

FORÇAS HEMODINÂMICAS EM ATEROSCLEROSE – REPERCUSSÕES SOBRE AS CARACTERÍSTICAS E ACTIVIDADE ENDOTELIAL / HEMODYNAMIC FORCES IN ATHEROSCLEROSIS – REPERCUSIONS ON THE ENDOTHELIAL CHARACTERISTICS AND ACTIVITY

Henrique S. Rosário¹

INTRODUÇÃO

A interacção entre hemodinâmica e o endotélio é um determinante importante da função cardiovascular. Tensão de cisalhamento é a força por unidade de superfície criada quando uma força tangencial (fluxo sanguíneo) actua sobre uma superfície (endotélio) — sempre que ocorre o fluxo, existe tensão de cisalhamento.

A mecanotransdução induzida por cisalhamento (a conversão de tensões mecânicas para respostas bioquímicas) é particularmente importante nas artérias, na qual o fluxo sanguíneo regula a estrutura e o tónus vascular. Esta regulação ocorre através da libertação de factores derivados do endotélio tais como monóxido de azoto, prostaglandinas, lipoxigenases, factores hiperpolarizantes, factores de crescimento e outras moléculas¹⁻⁵. Contrastando com as alterações observadas durante vasoregulação aguda, as alterações sustentadas da hemodinâmica local facilitam a remodelação adaptativa da parede arterial através da modulação da expressão génica e da síntese proteica na célula endotelial^{6,7}.

A célula endotelial é o elemento regulador essencial da função da parede vascular. Possui propriedades anticoagulantes e permite o controlo fisiológico do diâmetro vascular e a modulação da permeabilidade vascular. Também está envolvida como mediador na sinalização vascular dependente da inflamação aguda e crónica, cicatrização lesional e alterações fisiopatológicas como a aterogénese⁸.

O fluxo sanguíneo é o mediador mais importante destas funções e exerce os seus efeitos através de processos de mecanotransdução endotelial. Estas interacções entre tensão de cisalhamento e o endotélio são mecanismos homeostáticos de adaptação sendo simultaneamente, como acima foi referido, participantes-chave na fisiopatologia cardiovascular, particularmente no que diz respeito a localizações mais susceptíveis e a progressão da aterosclerose.

Na circulação arterial, a tensão de cisalhamento tem um papel decisivo na determinação de onde a maioria das patologias vasculares tem origem⁹, estando implicada no desenvolvimento de fenótipos endoteliais

¹ Professor auxiliar, Instituto de Bioquímica, Faculdade de Medicina de Lisboa, Unidade de Biologia Microvascular e Inflamação, Instituto de Medicina Molecular

associados tanto a vasoproteção como a susceptibilidade aumentada para aterosclerose^{10,11}.

TENSÃO DE CISALHAMENTO

Fenótipo endotelial

A tensão de cisalhamento elevada é geralmente benéfica pois promove a vasodilatação adaptativa ou remodelação adaptativa da parede arterial através de mecanismos endotélio-dependentes¹². No entanto, em doenças cardiovasculares, como hipercolesterolemia, diabetes mellitus, hipertensão arterial e doenças inflamatórias sistêmicas a disfunção endotelial surge como manifestação precoce. Esta disfunção vascular normalmente é caracterizada por uma perturbação da vasoregulação dependente do fluxo (com diminuição dos processos vasodilatadores e aumento da vasoconstrição). O mecanismo dominante que define esta disfunção endotelial generalizada é a diminuição do efeito da tensão de cisalhamento sobre a expressão e actividade da sintase do monóxido de azoto endotelial (eNOS)^{2,3}, essencial para a síntese e libertação do monóxido de azoto, potente mediador endógeno vasodilatador, mediador antioxidante e anti-inflamatório.

Alterações endoteliais nos locais de aterosclerose

De grande importância clínica são os diferentes fenótipos endoteliais funcionais associados com as características particulares do fluxo e tensão de cisalhamento que se desenvol-

vem em curvaturas (por exemplo, o arco aórtico), ramos e bifurcações arteriais¹³⁻¹⁶. Nestas áreas o fluxo perde características de tensão de cisalhamento unidireccional e pulsátil para criar zonas de separação do fluxo que incluem inversão de fluxo e turbulência (fluxo caótico). Essas regiões, onde a tensão de cisalhamento adquire características oscilatórias, (com baixas velocidades e gradientes temporo-espaciais intensos) são sensíveis ao desenvolvimento focal da aterosclerose.

Uma lesão aterosclerótica em desenvolvimento pode alterar o padrão de tensão de cisalhamento local sobre o endotélio. Quando uma estenose significativa está presente, uma maior velocidade de fluxo através do espaço luminal pode criar fluxo turbulento na região imediatamente a jusante. Ao longo do tempo este fluxo turbulento induzido pela lesão pode contribuir para o seu crescimento. Estudos *in vitro* e *in vivo* de células endoteliais têm demonstrado que tal ambiente promove a expressão de genes e proteínas pro-inflamatórias favoráveis ao aumento da susceptibilidade à aterosclerose^{15,16}, crescimento e instabilidade da placa aterosclerótica¹⁷ e maior risco de trombose¹⁸.

FORÇAS HEMODINÂMICAS E FENÓTIPOS ENDOTELIAIS

A resposta endotelial às tensões de cisalhamento, factor determinante para o desenvolvimento de fenótipos regionais que promovem a susceptibilidade e protecção para progressão da placa aterosclerótica, são regulados estreitamente por processos de expressão^{10,15,16,19}.

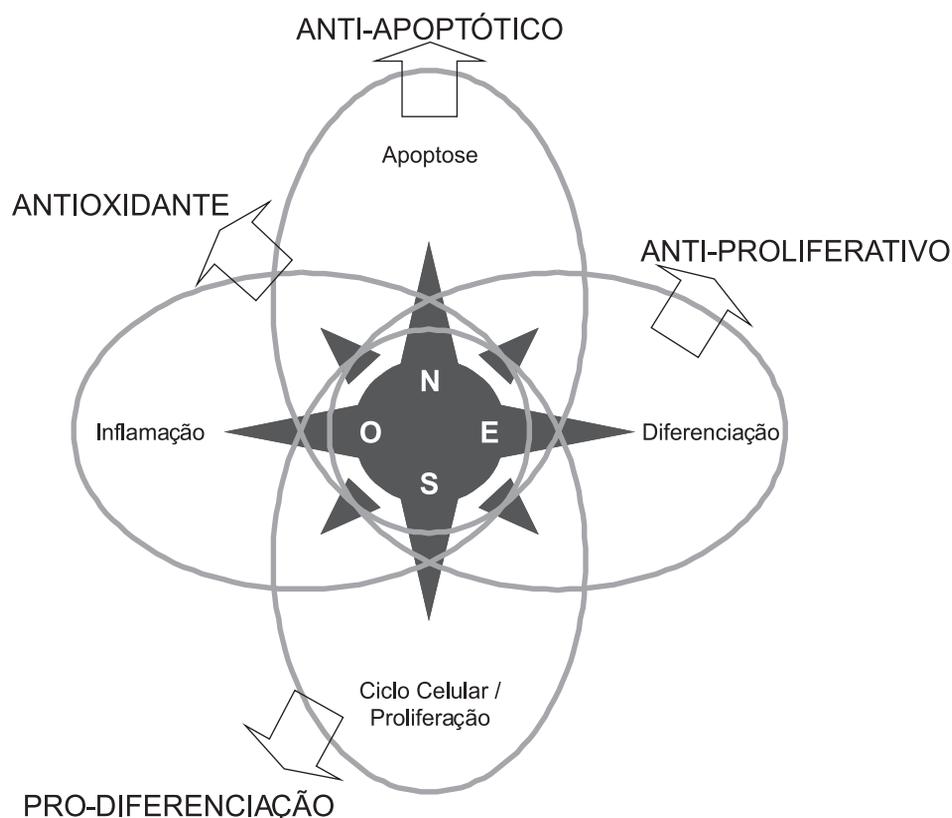


Fig. 1 – O fluxo hemodinâmico aplicado sobre a célula endotelial coordena, em termos fenotípicos, o padrão de expressão genética no sentido de diferentes programas transcripcionais de activação. A interacção entre estes padrões de activação endotelial produz diferentes linhas orientadoras, como uma bússola, para o funcionamento da célula endotelial. Nesta imagem representa-se as orientações (setas) genericamente induzidas sobre a célula endotelial por um fluxo hemodinâmico laminar.

A tensão de cisalhamento laminar unidireccional correlaciona-se com a indução *in vitro* de perfis de transcrição considerados protectores (por exemplo, antioxidante, anti-inflamatório, antiproliferativo – ver Fig. 1), e *in situ* com a expressão endotelial dos genes envolvidos em locais que estão protegidos contra aterosclerose²⁰⁻²².

Em modelos murinos transgénicos o padrão transcripcional de genes específicos na célula endotelial correlaciona-se estreitamente com as condições hemodinâmicas específicas^{23,24}. Da mesma forma, estudos de expressão genética global no endotélio forneceram um panorama mais abrangente das interacções que ocorrem nos locais de fluxo perturba-

do^{10,20,25,26}. Contudo o quadro geral torna-se mais complexo pelo facto de ocorrerem interacção de múltiplos factores fisiopatológicos com as forças hemodinâmicas. A análise diferencial do transcriptoma em amostras da curvatura interna da aorta torácica descendente e do arco aórtico em modelo porcino revelou que a expressão de genes de susceptibilidade (proinflamatórios e procoagulantes) e de protecção (antioxidantes e anticoagulantes) podem coexistir nas áreas de maior susceptibilidade hemodinâmica à lesão aterosclerótica¹⁰. Assim, o conceito actual propõe a existência de um fenótipo endotelial equilibrado, com promoção da expressão de genes protectores que defendam a

parede vascular na presença de fluxo perturbado. Contudo, este equilíbrio transcripcional e de síntese proteica desaparecerá facilmente na presença de factores de risco adicionais, nomeadamente hipercolesterolemia e aumento da pressão transmural (i.e., hipertensão), que desviarão o balanço a favor de um fenótipo endotelial pró-aterosclerótico²⁷.

Sintase do monóxido de azoto (NOS)

Estudos *in vivo* demonstraram que a expressão genética da NOS endotelial é alterada por intervenções (por exemplo, estreitamento concêntrico do lúmen) que aumentem a tensão de cisalhamento laminar²³. Esta forte indução da expressão da NOS na zona de estreitamento é contudo acompanhada de uma diminuição da sua expressão imediatamente a jusante, onde se encontra uma região de fluxo turbulento. Em ratinhos “knockout” para a apolipoproteína-E, com elevada susceptibilidade a desenvolvimento de aterosclerose, esta associa-se invariavelmente a esta região de fluxo turbulento a jusante do estreitamento arterial onde a expressão da NOS endotelial está reduzida²⁴. O nexos de causalidade entre a hemodinâmica alterada e a reduzida produção de monóxido de azoto *in vivo* está assim bem estabelecido.

Inflamação

O estudo das alterações do fenótipo endotelial no ambiente complexo do fluxo arterial à superfície da placa aterosclerótica é limitada por desa-

fios técnicos. Contudo, foi identificada a expressão endotelial diferenciada de quimiocinas, NF- κ B, p53, TGF- β e outras proteínas pró-inflamatórias em placas ateroscleróticas avançadas, em comparação com lesões precoces¹¹. Embora não tenham sido tomadas em consideração possíveis padrões temporo-espaciais na progressão da placa aterosclerótica, este estudo fornece pistas para o estudo do envolvimento de mediadores inflamatórios na regulação do fenótipo endotelial

MECANOTRANSDUÇÃO DAS FORÇAS HEMODINÂMICAS

O estudo experimental detalhado do efeito mecânico e biofísico da tensão de cisalhamento sobre a célula endotelial exige a utilização de técnicas laboratoriais morfo-funcionais a um nível subcelular^{1,5,28-31}. A tensão de cisalhamento depende da geometria detalhada da superfície da artéria concluindo-se que simplificar a superfície endotelial (tratando-a como homogénea) não permitirá conhecer a heterogeneidade espacial de distribuição sub-celular da tensão de cisalhamento; para este fim é necessário caracterizar detalhadamente a topografia da célula endotelial³².

A mecanotransdução endotelial da tensão de cisalhamento exige várias etapas sequenciais^{5,33}: i) deformação da superfície celular; ii) transmissão intracelular do sinal; iii), conversão da força mecânica em actividade bioquímica e cascatas de segundos mensageiros; iv) conversão da sinalização em actividade efectora e retrocontrolo dos mecanismos de mecanotransdução.

Estas relações temporais não estão ainda bem estabelecidas, podendo, por exemplo, as duas etapas iniciais ocorrer praticamente em simultâneo. Contudo, este modelo apresenta a vantagem de permitir interpretar os dados já conhecidos e facilmente integrar novos resultados. Como exemplo, as alterações do potencial de membrana endotelial podem ser suficientes para induzir a libertação de mediadores vasoactivos nas etapas i), iii) e iv) através da activação de canais iónicos, dispensando a transmissão intracelular das forças mecânicas que ocorre em ii)^{34,35}. Na maioria das situações, contudo, para a sinalização da tensão de cisalhamento para localizações subcelulares a importância da transmissão de forças para o interior da célula a partir do lúmen vascular exige a mobilização do citoesqueleto (modelo descentralizado de mecanotransdução)⁵.

Deformação física

A mobilização de um ou mais elementos celulares é necessário para iniciar mecanicamente induzida por respostas de sinalização. Como a tensão de cisalhamento actua na superfície luminal da célula, esta vai conter os elementos iniciais de participação na mecanotransdução. Exemplos incluem a activação dos canais iónicos, proteínas G e alterações na fluidez membranar³³ e metabolismo fosfolipídico. A distribuição das forças que actuam sobre a superfície luminal da membrana endotelial é determinada pela microgeometria da superfície, secundariamente às características do fluxo de sangue em massa. O mapeamento detalhado da superfície endo-

telial por microscopia de força atómica seguida de modelagem computacional do fluxo permitiu identificar heterogeneidade intercelular e subcelular da distribuição de forças mecânicas³². Em particular, a zona de superfície celular mais saliente no fluxo é sujeita às forças mais altas tensão de cisalhamento. Esta estrutura mais elevada é habitualmente a área de superfície celular que se estende ao longo da região nuclear, com uma altura de pico típico de 5 a 7 μm .

Para além desta área, foram identificadas outras estruturas especializadas que detectam e ampliam a tensão de cisalhamento à superfície da célula endotelial. Duas destas estruturas celulares que se projectam em direcção à região de fluxo são o glicocálice, rico em glicoproteínas alongadas da superfície celular³⁶⁻³⁷, e os cílios primários, que se ligam ao citoesqueleto na sua base e se estendem através da superfície celular luminal para a região de fluxo³⁸.

Transmissão de força (mecanotransmissão)

A deformação endotelial sob tensão luminal permite a transmissão de forças para o citosol através dos seus elementos estruturais. No endotélio este sistema compreende os filamentos do citoesqueleto distribuídos por todo o corpo da célula e o citoesqueleto cortical submembranar rico em espectrina. Estes elementos próprios estão interligados e também estão ligados a proteínas de membrana em toda a célula, fornecendo rigidez elástica enquanto mantêm a forma e a estrutura da célula. Se a integridade e dinâmica do citoesqueleto forem per-

turbadas experimentalmente verificou-se inibição da resposta endotelial ao fluxo³⁹. Por seu lado, o fluxo induz a realocização celular das mitocôndrias ao longo dos microtúbulos, mobilização dos filamentos intermediários e deformação dos filamentos de actina. As forças associadas a estas deformações celulares podem inclusivamente ser transmitidas às células adjacentes através de estruturas juncionais e pela matriz extracelular^{40,41,42}.

Respostas de sinalização imediatas

Em várias localizações subcelulares ocorrem respostas rápidas que incluem activação dos canais iónicos localizados na membrana luminal, libertação de íons de cálcio intracelulares, clivagem de fosfolípidos membranares, alteração na fluidez da membrana e fosforilação de várias proteínas, todos eles com a função de activar vias de sinalização secundárias. A sua organização espacial e integração são mal compreendidas, mas envolvem eventos locais de fosforilação de proteínas e aparecimento de moléculas de sinalização difusíveis. Foi igualmente proposto que a aplicação de força através do citoesqueleto pode alterar directamente a conformação (e assim a actividade) de proteínas acopladas a este⁴³. A integração temporal destas múltiplas respostas é essencial para permitir às células discriminar rápida e eficientemente alterações do fluxo e reagir rapidamente a este.

CONCLUSÃO

A evolução das respostas relacionadas a aplicação de fluxo hemodinâmico no endotélio é uma das muitas especializações essenciais para o funcionamento eficiente do sistema vascular. A diversidade de funções endoteliais reflecte-se na variedade de mecanismos de mecanotransdução e sugere que a sua regulação através de um único mecanismo é improvável. Uma abordagem de biologia de sistemas poderá ser útil e até necessária para determinar como ocorre a resposta celular de mecanotransdução em contexto fisiológico ou patológico de interesse, com valorização e discriminação do potencial de redundância entre os diversos elementos dentro do sistema.

Novas terapêuticas farmacológicas dirigidas aos mecanismos intracelulares reguladores de tensão de cisalhamento podem ser benéficas. Uma abordagem alternativa é a “renormalização” das características indesejáveis do fluxo, sistematicamente e em locais que exigem intervenção; a este respeito, o controlo da pressão arterial e o exercício físico são terapêuticos; este último, nomeadamente, pode induzir vasodilatação mediada por fluxo em diversos territórios arteriais e pode induzir alterações hemodinâmicas localizadas benéficas. Outras intervenções possíveis incluem modificações para o design de *stents* e outros dispositivos que visem otimizar as características localizadas do fluxo.

REFERÊNCIAS

1. Pohl U, *et al.* Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increased flow in vivo. *Hypertension* 1986; 8:37-44.
2. Moncada S. Adventures in vascular biology: a tale of two mediators. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006; 361:735-759.
3. Corson MA, *et al.* Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circ Res* 1996; 79: 984-991.
4. Griffith TM. Endothelial control of vascular tone by nitric oxide and gap junctions: a haemodynamic perspective. *Biorheology* 2002; 39:307-318.
5. Davies PF. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev* 1995; 75:519-560.
6. Langille BL, O'Donnell F. Reductions in arterial diameter produced by chronic decreases in blood flow are endothelium-dependent. *Science* 1986; 231:405-407.
7. Zhang H, *et al.* Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor signaling in flow-induced arterial remodeling. *Circ Res* 2008; 102:1275-1285.
8. Aird WC. Proximate and evolutionary causation of endothelial heterogeneity. *Semin Thromb Hemost.* 2010; 36:276-285.
9. Glagov S, *et al.* Hemodynamics and atherosclerosis. Insights and perspectives gained from studies of human arteries. *Arch Pathol Lab Med* 1988; 112:1018-1031.
10. Passerini AG, *et al.* Coexisting proinflammatory and antioxidative endothelial transcription profiles in a disturbed flow region of the adult porcine aorta. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101:2482-2487.
11. Volger OL, *et al.* Distinctive expression of chemokines and transforming growth factor-beta signaling in human arterial endothelium during atherosclerosis. *Am J Pathol* 2007; 171:326-337.
12. Mattsson EJ, *et al.* Increased blood flow induces regression of intimal hyperplasia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17: 2245-2249.
13. Suo J, *et al.* Blood flow patterns in the proximal human coronary arteries: relationship to atherosclerotic plaque occurrence. *Mol Cell Biomech* 2008; 5:9-18.
14. Steinman DA, Taylor CA. Flow imaging and computing: large artery hemodynamics. *Ann Biomed Eng* 2005; 33:1704-1709.
15. Davies PF, *et al.* A spatial approach to transcriptional profiling: mechanotransduction and the focal origin of atherosclerosis. *Trends Biotechnol* 1999; 17:347-351.
16. García-Cardena G, *et al.* Mechanosensitive endothelial gene expression profiles: scripts for the role of hemodynamics in atherogenesis? *Ann NY Acad Sci* 2001; 947:1-6.
17. Libby P. Coronary artery injury and the biology of atherosclerosis: inflammation, thrombosis, and stabilization. *Am J Cardiol* 2000; 86:3J-8J.
18. Folie BJ, McIntire LV. Mathematical analysis of mural thrombogenesis. Concentration profiles of platelet-activating agents and effects of viscous shear flow. *Biophys J* 1989; 56:1121-1141.
19. Suo J, *et al.* Hemodynamic shear stresses in mouse aortas: implications for atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27:346-351.
20. Dekker RJ, *et al.* Prolonged fluid shear stress induces a distinct set of endothelial cell genes, most specifically lung Krüppel-like factor (KLF2). *Blood* 2002; 100:1689-1698.
21. Dai G, *et al.* Biomechanical forces in atherosclerosis-resistant vascular regions regulate endothelial redox balance via phosphoinositol 3-kinase/Akt-dependent activation of Nrf2. *Circ Res* 2007; 101:723-733.
22. Ziegler T, *et al.* Influence of oscillatory and unidirectional flow environments on the expression of endothelin and nitric oxide synthase in cultured endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18:686-692.
23. Cheng C, *et al.* Shear stress affects the intracellular distribution of eNOS: direct demonstration by a novel in vivo technique. *Blood* 2005; 106:3691-3698.
24. Cheng C, *et al.* Atherosclerotic lesion size and vulnerability are determined by patterns of fluid shear stress. *Circulation* 2006; 113:2744-2753.
25. Iiyama K, *et al.* Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation. *Circ Res* 1999; 85:199-207.
26. De Nigris F, *et al.* Beneficial effects of antioxidants and l-arginine on oxidation-sensitive gene expression and endothelial NO synthase activity at sites of disturbed shear stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:1420-1425.
27. Magid R, Davies PF. Endothelial protein kinase C isoform identity and differential activity of PKC ζ in an athero-susceptible region of porcine aorta. *Circ Res* 2005; 97:443-449.
28. García-Cardena G, Gimbrone MA. Biomechanical modulation of endothelial phenotype: implications for health and disease. *Handb Exp Pharmacol* 2006; 176:79-95.
29. Davies PF, *et al.* Influence of hemodynamic forces on vascular endothelial function. In vitro studies of shear stress and pinocytosis in bovine aortic cells. *J Clin Invest* 1984; 73:1121-1129.
30. Davies PF, *et al.* Turbulent fluid shear stress induces vascular endothelial cell turnover in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:2114-2117.
31. Shyy YJ, *et al.* Fluid shear stress induces a biphasic response of human monocyte chemotactic protein 1 gene expression in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:4678-4682.
32. Barbee KA, *et al.* Subcellular distribution of shear stress at the surface of flow aligned and non-aligned endothelial monolayers. *Am J Physiol* 1995; 268:H1765-H1772.
33. Califano JP, Reinhart-King CA. Exogenous and endogenous force regulation of endothelial cell behavior. *J Biomech* 2010; 43:79-86.
34. Olesen S-P, *et al.* Hemodynamic shear stress activates a K⁺ current in vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 331:168-170.
35. Gautam M, *et al.* Flow-activated chloride channels in vascular endothelium. Shear stress sensitivity, desensitization dynamics, and physiological implications. *J Biol Chem* 2006; 281:36492-36500.

36. Weinbaum S, *et al.* The structure and function of the endothelial glycocalyx layer. *Annu Rev Biomed Eng* 2007; 9:121-167.
37. Vink H, Duling BR. Identification of distinct luminal domains for macromolecules, erythrocytes, and leukocytes within mammalian capillaries. *Circ Res* 1996; 79:581-589.
38. Van der Heiden K, *et al.* Endothelial primary cilia in areas of disturbed flow are at the base of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2008; 196:542-550.
39. Malek AM, Izumo S. Mechanism of endothelial cell shape change and cytoskeletal remodeling in response to fluid shear stress. *J Cell Sci* 1996; 109:713-726.
40. Helmke BP, *et al.* Spatial concentration of intracellular strain induced by hemodynamic shear stress. *Biophys J* 2003; 84:2691-2699.
41. Mott RE, Helmke BP. Mapping the dynamics of shear stress-induced structural changes in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 293:C1616-C1626.
42. Hu S, Wang N. Control of stress propagation in the cytoplasm by prestress and loading frequency. *Mol Cell Biomech* 2006; 3:49-60.
43. Dahl KN, *et al.* Mechanobiology and the microcirculation: cellular, nuclear and fluid mechanics. *Microcirculation* 2010; 17:179-191.