

Microscopia de força atômica no estudo da superfície endotelial de bifurcações arteriais cerebrais humanas

Rogelio Iván Ortiz-Velázquez¹, José Guilherme Mendes Pereira Caldas²,
Patrícia Hatsue Suegama³, Marina Magnani³, Jorge Arturo Santos-Franco¹,
Rodrigo Mercado-Pimentel¹, Leonardo Yuji Tanaka⁴, Maria Cecília Salvador⁵

Laboratório de Microscopia Eletrônica e de Força Atômica do Departamento de Engenharia
Metalúrgica e de Materiais da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo (USP)

Laboratório de Filmes Finos do Instituto de Física da USP

Laboratório de Biologia Vascular do Instituto do Coração (InCor)

RESUMO

Objetivo: Apresentar o estudo morfológico do endotélio vascular de artérias cerebrais humanas e discutir aplicações e limitações da microscopia de força atômica (AFM) no estudo da patologia vascular. **Material e métodos:** Foram utilizadas amostras do segmento M1 e da bifurcação da artéria cerebral média, com e sem doença aterosclerótica. Imagens topográficas, obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), das amostras fixadas quimicamente e desidratadas mediante ponto crítico foram confrontadas com imagens de amostras não fixadas, obtidas por AFM. **Resultados:** As células endoteliais nos segmentos retos de M1 e da bifurcação da ACM, sem doença aterosclerótica, são alongadas e alinhadas com o eixo axial do vaso, porém poligonais e sem orientação preferencial na bifurcação aterosclerótica. A bifurcação com aterosclerose apresenta uma monocamada endotelial altamente irregular e corrugada que invagina na luz do vaso e mostra características heterogêneas na superfície da membrana. A resolução das imagens de MEV foi superior àquela obtida nas imagens de AFM a baixa magnificação. Nas imagens de AFM, a parte lateral e as uniões celulares são pouco definidas e a varredura em altas magnificações diminui a resolução. Contudo, é possível determinar a topografia tridimensional da superfície celular, podendo-se, ao mesmo tempo, realizar estudos funcionais. **Conclusão:** Apesar da combinação única de alta resolução de imagem e operação sob condições próximas às fisiológicas, a AFM em amostras flexíveis apresenta resolução que depende do tipo de cantilever e do grau de hidratação da amostra. Por isso, em amostras vasculares as condições fisiológicas terão de ser estritamente reproduzidas.

PALAVRAS-CHAVE

Endotélio vascular. Microscopia de força atômica. Microscopia eletrônica de varredura.

ABSTRACT

Atomic force microscopy in the study of the endothelial surface of the human brain artery bifurcations

Objective: To present the morphologic study of the vascular endothelium of the human brain arteries and discuss applications and limitations of the atomic force microscopy (AFM), in the study of vascular pathology. **Material and methods:** Samples of the M1 segment of the middle cerebral artery and of its bifurcation, with and without atherosclerotic disease, were used for this study. Samples chemically fixed and dehydrated through critical point served as reference for the study of samples not fixed by atomic force microscopy. **Results:** The endothelial cells in M1 and the bifurcation of the middle cerebral artery, without atherosclerotic compromise are elongated and aligned with the axis of the vessel, but are polygonal and without preferential orientation at the bifurcation with atherosclerotic compromise. The bifurcation with atherosclerosis presents an endothelial monolayer highly irregular that outstands in the lumen of the vessel and shows heterogeneous features on the surface of the membrane. The resolution of images of scanning electron microscopy is greater than the one obtained from the AFM images of low magnification. In AFM images, the sides and the cellular unions are poorly defined and scanning at high

1 Neurocirurgião.

2 Professor livre-docente do Departamento de Radiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e chefe do Serviço de Neurorradiologia Intervencionista do Hospital das Clínicas da FMUSP.

3 Doutora em Química, Escola Politécnica da USP.

4 Laboratório de Biologia Vascular do Instituto do Coração (InCor) de São Paulo.

5 Professora-associada, Laboratório de Filmes Finos, Instituto de Física da USP.

magnifications decreases the resolution. However, it is possible to verify the three-dimensional topography of the cell surface while it is possible the achievement functional studies. **Conclusions:** Despite the unique combination of high resolution image and operating under physiological conditions, the AFM on flexible samples displays resolution dependent on the type of cantilever and degree of hydration of the sample. So in vascular samples physiological conditions must be strictly reproduced.

KEY WORDS

Vascular endothelium. Atomic force microscopy. Scanning electron microscopy.

Introdução

O endotélio dos diferentes segmentos vasculares apresenta morfologia e funções especializadas apropriadas à sua localização.³³ Em contato com o fluxo sanguíneo, as células endoteliais encontram-se expostas à tensão de cisalhamento (*shear stress*), gerada pela orientação do fluxo, e à tensão circunferencial secundária à distensão da parede pela pressão arterial.¹⁸ Uma característica comum a toda célula endotelial, sem importar a localização, é a capacidade de responder a alterações nas condições hemodinâmicas, particularmente às mudanças na tensão de cisalhamento (*shear stress*), que atua diretamente na sua superfície,^{14,15,18,23,31} originando respostas que transformam a morfologia e a função celular por meio de mudanças na expressão gênica.^{27,34}

O endotélio é a superfície-chave na integração de sinais entre o fluxo de sangue e a parede vascular e é possível comprovar que mudanças crônicas nas características do fluxo estimulam o remodelamento da parede arterial mediante processos que são dependentes do endotélio.^{14,15} Consequentemente, o papel que as tensões hemodinâmicas desempenham na regulação da função endotelial é hoje um intenso campo de pesquisa.^{14,20,33,31} Fenômenos como a angiogênese e o remodelamento da parede arterial têm recebido atenção crescente com o intuito de correlacionar fatores estruturais e hemodinâmicos na formação de lesões vasculares aneurismáticas e aterosclerose intracraniana.^{14,18,20,23,27,34,35} Essas lesões ocorrem, principalmente, em localizações de geometria complexa da árvore arterial (bifurcações e curvas arteriais), onde incidem as maiores variações espaço-temporais da tensão de cisalhamento, fluxos secundários, separação do fluxo etc.^{18,34,35} Desse modo, regiões que apresentam tensão de cisalhamento oscilatório têm correlação significativa, do ponto de vista biológico e estatístico, com a localização da placa de ateroma.³⁵ Já locais de tensões elevadas correlacionam-se com os sítios de ruptura aneurismática.⁸ Por outro lado, essas regiões apresentam morfologia endotelial característica quando comparadas com as regiões de fluxo laminar.¹⁴

Considerando que orientação, forma e estrutura das células endoteliais variam de acordo com as condições hemodinâmicas locais,^{14,15,18,23,31,35} é possível assumir a hipótese de que a morfologia do endotélio seja um marcador das condições que dão início ao desenvolvimento das lesões vasculares. Ao passo que, se as tensões que suportam o endotélio estão sujeitas à magnitude da carga hemodinâmica e de como essa se distribui sobre a superfície,¹⁴ então, o padrão de distribuição das tensões encontra-se associado ao arranjo tridimensional da superfície celular, ou seja, depende da geometria celular. Assim, o conhecimento da estrutura detalhada da superfície endotelial é necessário para a análise das forças hemodinâmicas e das respostas fisiológicas associadas a elas.

No estudo das superfícies biológicas, a microscopia eletrônica de varredura (MEV) gera imagens de maior resolução que as de microscopia óptica, permitindo observar detalhes da microestrutura. Porém, não é possível associar a morfologia endotelial e suas características mecânicas mediante essa técnica, pois a amostra precisa ser cuidadosamente preparada. No entanto, uma alternativa pode ser a microscopia de varredura por sonda mecânica (SPM – *scanning probe microscopy*). Esta vem sendo utilizada em todas as áreas da ciência dos materiais e das superfícies, incluindo a produção de imagens tridimensionais.²⁵ O microscópio de força atômica (AFM), pertencente à família SPM, tem alta resolução e pode ser operado em meios aquosos. Consequentemente, seu potencial na análise de materiais biológicos em condições fisiológicas foi rapidamente reconhecido.^{2,28}

Apresenta-se o estudo comparativo das imagens da superfície endotelial de amostras de bifurcações arteriais cerebrais humanas obtidas mediante AFM e MEV, discutindo-se as vantagens e as limitações da AFM.

Material e métodos

Dois pares de amostras do segmento M1 e da bifurcação da artéria cerebral média, com e sem doença ate-

rosclerótica, foram utilizados neste estudo. Previamente à coleta das artérias, a superfície externa foi marcada com solução de violeta de genciana a cada 5 mm, ao longo do comprimento do eixo axial, com a finalidade de identificar sua extensão *in situ*. Sob ampliação, por meio de microscópio cirúrgico, as artérias foram canuladas e lavadas com solução salina. Segmentos arteriais de comprimento axial e circunferencial de 10 mm x 4 mm, respectivamente, foram esticados até a recuperação de seu comprimento *in situ*, em placas de silício recobertas com cianoacrilato de metila, com o intuito de reproduzir a tensão axial original.

MEV

As amostras foram estabilizadas por fixação química mediante imersão em glutaraldeído durante 24 horas e, em seguida, lavadas em solução tampão fosfato, para posteriormente serem pós-fixadas em solução a 1% de tetróxido de ósmio (OsO_4) tamponado a pH = 6,5, durante uma hora. A seguir, as amostras foram colocadas em cestas permeáveis do aparelho de ponto crítico e desidratadas por meio de soluções de etanol (30%, 50%, 70%, 80% e 95%) em duas trocas de 25 minutos para cada banho e, finalmente, secas em câmara de substituição por gás carbônico liquefeito. As amostras foram recobertas com ouro em um metalizador Edwards Coater S150B (Edwards Ltda.), e as imagens, no modo de elétrons secundários, foram obtidas em um equipamento Philips XL-30, acoplado a um espectrômetro de energia dispersiva de raios X (EDS), a tensões aceleradoras de 10 KV.

AFM

Um AFM (Nanoscope IIIA, Veeco Instruments, Santa Barbara, Califórnia) equipado com um estágio de varredura piezolétrico “J” (amplitude máxima de varredura de 160 μm) e cantilever em “V” de nitreto de silício com constante de mola de 0,25 N/m (Veeco) foi utilizado para obter imagens topográficas da superfície endotelial de amostras não fixadas, porém conservadas em nitrogênio líquido. As imagens foram realizadas em modo contato e com força constante, a partir de janelas de varredura variáveis de até 15 μm^2 x 15 μm^2 e frequência de 1 Hz.

Resultados

Nas figuras 1 a 8 são apresentadas imagens de MEV e AFM da superfície endotelial nos segmentos

retos de M1 e da bifurcação da artéria cerebral média. As figuras 1 e 2, dos segmentos retos e da bifurcação sem aterosclerose, mostram que as células são alongadas e alinhadas com o eixo axial do vaso. Porém, as figuras 3 a 5, imagens de MEV da bifurcação aterosclerótica, mostram células poligonais sem orientação preferencial, numa monocamada endotelial altamente irregular e corrugada que invagina na luz do vaso e mostra características heterogêneas na superfície da membrana. Em algumas células, depressões da superfície da membrana foram observadas, geralmente associadas a uniões intercelulares. As uniões intercelulares aparecem bem definidas nas imagens da MEV e sua resolução supera aquela obtida nas imagens de AFM sob baixa magnificação (*scanner* “J”), como pode ser observado nas figuras 6 a 8. Nas imagens de AFM, a parte lateral e as uniões celulares são pouco definidas e a varredura em altas magnificações diminui a resolução. Contudo, é possível determinar a altura celular, o que não ocorre com a microscopia eletrônica de varredura.

Uma ampla variedade de curvas de indentação foi obtida (Figura 9), porém a interação permanente ponta-amostra impossibilitou qualquer conclusão sobre as propriedades mecânicas (Figura 10).

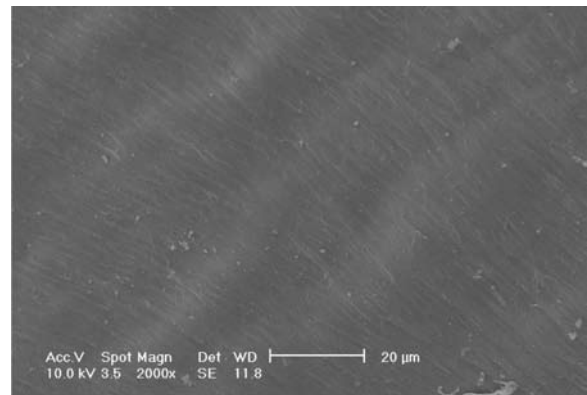


Figura 1a – Micrografia obtida por MEV da superfície luminal do segmento M_1 (2000x).

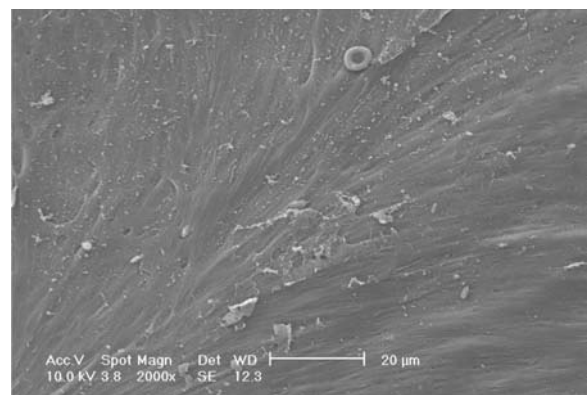


Figura 1b – Bifurcação da artéria cerebral média sem aterosclerose (2000x). A superfície endotelial orienta-se no sentido da direção do fluxo.

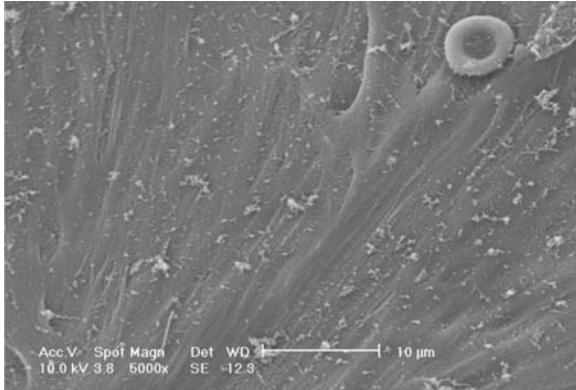


Figura 2a – Micrografia obtida por MEV da superfície endotelial da bifurcação da artéria cerebral média sem aterosclerose 5000x.

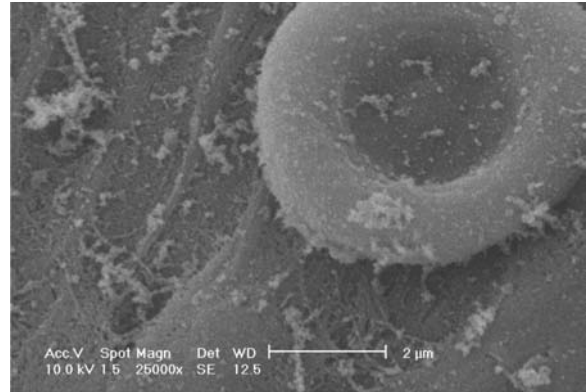


Figura 2b – Magnificação de 25000x. Os limites laterais e uniões celulares são definidos.

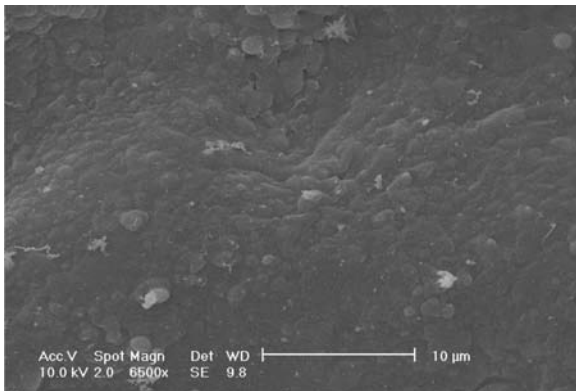


Figura 3 – Micrografia obtida por MEV da superfície luminal da bifurcação da artéria cerebral média com aterosclerose. A superfície apresenta uma monocamada endotelial irregular e corrugada que recobre protruções da luz do vaso (6500x).

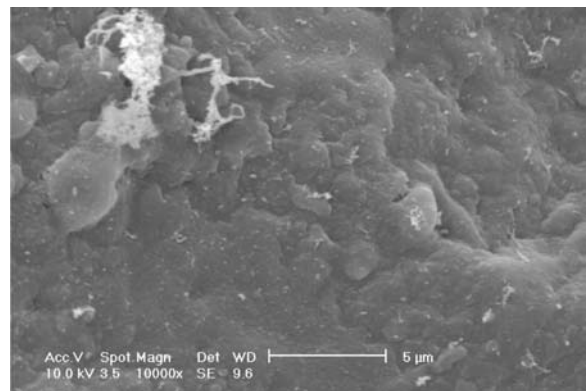
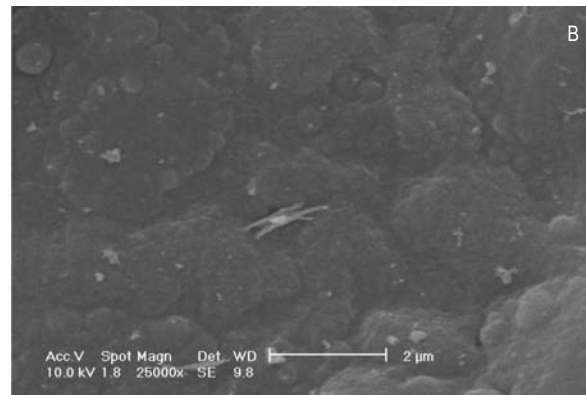
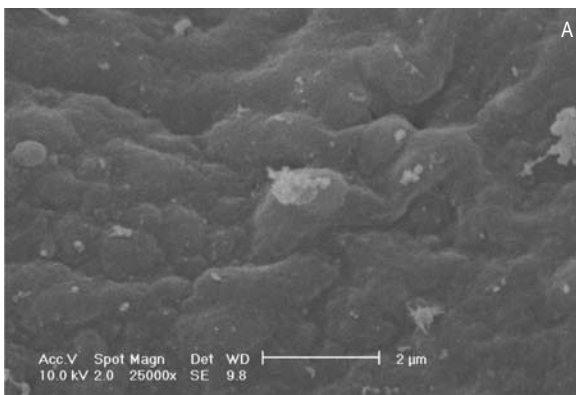


Figura 4 – Micrografia obtida por MEV da superfície luminal da bifurcação com aterosclerose. As células endoteliais apresentam morfologia poligonal sem orientação preferencial (10000x).



Figuras 5a e 5b – Micrografias obtidas por MEV da superfície luminal da bifurcação com aterosclerose. As células endoteliais apresentam-se com limites definidos e características heterogêneas na superfície da membrana (25000x).

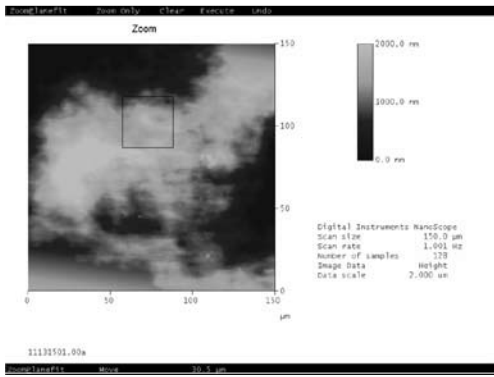


Figura 6 – Imagem por AFM da superfície endotelial da bifurcação com aterosclerose. É possível reconhecer a irregularidade da superfície luminal, porém a resolução da morfologia celular se encontra comprometida.

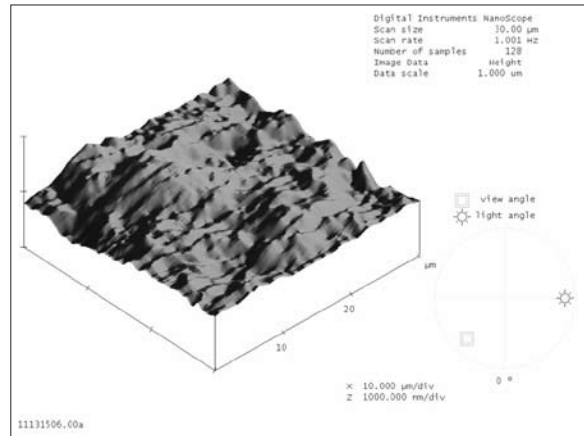


Figura 7 – Representação tridimensional da imagem por AFM da artéria cerebral média com aterosclerose. É possível reconhecer, na morfologia da superfície, os efeitos da indentação da amostra pela sonda (sulcos orientados na direção da varredura, 30 μm² x 30 μm²).

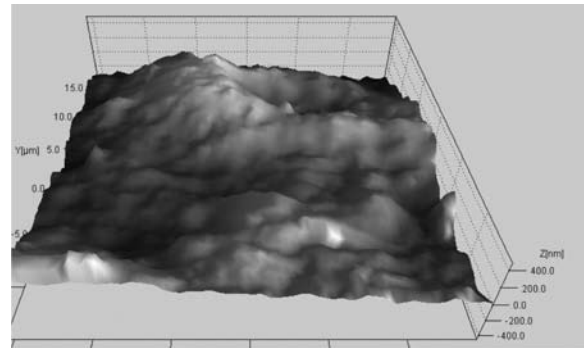
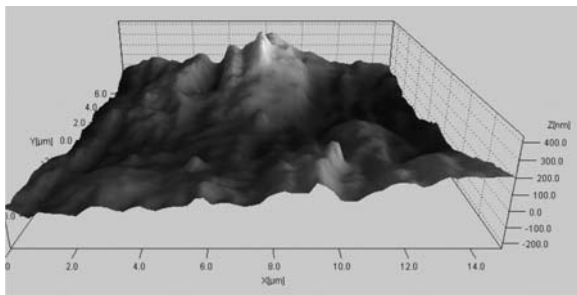


Figura 8 – Representação tridimensional da imagem por AFM da superfície endotelial da bifurcação da ACM com aterosclerose. A topografia tridimensional é facilmente reproduzida, permitindo a determinação da altura, porém os limites celulares não são definidos (15 μm² x 15 μm²).

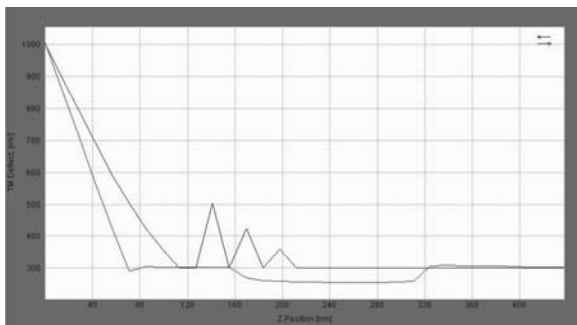


Figura 9 – Gráfico de força versus deslocamento (force plot) durante nanoindentação-AFM. Distingue-se a fase de indentação (primeira porção ou ascendente da curva) da retirada da ponta (segunda porção ou de descida da curva). A diferença entre ambas as porções da curva corresponde à histerese da amostra.

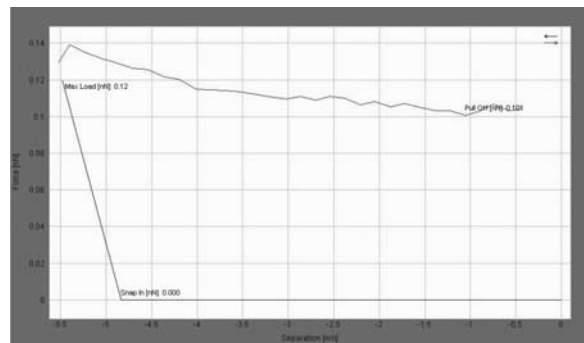


Figura 10 – Efeitos da interação permanente sonda-amostra no gráfico de força versus deslocamento (force plot) durante nanoindentação-AFM. A ponta permanece aderida na amostra, impossibilitando a obtenção de informação confiável.

Discussão

Previamente ao desenvolvimento dos microscópios de varredura por sonda, a única ferramenta disponível na pesquisa da superfície de células vivas foi o microscópio óptico. Porém, a resolução é limitada e, sem o uso de um microscópio confocal associado, não é possível determinar altura ou profundidade. Heinrich Rohrer e Gerd Binnig desenvolveram os procedimentos de controle da corrente de tunelamento que permitiram a construção do primeiro microscópio da família de varredura por sonda mecânica.^{6,19} O microscópio de força atômica é um microscópio de varredura por sonda desenhado para a pesquisa de superfícies, que permite superar as limitações da microscopia óptica e caracterizar quantitativamente a superfície celular em condições próximas das fisiológicas, numa escala de resolução até então inacessível.^{1,19,26}

O princípio de funcionamento da AFM pode ser resumido da seguinte maneira: uma sonda mecânica é montada sobre a extremidade livre de um cantilever e colocada em contato com a superfície da amostra a ser investigada. O contato dá origem a uma interação altamente localizada entre a sonda e a amostra, o que produz a deflexão do cantilever, enquanto um estágio de varredura (*scanner piezolétrico*) provê a movimentação lateral da amostra em relação à sonda, descrevendo um padrão de varredura. Durante a varredura, a deflexão do cantilever é monitorada por meio de um sistema óptico, de maneira a manter a força, no valor previamente determinado. Para tanto, é realizada uma retroalimentação por meio de um computador que ajusta a posição vertical da amostra. Assim, as variações da altura no movimento do estágio de varredura correspondem exatamente às variações na topografia da amostra e sua morfologia é revelada diretamente.²⁵

As imagens de superfície obtidas mediante AFM dos segmentos arteriais retos e da bifurcação sem aterosclerose demonstram, em concordância com Miyazaki,⁹ que as células endoteliais apresentam morfologia alongada e alinham-se seguindo a direção do fluxo (tensão de cisalhamento ou *shear stress*). Contudo, morfologia irregular, sem orientação preferencial, pode ser observada na bifurcação com aterosclerose. Outros estudos são necessários para caracterizar o significado das prováveis diferenças encontradas, porém essas podem influenciar a interpretação das condições mecânicas locais que participam da origem das lesões vasculares, pois estudos teóricos em mecânica de fluidos modelados em superfícies sinusoidais demonstram que a geometria do endotélio determina as variações de tensão de cisalhamento (*shear stress*).³¹

Comparando-se as imagens obtidas por ambas as técnicas, foi possível observar uma melhor resolução nas imagens obtidas da MEV e houve dificuldade em varrer o endotélio em altas magnificações com AFM. No caso de materiais flexíveis, como as células, a resolução

da AFM encontra-se limitada pela indentação elástica da amostra.^{1,28,29} Isso porque, na obtenção de imagens, certa força é aplicada à ponta com a finalidade de gerar a tração suficiente que permita que os detalhes da superfície possam ser definidos pelo microscópio.

Um modo de operação adicional, que consiste em realizar uma varredura vertical da amostra com relação à ponta (sem movimento lateral), permite a obtenção de um gráfico de força *versus* deslocamento ou *force-plot* (Figura 9). Nesse modo, a deflexão do cantilever é monitorada continuamente, enquanto a ponta da sonda se move na direção da amostra, até que essa finalmente a toca. Então, o movimento da ponta é revertido com o objetivo de tornar a ponta livre novamente. A curva do gráfico, em uma amostra rígida, apresenta duas regiões: a primeira, plana, onde a deflexão é nula e, portanto, constante. Isso se deve ao fato de a ponta não ter contato com a amostra. A segunda, por sua vez, denominada parte de contato, representa a interação ponta-amostra, na qual a deflexão do cantilever gera informações a respeito da rigidez da amostra. Se a amostra for flexível, a ponta pode deformá-la, acontecendo uma parcial penetração da ponta na amostra. Nesse caso, a deflexão do cantilever é pequena e a curva torna-se não linear. Esse efeito pode ser reproduzido ao incrementar a quantidade de água da amostra.²⁸ Portanto, amostras edematizadas, tais como amostras cadavéricas utilizadas neste estudo, podem dificultar a obtenção de imagens e limitar a resolução delas. Já que a falta de rigidez da célula afeta a resolução da imagem de AFM, modos especiais de aquisição têm sido propostos, tais como o contato intermitente em meios líquidos com altas frequências de oscilação.^{10,13}

O aspecto difuso das imagens das células em meios líquidos na escala micrométrica é comum a toda AFM e é mais ou menos pronunciado conforme o tipo de célula.^{1,6,8,10,29,30} A qualidade das imagens melhora em células fixadas, porém somente é satisfatória em células secas mediante procedimentos de ponto crítico. Por outra parte, Le Grimmellec e cols.²¹ sugerem que as imagens difusas se encontrem associadas ao glicocalix e que sejam secundárias ao movimento de cadeias de açúcares sob a ponta da sonda durante a varredura. O autor observou que o tratamento de células vivas com neuraminidase, enzima que parcialmente degrada o glicocalix, permite a obtenção de imagens submicrométricas da superfície celular e dos subdomínios da membrana. Nos subdomínios da membrana, os microdomínios lipídicos, também denominados *lipid rafts*, são componentes estruturais que resultam cruciais para o desenvolvimento e a função de qualquer tipo celular.³² Contudo, no estudo desses subdomínios especializados houve um impasse, decorrente da escala proposta para seu tamanho (50 nm)¹⁷ e da ausência de métodos de alta resolução para o estudo das membranas biológicas.³² Entre as possíveis técnicas com potencial para caracterizar

esses subdomínios em células vivas, a AFM distingue-se por causa de sua alta resolução espaço-temporal.¹⁷

Além das imagens de superfície, a AFM também pode ser utilizada como um indetador ultrapreciso, capaz de determinar as propriedades mecânicas dos materiais biológicos.^{1,9,24,28-30} Virtualmente, todos os tipos celulares se adaptam a seu ambiente mecânico, e os vasos sanguíneos estão compostos de materiais dinâmicos que, de modo contínuo, adaptam sua estrutura em resposta à carga hemodinâmica.^{14,18,27,33} Entre esses, as células endoteliais são particularmente adaptáveis, porém o processo adaptativo é ainda pouco conhecido.^{14,18} Diversas técnicas, tais como sucção mediante micropipeta, espectroscopia por cintilação, pinças ópticas e microscopia acústica, têm sido aplicadas para testar as propriedades mecânicas do endotélio vascular e as respostas a elas associadas. Porém, as principais diferenças entre a nanoindentação-AFM e os métodos convencionais incluem a alta resolução lateral da AFM,²⁸ sua capacidade de controlar a força aplicada e a possibilidade de definir as propriedades mecânicas no ponto de aplicação.⁹

Neste estudo, contudo, a interação permanente ponta-amostra durante as medidas de nanoindentação influenciou na aquisição dos dados, impedindo de se chegar a conclusões relacionadas às propriedades mecânicas. Problemas de interação permanente sonda-amostra em espécimes biológicos são de difícil solução com sondas convencionais de AFM como a utilizada neste estudo, pois dependem da geometria da ponta, força de indentação e viscosidade da amostra.^{4,7,22} Entretanto, a introdução de sondas especialmente desenhadas para indentação de materiais biológicos permite a resolução da maioria deles.¹³ Assim, Charras e cols.,⁹ em células submetidas à nanoindentação-AFM, conseguiram determinar a distribuição das tensões, o módulo de elasticidade e a deformação induzida resultante da indentação. As propriedades viscoelásticas e o comportamento de deformação das células afetam inúmeras respostas biológicas, por exemplo, tanto a transformação celular como a tumorigênese estão associadas à diminuição do módulo elástico e da viscosidade aparente, sugerindo que o potencial metastático depende das propriedades mecânicas. Darling e cols.¹⁰ mostraram, por meio de medidas de AFM, que as propriedades mecânicas diferem significativamente entre diversas linhas celulares de condrossarcoma, as quais exibem diferentes níveis de invasividade e potencial metastático, sendo que as linhas de menor módulo elástico apresentam o pior comportamento. Assim, já que a modulação temporal-espacial das propriedades mecânicas da célula está intimamente relacionada a importantes processos fisiológicos e aferições das propriedades viscoelásticas de células vivas mediante nanoindentação-AFM devem proporcionar valiosa informação desses processos.^{1,4,7,13} Entretanto,

deve-se considerar que os resultados baseados em medidas de nanoindentação por AFM são altamente dependentes do modelo teórico usado na sua interpretação²⁸ e que propriedades elásticas podem ser obtidas qualitativamente mediante outros modos de operação do AFM, como força modulada.²⁶

Finalmente, a mecanotransdução dos estímulos físicos implica a deformação de canais iônicos e modificações do citoesqueleto.⁹ Receptores e canais iônicos desempenham papel essencial na manutenção da homeostase e, mesmo com estudos extensivos sobre as bases moleculares da sua função, pouco se conhece de sua localização, densidade e distribuição espacial, embora essas características possam exercer o controle local da função celular.^{3,16} Para se obter essa informação estrutural, são necessárias técnicas de imagem com resolução molecular de amostras em condições fisiológicas.³ Logo, Horton e cols.,¹⁶ utilizando um AFM associado a um microscópio confocal, lograram mapear as forças entre ligandos e receptores de células vivas. No mesmo sentido, Almqvist e cols.,³ usando sondas de AFM conjugadas com anti-Flk-1 (anticorpo contra o receptor VEGFR com função de tirosina quinase), determinaram as forças de ligação, distribuição e densidade dos receptores da membrana plasmática, descobrindo que a densidade desses receptores se correlaciona com as propriedades mecânicas da célula.

Considerando sua versatilidade, a técnica de AFM é uma ferramenta de potencial promissor na pesquisa de processos biológicos que acontecem na escala nanométrica e molecular.

Conclusão

Apesar da combinação única de alta resolução de imagem e operação sob condições próximas às fisiológicas, a AFM em amostras biológicas apresenta resolução dependente do tipo de cantilever e do grau de hidratação da amostra. Por isso, em amostras vasculares as condições fisiológicas terão de ser estritamente reproduzidas. A técnica de AFM, contudo, é uma ferramenta promissora no estudo da fisiopatologia aneurismática e aterosclerótica, pois não somente permite a obtenção de imagens de amostras sem necessidade de qualquer preparação, como possibilita a caracterização das propriedades mecânicas delas.

Agradecimentos

Os autores agradecem à professora doutora Marina Silveira e à técnica Simone Tesch Toledo, do Instituto de

Física da Universidade de São Paulo, pelo suporte na preparação de amostras mediante a técnica de ponto crítico.

Este trabalho foi realizado graças ao apoio da Fapesp (Processo nº 2006/03977-1).

Referências

1. A-Hassan E, Heinz WF, Antonik MD, D'Costa NP, Nagaswaran S, Schoenenberger CA, et al. Relative microelastic mapping of living cells by atomic force microscopy. *Biophys J*. 1998;74:1564-78.
2. Alessandrini A, Facci P. AFM: a versatile tool in biophysics. *Meas Sci Technol*. 2005;16:R65-R92.
3. Almqvist N, Bhatia R, Primbs G, Desai N, Banerjee S, Laly R. Elasticity and adhesion force mapping reveals real-time clustering of growth factor receptors and associated changes in local cellular rheological properties. *Biophys J*. 2004;86:1753-62.
4. Attard P. Measurement and interpretation of elastic and viscoelastic properties with the atomic force microscope. *J Phys Condens Matter*. 2007;19:473-501.
5. Barbee KA, Davies PF, Lal R. Shear stress induced reorganization of the surface topography of living endothelial cells imaged by atomic force microscopy. *Cir Res*. 1994;74:163-71.
6. Binnig G, Quate CF, Gerber Ch. Atomic force microscope. *Phys Rev Lett*. 1986;12:930-33.
7. Bowen WR, Lovitt RW, Wright CJ. Application of atomic force microscopy to the study of micromechanical properties of biological materials. *Biotechnol Lett*. 2000;22:893-903.
8. Cebal JR, Castro MA, Burgess JE, Pergolizzi RS, Sheridan MJ, Putman CM. Characterization of cerebral aneurysms for assessing risk of rupture by using patient-specific computational hemodynamics models. *AJNR*. 2005;26:2550-9.
9. Charras GT, Lehenkari PP, Horton MA. Atomic force microscopy can be used to mechanically stimulate osteoblasts and evaluate cellular strain distributions. *Ultramicroscopy*. 2001;86:85-95.
10. Darling EM, Zauscher S, Block JA, Guiliak F. A thin-layer model for viscoelastic, stress-relaxation testing of cells using atomic force microscopy: Do cell properties reflect metastatic potential? *Biophys J*. 2007;92:1784-91.
11. Davies E, Mundel T, Barbee KA. A mechanism for heterogeneous endothelial responses to flow in vivo and in vitro. *J Biomech*. 1995;28:1553-60.
12. Davies PF, Zilberberg J, Helmke BP. Spatial microstimuli in endothelial mechanosignaling. *Circ Res*. 2003;92:359-70.
13. Eberstein DM, Pruitt LA. Nanoindentation of soft hydrated materials for application to vascular tissues. *J Biomed Mater Res*. 2004;69A:222-32.
14. Gimbrone MA, Resnick N, Nagel T, Khachigian LM, Collins T, Topper JN. Hemodynamics, endothelial gene expression, and atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci*. 1997;811:1-10.
15. Hansson GK, Robertson AK, Söderberg-Nauclér C. Inflammation and atherosclerosis. *Annu Rev Pathol*. 2006;1:297-329.
16. Horton M, Charras G, Lehenkari P. Analysis of ligand-receptor interactions in cells by atomic force microscopy. *J Recept Signal Transd*. 2002;22:169-90.
17. Jacobson K, Mouritsen OG, Anderson RGW. Lipid rafts: at a crossroad between cell biology and physics. *Nature Cell Biology*. 2007;9:7-14.
18. Jankowski P, Bilo G, Kawecka-Jaszcz K. The pulsatile component of blood pressure: its role in the pathogenesis of atherosclerosis. *Blood Press*. 2007;16:238-45.
19. Kasas S, Gotzov V, Celio MR. Observation of living cells using the atomic force microscope. *Biophys J*. 1993;64:539-44.
20. Knudsen HL and Frangos JA. Role of cytoskeleton in shear stress-induced endothelial nitric oxide production. *Am J Physiol*. 1997;273:H347-55.
21. Le Grimmellec C, Lesniewska E, Cachia TC, Schreiber T, De Fornel T, Goudonnet JP. Imaging of the membrane surface of MDCK cells by atomic force microscopy. *Biophys J*. 1994;67:36-41.
22. Lundkvist A, Lilleodden E, Siekhaus W, Kinney J, Pruitt L, Balooch M. Viscoelastic properties of healthy human artery measured in saline solution by AFM-based indentation technique. *Materials Research Society Conference Proceedings*. San Francisco, CA; April 1995; p. 21-28.
23. Mallika V, Goswami B, Rajappa M. Atherosclerosis pathophysiology and the role of novel risk factors: a clinico-biochemical perspective. *Angiology*. 2007;58:513-22.
24. Miyazaki H, Hayashi K. Atomic force microscopic measurement of the mechanical properties of intact endothelial cells in fresh arteries. *Med Biol Eng Comput*. 1999;37:530-36.
25. Neves BRA, Vilela JMC, Andrade MS. Scanning probe microscopy: an introduction. *Cerâmica*. 1998;44:212-9.
26. Putman CAJ, Van der Werf KO, De Groot BG, Van Hulst NF, Greve J. Viscoelasticity of living cells allows high-resolution imaging by tapping mode atomic force microscopy. *Biophys J*. 1994;67:2454-6.
27. Qin K, Jiang Z, Sun H, Gong K, Liu Z. A multiscale model for analyzing the synergy of CS and WSS on the endothelium in straight arteries. *Acta Mech Sinica*. 2006;22:76-83.
28. Radmacher M. Measuring the elastic properties of biological samples with the atomic force microscope. *IEEE Med Eng Biol*. 1997;16:47-57.
29. Radmacher M, Fritz M, Kacher CM, Cleveland JP, Hansma PK. Measuring the viscoelastic properties of human platelets with the atomic force microscope. *Biophys J*. 1996;70:556-67.
30. Rotsch C, Radmacher M. Drug-induced changes of cytoskeletal structure and mechanics in fibroblasts: An atomic force microscopy study. *Biophys J*. 2000;78:520-35.
31. Satcher RLJ, Bussolari SR, Gimbrone MAJ, Dewey CFJ. The distribution of fluid forces on model arterial endothelium using computational fluid dynamics. *J Biomech Eng*. 1992;14:309-16.
32. Tsui-Pierchala BA, Encinas M, Milbrandt J, Johnson EM Jr. Lipid rafts in neuronal signaling and function. *Trends Neurosci*. 2002;25:412-7.
33. Vanepss JS, Vorp DA. Mechano-pathobiology of atherogenesis: a review. *J Surg Res*. 2007;142:202-17.
34. Zalba G, Fortuño A, San José G, Moreno MU, Beloqui O, Díez J. Oxidative stress, endothelial dysfunction and cerebrovascular disease. *Cerebrovasc Dis*. 2007;24:24-9.
35. Zarins CK, Giddens DP, Bharadvaj BK, Sottiurai VS, Mabon RF, Glagov S. Quantitative correlation of plaque localization with flow velocity profiles and wall shear stress. *Circ Res*. 1983;53:502-14.

Original recebido em março de 2008

Aceito para publicação em setembro de 2008

Endereço para correspondência

Rogelio Iván Ortiz-Velásquez

Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255, 3º andar – Cerqueira César – 05403-001 – São Paulo, SP, Brasil

E-mail: rivanov72@usp.br