 2. Esquema da via canônica das proteínas morfogenéticas ósseas	8
Figura 3. Representação esquemática dos animais e dietas utilizadas neste projeto ..	10
Figura 4. Representação esquemática dos tratamentos <i>in vitro</i> das células musculares lisas vasculares para manipulação da sinalização de proteína morfogenética óssea com experimentos de ganho de função	11
Figura 5. Histologia de secções das aortas (hematoxilina e eosina; 8 semanas)	15
Figura 6. Histologia de secções das aortas (Verhoeff; 8 semanas)	16
Figura 7. Histologia de secções das aortas (Tricrômio de Masson; 8 semanas)	16
Figura 8. Histologia de secções das aortas (hematoxilina e eosina; 16 semanas)	17
Figura 9. Histologia de secções das aortas (Verhoeff; 16 semanas)	18
Figura 10. Histologia de secções das aortas (Tricrômio de Masson; 16 semanas)	18
Figura 11. Imuno-histoquímica para cadeia pesada de miosina de secções de aorta de camundongos de 8 semanas de dieta	23
Figura 12. Imuno-histoquímica para SM22 alfa de secções de aorta de camundongos de 8 semanas de dieta	24
Figura 13. Imuno-histoquímica para alfa actina de secções de aorta de camundongos de 8 semanas de dieta	26
Figura 14. Imuno-histoquímica para cadeia pesada de miosina de secções de aorta de camundongos de 16 semanas de dieta	28
Figura 15. Imuno-histoquímica para SM22 alfa de secções de aorta de camundongos de 16 semanas de dieta	29
Figura 16. Imuno-histoquímica para alfa actina de secções de aorta de camundongos de 16 semanas de dieta	30
Figura 17. Mapa colorimétrico representativo da eficiência dos tratamentos realizados nas CMLV de 8 semanas	36
Figura 18. Mapa colorimétrico representativo da eficiência dos tratamentos realizados nas CMLV de 16 semanas	39
Figura 19. Esquema representativo das possíveis vias que BMP4 e Gremlin poderiam interagir no período precoce da doença aterosclerótica levando a CMLV ao fenótipo sintético	45

Lista de tabelas

Tabela 1. <i>Primer</i> utilizados	12
Tabela 2. Lista de anticorpos	13
Tabela 3. Níveis de expressão de cadeia pesada de miosina, calponina, SM22 alfa e alfa actina, segundo a linhagem do animal e dieta consumida	19
Tabela 4. Testes para os efeitos de linhagem e de dieta nos níveis de expressão de cadeia pesada de miosina, calponina, SM22 alfa e alfa actina	20
Tabela 5. Comparações entre dietas para cada linhagem e entre linhagens dentro de cada dieta para níveis de expressão de cadeia pesada de miosina.....	20
Tabela 6. Níveis de expressão de cadeia pesada de miosina, calponina, SM22 alfa e alfa actina, segundo a linhagem do animal e dieta consumida	21
Tabela 7. Teste para os efeitos de linhagem e de dieta nos níveis de expressão de cadeia pesada de miosina, calponina, SM22 alfa e alfa actina.....	21
Tabela 8. Níveis de expressão de cadeia pesada de miosina, calponina, SM22 alfa e alfa actina, segundo a linhagem dos animais.....	21
Tabela 9. Níveis de expressão de cadeia pesada de miosina, calponina, SM22 e alfa actina, segundo a dieta consumida pelos animais	22
Tabela 10. Níveis de expressão de cadeia pesada de miosina, segundo a dieta consumida e linhagem dos animais.....	23
Tabela 11. Testes para os efeitos de linhagem e de dieta nos percentuais de área marcada por cadeia pesada de miosina.....	24
Tabela 12. Percentuais de área marcada por SM22, segundo a linhagem do animal e dieta consumida	25
Tabela 13. Testes para os efeitos de linhagem e de dieta nos percentuais de área marcada por SM22	25
Tabela 14. Percentuais de área marcada por alfa actina, segundo a linhagem do animal e dieta consumida	26
Tabela 15. Testes para os efeitos de linhagem e de dieta nos percentuais de área marcada por alfa actina	27
Tabela 16. Percentuais de área marcada por cadeia pesada de miosina, segundo a linhagem do animal e dieta consumida	27

Tabela 17. Testes para os efeitos de linhagem e de dieta nos percentuais de área marcada por cadeia pesada de miosina.....	27
Tabela 18. Percentuais de área marcada por SM22, segundo a linhagem do animal e dieta consumida	29
Tabela 19. Testes para os efeitos de linhagem e de dieta nos percentuais de área marcada por SM22	30
Tabela 20. Percentuais de área marcada por alfa actina, segundo a linhagem do animal e dieta consumida	31
Tabela 21. Testes para os efeitos de linhagem e de dieta nos percentuais de área marcada por SM22	31
Tabela 22. Níveis de expressão de cadeia pesada de miosina segundo a linhagem dos animais	32
Tabela 23. Níveis de expressão de cadeia pesada de miosina segundo a dieta recebida pelos animais.....	33
Tabela 24. Níveis de expressão de calponina segundo a linhagem dos animais	33
Tabela 25. Níveis de expressão de calponina segundo a dieta recebida pelos animais	34
Tabela 26. Níveis de expressão de SM22 alfa segundo a linhagem dos animais.....	34
Tabela 27. Níveis de expressão de SM22 alfa segundo a dieta recebida pelos animais	35
Tabela 28. Valores médios ajustados e intervalos de confiança de 95% para os níveis de expressão de alfa actina segundo a linhagem dos animais	35
Tabela 29. Níveis de expressão de alfa actina segundo a dieta recebida pelos animais	36
Tabela 30. Níveis de expressão de cadeia pesada de miosina segundo a linhagem dos animais	37
Tabela 31. Níveis de expressão de calponina segundo o tratamento <i>in vitro</i>	38
Tabela 32. Níveis de expressão de SM22 alfa segundo o tratamento <i>in vitro</i>	38
Tabela 33. Níveis de expressão de alfa actina segundo o tratamento <i>in vitro</i>	38

Lista de abreviaturas

ApoE-/-	Apolipoproteína E
ATS	Aterosclerose
AVC	Acidente Vascular Cerebral
BMP	<i>Bone Morphogenetic Proteins</i>
BMPRI	<i>Bone Morphogenetic Proteins Receptor type I</i>
BMPRII	<i>Bone Morphogenetic Proteins Receptor type II</i>
CMLV	Células musculares lisas vasculares
DC	Dieta Controle
DH	Dieta Hiperlipidêmica
IAM	Infarto Agudo do Miocárdio
IHQ	Imuno-Histoquímica
I-SMADs	<i>Interference - small mothers against decapentaplegic</i>
MEC	Matriz Extracelular
MHC	Cadeia Pesada de Miosina (<i>Myosin Heavy Chain</i>)
ox-LDL	Lipoproteínas de Baixa Densidade Oxidadas
PDGF-BB	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas BB (<i>Platelet-Derived Growth Factor BB</i>)
qPCR	<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
SM22	<i>Smooth muscle</i>
SMADs	<i>Small mothers against decapentaplegic</i>
TGF- β	Fator de Crescimento Transformador beta (<i>Transforming Growth Factor beta</i>)

Resumo

Introdução: As células musculares lisas vasculares são células altamente especializadas e diferenciadas. Em resposta a estímulos pró-aterogênicos, elas são capazes de alterar seu estado de diferenciação aumentando a taxa de proliferação e migração. Há também evidências crescentes de que a sinalização das proteínas morfogenéticas ósseas estão envolvidas em doenças vasculares, incluindo aterosclerose. **Objetivos:** Caracterizar o fenótipo de células musculares lisas vasculares obtidas de camundongos alimentados por 8 ou 16 semanas de dieta controle ou hiperlipidêmica e sua relação com a sinalização da via das proteínas morfogenéticas ósseas. **Métodos:** Camundongos de ambos os sexos entre 2 a 3 meses de idade C57BL/6 (n=100) e ApoE^{-/-} (n=107) foram alimentados por 8 ou 16 semanas com dieta controle e/ou dieta hiperlipidêmica. Após o período de dieta e eutanásia, foi coletado o arco da aorta e células musculares lisas vasculares isoladas em cultura primária. Estas células foram submetidas ou não a tratamentos com proteínas recombinantes de BMP2, BMP4 (10ng/mL) ou Gremlin (25ng/mL) por 24 horas para avaliação da expressão de genes de diferenciação (cadeia pesada de miosina, calponina, SM22 e alfa actina) através de qPCR e análise proteica por imunohistoquímica. A análise estatística foi realizada considerando distribuição Gama e as comparações múltiplas corrigidas pelo método de Bonferroni. Dados apresentados por diferença média estimada e intervalo de confiança de 95%. **Resultados:** Nossos dados mais relevantes foram no período precoce da aterosclerose (8 semanas de dieta). A avaliação das linhagens utilizadas, independentemente da dieta consumida, demonstrou redução da expressão dos genes de diferenciação de células musculares lisas vasculares mediante os seguintes tratamentos: C57B/6 tratadas com BMP4 SM22 (0,794 [0,256; 1,331]), Alfa actina (0,927 [0,484; 1,370]); ApoE^{-/-} tratadas com BMP4: Sm22 (0,879 [0,331; 1,427]) e Alfa actina (1,190 [0,412; 1,968]); ApoE^{-/-} tratadas com Gremlin: Sm22 (1,001 [0,437; 1,564]), Alfa actina (1,248 [0,479; 2,017]) e calponina (1,614 [0,764; 2,463]). Considerando a dieta consumida, também foi possível observar redução da expressão dos genes de diferenciação das células musculares lisas vasculares mediante tratamentos: dieta controle tratadas com BMP4: Sm22 (0,927 [0,484; 1,370]) e Alfa actina (0,613 [0,157; 1,068]); dieta controle tratadas com Gremlin: Sm22 (0,921 [0,433; 1,410]) e MHC (1,477 [0,605; 2,349]); Dieta Hiperlipidêmica tratadas com BMP4: Alfa actina (1,190 [0,412;

1,968]); dieta hiperlipidêmica tratadas com Gremlin: Alfa actina (1,248 [0,479; 2,017]) e calponina (1,319 [0,510; 2,129]). Todos os grupos experimentais foram comparados ao grupo controle sem tratamento. **Conclusões:** Em 8 semanas de dieta, o tratamento com BMP4 recombinante foi eficaz na redução dos genes SM22 e alfa actina, independentemente da linhagem ou dieta consumida. Gremlin foi mais eficaz na indução de desdiferenciação, preferencialmente em animais ApoE^{-/-} ou animais alimentados com dieta hiperlipidêmica. Os efeitos de Gremlin sobre o estado de diferenciação de células musculares lisas vasculares sugerem mecanismo independente da via das proteínas morfogenéticas ósseas.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Estrutura vascular

Os vasos são grandes reservatórios com propriedades elásticas, capazes de conduzir o sangue ejetado pelo coração, com poucas mudanças de pressão, através de um fluxo pulsátil.⁽¹⁾ Esta propriedade adquirida é fundamental para acomodar o estresse circunferencial aplicado pelo fluxo sanguíneo e sem esta característica, a enorme onda de pressão inibiria o esvaziamento do coração (sístole) e posteriormente, impossibilitaria a diástole cardíaca. O que torna este fenômeno possível é a presença da matriz extracelular (MEC) especializada juntamente com as células que compõem os vasos sanguíneos.⁽¹⁾ Sabe-se que a MEC apresenta propriedades estruturais e mecânicas necessárias para manter a elasticidade do vaso, assim como fornece sinais que auxiliam, induzem ou estabelecem fenótipos das células vasculares.

O vaso arterial é composto por três camadas distintas: íntima, média e adventícia.^(2,3) A camada íntima, que entra em contato com o fluxo sanguíneo, é composta pelas células endoteliais, que ficam dispostas em monocamada. Juntamente com estas células encontram-se os pericitos que participam do revestimento interno do vaso e contribuem para manter a homeostase local.⁽⁴⁾ Estas células também desempenham um papel importante na arquitetura do vaso. As células endoteliais são capazes de produzir elastina, elemento que forma a lâmina elástica interna. Ainda, estas células são perfeitamente adaptadas para conduzir o fluxo turbulento de sangue,^(4,5) e estão diretamente ligadas à lâmina basal, estrutura sustentada pela lâmina elástica interna.⁽⁶⁾

O revestimento endotelial é exposto a diversos estímulos bioquímicos e hemodinâmicos em toda rede vascular, o que requer células apropriadas para suportar a força de cisalhamento e a tensão cíclica local. As células endoteliais acabam sofrendo variações fenotípicas, em resposta a sinalização local, em direção à manutenção da homeostase adequada.^(5,7)

Abaixo da camada íntima encontramos a região subendotelial, normalmente acelular, porém em humanos e animais maiores, podemos encontrar algumas populações de células musculares lisas vasculares (CMLV).^(3,7)

A camada média das artérias é composta basicamente pelas CMLV e elastina, que se dispõem em folhas (lamelas), entre as quais estão localizadas também as fibras de colágeno, elementos que formam a MEC.⁽¹⁾ A presença da elastina no vaso é o elemento-chave para este ser distensível e adaptável à pressão sanguínea.⁽¹⁾ Portanto, a elastina, juntamente com as CMLV, é responsável por distribuir a tensão de maneira uniforme por toda a parede do vaso.⁽²⁾ Entre as lamelas de elastina, existem agrupamentos de colágeno, que se alinham conforme a tensão na parede vascular, evitando a ruptura do vaso.^(8,9) As CMLV são altamente especializadas, respondem a estímulos externos, são também responsáveis pela contratilidade, tônus e diâmetro vascular, contribuindo para o controle da pressão arterial.^(10,11) Em seu estado maduro-diferenciado, as CMLV apresentam baixa taxa de migração e proliferação.⁽³⁾

A camada externa do vaso, chamada de camada adventícia, é bem definida em grandes artérias humanas.⁽¹⁾ Consiste em MEC rica em colágeno, que é produzido basicamente por uma camada de células fibroblásticas.⁽¹²⁾ A rica produção de colágeno nesta camada é fator protetor aos vasos. Em grandes vasos sanguíneos é possível observar na camada adventícia a *vasa vasorum*, que corresponde a uma rede de microvasos responsáveis pela irrigação mais externa do vaso, fornecendo oxigênio e nutrientes para as células presentes nesta camada.^(1,12) Estudos demonstraram⁽¹³⁾ que a adventícia pode ser um compartimento de detecção de lesão do vaso e, em vasos sanguíneos maduros, esta camada pode conter células progenitoras residentes capazes de se diferenciar em CMLV envolvidas no reparo vascular.^(1,13,14)

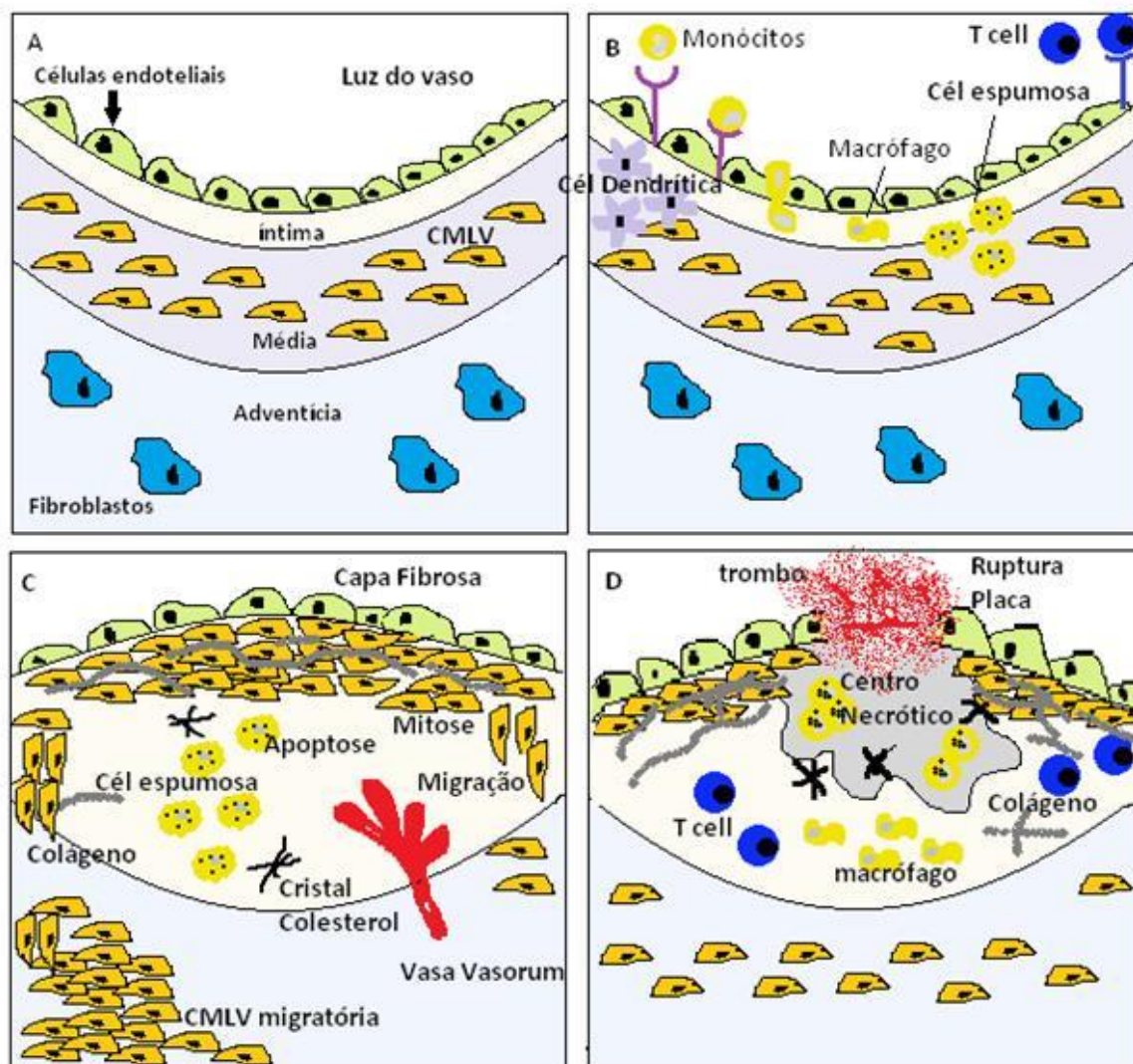
1.2 Aterosclerose

As doenças cardiovasculares são responsáveis pelo maior número de mortes em todo mundo. A aterosclerose (ATS), caracterizada como uma doença inflamatória crônica da parede arterial é considerada uma doença típica do mundo ocidental, devido ao estilo de vida atual e hábitos alimentares. Definida como uma doença silenciosa e progressiva, suas manifestações clínicas principais, muitas vezes fatais, são o Infarto Agudo do Miocárdio (IAM) e Acidente Vascular Cerebral (AVC).^(3,15,16)

Placas ateroscleróticas são encontradas principalmente em locais com fluxo sanguíneo turbulento, devido à força de cisalhamento local. Outros fatores que

contribuem para a formação da placa são idade, sexo, sedentarismo, obesidade, dislipidemia, diabetes, hipertensão arterial sistêmica, tabagismo e fatores genéticos.⁽¹⁷⁾

O início dessa doença (Figura 1) é caracterizado por um dano focal na camada endotelial, que pode ser ocasionado principalmente pelo desequilíbrio do metabolismo de lipídios, mormente por altos níveis de Lipoproteínas de Baixa Densidade oxidadas (ox-LDL). Como consequência, ocorre aumento da expressão de moléculas de adesão e produção de citocinas inflamatórias, as quais atraem principalmente monócitos e linfócitos T para o vaso.⁽⁴⁾ A adesão de leucócitos na camada endotelial do vaso é a etapa chave para o início do processo de formação da placa aterosclerótica.⁽³⁾ Os monócitos migrantes, que se diferenciam em macrófagos no interior do vaso, são o tipo leucocitário mais atraído para o local da lesão inicial. Estas células fagocitam o colesterol ox-LDL (após englobar estas moléculas lipídicas, são denominados como células espumosas ou *foam cells*) e ficam instaladas na região, contribuindo para o crescimento da placa e propiciando um ambiente pró-inflamatório.⁽⁶⁾ Juntamente com as células do sistema imunológico descritas, as CMLV também participam de todos os estágios da formação da placa aterosclerótica.⁽⁷⁾ As CMLV são capazes de responder aos estímulos locais. Acredita-se que estes estímulos sejam capazes de modificar estas células morfofisiologicamente, de forma que parte delas percam suas características iniciais e passem a participar do processo de formação da placa aterosclerótica.⁽³⁾ As CMLV migram da camada média para a íntima, aumentando a síntese de macromoléculas da MEC, como elastina, colágeno e proteoglicanos. Com o passar do tempo e da evolução da doença, há um aumento do centro necrótico da lesão, contribuindo para a obstrução do vaso sanguíneo. Placas em estado avançado também contêm cristais de colesterol e até mesmo *vasa vasorum*.⁽³⁾



A) Camadas do vaso arterial e células constituintes. B) Após lesão focal, ocorre a quimioatração de células do sistema imunológico para o local. Macrófagos que fagocitam o LDL oxidado acabam se instalando na região da lesão e contribuem para o crescimento da placa aterosclerótica. C) As células musculares lisas vasculares respondem aos estímulos locais e sistêmicos, proliferando e migrando para o local da lesão, produzindo componentes de matriz extracelular, aumentando o volume da placa aterosclerótica, formando uma capa espessa e fibrosa. D) Desfecho da doença. Com o passar dos anos, a capa fibrosa da placa pode se romper. A exposição do centro necrótico da placa aos componentes da cascata de coagulação sanguínea leva rapidamente à formação de trombo plaquetário, que pode obstruir totalmente o vaso sanguíneo, ocasionando o infarto agudo do miocárdio. Em outros casos, trombo formado em determinado vaso pode obstruí-lo ou se desprender do local da lesão e ocluir pequenos vasos distais, ocasionando o acidente vascular cerebral.

Fonte: Traduzido e adaptado de Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*.2011;473(7347):317-25.⁽³⁾

Figura 1. Estágios do desenvolvimento das lesões ateroscleróticas

A estabilidade da placa está relacionada com sua composição. Conforme descrito na literatura, a capa fibrosa das placas ateroscleróticas é rica em CMLV, que envolve um centro necrótico, já mencionado aqui. A proporção relativa entre os componentes da capa fibrosa *versus* centro necrótico pode ter implicações diretas

nas manifestações clínicas.⁽¹⁸⁾ Placas com capa fibrosa bem estabelecida apresentam maior concentração de CMLV e são mais estáveis.⁽¹⁸⁾ Essa característica reduz a susceptibilidade da placa ao rompimento, evitando a exposição do centro necrótico ao sangue.⁽¹⁸⁾ Placas com a capa fibrosa com menor quantidade de CMLV e maior proporção de infiltrado de células inflamatórias e partículas de lipídeos são mais susceptíveis ao rompimento. Quando há o rompimento devido ao *shear stress* local, fatores plaquetários e teciduais entram em contato com o centro necrótico, desencadeando a rápida ativação da cascata de coagulação e a formação do trombo plaquetário, que se estende para o lúmen do vaso. O bloqueio da circulação sanguínea local ocasiona o IAM. Já a obstrução local ou desprendimento do trombo plaquetário com consequente oclusão de vasos cerebrais menores ocasiona o AVC.^(3,18)

1.3 Células musculares lisas vasculares e estado de diferenciação

As CMLV desempenham papel crucial no remodelamento vascular numa variedade de doenças já descritas na literatura, como a ATS, hipertensão e aneurismas vasculares.⁽¹⁸⁾ Estas células respondem a estímulos ambientais e são capazes de alterar seu estado de diferenciação, aumentando sua taxa de proliferação, apresentando capacidade de migração e a síntese de MEC, considerados eventos críticos nas doenças mencionadas.⁽¹⁸⁾ Na literatura atual encontramos alguns estudos que tentam rastrear a origem das CMLV presentes na placa aterosclerótica. A caracterização destas células é parte fundamental no entendimento da progressão da doença.^(10,19,20)

Alguns autores especulam que a capacidade de desdiferenciação das CMLV em determinados indivíduos seria relacionada à programação embrionária dessas células, sugerindo que a susceptibilidade ou resistência à ATS estaria relacionada a um processo originado na embriogênese e posteriores mecanismos epigenéticos. Tem sido amplamente descrito que as CMLV expressam genes clássicos de diferenciação celular, como Cadeia Pesada de Miosina (MHC – *Myosin Heavy Chain*), Calponina, SM22-alfa (*smooth muscle-22* alfa) e Alfa actina. A MHC é uma proteína estrutural citoplasmática considerada o principal componente da contratilidade da CMLV. A Calponina é uma proteína reguladora associada ao filamento de actina, que exerce papel na função contrátil das CMLV. A SM22-alfa é uma proteína relacionada a calponina, sua função é

participar da contração celular e também é conhecida como marcador precoce da diferenciação de CMLV. A proteína alfa actina está relacionada as fibras musculares, função de motilidade celular, estrutura e integridade. Também é conhecida como marcador precoce da diferenciação de CMLV.^(10,18,21,22) Sabe-se que a análise deste conjunto de genes seria essencial para a caracterização de desdiferenciação celular.⁽¹⁸⁾

Placas ateroscleróticas humanas analisadas em situações pós-morte apresentaram células positivas para os marcadores de CMLV mencionados acima, e estas coexpressavam os marcadores CD68 e LGALS3.⁽¹⁹⁾ Este fato sugere que existem células espumosas que também expressam genes de CMLV, e possivelmente revela uma transição de fenótipo como *macrophage-like cell*.⁽¹⁸⁾

A capacidade de fagocitar moléculas de colesterol DL provavelmente se dá devido a estímulos locais que as CMLV recebem constantemente. Logo, estas células são capazes de modular seu fenótipo em resposta ao ambiente, auxiliando na fagocitose de ox-LDL e passando a se instalar no centro necrótico da placa como célula espumosa. Além disso, as CMLV migram para formar a capa fibrosa da lesão e produzem quimiocinas capazes de atrair mais monócitos, células T e dendríticas para o local da lesão.^(6,17)

A presença de CMLV fenotipicamente moduladas auxilia na remoção do ox-LDL, porém, ao se instalarem na região necrótica da placa, acabam contribuindo para a inflamação local.⁽¹⁸⁾ Por outro lado, a proliferação destas células na capa fibrosa da placa garante maior estabilidade para a placa, assim como a maior produção de MEC, diminuindo o risco de ruptura.^(3,18) Acredita-se que parte das CMLV presentes nas placas ateroscleróticas podem também ser de origem mieloide, ou seja, derivadas da medula óssea.^(1,10)

A literatura atual explora caminhos que possivelmente levam as CMLV a alterar seu fenótipo contrátil para sintético. As regiões CarG Box são regiões específicas nos promotores dos genes de diferenciação de CMLV e são ativadas após o co-ativador miocardina se ligar ao fator de resposta ao soro (SRF). Ao ativar estas regiões, as CMLV expressam genes que mantêm o fenótipo contrátil. Sabe-se que TGF- β (*Transforming growth factor beta*) produzido pelas CMLV ativa a ligação entre miocardina e SRF.⁽²³⁾ Recentes estudos demonstraram que PDGF-BB (*Platelet-Derived Growth Factor BB*) foi capaz de ativar outros fatores de transcrição, como por exemplo, *Kruppel-like factor 4* (KLF4) capaz de reduzir a expressão da miocardina, levando a

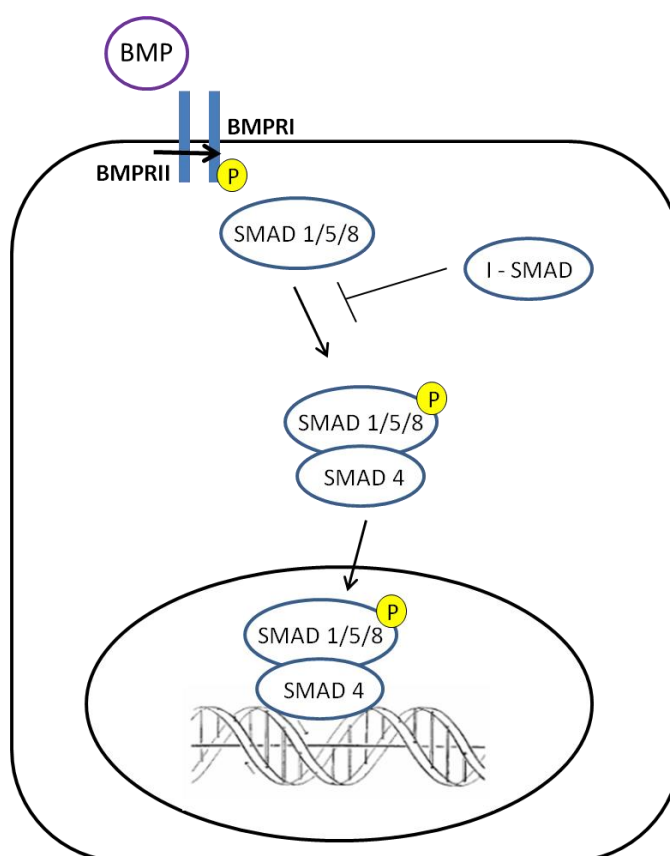
CMLV a reduzir a transcrição de seus genes específicos alterando seu fenótipo para sintético.⁽²⁴⁾

1.4 Proteína morfogenética óssea e seu antagonista Gremlin

Pertencentes à superfamília do TGF- β , as proteínas morfogenéticas ósseas (BMP – *Bone Morphogenetic Proteins*) são um grupo de proteínas cuja primeira isoforma foi descoberta na década de 1960.⁽²⁵⁾ Primeiramente, estas proteínas foram descritas como indutoras da formação dos ossos e cartilagens, porém, a literatura atual demonstra que sua ação vai além deste papel e estão envolvidas em diversos processos como desenvolvimento muscular (atuando no desenvolvimento do tecido, proliferação, migração e apoptose), biologia vascular e câncer.^(25,26) As BMPs também já foram descritas como promotores da calcificação vascular e angiogênese tumoral.⁽²⁶⁾ Também foi demonstrado que as BMPs atuam como mediadores de inflamação endotelial em resposta pró-aterogênica, devido ao *shear stress* local em vasos propensos à ATS.⁽²⁷⁾

As proteínas BMPs ativas são compostas de 50-100 aminoácidos com sete cisteínas, seis delas formando três ligações dissulfeto intramoleculares, conhecida como grupos de cisteínas.^(25,27) A sinalização canônica destas proteínas (Figura 2) é dependente dos receptores de membrana dos tipos I e II de BMP (BMPRI e BMPRII).⁽²⁵⁾ Após a interação com o receptor BMPRII, ocorre à ativação do BMPRI e esta associação resulta na imediata fosforilação das proteínas *small mothers against decapentaplegic* (SMADs) (do tipo 1/5/8). As SMADs são proteínas citoplasmáticas que atuam como mediadoras na sinalização intracelular, principalmente na cascata de sinalização das proteínas da família do TGF- β .⁽¹⁵⁾ Após a fosforilação das SMADs 1/5/8, ainda no citoplasma, forma-se outro heterodímero composto pelas SMADS reguladoras com a SMAD 4 (SMADs mediadora). Este complexo heterodimérico é translocado para o núcleo onde pode ser associado com fatores de transcrição modulando a expressão de genes alvos.^(15,25) A regulação desta sinalização pode ocorrer por meio de proteínas citoplasmáticas como, por exemplo, as SMADs de interferência (I-SMADs do tipo 6/7), que bloqueiam a formação do heterodímero, impedindo a atuação deste no núcleo da célula, ou através dos antagonistas dos BMPs.⁽²⁶⁾ Existem vários antagonistas específicos para as diferentes isoformas já descritas dos BMPs.^(25,26)

O gene Gremlin, antagonista de BMPs 2, 4 e 7 (os BMPs -2 e -4 são as isoformas de interesse deste projeto), possui na sua forma glicosilada aproximadamente 28 kDa e é essencial à formação embrionária de rins, pulmões, ossos, retina e outros tecidos.⁽²⁵⁾ A ligação de Gremlin é seletiva para as isoformas das BMPs citadas e impede a interação destas proteínas com o BMPRII, bloqueando assim a via de sinalização citada anteriormente.^(26,28) A isoforma Gremlin-1 é uma proteína altamente conservada, membro da superfamília do TGF- β , sua expressão está aumentada em células endoteliais expostas ao fluxo alterado (*shear stress*) em aortas de rato e artérias coronárias em humanos, sugerindo o envolvimento dessa proteína na inflamação e ATS.⁽²⁹⁾ Dados anteriores publicados deste laboratório já relacionavam a importância de Gremlin na vasculatura. Após a superexpressão *in vitro* de Gremlin em CMLV de ratos foi identificado aumento na migração, proliferação e apoptose destas células e posterior validação *in vivo* em modelo de restenose vascular.^(30,31)



As proteínas morfogenéticas ósseas ligam-se ao receptor de membrana BMPRII que se heterodimeriza com o receptor BMPRI, ocorrendo uma rápida fosforilação das proteínas SMADS, que no citoplasma, irão formar um complexo com a SMAD do tipo 4. Este complexo é translocado para o núcleo, onde pode ser associado com fatores de transcrição modulando a expressão de genes alvos. Uma regulação desta via pode ser feita por meio da inibição da formação do complexo SMAD 1/5/8 com a SMAD 4, através da interferência das SMADs 6/7, conhecida como SMAD de interferência (I-SMAD).

Figura 2. Esquema da via canônica das proteínas morfogenéticas ósseas

Estudos genéticos em humanos demonstraram que possíveis mutações na sinalização dos genes de BMPs estão ligadas a problemas e doenças vasculares, como talangectasia, hipertensão arterial pulmonar e tumores angiogênicos, demonstrando assim, sua importância nas doenças vasculares.⁽²⁶⁾

Resultados anteriores de nosso grupo demonstraram que BMPs (2 e 4) estão suprarreguladas nos vasos e em CMLV de animais deficientes para Apolipoproteína E (ApoE^{-/-}) alimentados com dieta hiperlipidêmica (DH) durante 8 e 16 semanas.⁽³²⁾ Estes achados corroboram e ampliam dados da literatura.^(24,25) Demonstramos também que Gremlin é constitutivamente expresso em CMLV de ratos e camundongos.⁽²⁶⁾

Adicionalmente, esse gene desempenha papel importante na proliferação e migração das CMLV, além de ser regulado por fatores de crescimento e por lesão vascular.^(17,26) Há necessidade, contudo, de estudos adicionais para melhor compreensão do efeito da sinalização por BMPs sobre mudanças fenotípicas nas CMLV. Trabalhamos com a hipótese de que a sinalização de BMPs via SMADS possa estar envolvida na desdiferenciação da CMLV, colaborando para a progressão da ATS.

A melhor compreensão do processo de desdiferenciação das CMLV no contexto da ATS é de grande importância. Proteínas envolvidas com a sinalização da via BMPs são candidatas interessantes como marcadoras do desenvolvimento da lesão e, conseqüentemente, possível alvo terapêutico na ATS. Nosso trabalho explorou as mudanças fenotípicas das CMLV obtidas do arco aórtico de animais selvagens ou deficientes para a ApoE^{-/-} alimentados com DH.

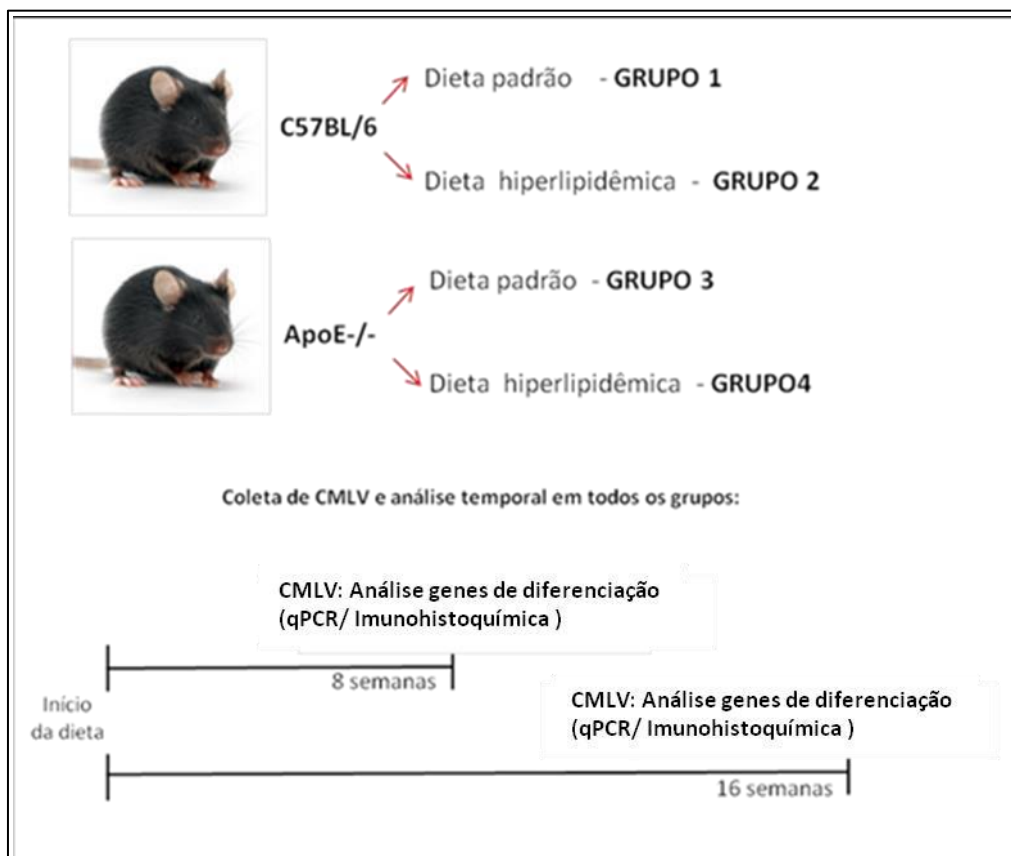
1.5 Objetivos

1. Caracterizar o estado de diferenciação das células musculares lisas vasculares de aorta em camundongos ApoE^{-/-} comparados com sua respectiva linhagem selvagem controle (C57BL/6), alimentados ou não com dieta hiperlipidêmica no período de 8 e 16 semanas;

2. Avaliar o fenótipo das células musculares lisas vasculares após manipulação da sinalização de proteína morfogenética óssea no mesmo sistema, com experimentos de ganho de função desta via.

2 MÉTODOS

O desenho experimental deste trabalho está representado nas figuras 3 e 4 a seguir:



Camundongos C57BL/6 e ApoE com idade entre 2 a 3 meses foram alimentados com dieta padrão/controle ou hiperlipidêmica por 8 e 16 semanas, e após esses dois períodos, CMLV foram coletadas do arco aórtico e a expressão de genes clássicos foi determinada por qPCR quantitativo e imuno-histoquímica.

Figura 3. Representação esquemática dos animais e dietas utilizadas neste projeto

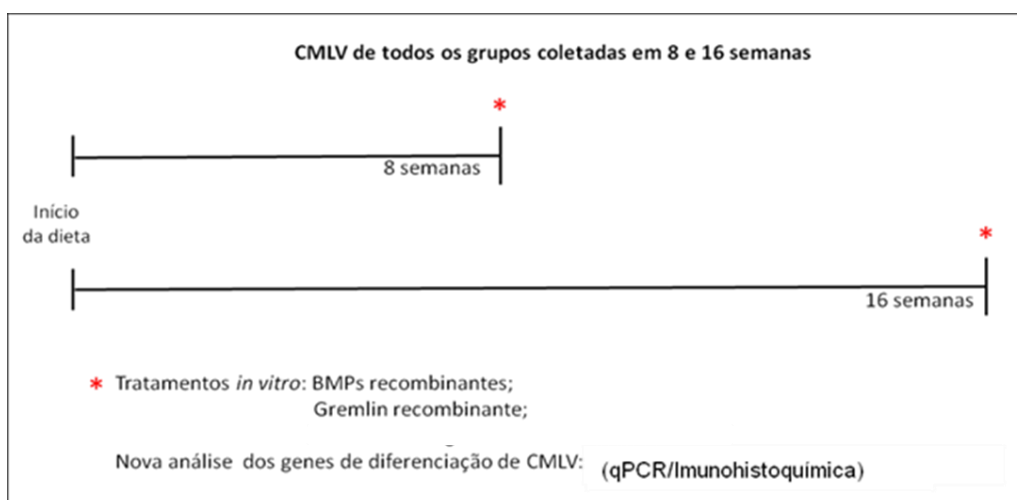


Figura 4. Representação esquemática dos tratamentos *in vitro* das células musculares lisas vasculares para manipulação da sinalização de proteína morfogenética óssea com experimentos de ganho de função

Centro de Pesquisa: O Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein (IIEPAE) conta com um moderno Centro de Experimentação e Treinamento em Cirurgia (CETEC), que inclui um biotério completo, destinado a pesquisa com modelos animais, único do setor acadêmico a ter conferida a acreditação internacional da *Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International* (AAALAC). Desta forma, temos toda a estrutura necessária para manutenção dos animais que foram utilizados para desenvolver este projeto.

Animais e dieta: Camundongos de ambos os sexos com idade entre 2 a 3 meses de vida deficientes para ApoE^{-/-} e sua respectiva linhagem selvagem controle (C57BL/6) foram utilizados como modelo experimental neste estudo. Foram utilizados 100 animais C57BL/6 e 107 animais ApoE^{-/-} que foram submetidos à dieta controle (DC) ou hiperlipidêmica por 8 ou 16 semanas de dieta. Os animais ApoE^{-/-} são reconhecidamente adequados para estudo da ATS, recapitulando em boa parte a doença desenvolvida em humanos.^(28,29) Esse modelo encontra-se em uso em nosso laboratório nos últimos 3 anos. Os animais foram alimentados com DC ou hiperlipidêmica (Research Diets, NJ, USA) por períodos de 8 ou 16 semanas. A DC é composta de 4,5% de gordura com 0,1% de colesterol, enquanto a DH contém 21% de gordura e 1,5% de colesterol. Após o término do protocolo os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ pré-anestesiados com isoflurano, o arco aórtico coletado assepticamente e as CMLV isoladas para cultura.

Cultura celular: Culturas primárias de CMLV da aorta de camundongos foram obtidas por métodos já padronizados neste laboratório.

Resumidamente, após o período de dieta (8 ou 16 semanas), os animais foram sacrificados, o tórax foi aberto e a região do arco e aorta torácica foi isolada de maneira estéril, sendo retiradas a camada adventícia e células endoteliais. A camada média do vaso foi cortada em pequenos fragmentos e tratada com collagenase tipo D (SigmaAldrich; 500µg/mL) por 1 hora a 37°C e, após lavagens, as células foram semeadas em frascos de cultura em meio DMEM:F12 (Gibco Life Technologies – Invitrogen, Carlsbad/CA) suplementado com FBS a 10% (Invitrogen, Carlsbad/CA) e penicilina/estreptomicina (1%, Invitrogen/CA), sendo mantidas a 37°C e 5% CO₂. Culturas foram utilizadas nas primeiras 07 passagens. Estoques de células congeladas garantiram a manutenção de uniformidade nos experimentos, com semelhança fenotípica do início ao fim do projeto.

Isolamento de RNA total: O RNA total das CMLV foi extraído por meio do kit RNeasy (GE Healthcare), seguindo as instruções do fabricante. A concentração de RNA total foi determinada por espectrofotometria, a partir da absorbância em 260nm, e a pureza das amostras foi determinada pela razão entre os valores de absorbâncias em 260nm e 280nm. Somente as amostras que apresentaram razões entre 1.9 e 2.1 foram utilizadas. A integridade do RNA foi averiguada por eletroforese em gel de agarose.

qPCR: Os níveis de expressão de RNAm para os genes SM22 alfa, MHC, alfa actina, calponina e GAPDH foram avaliados. A tabela 1 apresenta os *Primer* utilizados:

Tabela 1. *Primer* utilizados

Gene	Tipo	Sequência	Tamanho amplicon
SM22 alfa	Sense	5' GCAGATGGAACAGGTGGCTCA 3'	138pb
	Antisense	5' CTGCCCAAAGCCATTAGAGTCC 3'	
MHC	Sense	5' TGGAGCCGGAAGACAGAGAAC 3'	169pb
	Antisense	5' GTTCTTGACGGTTTTCGCATTG 3'	
Calponina	Sense	5' ACCTCCCAGAACAGAAACCC 3'	155pb
	Antisense	5' GTCACATCCACAAACACCAGTCAC 3'	
alfa actina	Sense	5' AGCCCTCGCACCCAGCAC 3'	177pb
	Antisense	5' GCTTCGTCGTATTCTGTTTGCTG 3'	
GAPDH	Sense	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'	234pb
	Antisense	5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'	

O cDNA foi preparado a partir de 0,5µg de RNA total com o uso enzima ImProm II (Promega), combinando-se com oligo-dT (500ng), MgCl₂ (50mM) e dNTP mix (10mM) em tampão concentrado específico e água. Uma alíquota de cDNA foi

combinada aos componentes do *kit* SYBR GREEN PCR Master Mix (QIAGEN) e *Primer* específicos para cada gene. O qPCR foi realizado no termociclador Rotor Gene (Qiagen/CorbettResearch).

Avaliação morfológica e imuno-histoquímica das artérias: Após a aorta ser dissecada, os segmentos foram embebidos em parafina e cortes corados por HE (morfologia), tricrômio de Masson (deposição de colágeno/matriz), e Verhoeff (fibras elásticas). Paralelamente, para a análise de imuno-histoquímica (IHQ), cortes incluídos em parafina foram bloqueados e incubados com anticorpos primários conforme descrito na tabela 2. Todas as secções foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com HRP e a detecção feita com reagentes indicados pelo fabricante. Os cortes foram contracorados com HE. Os controles foram feitos com uso de anticorpo anti-IgG isotípico de camundongo.

Estatística imuno-histoquímica: Para minimizar viés de interpretação, as lâminas foram fotografadas e as medições para quantificação foram realizadas por um observador independente que desconhecia a identidade das amostras. A distribuição dos dados foi estudada por meio de histogramas e *boxplots* e para a análise inferencial foram aplicados modelos de equações de estimação generalizadas, considerando a correlação entre as medidas obtidas em diferentes fotos de um mesmo animal.

Foram ajustados modelos com distribuição de probabilidade gama e função de ligação log para os percentuais de área marcada por MHC, SM22 e alfa actina nos experimentos de oito e de dezesseis semanas.

Todos os modelos tinham como as variáveis explicativas ‘linhagem do animal’ e ‘dieta consumida’, além da interação entre ‘linhagem’ e ‘dieta’ e os resultados dos modelos foram apresentados por valores médios estimados e intervalos de confiança de 95%.

As análises foram realizadas com o programa SPSS e adotou-se nível de significância de 5%.

Tabela 2. Lista de anticorpos

Espécie	Alvo	Empresa	Nº catálogo	Concentração utilizada
Camundongo	α -Actina	Sigma Aldrich	A2547	1:400
Camundongo	MHC	Abcam	Ab53219	1:100
Camundongo	SM22 – alfa	Abcam	Ab155272	1:100

Estatística qPCR: Os desfechos numéricos do estudo (MHC, Calponina, SM22 alfa e alfa actina) foram descritos por medianas, quartis, valores mínimos e máximos e suas distribuições de frequências verificadas por meio de histogramas, *boxplot* e gráficos de comparações de quantis. Para cada desfecho numérico foi ajustado um modelo linear generalizado, com distribuição de probabilidade gama e função de ligação *log*, e as variáveis explicativas ‘linhagem do animal’ e ‘dieta consumida’, além da interação entre linhagem e dieta. O efeito do tratamento *in vitro*, controlando para linhagem dos animais e dieta consumida por eles na expressão dos desfechos, foi avaliado por meio de modelos lineares generalizados com distribuição de probabilidade gama e função de ligação *log*, e as variáveis explicativas ‘tratamento *in vitro*’, ‘linhagem’ e ‘dieta’, considerando as interações entre tratamento e linhagem e entre tratamento e dieta. Os resultados dos modelos foram apresentados por valores médios estimados e intervalos de confiança de 95% e as comparações múltiplas foram corrigidas pelo método de Bonferroni sequencial. As análises foram realizadas com os programas R e SPSS e adotou-se nível de significância de 5%.

2.1 Estratégias de ação

Para cumprir os objetivos inicialmente propostos, utilizamos as seguintes estratégias de ação, detalhadas para cada objetivo:

Analizamos a expressão de genes marcadores de CMLV diferenciadas largamente estudadas, como alfa actina de músculo liso, SM22 alfa, MHC e calponina. Para tanto, utilizamos as técnicas de qPCR e IHQ. Este objetivo é essencial para demonstrar que a desdiferenciação de CMLV também ocorre em nosso modelo e que o mesmo é viável para atingir o segundo objetivo.

Ensaio de ganho de função da via BMPs foram realizados. Entre eles, o tratamento com proteínas recombinantes (BMP2, BMP4, Gremlin). Depois de estabelecidos os modelos, novas avaliações dos genes descritos foram realizadas.

2.2 Aspectos éticos

Este trabalho foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA: 2079-14) do Hospital Israelita Albert Einstein.

3 RESULTADOS

3.1 Análise histológica de secções de aorta de camundongos alimentados por 8 e 16 semanas de dieta

Para avaliar a morfologia e a composição da parede arterial dos vasos dissecados dos quatro grupos de animais em diferentes períodos de dieta, realizamos análises histológicas (HE, Masson e Verhoeff). As figuras 5, 6 e 7 representam as análises de HE, Verhoeff e Masson dos animais com 8 semanas de dieta.



Cortes representativos do arco aórtico dos grupos G1 (C57 + dieta padrão), G2 (C57 + dieta hiperlipidêmica), G3 (ApoE^{-/-} + dieta padrão) e G4 (ApoE^{-/-} + dieta hiperlipidêmica). Aumento de 4x. N: 3.

Figura 5. Histologia de secções das aortas (hematoxilia e eosina; 8 semanas)

8 semanas

Dieta Controle

Dieta Hiperlipidêmica

B6

ApoE^{-/-}

Cortes representativos do arco aórtico dos grupos G1 (C57 + dieta padrão), G2 (C57 + dieta hiperlipidêmica), G3 (ApoE^{-/-} + dieta padrão) e G4 (ApoE^{-/-} + dieta hiperlipidêmica). Aumento de 4x. N: 3.

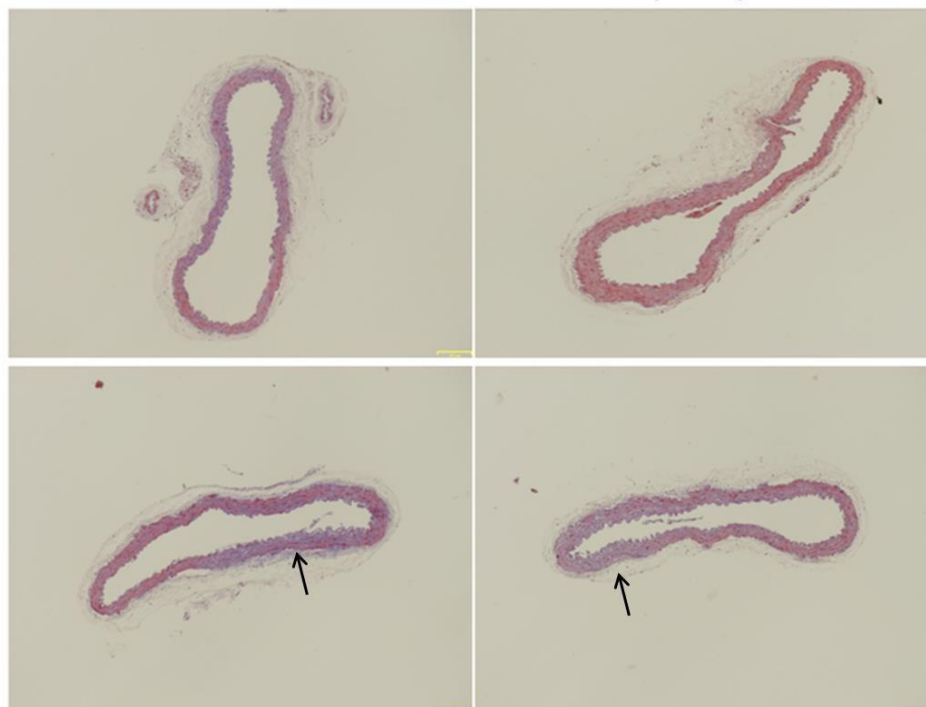
Figura 6. Histologia de secções das aortas (Verhoeff; 8 semanas)

8 semanas

Dieta Controle

Dieta Hiperlipidêmica

B6

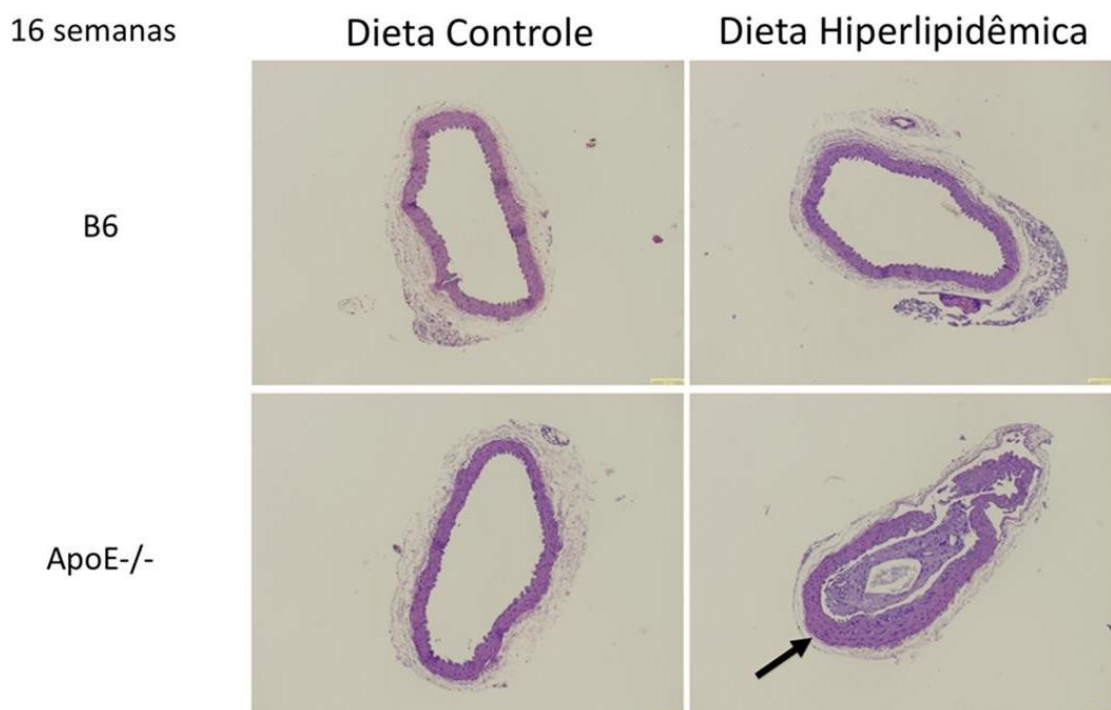
ApoE^{-/-}

Cortes representativos do arco aórtico dos grupos G1 (C57 + dieta padrão), G2 (C57 + dieta hiperlipidêmica), G3 (ApoE^{-/-} + dieta padrão) e G4 (ApoE^{-/-} + dieta hiperlipidêmica). Aumento de 4x. Setas evidenciam acúmulo de colágeno na parede arterial. N: 3.

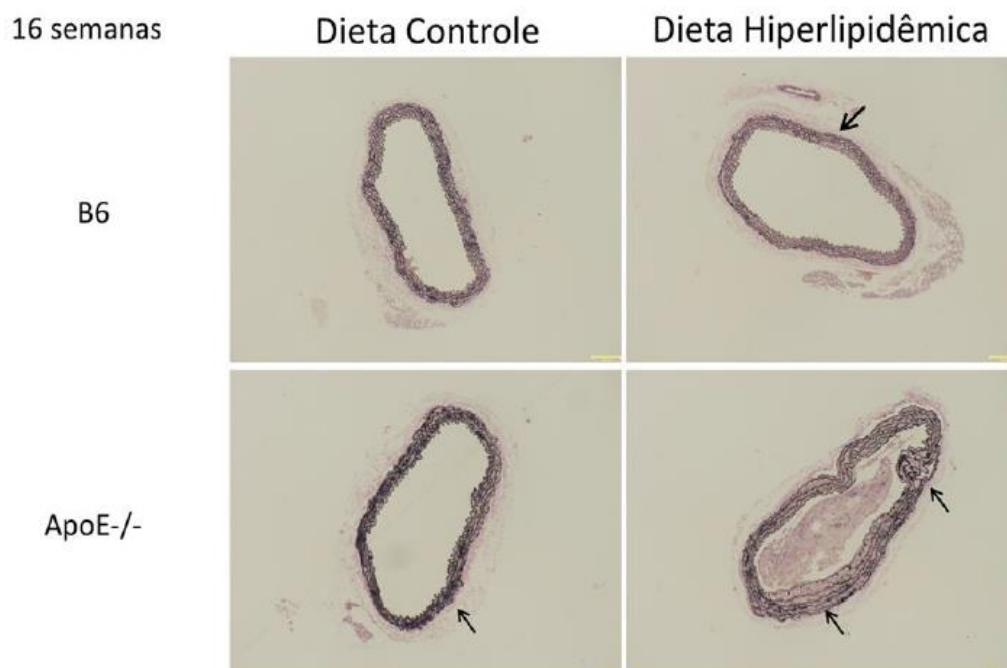
Figura 7. Histologia de secções das aortas (Tricrômio de Masson; 8 semanas)

Assim como esperado,⁽³³⁾ com 8 semanas de dieta não há formação de placa aterosclerótica (Figuras 5, 6 e 7). Observam-se, porém, alguns fenômenos característicos do estabelecimento e progressão da ATS principalmente nos animais ApoE^{-/-} com ou sem DH, como alterações na composição da parede arterial, aumento da deposição de matriz, marcação positiva para deposição de colágeno (caracterizada pela coloração azul – Figura 7) e desarranjo das fibras elásticas da camada média (observado por meio da coloração Verhoeff – Figura 6).

Abaixo, observamos que aortas dos camundongos submetidos ao protocolo de dieta durante 16 semanas apresentam características mais expressivas da doença, com placas ateroscleróticas já formadas e bem estabelecidas nos animais do G4 (ApoE + DH). Observamos o espessamento da camada média na região de formação da placa aterosclerótica (Figura 8), assim como o desarranjo das lâminas elásticas nos grupos G3 e G4 (Figura 9), maior deposição de colágeno na camada média (G3) e placa (G4) (Figura 10). Estas imagens são compatíveis com o esperado descrito na literatura.⁽³²⁾

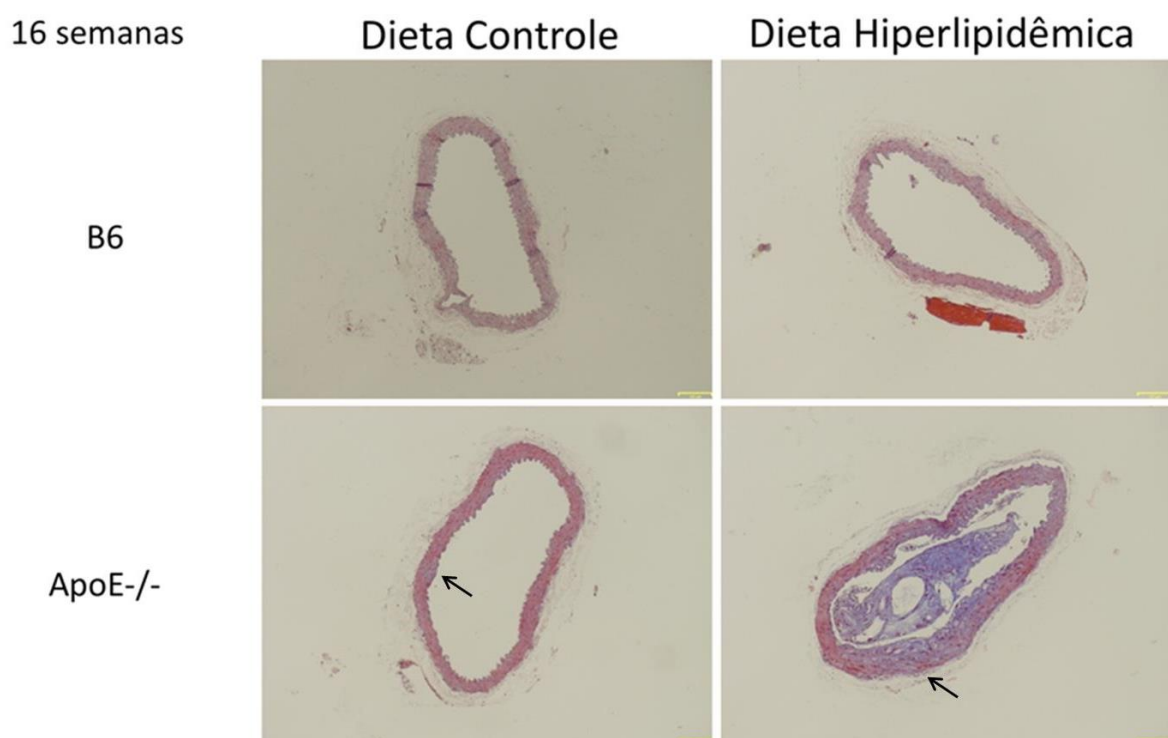


Cortes representativos do arco aórtico dos grupos G1 (C57 + dieta padrão), G2 (C57 + dieta hiperlipidêmica), G3 (ApoE^{-/-} + dieta padrão) e G4 (ApoE^{-/-} + dieta hiperlipidêmica). Aumento de 4x. Seta indica espessamento da camada média e formação de placa aterosclerótica. N: 3.
Figura 8. Histologia de secções das aortas (hematoxilina e eosina; 16 semanas)



Cortes representativos do arco aórtico dos grupos G1 (C57 + dieta padrão), G2 (C57 + dieta hiperlipidêmica), G3 (ApoE^{-/-} + dieta padrão) e G4 (ApoE^{-/-} + dieta hiperlipidêmica). Aumento de 4x. Setas indicam desarranjo da camada média vascular. N: 3.

Figura 9. Histologia de secções das aortas (Verhoeff; 16 semanas)



Cortes representativos do arco aórtico dos grupos G1 (C57 + dieta padrão), G2 (C57 + dieta hiperlipidêmica), G3 (ApoE^{-/-} + dieta padrão) e G4 (ApoE^{-/-} + dieta hiperlipidêmica). Aumento de 4x. Setas evidenciam acúmulo de colágeno na parede arterial. N: 3.

Figura 10. Histologia de secções das aortas (Tricrômio de Masson; 16 semanas)

3.2 Caracterização da diferenciação das células musculares lisas vasculares dos animais alimentados por 8 semanas de dieta

3.2.1 Análise do estado de diferenciação das células musculares lisas vasculares por reação em cadeia da polimerase quantitativa

Para caracterizarmos o estado de diferenciação das CMLV, como proposto no objetivo 1 deste projeto, camundongos C57BL/6 e ApoE^{-/-} foram alimentados por 8 semanas com DC ou hiperlipidêmica, sendo agrupados da seguinte forma: C57BL/6 alimentados com DC (Grupo 1), C57BL/6 alimentados com DH (Grupo 2) ApoE^{-/-} alimentados com DC (Grupo 3) e ApoE^{-/-} alimentados com DH (Grupo 4).

Estes animais foram sacrificados de acordo com os protocolos aprovados no comitê de ética e tiveram a região do arco aórtico coletados e as CMLV isoladas em cultura primária, conforme já descrito em métodos. Na ATS, sabe-se que há diminuição da expressão dos marcadores clássicos de diferenciação de músculo liso, amplamente descritos na literatura, como alfa actina de músculo liso, cadeia pesada de miosina (MHC – *Myosin Heavy Chains*), Calponina e SM22 alfa. O mecanismo pelo qual esta resposta acontece ainda não está claro.⁽¹⁰⁾ A tabela 3 demonstra os valores médios ajustados e intervalo de confiança de 95% para os níveis de expressão de MHC, Calponina, SM22 alfa e alfa actina, segundo a linhagem do animal e dieta consumida.

Tabela 3. Níveis de expressão de cadeia pesada de miosina, calponina, SM22 alfa e alfa actina, segundo a linhagem do animal e dieta consumida

Expressão	Linhagem C57		Linhagem ApoE	
	Dieta controle média estimada (IC 95%)	Dieta hiperlipidêmica média estimada (IC 95%)	Dieta controle média estimada (IC 95%)	Dieta hiperlipidêmica média estimada (IC 95%)
MHC	0,538 (0,335; 0,864)	1,523 (1,012; 2,292)	1,060 (0,718; 1,566)	0,889 (0,578; 1,366)
Calponina	1,002 (0,654; 1,537)	1,071 (0,732; 1,568)	1,062 (0,725; 1,553)	0,744 (0,505; 1,097)
SM22 alfa	0,595 (0,381; 0,931)	0,741 (0,500; 1,097)	0,634 (0,438; 0,918)	0,717 (0,487; 1,056)
alfa actina	0,548 (0,340; 0,883)	0,936 (0,615; 1,425)	0,999 (0,677; 1,475)	0,873 (0,574; 1,329)

IC 95%: Intervalo de confiança de 95%.

Tabela 4. Testes para os efeitos de linhagem e de dieta nos níveis de expressão de cadeia pesada de miosina, calponina, SM22 alfa e alfa actina

Expressão	Efeito de linhagem Valor de p	Efeito de dieta Valor de p	Efeito de interação entre linhagem e dieta Valor de p
MHC	0,747	0,047	0,005
Calponina	0,447	0,474	0,295
SM22 alfa	0,940	0,404	0,815
Alfa actina	0,224	0,358	0,125

Tabela 5. Comparações entre dietas para cada linhagem e entre linhagens dentro de cada dieta para níveis de expressão de cadeia pesada de miosina

	Contraste	Valor de p
Linhagem C57	Dieta controle x dieta hiperlipidêmica	0,016
Linhagem ApoE	Dieta controle x dieta hiperlipidêmica	0,550
Dieta controle	Linhagem C57 x linhagem ApoE	0,105
Dieta hiperlipidêmica	Linhagem C57 x linhagem ApoE	0,177

Valor de p corrigido pelo método de Bonferroni sequencial.

Avaliando os níveis de expressão de MHC observamos (Tabela 4) que há efeito de interação entre linhagem e dieta ($p=0,005$) e que esta interação é dependente da dieta consumida $p=0,016$ (Tabela 5). Portanto, nas CMLV isoladas das aortas sem serem submetidas a quaisquer tratamentos, apenas o gene MHC foi suprarregulado no Grupo 2.

3.2.2 Análise do estado de diferenciação das células musculares lisas vasculares por qPCR (16 semanas de dieta)

Assim como no protocolo de 8 semanas, aortas dos animais alimentados por 16 semanas de dieta foram coletadas e isoladas em cultura. Após 3 ou 4 passagens obtivemos uma cultura homogênea de CMLV e novamente analisamos os genes de diferenciação.

As análises estatísticas geradas das amostras de CMLV do protocolo de 16 semanas demonstraram maiores níveis de expressão de MHC ($p=0,024$) e alfa actina ($p=0,034$) no grupo de animais ApoE^{-/-} independentemente da dieta consumida.

Para os níveis de expressão do gene calponina os animais ApoE^{-/-} apresentaram menor expressão quando comparados aos animais C57BL/6 ($p<0,001$).

Na avaliação do gene SM22 alfa, não foram evidenciadas diferenças estatísticas independentemente de gene ou dieta consumida. As tabelas 6, 7, 8 e 9 representam os dados discutidos.

Tabela 6. Níveis de expressão de cadeia pesada de miosina, calponina, SM22 alfa e alfa actina, segundo a linhagem do animal e dieta consumida

Expressão	Linhagem C57		Linhagem ApoE	
	Dieta controle Média estimada (IC 95%)	Dieta hiperlipidêmica Média estimada (IC 95%)	Dieta controle Média estimada (IC 95%)	Dieta hiperlipidêmica Média estimada (IC 95%)
MHC	0,907 (0,438; 1,875)	0,579 (0,294; 1,140)	1,897 (0,918; 3,924)	1,465 (0,681; 3,151)
Calponina	1,129 (0,617; 2,063)	1,497 (0,853; 2,627)	0,206 (0,113; 0,377)	0,824 (0,436; 1,556)
SM22 alfa	0,833 (0,482; 1,440)	0,705 (0,423; 1,174)	0,826 (0,478; 1,427)	1,135 (0,638; 2,020)
Alfa actina	1,231 (0,790; 1,917)	1,233 (0,816; 1,864)	1,975 (1,268; 3,077)	2,004 (1,256; 3,197)

IC 95%: Intervalo de confiança de 95%.

Tabela 7. Teste para os efeitos de linhagem e de dieta nos níveis de expressão de cadeia pesada de miosina, calponina, SM22 alfa e alfa actina

Expressão	Efeito de linhagem Valor de p	Efeito de dieta Valor de p	Efeito de interação entre linhagem e dieta Valor de p
MHC	0,024	0,339	0,798
Calponina	0,000	0,007	0,073
SM22 alfa	0,402	0,787	0,383
Alfa actina	0,034	0,971	0,978

Tabela 8. Níveis de expressão de cadeia pesada de miosina, calponina, SM22 alfa e alfa actina, segundo a linhagem dos animais

Expressão	Linhagem	
	C57 Média estimada (IC 95%)	ApoE Média estimada (IC 95%)
MHC	0,724 (0,441; 1,191)	1,667 (0,983; 2,826)
Calponina	1,300 (0,861; 1,963)	0,412 (0,266; 0,639)
SM22 alfa	0,766 (0,527; 1,114)	0,968 (0,650; 1,440)
Alfa actina	1,232 (0,910; 1,668)	1,989 (1,442; 2,745)

IC 95%: Intervalo de confiança de 95%.

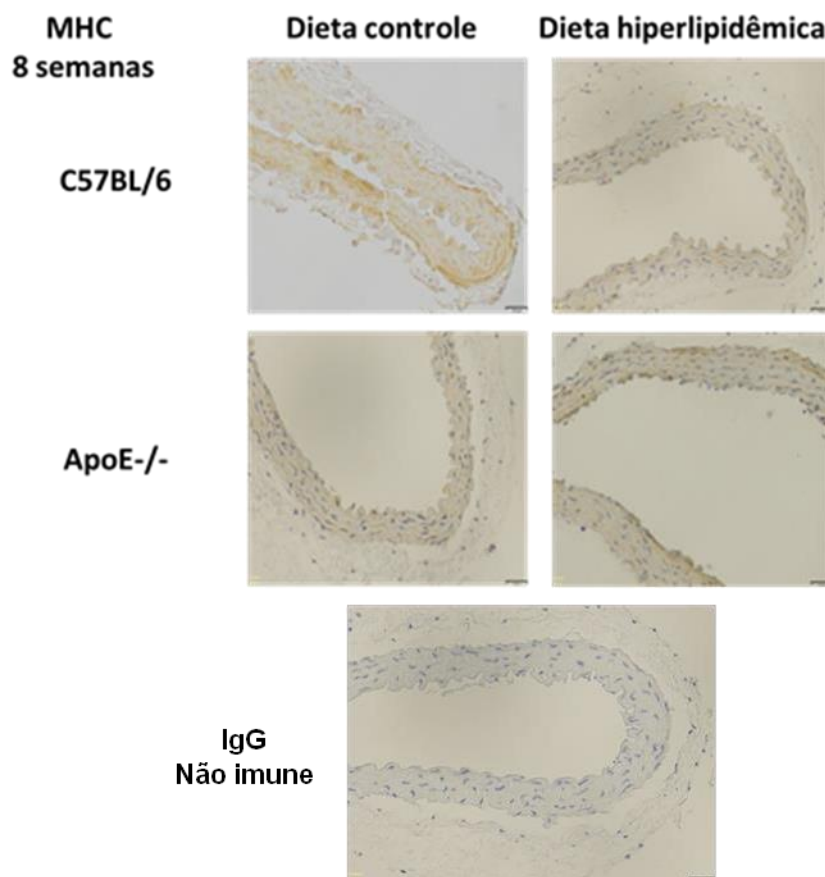
Tabela 9. Níveis de expressão de cadeia pesada de miosina, calponina, SM22 e alfa actina, segundo a dieta consumida pelos animais

Expressão	Dieta	
	Controle Média estimada (IC 95%)	Hiperlipidêmica Média estimada (IC 95%)
MHC	1,311 (0,785; 2,192)	0,921 (0,552; 1,536)
Calponina	0,482 (0,315; 0,739)	1,111 (0,726; 1,698)
SM22 alfa	0,829 (0,563; 1,221)	0,894 (0,609; 1,314)
Alfa actina	1,559 (1,140; 2,133)	1,572 (1,151; 2,147)

IC 95%: Intervalo de confiança de 95%.

3.2.3 Análise da diferenciação das células musculares lisas vasculares por imuno-histoquímica (8 semanas)

Para corroborar dados de qPCR, investigamos a expressão das proteínas em cortes histológicos dos 4 grupos de animais estudados. Para quantificar as marcações de IHQ as lâminas foram fotografadas, em média, cinco regiões aleatórias de cada aorta. As figuras 11, 12 e 13 representam a expressão das proteínas MHC, SM22 alfa e alfa actina.



Cortes representativos do arco aórtico dos diferentes grupos de animais e respectivas dietas. Os cortes foram contra corados com hematoxilina, marcação em marrom indicam expressão de MHC. Aumento de 20x. N: 3-4 por grupo.

Figura 11. Imuno-histoquímica para cadeia pesada de miosina de secções de aorta de camundongos de 8 semanas de dieta

Os percentuais de área marcada por MHC foram mensurados em 60 fotos de 13 animais no experimento de oito semanas. As análises da expressão de MHC foram feitas considerando efeito linhagem do animal e dieta recebida. A tabela 10 representa as médias dos valores mensurados para a proteína MHC. A tabela 11 representa os valores dos testes de efeito entre linhagem e dieta de área marcada por MHC.

Tabela 10. Níveis de expressão de cadeia pesada de miosina, segundo a dieta consumida e linhagem dos animais

Experimento	Linhagem C57		Linhagem ApoE	
	Dieta controle Média estimada (IC 95%)	Dieta hiperlipidêmica Média estimada (IC 95%)	Dieta controle Média estimada (IC 95%)	Dieta hiperlipidêmica Média estimada (IC 95%)
8 semanas	13,30 (7,89; 22,43)	14,60 (13,48;15,81)	11,29 (9,27; 13,74)	13,08 (8,88; 19,26)

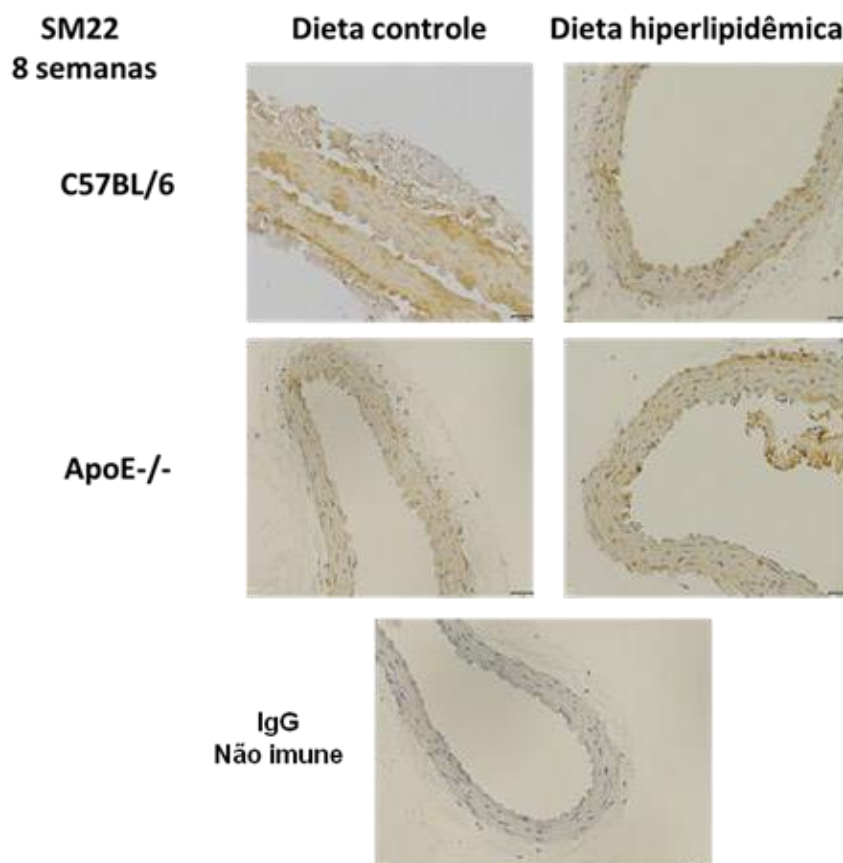
IC 95%: Intervalo de confiança de 95%.

Tabela 11. Testes para os efeitos de linhagem e de dieta nos percentuais de área marcada por cadeia pesada de miosina

Experimento	Efeito de linhagem Valor de p	Efeito de dieta Valor de p	Efeito de interação entre linhagem e dieta Valor de p
8 semanas	0,432	0,491	0,876

Não encontramos evidência de interação significativa entre dieta e linhagem ($p=0,876$). Além disso, não há evidências de que os percentuais de área marcada por MHC sejam diferentes entre as dietas consumidas ($p=0,491$) ou que difiram entre linhagens C57 e ApoE $-/-$ ($p=0,432$).

Portanto, os dados de IHQ não evidenciaram o aumento de expressão desta proteína nos animais do grupo 2 (assim como os dados de expressão gênica). Experimentos de mecanismos de regulação pós-transcricional poderiam explicar este achado.



Cortes representativos do arco aórtico dos diferentes grupos de animais e respectivas dietas. Os cortes foram contra corados com hematoxilina, marcação em marrom indicam expressão de SM22 alfa. Aumento de 20x. N: 3.

Figura 12. Imuno-histoquímica para SM22 alfa de seções de aorta de camundongos de 8 semanas de dieta

Os percentuais de área marcada por SM22 foram mensurados em 57 fotos de 12 animais no experimento de oito semanas. As análises foram realizadas, assim como na proteína MHC, considerando efeito linhagem do animal e dieta recebida. As tabelas 12 e 13 representam os dados encontrados nas IHQ para SM22 alfa.

Tabela 12. Percentuais de área marcada por SM22, segundo a linhagem do animal e dieta consumida

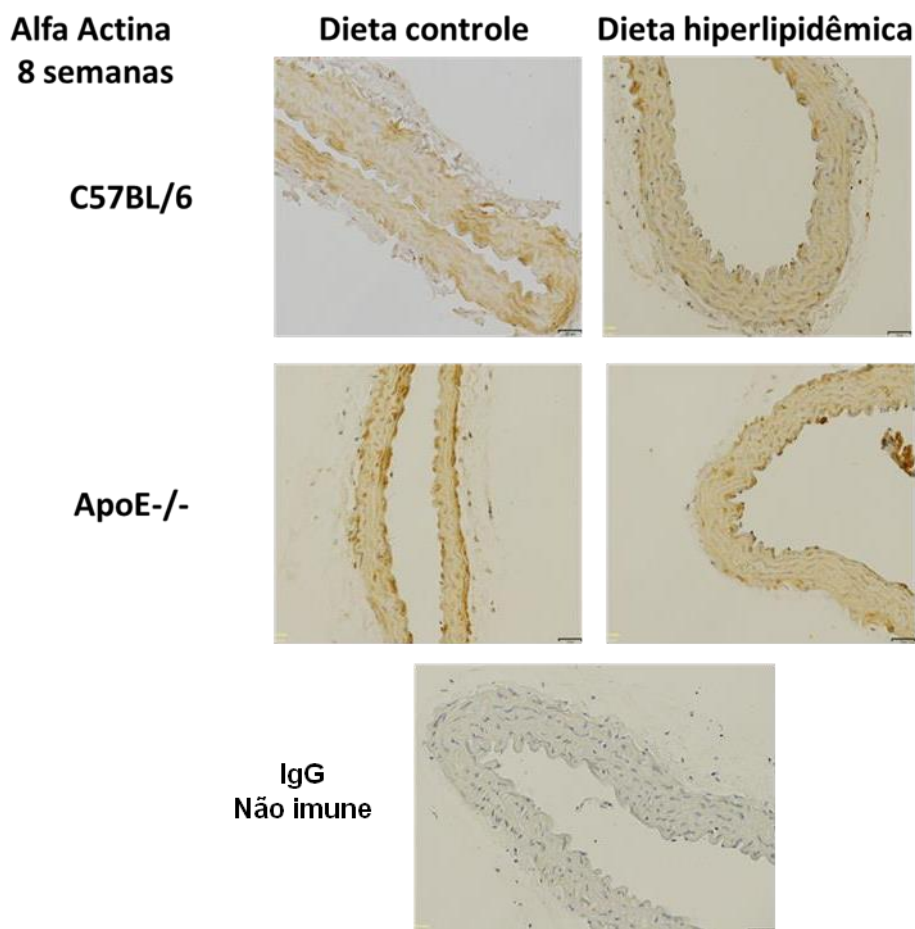
Experimento	Linhagem C57		Linhagem ApoE	
	Dieta controle Média estimada (IC 95%)	Dieta hiperlipidêmica Média estimada (IC 95%)	Dieta controle Média estimada (IC 95%)	Dieta hiperlipidêmica Média estimada (IC 95%)
8 semanas	24,35 (20,71; 28,64)	27,54 (24,93; 30,43)	14,84 (8,66; 25,42)	24,47 (20,96; 28,56)

IC 95%: Intervalo de confiança de 95%.

Tabela 13. Testes para os efeitos de linhagem e de dieta nos percentuais de área marcada por SM22

Experimento	Efeito de linhagem Valor de p	Efeito de dieta Valor de p	Efeito de interação entre linhagem e dieta Valor de p
8 semanas	0,042	0,039	0,212

Na avaliação de porcentagem de marcação da proteína SM22 nos animais de oito semanas de dieta, não encontramos evidência de interação significativa entre dieta e linhagem ($p=0,212$). Observamos evidências de efeito significativo de linhagem dos animais, onde animais ApoE^{-/-} apresentaram menores percentuais de área marcada por SM22 ($p=0,042$; diferença média estimada: -6,85; IC 95%: -12,73 a -0,97). Considerando a dieta consumida, animais que receberam DH apresentaram maiores percentuais de área marcada ($p=0,039$; diferença média estimada: 6,95; IC 95%: 1,10 a 12,80).



Cortes representativos do arco aórtico dos diferentes grupos de animais e respectivas dietas. Os cortes foram contra corados com hematoxilina, marcação em marrom indicam expressão de alfa actina. Aumento de 20x. N: 3.

Figura 13. Imuno-histoquímica para alfa actina de secções de aorta de camundongos de 8 semanas de dieta

Os percentuais de área marcada por alfa-Actina foram mensurados em 55 fotos de 12 animais no experimento de oito semanas de dieta. Assim como as demais proteínas, as mesmas análises foram consideradas para alfa actina, conforme tabelas 14 e 15 abaixo.

Tabela 14. Percentuais de área marcada por alfa actina, segundo a linhagem do animal e dieta consumida

Experimento	Linhagem C57		Linhagem ApoE	
	Dieta controle Média estimada (IC 95%)	Dieta hiperlipidêmica Média estimada (IC 95%)	Dieta controle Média estimada (IC 95%)	Dieta hiperlipidêmica Média estimada (IC 95%)
8 semanas	26,62 (22,86; 30,37)	28,38 (22,97; 33,80)	20,02 (13,28; 26,75)	27,82 (24,60; 31,04)

IC 95%: Intervalo de confiança de 95%.

Tabela 15. Testes para os efeitos de linhagem e de dieta nos percentuais de área marcada por alfa actina

Experimento	Efeito de linhagem Valor de p	Efeito de dieta Valor de p	Efeito de interação entre linhagem e dieta Valor de p
8 semanas	0,159	0,060	0,235

De acordo com os dados das tabelas acima, não encontramos evidência de interação significativa entre dieta e linhagem ($p=0,235$). Além disso, não há evidências de que os percentuais de área marcada por alfa actina sejam diferentes entre as dietas consumidas ($p=0,060$) ou que difiram entre linhagens C57BL/6 e ApoE^{-/-} ($p=0,159$).

3.2.4 Análise da diferenciação das células musculares lisas vasculares por imuno-histoquímica (16 semanas)

Para complementar os dados de expressão gênica, avaliamos as proteínas MHC, SM22 e alfa actina em secções de aortas de camundongos alimentados por 16 semanas de dieta. Observamos na figura 14 marcações para a proteína MHC. Os percentuais de área marcada por MHC foram mensurados em 53 fotos de 14 animais no experimento de 16 semanas de dieta. Os resultados foram apresentados por valores médios ajustados (Tabela 16) e por estimativas de efeito dos modelos ajustados (Tabela 17).

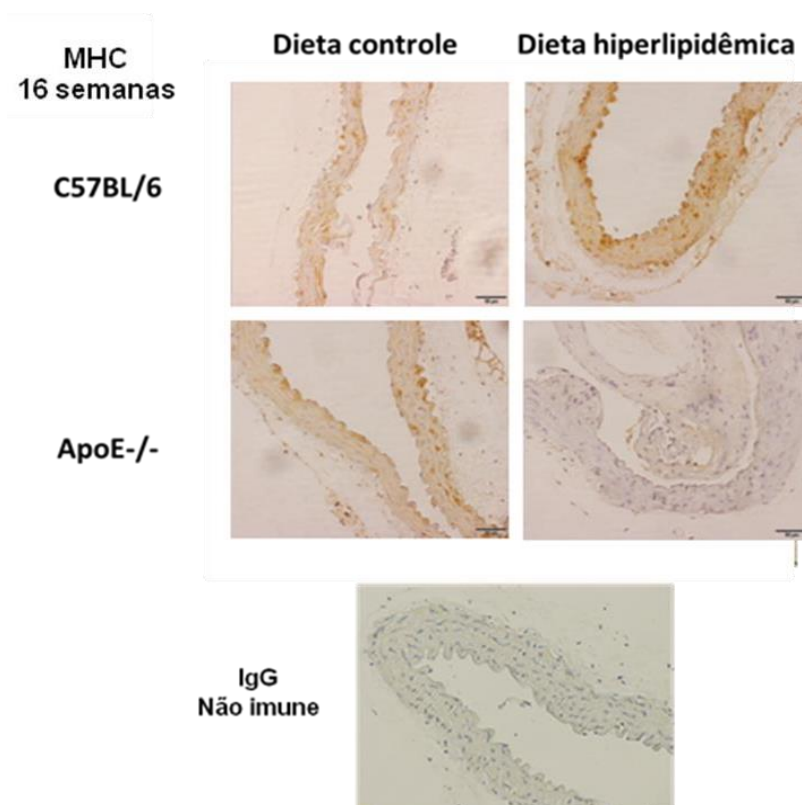
Tabela 16. Percentuais de área marcada por cadeia pesada de miosina, segundo a linhagem do animal e dieta consumida

Experimento	Linhagem C57		Linhagem ApoE	
	Dieta controle Média estimada (IC 95%)	Dieta hiperlipidêmica Média estimada (IC 95%)	Dieta controle Média estimada (IC 95%)	Dieta hiperlipidêmica Média estimada (IC 95%)
16 semanas	9,88 (8,26; 11,82)	10,80 (7,07; 16,49)	13,39 (10,28; 17,44)	9,30 (8,10; 10,67)

IC 95%: Intervalo de confiança de 95%.

Tabela 17. Testes para os efeitos de linhagem e de dieta nos percentuais de área marcada por cadeia pesada de miosina

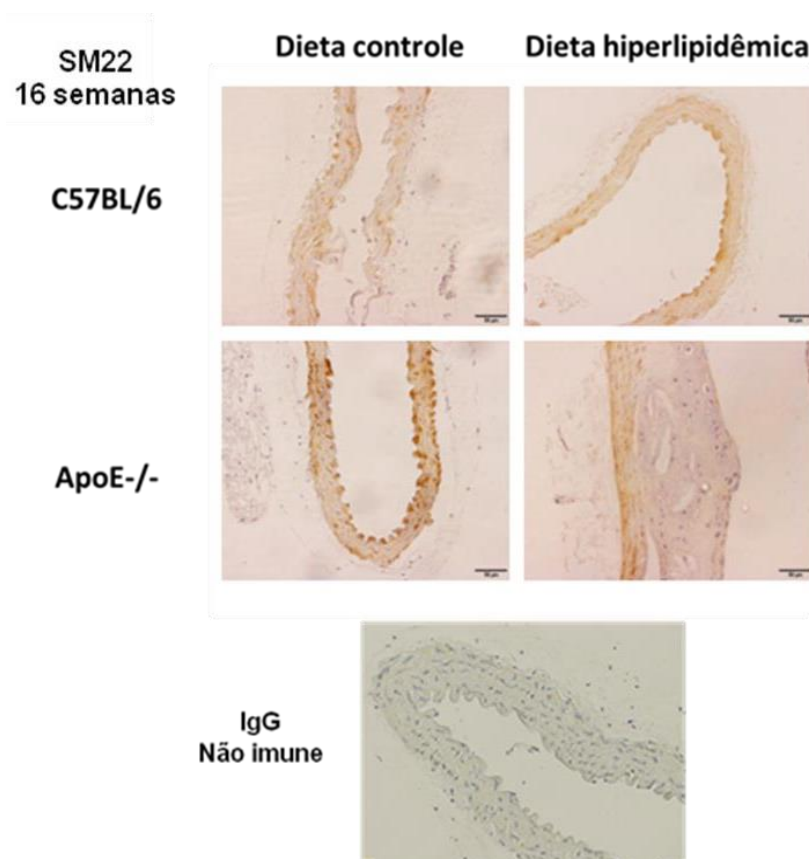
Experimento	Efeito de linhagem Valor de p	Efeito de dieta Valor de p	Efeito de interação entre linhagem e dieta Valor de p
16 semanas	0,581	0,325	0,105



Cortes representativos do arco aórtico dos diferentes grupos de animais e respectivas dietas. Os cortes foram contra corados com hematoxilina, marcação em marrom indicam expressão de MHC. Aumento de 20x. N: 3-4 por grupo.

Figura 14. Imuno-histoquímica para cadeia pesada de miosina de secções de aorta de camundongos de 16 semanas de dieta

Nas aortas de 16 semanas de dieta com marcações para a proteína MHC não foram observadas evidências de interação entre dieta e linhagem ($p=0,105$). Não foram encontradas evidências de efeitos significativos de dieta ($p=0,325$) ou de linhagem ($p=0,581$). Portanto, ao contrário dos dados de expressão gênica, não observamos aumento da proteína MHC no grupo de animais ApoE^{-/-} alimentados com DH. Mecanismos de regulação pós-transcricional provavelmente explicariam este achado.



Cortes representativos do arco aórtico dos diferentes grupos de animais e respectivas dietas. Os cortes foram contra corados com hematoxilina, marcação em marrom indicam expressão de SM22 alfa. Aumento de 20x. N: 3.

Figura 15. Imuno-histoquímica para SM22 alfa de secções de aorta de camundongos de 16 semanas de dieta

Os percentuais de área marcada por SM22 foram mensurados em 42 fotos de 12 animais no experimento de 16 semanas de dieta. Também avaliamos os resultados por valores médios ajustados (Tabela 18) e por estimativas de efeito dos modelos ajustados (Tabela 19).

Tabela 18. Percentuais de área marcada por SM22, segundo a linhagem do animal e dieta consumida

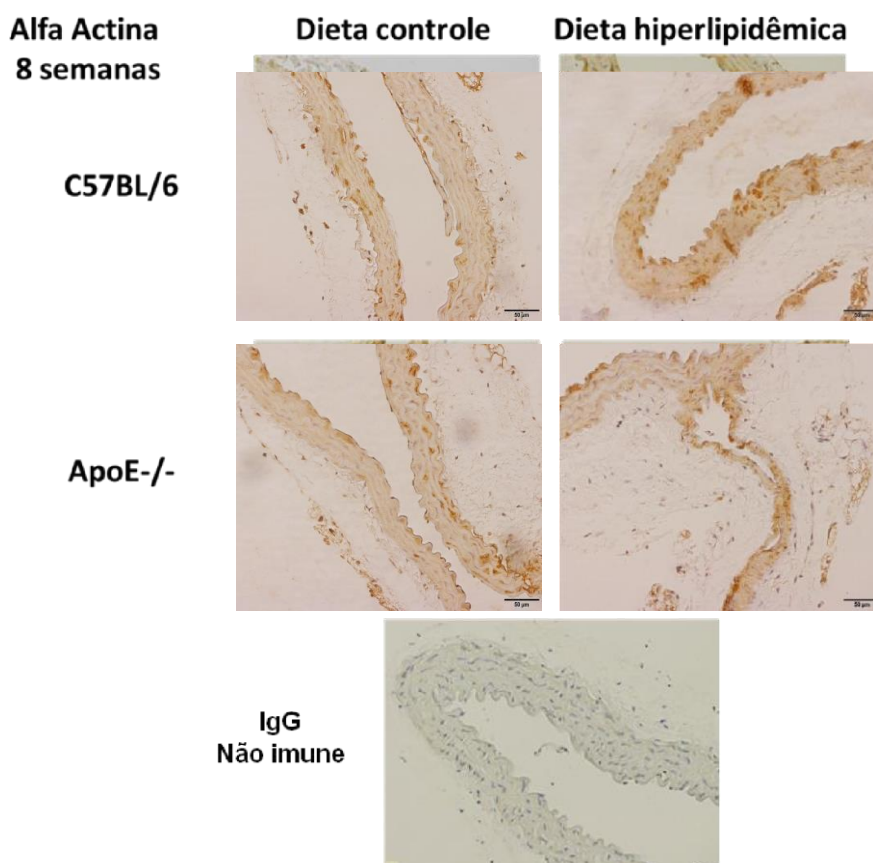
Experimento	Linhagem C57		Linhagem ApoE	
	Dieta controle Média estimada (IC 95%)	Dieta hiperlipidêmica Média estimada (IC 95%)	Dieta controle Média estimada (IC 95%)	Dieta hiperlipidêmica Média estimada (IC 95%)
16 semanas	10,40 (9,48; 11,33)	12,57 (6,47; 18,66)	19,84 (11,95; 27,73)	17,66 (13,15; 22,16)

IC 95%: Intervalo de confiança de 95%.

Tabela 19. Testes para os efeitos de linhagem e de dieta nos percentuais de área marcada por SM22

Experimento	Efeito de linhagem Valor de p	Efeito de dieta Valor de p	Efeito de interação entre linhagem e dieta Valor de p
16 semanas	0,009	0,998	0,437

Nas amostras de IHQ de 16 semanas marcadas para a proteína SM22, não foram observadas evidências de interação entre dieta e linhagem ($p=0,437$). Os animais ApoE^{-/-} apresentaram maior marcação para SM22 quando comparado aos animais C57BL/6 ($p=0,009$; diferença média estimada: 7,26; IC 95%: 1,78; 12,75), mas não entre as dietas consumidas pelos animais ($p=0,998$).



Cortes representativos do arco aórtico dos diferentes grupos de animais e respectivas dietas. Os cortes foram contra corados com hematoxilina, marcação em marrom indicam expressão de alfa actina. Aumento de 20x. N: 3.

Figura 16. Imuno-histoquímica para alfa actina de secções de aorta de camundongos de 16 semanas de dieta

Os percentuais de área marcada por alfa-Actina foram mensurados em 52 fotos de 12 animais neste experimento. As tabelas 20 e 21 representam as análises estatísticas realizadas.

Tabela 20. Percentuais de área marcada por alfa actina, segundo a linhagem do animal e dieta consumida

Experimento	Linhagem C57		Linhagem ApoE	
	Dieta controle Média estimada (IC 95%)	Dieta hiperlipidêmica Média estimada (IC 95%)	Dieta controle Média estimada (IC 95%)	Dieta hiperlipidêmica Média estimada (IC 95%)
16 semanas	16,41 (7,09; 25,73)	15,94 (7,53; 24,35)	23,43 (20,00; 26,86)	23,07 (17,38; 28,76)

IC 95%: Intervalo de confiança de 95%.

Tabela 21. Testes para os efeitos de linhagem e de dieta nos percentuais de área marcada por SM22

Experimento	Efeito de linhagem Valor de p	Efeito de dieta Valor de p	Efeito de interação entre linhagem e dieta Valor de p
16 semanas	0,052	0,910	0,988

Não foram observadas evidências de interação entre dieta e linhagem ($p=0,988$) na expressão da proteína alfa actina. Também não encontramos evidências de efeitos significativos de dieta ($p=0,910$) ou de linhagem ($p=0,052$). Portanto, ao contrário dos dados de qPCR, a proteína alfa actina não se apresentou aumentada nos animais ApoE^{-/-}.

3.3 Avaliação do fenótipo das células musculares lisas vasculares (protocolo de 8 semanas de dieta) após manipulação da sinalização de proteínas morfogenéticas ósseas

Como proposto no objetivo 2 deste trabalho, após o estabelecimento da cultura celular das CMLV dos 4 grupos de animais estudados, estas células foram tratadas com as proteínas recombinantes de BMP-2, BMP-4 (10ng/mL por 24 horas) ou Gremlin (25ng/mL por 24 horas), para posterior análise dos genes de diferenciação celular. A proteína recombinante Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas BB, (PDGF-BB – *Platelet-Derived Growth Factor BB*) (25ng/mL por 24 horas) foi utilizada com controle positivo da desdiferenciação.

Os genes MHC, calponina, SM22 e alfa actina foram avaliados quanto às suas variáveis explicativas: linhagem do animal e dieta consumida, além da interação linhagem-dieta.

3.3.1 Cadeia Pesada de Miosina

Na análise de expressão do gene MHC segundo linhagem dos animais (Tabela 22) observamos que apenas o tratamento com PDGF-BB foi efetivo para a redução da expressão deste gene nos animais C57BL/6.

Tabela 22. Níveis de expressão de cadeia pesada de miosina segundo a linhagem dos animais

	Linhagem C57	Linhagem ApoE
Tratamento <i>in vitro</i>	Média estimada (IC 95%)	Média estimada (IC 95%)
Controle	1,534 (0,907; 2,596)	1,107 (0,662; 1,851)
BMP-2	0,925 (0,469; 1,822)	1,207 (0,678; 2,149)
BMP-4	1,208 (0,650; 2,245)	0,822 (0,377; 1,793)
Gremlin	0,905 (0,636; 1,288)	0,482 (0,328; 0,708)
PDGF-BB	0,343 (0,217; 0,542)	1,010 (0,447; 2,280)
Contraste	Valor de p	Valor de p
Controle x BMP-2	>0,999	>0,999
Controle x BMP-4	>0,999	>0,999
Controle x Gremlin	0,932	0,285
Controle x PDGF-BB	0,036	>0,999

Valores de p corrigidos pelo método de Bonferroni sequencial.

Em relação à dieta consumida, o tratamento com Gremlin recombinante reduziu a expressão da MHC nos animais que foram alimentados com DC (Tabela 23).

Tabela 23. Níveis de expressão de cadeia pesada de miosina segundo a dieta recebida pelos animais

	Dieta controle	Dieta hiperlipidêmica
Tratamento <i>in vitro</i>	Média estimada (IC 95%)	Média estimada (IC 95%)
Controle	1,747 (1,064; 2,871)	0,972 (0,565; 1,672)
BMP-2	0,805 (0,364; 1,777)	1,387 (0,853; 2,257)
BMP-4	0,869 (0,415; 1,819)	1,143 (0,603; 2,166)
Gremlin	0,270 (0,192; 0,381)	1,612 (1,088; 2,390)
PDGF-BB	0,544 (0,292; 1,016)	0,636 (0,306; 1,324)
Contraste	Valor de p	Valor de p
Controle x BMP-2	0,517	>0,999
Controle x BMP-4	0,553	>0,999
Controle x Gremlin	0,007	0,553
Controle x PDGF-BB	0,080	>0,999

Valores de p corrigidos pelo método de Bonferroni sequencial.

3.3.2 Calponina

Observamos que os tratamentos com Gremlin ($p=0,001$) ou PDGFBB ($p<0,001$) reduziram a expressão de calponina nas CMLV de animais ApoE^{-/-} (Tabela 24).

Tabela 24. Níveis de expressão de calponina segundo a linhagem dos animais

	Linhagem C57	Linhagem ApoE ^{-/-}
Tratamento <i>in vitro</i>	Média estimada (IC 95%)	Média estimada (IC 95%)
Controle	1,222 (0,709; 2,108)	2,044 (1,365; 3,060)
BMP-2	1,123 (0,686; 1,838)	1,124 (0,723; 1,746)
BMP-4	0,576 (0,428; 0,777)	1,143; (0,581; 2,246)
Gremlin	0,542 (0,325; 0,902)	0,430 (0,269; 0,688)
PDGF-BB	1,783 (1,090; 2,917)	0,130 (0,078; 0,216)
Contraste	Valor de p	Valor de p
Controle x BMP-2	0,822	0,367
Controle x BMP-4	0,367	0,367
Controle x Gremlin	0,367	0,001
Controle x PDGF-BB	0,638	<0,001

Valores de p corrigidos pelo método de Bonferroni sequencial.

Da mesma forma, os tratamentos com Gremlin ($p=0,010$) ou PDGF-BB ($p=0,002$) foram efetivos na redução deste gene nas CMLV dos animais alimentados com DH (Tabela 25).

Tabela 25. Níveis de expressão de calponina segundo a dieta recebida pelos animais

	Dieta controle	Dieta hiperlipidêmica
Tratamento <i>in vitro</i>	Média estimada (IC 95%)	Média estimada (IC 95%)
Controle	1,389 (0,819; 2,356)	1,798 (1,164; 2,778)
BMP-2	1,012 (0,680; 1,506)	1,247 (0,754; 2,064)
BMP-4	0,869 (0,553; 1,367)	0,758 (0,438; 1,310)
Gremlin	0,486 (0,281; 0,840)	0,479 (0,310; 0,742)
PDGF-BB	0,730 (0,458; 1,163)	0,316 (0,183; 0,548)
Contraste	Valor de p	Valor de p
Controle x BMP-2	0,664	0,664
Controle x BMP-4	0,664	0,127
Controle x Gremlin	0,127	0,010
Controle x PDGF-BB	0,440	0,002

Valores de p corrigidos pelo método de Bonferroni sequencial.

3.3.3 SM22 alfa

A expressão gênica da SM22 alfa foi reduzida nas CMLV dos animais C57BL/6 tratadas com BMP4. Já nas CMLV dos animais ApoE^{-/-} observamos redução na expressão gênica após tratamento com BMP4 (p=0,010), Gremlin (p=0,004) e PDGF-BB (p<0,001). Estes dados estão demonstrados na tabela 26.

Tabela 26. Níveis de expressão de SM22 alfa segundo a linhagem dos animais

	Linhagem C57	Linhagem ApoE ^{-/-}
Tratamento <i>in vitro</i>	Média estimada (IC 95%)	Média estimada (IC 95%)
Controle	1,115 (0,700; 1,774)	1,315 (0,876; 1,973)
BMP-2	0,671 (0,474; 0,951)	1,112 (0,724; 1,708)
BMP-4	0,321 (0,205; 0,502)	0,436 (0,327; 0,580)
Gremlin	0,431 (0,235; 0,791)	0,314 (0,177; 0,559)
PDGF-BB	0,837 (0,554; 1,265)	0,131 (0,082; 0,207)
Contraste	Valor de p	Valor de p
Controle x BMP-2	0,379	0,764
Controle x BMP-4	0,019	0,010
Controle x Gremlin	0,084	0,004
Controle x PDGF-BB	0,764	<0,001

Valores de p corrigidos pelo método de Bonferroni sequencial.

Também observamos diminuição na expressão de SM22 nos animais alimentados com DC após tratamento com BMP4 (p<0,001), Gremlin (p=0,001) e PDGF-BB (p<0,001). Nos animais alimentados com DH houve redução na expressão gênica apenas quando as CMLV foram tratadas com PDGF-BB (p=0,047) conforme tabela 27.

Tabela 27. Níveis de expressão de SM22 alfa segundo a dieta recebida pelos animais

	Dieta controle	Dieta hiperlipidêmica
Tratamento <i>in vitro</i>	Média estimada (IC 95%)	Média estimada (IC 95%)
Controle	1,245 (0,879; 1,763)	1,178 (0,716; 1,938)
BMP-2	0,770 (0,521; 1,138)	0,969 (0,635; 1,478)
BMP-4	0,318 (0,237; 0,426)	0,440 (0,275; 0,702)
Gremlin	0,323 (0,160; 0,652)	0,419 (0,258; 0,680)
PDGF-BB	0,296 (0,190; 0,460)	0,370 (0,239; 0,573)
Contraste	Valor de p	Valor de p
Controle x BMP-2	0,156	0,568
Controle x BMP-4	<0,001	0,066
Controle x Gremlin	0,001	0,066
Controle x PDGF-BB	<0,001	0,047

Valores de p corrigidos pelo método de Bonferroni sequencial.

3.3.4 Alfa actina

Os níveis de alfa actina foram reduzidos nas CMLV de animais C57BL/6 após tratamento com BMP4 ($p=0,020$) ou PDGF-BB ($p<0,001$). Nas células provenientes de animais ApoE^{-/-}, houve diminuição da expressão gênica após tratamento com BMP4 ($p=0,015$), Gremlin ($p<0,001$) ou PDGF-BB ($p<0,001$) conforme tabela 28.

Tabela 28. Valores médios ajustados e intervalos de confiança de 95% para os níveis de expressão de alfa actina segundo a linhagem dos animais

	Linhagem C57	Linhagem ApoE ^{-/-}
Tratamento <i>in vitro</i>	Média estimada (IC 95%)	Média estimada (IC 95%)
Controle	1,245 (0,924; 1,678)	1,753 (1,229; 2,502)
BMP-2	0,930 (0,660; 1,311)	1,590 (1,058; 2,392)
BMP-4	0,534 (0,294; 0,968)	0,639 (0,361; 1,130)
Gremlin	0,701 (0,286; 1,719)	0,403 (0,207; 0,787)
PDGF-BB	0,568 (0,350; 0,922)	0,170 (0,083; 0,348)
Contraste	Valor de p	Valor de p
Controle x BMP-2	0,432	0,723
Controle x BMP-4	0,020	0,015
Controle x Gremlin	0,432	<0,001
Controle x PDGF-BB	0,020	<0,001

Valores de p corrigidos pelo método de Bonferroni sequencial.

A expressão da alfa actina também foi reduzida nas CMLV de animais alimentados com DC e tratadas com BMP4 ($p=0,033$) e PDGF-BB ($p=0,001$).

Nas CMLV de animais alimentados com DH, a redução deste gene foi observada após tratamento com BMP4 ($p=0,014$), Gremlin ($p=0,009$) e PDGF-BB ($p<0,001$) (Tabela 29).

Tabela 29. Níveis de expressão de alfa actina segundo a dieta recebida pelos animais

	Dieta controle	Dieta hiperlipidêmica
Tratamento <i>in vitro</i>	Média estimada (IC 95%)	Média estimada (IC 95%)
Controle	1,288 (1,058; 1,569)	1,695 (1,112; 2,583)
BMP-2	1,043 (0,815; 1,335)	1,419 (0,869; 2,315)
BMP-4	0,676 (0,386; 1,182)	0,505 (0,274; 0,931)
Gremlin	0,633 (0,251; 1,600)	0,447 (0,236; 0,847)
PDGF-BB	0,388 (0,192; 0,785)	0,248 (0,141; 0,436)
Contraste	Valor de p	Valor de p
Controle x BMP-2	0,369	0,586
Controle x BMP-4	0,033	0,014
Controle x Gremlin	0,134	0,009
Controle x PDGF-BB	<0,001	<0,001

Valores de p corrigidos pelo método de Bonferroni sequencial.

Em resumo, podemos observar os efeitos dos tratamentos *in vitro* nas CMLV na figura 17, onde está representado de forma colorimétrica os efeitos de BMP4, Gremlin e PDGF-BB em CMLV obtidas de camundongos de 8 semanas de dieta. O tratamento com BMP2 não foi representado na tabela, pois ao contrário do que esperávamos, esta isoforma não modulou a expressão dos genes avaliados. A eficiência dos tratamentos foi representada pela intensidade das cores. Os dados representam o número de vezes da expressão gênica reduzida comparada com seu respectivo controle. Todos os dados apresentados na tabela foram significativamente estatísticos.

	Tratamentos											
	BMP4				Gremlin				PDGF-BB			
	linhagem		dieta		linhagem		dieta		linhagem		dieta	
	C57	ApoE	controle	Hiperlip	C57	ApoE	controle	Hiperlip	C57	ApoE	controle	Hiperlip
MHC							-6,5 X		-4,5 X			
Calponina						-4,8 X		-3,7 X		-15,7 X		-5,7 X
SM22	-3,5 X	-3, X	-3,9 X			-4,2 X	-3,9 X			-10, X		-3,2 X
Alfa actina	-2,3 X	-2,7 X	-1,9 X	-3,4 X		-4,3 X		-3,8 X	-2,2 X	-10,3 X	-3,3 X	-6,8 X

Cores representam a intensidade da redução dos genes avaliados após tratamentos *in vitro*.

Figura 17. Mapa colorimétrico representativo da eficiência dos tratamentos realizados nas CMLV de 8 semanas

3.4 Avaliação do fenótipo das células musculares lisas vasculares (protocolo de 16 semanas de dieta) após manipulação da sinalização de proteínas morfogenéticas ósseas

Devido à variabilidade encontrada na expressão gênica entre amostras de um mesmo grupo, foram realizados testes para validar os efeitos de tratamento *in vitro*, controlado por linhagem e dieta. Para isso, a expressão de MHC, Calponina, SM22 alfa e alfa actina em CMLV após os animais serem alimentados por 16 semanas foi avaliada.

Apenas para o gene MHC foi possível observar efeito de interação entre linhagem e tratamento *in vitro* ($p < 0,001$), ou seja, há evidências de que o efeito do tratamento *in vitro* dependa da linhagem dos animais (Tabela 30).

Para os demais desfechos não observamos evidências de efeito de interação significativa entre linhagem e tratamento *in vitro* nos níveis de expressão de Calponina ($p = 0,667$), de SM22 alfa ($p = 0,888$) e de alfa actina ($p = 0,331$). Também não encontramos evidências de efeito de interação significativa entre dieta e tratamento *in vitro* nos níveis de expressão de Calponina ($p = 0,598$), de SM22 alfa ($p = 0,328$) e de alfa actina ($p = 0,811$). Nestes desfechos os resultados foram apresentados por valores médios ajustados pelos modelos para cada nível do efeito de tratamento *in vitro*.

Tabela 30. Níveis de expressão de cadeia pesada de miosina segundo a linhagem dos animais

	Linhagem C57	Linhagem ApoE ^{-/-}
Tratamento <i>in vitro</i>	Média estimada (IC 95%)	Média estimada (IC 95%)
Controle	1,316 (0,534; 3,247)	1,037 (0,524; 2,050)
BMP-2	0,295 (0,168; 0,520)	3,922 (1,793; 8,578)
BMP-4	0,484 (0,294; 0,797)	2,269 (1,056; 4,876)
Gremlin	0,550 (0,238; 1,267)	1,193 (0,510; 2,790)
PDGF-BB	0,495 (0,166; 1,475)	0,301 (0,132; 0,688)
Contraste	Valor de p	Valor de p
Controle x BMP-2	0,382	0,218
Controle x BMP-4	0,535	0,395
Controle x Gremlin	0,535	0,804
Controle x PDGF-BB	0,535	0,218

Valores de p corrigidos pelo método de Bonferroni sequencial.

Tabela 31. Níveis de expressão de calponina segundo o tratamento *in vitro*

Tratamento <i>in vitro</i>	Média estimada (IC 95%)
Controle	1,090 (0,684; 1,737)
BMP-2	0,930 (0,611; 1,414)
BMP-4	1,223 (0,749; 1,995)
Gremlin	0,442 (0,291; 0,671)
PDGF-BB	0,164 (0,096; 0,280)
Contraste	Valor de p
Controle x BMP-2	>0,999
Controle x BMP-4	>0,999
Controle x Gremlin	0,056
Controle x PDGF-BB	0,002

Valores de p corrigidos pelo método de Bonferroni sequencial.

Tabela 32. Níveis de expressão de SM22 alfa segundo o tratamento *in vitro*

Tratamento <i>in vitro</i>	Média estimada (IC 95%)
Controle	0,981 (0,653; 1,474)
BMP-2	1,484 (0,953; 2,312)
BMP-4	0,900 (0,583; 1,389)
Gremlin	0,621 (0,387; 0,995)
PDGF-BB	0,368 (0,198; 0,685)
Contraste	Valor de p
Controle x BMP-2	0,462
Controle x BMP-4	0,777
Controle x Gremlin	0,462
Controle x PDGF-BB	0,036

Valores de p corrigidos pelo método de Bonferroni sequencial

Tabela 33. Níveis de expressão de alfa actina segundo o tratamento *in vitro*

Tratamento <i>in vitro</i>	Média estimada (IC 95%)
Controle	1,723 (1,219; 2,436)
BMP-2	2,297 (1,593; 3,312)
BMP-4	1,798 (1,255; 2,575)
Gremlin	1,206 (0,767; 1,895)
PDGF-BB	0,828 (0,409; 1,675)
Contraste	Valor de p
Controle x BMP-2	0,629
Controle x BMP-4	0,868
Controle x Gremlin	0,629
Controle x PDGF-BB	0,143

Valores de p corrigidos pelo método de Bonferroni sequencial.

Para facilitar a compreensão dos resultados obtidos em 16 semanas de dieta, também elaboramos um mapa representado de forma colorimétrica a eficácia

dos tratamentos utilizados (Figura 18). Os dados representam o número de vezes da expressão gênica reduzida comparada com seu respectivo controle. Todos os dados apresentados na tabela foram significativamente estatísticos.

	Tratamentos											
	BMP4				GREMLIN				PDGF-BB			
	linhagem		dieta		linhagem		dieta		linhagem		dieta	
	C57	ApoE	Controle	hiperlp	C57	ApoE	Controle	hiperlp	C57	ApoE	controle	hiperlp
MHC												
Calponina									-6,6 x			
SM22									-2,7 X			
Alfa Actina												

Cores representam a intensidade da redução dos genes avaliados após tratamentos *in vitro*.

Figura 18. Mapa colorimétrico representativo da eficiência dos tratamentos realizados nas CMLV de 16 semanas

Observamos que após 16 semanas de dieta, apenas o controle positivo da desdiferenciação PDGF-BB, foi capaz de reduzir a expressão dos genes Calponina e SM22 de maneira menos intensa quando comparado com dados de 8 semanas de dieta (Figura 17). Concluimos que as CMLV coletadas de animais de 16 semanas de dieta já partiram de um estado desdiferenciado, pois até mesmo nosso controle positivo teve sua eficácia reduzida.

4 DISCUSSÃO

Neste estudo avaliamos a desdiferenciação de CMLV em modelo murino de ATS. Os dados obtidos permitiriam esclarecer as mudanças fenotípicas dessas células e assim, melhorar a compreensão da progressão da doença vascular. Observamos BMP4 influenciando a expressão de dois genes no estágio precoce da ATS. Além disso, Gremlin agiu independentemente da via das BMPs, potencializando a desdiferenciação das CMLV. As análises histológicas documentaram dois momentos importantes da doença, evidenciando que nosso modelo estava ajustado conforme esperado na literatura. O tratamento por 8 semanas de dieta (Figura 5) reflete o período inicial da doença, portanto sem formação de placa, mas com alterações histológicas incipientes.⁽³⁾ Já a análise dos cortes histológicos após 16 semanas de dieta (Figura 6) mostra placas ateroscleróticas bem estabelecidas nos animais do grupo 4, onde grande parte da luz do vaso já está ocupada pelo espessamento da camada média e formação do centro necrótico. Neste estágio da doença, as CMLV passam a exercer funções distintas às aquelas habituais, deixando o estado quiescente (com baixa proliferação) e migrando e proliferando para a região da capa fibrosa da placa.^(3,34)

Na avaliação da expressão dos genes responsáveis pela diferenciação das CMLV proveniente de animais com 8 semanas de dieta o gene MHC teve sua expressão aumentada nos animais C57BL/6 alimentados com DH (grupo 2). Este achado não foi observado na análise da expressão proteica da MHC. Mecanismos de regulação pós-transcricionais poderiam explicar os achados deste estudo. Ainda no grupo de 8 semanas de dieta, observamos redução da proteína SM22 nos animais ApoE^{-/-}, independentemente da dieta consumida. Este resultado corrobora dados encontrados na literatura.^(35,36) A proteína alfa actina manteve-se homogênea entre os grupos avaliados. Curiosamente, quando analisamos a proteína SM22, considerando a dieta consumida os animais que foram alimentados com DH apresentaram aumento da proteína SM22. Acreditamos que este achado é resultado da técnica usada para quantificar as amostras que será discutido posteriormente. A literatura demonstra que fatores hormonais como a angiotensina II e vasopressina regulam positivamente alguns dos genes marcadores de músculo liso, como a alfa actina e SM22, além de influenciar na proliferação e hipertrofia celular.^(37,38) Song et al. analisaram em CMLV humanas a expressão de TLR4 (*Toll-like receptor 4*) e desdiferenciação via ox-LDL. Quando as

CMLV humanas tiveram TLR4 silenciado *in vitro*, a expressão de marcadores como alfa actina, SM22 e miocardina foi aumentada.⁽³⁹⁾ Também de acordo com a literatura, o cultivo de CMLV isoladas, assim como o excesso do número de passagens, são condições que influenciam na plasticidade celular.⁽³⁴⁾ Acreditamos que mesmo mantendo padrão homogêneo de passagens para realização dos experimentos (passagens 4 e 5), esta variável possa interferir em nossos dados deixando os quatro grupos avaliados em estágios semelhantes e mais adiantados de desdiferenciação. Dong et al. demonstraram a desdiferenciação de CMLV de ratos em cultura. As células mantidas em cultura por 15 dias tiveram a expressão dos marcadores SM22, calponina e alfa actina reduzidos em aproximadamente 50% quando comparado ao dia zero sem serem submetidas a quaisquer tratamentos.⁽⁴⁰⁾

Os dados de expressão gênica do grupo de 16 semanas de dieta demonstraram em CMLV dos animais ApoE^{-/-} (independentemente da dieta consumida), ao contrário do que já foi relatado por outros autores na literatura, aumento da expressão dos genes MHC e alfa actina. A literatura demonstra que em resposta ao ambiente inflamatório as CMLV produzem TGF- β 1, que por sua vez é capaz de sinalizar mecanismos intracelulares que aumentam a síntese dos genes MHC e Alfa actina.⁽²³⁾ Essa resposta poderia estar acontecendo em nosso modelo animal. Nesse mesmo grupo de animais a expressão gênica da calponina foi reduzida, dado que condiz a literatura.⁽¹⁰⁾ A análise proteica dos animais submetidos a 16 semanas de dieta revelaram apenas o aumento da proteína SM22 também nos animais ApoE^{-/-} independentemente da dieta consumida. Analisando o padrão de marcação nas lâminas destes animais (Figura 15), claramente no grupo de animais ApoE^{-/-} alimentados com DH percebemos maior intensidade de marcação nas CMLV localizadas na camada média, e mínima reatividade de marcação na placa aterosclerótica. Portanto, embora os dados estatísticos não demonstrem desdiferenciação, a análise histológica qualitativa demonstra a heterogeneidade da doença aterosclerótica. As CMLV que migraram para a placa apresentaram baixa marcação dos genes de interesse.

Na análise de quantificação por *pixels*, as camadas que compõe o vaso são avaliadas em conjunto, desta forma essa técnica se mostrou incapaz de revelar as alterações pontuais no componente vascular. Publicações em revistas de alto impacto também relatam situações semelhantes ao quantificar o vaso como um todo, mesmo evidenciando diferenças na intensidade de marcação na IHQ, a técnica empregada não foi capaz de refletir as diferenças encontradas na análise individual.⁽⁴¹⁾ Para confirmar

esta possibilidade, teríamos de reavaliar estas lâminas considerando as diferentes regiões do vaso e da placa aterosclerótica. Técnicas mais requintadas e complexas que vão além do escopo desse trabalho, como microscopia de dissecação a laser e qPCR com pré-amplificação,⁽⁴²⁾ poderiam trazer dados mais robustos. Serhatli et al. utilizaram a microscopia de dissecação a laser para avaliar degeneração de MEC em amostras coletadas de aneurisma de aorta. Foi possível demonstrar diferenças de expressão proteica de alguns elementos de matriz após seleção da região afetada.⁽⁴³⁾

Por outro lado, poderíamos tentar compreender estes achados realizando experimentos de controle pós-transcricional avaliando, por exemplo, a expressão de alguns microRNAs já descritos como reguladores das mudanças fenotípicas das CMLV.⁽⁴⁴⁻⁴⁶⁾ Outro caminho a ser explorado poderia ser avaliação do acúmulo de MEC. Em recente publicação, Bennet et al. mencionam mudanças fenotípicas das CMLV relacionado com a presença de MEC. De um modo geral, a presença de MEC suprime as mudanças fenotípicas das CMLV. Já a degradação de MEC por metaloproteinasas liberadas a partir de macrófagos e CMLV promoveria a desdiferenciação, facilitando assim a proliferação e migração destas células.⁽¹⁸⁾ Dados anteriores na literatura já demonstravam a importância da elastina (componente de MEC) na diferenciação das CMLV. Foi observado em modelos de camundongos nocaute para elastina indução de proliferação de CMLV, contribuindo para doença arterial obstrutiva.⁽⁴⁷⁾ Uma investigação adicional sobre o acúmulo de componentes de MEC nestas amostras poderia ajudar na compreensão de nossos resultados.

Além disso, vem sendo discutido na literatura que mudanças fenotípicas destas células são dependentes, também, de sua origem progenitora.⁽⁴⁸⁾ Bennet et al. apontaram que diferentes origens embrionárias das CMLV podem até modular a capacidade de desenvolver ou não ATS. A natureza das transições fenotípicas destas células é a chave para o melhor entendimento da desdiferenciação no ambiente da ATS.⁽¹⁸⁾ Evidências sugerem que a heterogeneidade das células que compõem a camada média do vaso pode refletir no fenótipo e na variabilidade de suas funções.⁽⁴⁸⁾ Chappell et al., demonstraram que dependendo da localização das CMLV a perda destes marcadores pode ser mais ou menos evidente (pontual), variando, por exemplo, pelo *stress* local. Este dado corrobora nossos dados de IHQ em que evidenciamos intensidades de marcações não homogêneas, demonstrando diferença de estado de diferenciação entre as CMLV no vaso.

Também foi proposto neste trabalho avaliar a influência das BMPs nas CMLV. A análise destas células dos animais provenientes de 8 e 16 semanas de dieta sugere que o tratamento com a proteína recombinante BMP2 não foi capaz de alterar a expressão de genes de diferenciação destas células. A literatura demonstra que a proteína BMP2^(49,50) está envolvida na calcificação vascular, ativando genes relacionados à diferenciação de osteoblastos (por exemplo, RUNX2, MSX2), capazes de ativar vias de calcificação celular e consequentemente, desdiferenciando CMLV. É possível que tempo e/ou concentração utilizados em nosso modelo possam ser insuficientes para alcançar a desdiferenciação. Recente publicação demonstrou que BMP2 facilita a transição de CMLV de camundongos obesos para um perfil osteogênico. Porém, foi utilizada *in vitro* concentração 5 vezes maior de BMP2 que aquela por nós empregada.⁽⁵¹⁾

Nos dados de 8 semanas de dieta, o tratamento com a proteína recombinante BMP4 foi capaz de reduzir apenas a expressão dos genes SM22 e alfa actina. Na literatura, estes dois genes são descritos como marcadores precoces na diferenciação de CMLV durante a embriogênese.⁽²³⁾ As BMPs já foram descritas como essenciais para o controle de muitos processos do desenvolvimento embrionário e também no organismo adulto. Possivelmente essa relação justifique o fato de BMP4 agir apenas na sinalização destes dois marcadores. A isoformas BMP4 também foi relacionada na literatura com calcificação de placas ateroscleróticas, quimioatraentes de monócitos e até mesmo indutores da hipertensão arterial.^(32,52,53) Este achado aponta para mais uma maneira de participação dessa proteína na formação da placa aterosclerótica, contribuindo na modulação de CMLV. Dados deste laboratório (ainda não publicados) demonstraram aumento na expressão de BMP4 em placas ateroscleróticas de amostras humanas (doença vascular periférica). Outra particularidade deste achado é que BMP4 agiu tanto nas células dos animais selvagens (C57BL/6) quanto de animais propensos à doença aterosclerótica (ApoE^{-/-}), sugerindo que BMP4 seja capaz de agir nas CMLV independentemente da presença de ATS ou hiperlipidemia. Isso ocorreu de forma específica para os genes SM22 e alfa actina.

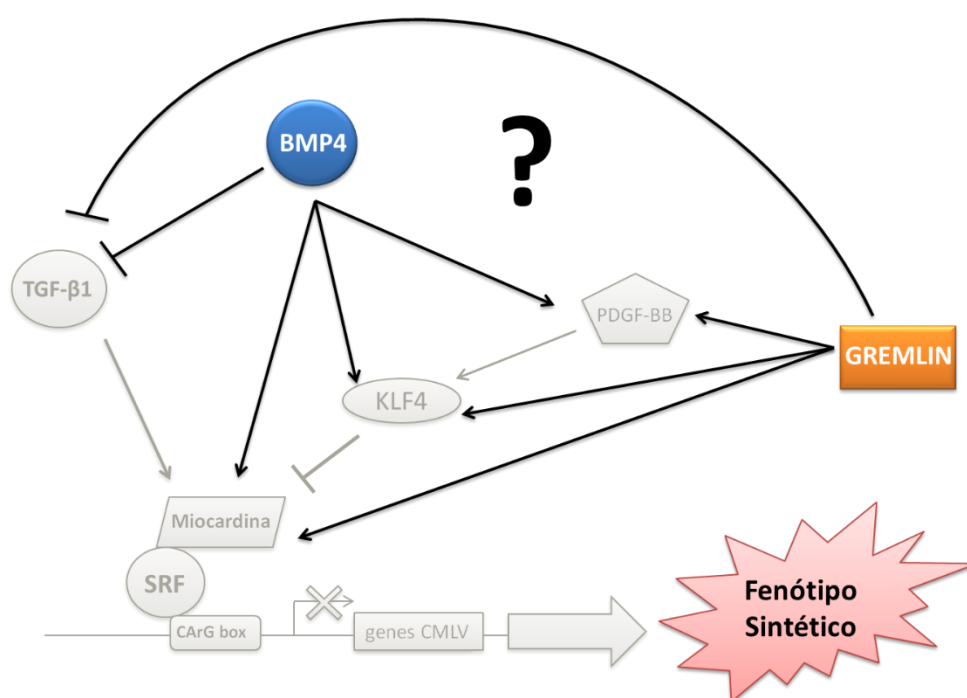
Nestas mesmas amostras também demonstramos que o antagonista das BMPs, Gremlin, foi capaz de reduzir a expressão dos quatro genes de diferenciação, agindo seletivamente nas CMLV provenientes de animais ApoE^{-/-} independentemente da dieta administrada. Este dado chama atenção e apoia dados atuais de nosso laboratório que mostram que camundongos haploinsuficientes para o gene Gremlin desenvolvem menos placas ateroscleróticas, mesmo quando alimentados com DH e até mesmo

quando inter cruzados com animais ApoE^{-/-}. Gremlin foi pouco explorado na literatura relacionada à ATS. Assim como nosso grupo, outros autores já descreveram Gremlin sendo expresso nas aortas de animais ApoE^{-/-}.⁽⁵⁴⁾ Também já foi descrito como antagonista endógeno do *macrophage migration inhibitory factor* (MIF) e quando a razão dos níveis de Gremlin e MIF estava desequilibrada no soro dos pacientes, o risco da ruptura de placas ateroscleróticas era maior.⁽⁵⁵⁾ Müller et al. demonstraram que Gremlin previne o recrutamento e ativação de macrófagos na placa aterosclerótica através da inibição de MIF. Na literatura também é conhecido como mediador inflamatório e Gremlin-1 é capaz de ligar-se com alta afinidade ao MIF, inibindo a liberação de TNF- α pelos macrófagos atenuando assim, a progressão da doença.⁽²⁹⁾

Nossos dados sugerem que Gremlin possa agir no estágio precoce da ATS de maneira independente da via das BMPs. Esta exclusividade da ação de Gremlin apenas nas CMLV de animais ApoE^{-/-} deixa os dados aqui encontrados mais intrigantes. Inicialmente, acreditávamos que Gremlin seria capaz de minimizar/atenuar os efeitos da sinalização de BMP, efeito clássico de antagonista. Contudo, tanto BMP4 quanto Gremlin parecem contribuir para a desdiferenciação de CMLV em cultura.

Os dados dos tratamentos *in vitro* das CMLV de 16 semanas de dieta demonstram que as células já partiram de um estado de desdiferenciação avançado. Ressaltamos que até mesmo nosso controle positivo da desdiferenciação PDGF-BB agiu de maneira menos intensa e em apenas dois genes. Evidenciamos que estas células foram cultivadas da mesma maneira que as células de 8 semanas de dieta e que ao comparar as imagens de IHQ de 8 e 16 semanas observamos menor intensidade de marcação em 16 semanas e placa bem estabelecida, portanto nosso modelo é adequado conforme literatura e claramente temos desdiferenciação. Concluimos que quaisquer que seja os mecanismos de ação de BMP4 e Gremlin influenciando a desdiferenciação de CMLV, certamente é no período precoce da doença aterosclerótica. Mecanismos distintos ocorrem nos diferentes estágios da doença aterosclerótica. Sabe-se que no estágio precoce da doença, a migração de monócitos circulantes prevalece (cerca de 70%) e que após o estabelecimento da placa, a proliferação local destas células predomina, sendo que apenas 13% dos monócitos são recrutados.⁽⁵⁶⁾ Após a placa estar bem estabelecida, talvez a sinalização por outras vias prevaleça. Estudos futuros poderiam melhor elucidar o papel de Gremlin na desdiferenciação das CMLV. Como citado anteriormente, dispomos de linhagens haploinsuficientes para o gene Gremlin, que foram inter cruzadas com animais ApoE^{-/-}. Este modelo de ganho de função de BMP

por perda parcial do antagonista é ferramenta valiosa na investigação dos mecanismos de Gremlin/BMP na ATS e desdiferenciação de CMLV, caminho que deverá ser trilhado pela aluna em seu projeto de doutorado. Finalizamos este trabalho ilustrando possíveis caminhos que Gremlin e BMP4 poderiam estar agindo nas CMLV. A figura 19 representa as possíveis vias de interação destas proteínas com vias já conhecidas na literatura, que levam as CMLV ao fenótipo sintético ou até mesmo bloqueando vias que auxiliam na manutenção do fenótipo contrátil.



Owens, G. K. 2015
 Karen E. Porter, Kirsten Riches, 2013
 Oliver G. McDonald et al, 2006

Gremlin ou BMP4 podem agir inibindo a via de TGF-β1. Outra possibilidade é estimularem a sinalização de PDGF-BB ou ativar diretamente KLF-4 e consequentemente inibir a ativação de miocardina e fator de resposta ao soro (SRF). Esta inibição impede a ativação das regiões CarGBox que são específicas regiões nos promotores dos genes de diferenciação de CMLV, levando ao fenótipo sintético.

Figura 19. Esquema representativo das possíveis vias que BMP4 e Gremlin poderiam interagir no período precoce da doença aterosclerótica levando a CMLV ao fenótipo sintético

4.1 Limitações

O tamanho amostral (animais utilizados) pode representar uma limitação desse estudo. Para dissertação de mestrado seguimos a recomendação dada pelo comitê de ética local. Na análise da influência de BMP/Gremlin na desdiferenciação das CMLV observamos em alguns casos diferenças entre grupos de magnitude razoável, sem significância estatística.

Utilização de técnicas mais requintadas para avaliar áreas seletivas que sofreram desdiferenciação (como a microscopia de dissecação a laser) requereria aumento de animais avaliados, inviabilizando a execução no âmbito de projeto de mestrado. As CMLV em cultura sofrem variações fenotípicas e longos períodos em cultura distanciam-nas ainda mais de seu comportamento biológico natural. Tentamos minimizar este viés restringindo o número de passagens (como já citado), mas isso pode não ter sido suficiente.

A ATS é sabidamente uma doença heterogênea e técnicas utilizadas neste trabalho, de alguma maneira, acabaram combinando material de células diferenciadas e desdiferenciadas, provavelmente mascarando dados de desdiferenciação.

5 CONCLUSÕES

1. Nossos experimentos reproduziram modelo de aterosclerose compatível com dados da literatura;
2. Vasos com aterosclerose apresentaram redução da expressão de proteínas específicas de diferenciação, conforme esperado;
3. BMP4, mas não sua isoforma BMP2, foi efetivo em reduzir a expressão de parte dos genes de diferenciação;
4. Gremlin, surpreendentemente, teve efeito na mesma direção e de forma mais evidente, reduzindo a expressão de todos os genes estudados em CMLV de animais propensos a ATS;
5. Estes dados sugerem que Gremlin atue independentemente da via das BMPs, não exercendo, nesse caso, seu papel de antagonista;
6. O estado avançado de desdiferenciação após 16 semanas de dieta provavelmente justifica o contraste observado entre os efeitos das proteínas estudadas em relação as células de animais alimentados por 8 semanas;
7. A análise deste trabalho, em conjunto com dados anteriores que documentaram suprarregulação de BMPs e Gremlin em vasos após 8 semanas de dieta hiperlipidêmica, permite concluir que Gremlin e BMP4 tenham papel relevante na fisiopatogênese da aterosclerose;
8. Estudos adicionais devem ser executados para melhor esclarecer a relevância desses achados e investigar o mecanismo de ação de Gremlin na desdiferenciação de CMLV.

6 REFERÊNCIAS

1. Wagenseil JE, Mecham RP. Vascular extracellular matrix and arterial mechanics. *Physiol Rev.* 2009;89(3):957-89.
2. Jin T, Stanculescu I. Computational modeling of the arterial wall based on layer-specific histological data. *Biomech Model Mechanobiol.* 2016.
3. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature.* 2011;473(7347):317-25.
4. Geevarghese A, Herman IM. Pericyte-endothelial crosstalk: implications and opportunities for advanced cellular therapies. *Transl Res.* 2014;163(4):296-306.
5. Krenning G, Barauna VG, Krieger JE, Harmsen MC, Moonen JR. Endothelial plasticity: shifting phenotypes through force feedback. *Stem Cells Int.* 2016;2016:9762959.
6. Hopkins PN. Molecular biology of atherosclerosis. *Physiol Rev.* 2013;93(3):1317-542.
7. Cahill PA, Redmond EM. Vascular endothelium - Gatekeeper of vessel health. *Atherosclerosis.* 2016;248:97-109.
8. Butoi ED, Gan AM, Manduteanu I, Stan D, Calin M, Pirvulescu M, et al. Cross talk between smooth muscle cells and monocytes/activated monocytes via CX3CL1/CX3CR1 axis augments expression of pro-atherogenic molecules. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1813(12):2026-35.
9. Alexander MR, Owens GK. Epigenetic control of smooth muscle cell differentiation and phenotypic switching in vascular development and disease. *Annu Rev Physiol.* 2012;74:13-40.
10. Gomez D, Owens GK. Smooth muscle cell phenotypic switching in atherosclerosis. *Cardiovasc Res.* 2012;95(2):156-64.
11. Gomez D, Swiatlowska P, Owens GK. Epigenetic control of smooth muscle cell identity and lineage memory. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35(12):2508-16.
12. Burton AC. Relation of structure to function of the tissues of the wall of blood vessels. *Physiol Rev.* 1954;34(4):619-42.
13. Schulze-Bauer CA, Regitnig P, Holzapfel GA. Mechanics of the human femoral adventitia including the high-pressure response. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;282(6):H2427-40.
14. Stenmark KR, Davie N, Frid M, Gerasimovskaya E, Das M. Role of the adventitia in pulmonary vascular remodeling. *Physiology.* 2006;21:134-45.
15. Cai J, Pardali E, Sanchez-Duffhues G, ten Dijke P. BMP signaling in vascular diseases. *FEBS letters.* 2012;586(14):1993-2002.
16. Zhu M, Zhang QJ, Wang L, Li H, Liu ZP. FoxO4 inhibits atherosclerosis through its function in bone marrow derived cells. *Atherosclerosis.* 2011;219(2):492-8.
17. Moore KJ, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell.* 2011;154(3):341-55.
18. Bennett MR, Sinha S, Owens GK. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. *Circ Res.* 2016;118(4):692-702.
19. Shankman LS, Gomez D, Cherepanova OA, Salmon M, Alencar GF, Haskins RM, et al. KLF4-dependent phenotypic modulation of smooth muscle cells has a key role in atherosclerotic plaque pathogenesis. *Nature med.* 2015;21(6):628-37.
20. Yao Y, Jumabay M, Ly A, Radparvar M, Cubberly MR, Bostrom KI. A role for the endothelium in vascular calcification. *Circ res.* 2013;113(5):495-504.

21. Nguyen AT, Gomez D, Bell RD, Campbell JH, Clowes AW, Gabbiani G, et al. Smooth muscle cell plasticity: fact or fiction? *Circ res.* 2013;112(1):17-22.
22. Feil S, Fehrenbacher B, Lukowski R, Essmann F, Schulze-Osthoff K, Schaller M, et al. Transdifferentiation of vascular smooth muscle cells to macrophage-like cells during atherogenesis. *Circ res.* 2014.
23. Guo X, Chen SY. Transforming growth factor-beta and smooth muscle differentiation. *World J Biol Chem.* 2012;3(3):41-52.
24. Porter KE, Riches K. The vascular smooth muscle cell: a therapeutic target in Type 2 diabetes? *Clin Sci (Lond).* 2013;125(4):167-82.
25. Brazil DP, Church RH, Surae S, Godson C, Martin F. BMP signalling: agony and antagonism in the family. *Trends Cell Biol.* 2015;25(5):249-64.
26. Bragdon B, Moseychuk O, Saldanha S, King D, Julian J, Nohe A. Bone morphogenetic proteins: a critical review. *Cell Signal.* 2011;23(4):609-20.
27. Yao Y, Bennett BJ, Wang X, Rosenfeld ME, Giachelli C, Lusis AJ, et al. Inhibition of bone morphogenetic proteins protects against atherosclerosis and vascular calcification. *Circ res.* 2010;107(4):485-94.
28. Wordinger RJ, Zode G, Clark AF. Focus on molecules: gremlin. *Exp Eye Res.* 2008;87(2):78-9.
29. Muller I, Schonberger T, Schneider M, Borst O, Ziegler M, Seizer P, et al. Gremlin-1 is an inhibitor of macrophage migration inhibitory factor and attenuates atherosclerotic plaque growth in ApoE^{-/-} mice. *J Biol Chem.* 2013.
30. Maciel TT, Melo RS, Campos AH. The bone morphogenetic protein antagonist gremlin promotes vascular smooth muscle cell apoptosis. *J Vasc Res.* 2009;46(4):325-32.
31. Maciel TT, Melo RS, Schor N, Campos AH. Gremlin promotes vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *J Mol Cell Cardiol.* 2008;44(2):370-9.
32. Simoes Sato AY, Bub GL, Campos AH. BMP-2 and -4 produced by vascular smooth muscle cells from atherosclerotic lesions induce monocyte chemotaxis through direct BMPRII activation. *Atherosclerosis.* 2014;235(1):45-55.
33. Reis ED, Li J, Fayad ZA, Rong JX, Hansoty D, Aguinaldo JG, et al. Dramatic remodeling of advanced atherosclerotic plaques of the apolipoprotein E-deficient mouse in a novel transplantation model. *J Vasc Surg.* 2001;34(3):541-7.
34. Lagna G, Ku MM, Nguyen PH, Neuman NA, Davis BN, Hata A. Control of phenotypic plasticity of smooth muscle cells by bone morphogenetic protein signaling through the myocardin-related transcription factors. *J Biol Chem.* 2007;282(51):37244-55.
35. Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev.* 2004;84(3):767-801.
36. Yang X, Dong M, Wen H, Liu X, Zhang M, Ma L, et al. MiR-26a contributes to the PDGFBB-induced phenotypic switch of vascular smooth muscle cells by suppressing Smad1. *Oncotarget.* 2017.
37. Kaplan-Albuquerque N, Garat C, Van Putten V, Nemenoff RA. Regulation of SM22 alpha expression by arginine vasopressin and PDGF-BB in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;285(4):H1444-52.
38. Jojima T, Uchida K, Akimoto K, Tomotsune T, Yanagi K, Iijima T, et al. Liraglutide, a GLP-1 receptor agonist, inhibits vascular smooth muscle cell proliferation by enhancing AMP-activated protein kinase and cell cycle regulation, and delays atherosclerosis in ApoE deficient mice. *Atherosclerosis.* 2017;261:44-51.

39. Song Y, Hou M, Li Z, Luo C, Ou JS, Yu H, et al. TLR4/NF-kappaB/ceramide signaling contributes to Ox-LDL-induced calcification of human vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol.* 2017;794:45-51.
40. Dong N, Wang W, Tian J, Xie Z, Lv B, Dai J, et al. MicroRNA-182 prevents vascular smooth muscle cell dedifferentiation via FGF9/PDGFRbeta signaling. *Int J Mol Med.* 2017;39(4):791-8.
41. Fuster JJ, MacLauchlan S, Zuriaga MA, Polackal MN, Ostriker AC, Chakraborty R, et al. Clonal hematopoiesis associated with TET2 deficiency accelerates atherosclerosis development in mice. *Science.* 2017;355(6327):842-7.
42. Espina V, Wulfkuhle JD, Calvert VS, VanMeter A, Zhou W, Coukos G, et al. Laser-capture microdissection. *Nature protocols.* 2006;1(2):586-603.
43. Serhatli M, Baysal K, Acilan C, Tuncer E, Bekpinar S, Baykal AT. Proteomic study of the microdissected aortic media in human thoracic aortic aneurysms. *J Proteome Res.* 2014;13(11):5071-80.
44. Zhang YN, Xie BD, Sun L, Chen W, Jiang SL, Liu W, et al. Phenotypic switching of vascular smooth muscle cells in the 'normal region' of aorta from atherosclerosis patients is regulated by miR-145. *J Cell Mol Med.* 2016;20(6):1049-61.
45. Wei X, Hou X, Li J, Liu Y. miRNA-181a/b regulates phenotypes of vessel smooth muscle cells through serum response factor. *DNA Cell Biol.* 2017;36(2):127-35.
46. Tang Y, Yu S, Liu Y, Zhang J, Han L, Xu Z. MicroRNA-124 control human vascular smooth muscle cell phenotypic Switch via Sp1. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2017:ajpheart 00660 2016.
47. Li DY, Brooke B, Davis EC, Mecham RP, Sorensen LK, Boak BB, et al. Elastin is an essential determinant of arterial morphogenesis. *Nature.* 1998;393(6682):276-80.
48. Zhang L, Xu Q. Vascular Progenitors and smooth muscle cells chicken and egg? *Circ Res.* 2017;120(2):246-8.
49. Liberman M, Pesaro AE, Carmo LS, Serrano Jr CV. Vascular calcification: pathophysiology and clinical implications. *Einstein.* 2013;11(3):376-82.
50. Evrard S, Delanaye P, Kamel S, Cristol JP, Cavalier E, calcifications SSjwgov. Vascular calcification: from pathophysiology to biomarkers. *Clin Chim Acta.* 2015;438:401-14.
51. Andrade MC, Carmo LS, Farias-Silva E, Liberman M. MSX2 is required for vascular smooth muscle cells osteoblastic differentiation but not calcification in insulin-resistant ob/ob mice. *Atherosclerosis.* 2017.
52. Koga M, Yamauchi A, Kanaoka Y, Jige R, Tsukamoto A, Teshima N, et al. BMP4 is increased in the aortas of diabetic ApoE knockout mice and enhances uptake of oxidized low density lipoprotein into peritoneal macrophages. *J Inflamm.* 2013;10(1):32.
53. Miriyala S, Gongora Nieto MC, Mingone C, Smith D, Dikalov S, Harrison DG, et al. Bone morphogenic protein-4 induces hypertension in mice: role of noggin, vascular NADPH oxidases, and impaired vasorelaxation. *Circulation.* 2006;113(24):2818-25.
54. Muller I, Schonberger T, Schneider M, Borst O, Ziegler M, Seizer P, et al. Gremlin-1 is an inhibitor of macrophage migration inhibitory factor and attenuates atherosclerotic plaque growth in ApoE-/- mice. *J Biol Chem.* 2013.
55. Muller, II, Muller KA, Karathanos A, Schonleber H, Rath D, Vogel S, et al. Impact of counterbalance between macrophage migration inhibitory factor and its inhibitor Gremlin-1 in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis.* 2014;237(2):426-32.
56. Robbins CS, Hilgendorf I, Weber GF, Theurl I, Iwamoto Y, Figueiredo JL, et al. Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis. *Nature med.* 2013;19(9):1166-72.

Abstract

Introduction: Vascular smooth muscle cells are highly specialized and differentiated cells. In response to pro-atherogenic stimuli they are able to alter their state of differentiation by increasing the rate of proliferation and migration. There is also growing evidence that bone morphogenetic protein signaling is involved in vascular diseases, including atherosclerosis. **Purpose:** To characterize the vascular smooth muscle cell phenotype of mice fed 8 or 16 weeks with control or high fat diet and its relation to the signaling pathway of bone morphogenetic proteins. **Methods:** Male and female C57BL/6 (n=100) and ApoE^{-/-} (n=107) mice between 2 and 3 months old, fed for 8 or 16 weeks with control diet and/or high fat diet. After the diet period and euthanasia, the aortic arch and vascular smooth muscle cells were isolated and cultivated as primary cultures. These cells were treated with recombinant BMP2, BMP4 (10ng/mL) or Gremlin (25ng/mL) for 24 hours and then gene expression of myosin heavy chain, calponin, SM22 and alpha actin was evaluated via qPCR and protein expression was analyzed by immunohistochemistry. The statistical analysis was performed considering Gamma distribution and the multiple comparisons corrected by Bonferroni method. Data was presented by estimated mean difference and 95% confidence interval. **Results:** Our most relevant data was found in the early period of atherosclerosis (8 weeks of diet). The comparison of the animals strains, independently of consumed diet, demonstrated reduced expression of vascular smooth muscle cell differentiation genes during the following treatments: for C57B/6 mice treated with BMP4, SM22 (0.794 [0.256; 1.331]), alpha actin (0.927 [0.484; 1,370]). For the ApoE^{-/-} mice treated with BMP4, Sm22 (0.879 [0.331; 1.427]) and Alpha actin (1.190 [0.412; 1.968]). When ApoE^{-/-} cells were treated with Gremlin, they showed reduced gene expression of Sm22 (1,001 [0,437; 1,564]), alpha actin (1,248 [0,479; 2,017]) and calponin (1,614 [0,764; 2,463]). Moreover, considering the consumed diet, it was also possible to observe a reduction in expression of the vascular smooth muscle cells differentiation genes. Control diet treated with BMP4 showed Sm22 (0.927 [0.484, 1.370]) and Alfa actin (0.613 [0.157, 1.068]); control diet treated with Gremlin, Sm22 (0.921 [0.433; 1.410]) and MHC (1.477 [0.605, 2.349]); high fat diet treated with BMP4 resulted in decreased Alpha actin (1.190 [0.412; 1.968]); high fat diet treated with Gremlin revealed downregulation of Alpha actin (1.248 [0.479, 2.017]) and calponin (1.319 [0.510; 2.129]). All experimental groups were compared to the control group without treatment.

Conclusions: At 8 weeks of diet, treatment with recombinant BMP4 was effective in reducing the SM22 and alpha actin genes, regardless of the animal lineage or consumed diet. Gremlin was more effective in inducing dedifferentiation, especially in ApoE^{-/-} animals or animals fed with a high fat diet. The effects of Gremlin on the differentiation state of vascular smooth muscle cells suggest an independent mechanism mediated by the bone morphogenetic proteins pathway.