THAÍS CRISTINA SOUZA DE OLIVEIRA

Efeito da exposição intermitente à angiotensina II em doses não pressoras sobre a liberação cardíaca de TGFβ e IL-6 em camundongos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2015

THAÍS CRISTINA SOUZA DE OLIVEIRA

Efeito da exposição intermitente à angiotensina II em doses não pressoras sobre a liberação cardíaca de TGFβ e IL-6 em camundongos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Lacchini

Co-orientador: Prof. Dr. Luciano de Figueiredo Borges

Versão original

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Oliveira, Thaís Cristina Souza de.
Efeito da exposição intermitente à angiotensina II em doses não pressoras sobre a liberação cardíaca de TGFβ e IL-6 em camundongos / Thaís Cristina Souza de Oliveira. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Silvia Lacchini.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Anatomia. Área de concentração: Ciências Morfofuncionais. Linha de pesquisa: Estudo do sistema renina-angiotensina e de processos inflamatórios aplicados à fisiopatologia cardiovascular.

Versão do título para o inglês: Effect of intermittent exposure to angiotensin II in non-pressor doses on cardiac release of TGFβ and IL-6 in mice.

1. Sistema renina angiotensina 2. Inflamação 3. Angiotensina II 4. TGF beta 5. IL-6 6. Plasminogênio I. Lacchini, Profa. Dra. Silvia II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais III. Título.

ICB/SBIB0162/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Thaís Cristina Souza de Oliveira.

Título da Tese: Efeito da exposição intermitente à angiotensina II em doses não pressoras sobre a liberação cardíaca de TGFβ e IL-6 em camundongos.

Orientador(a): Profa. Dra. Silvia Lacchini.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **130** nas fls. **12** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Silvia Lacchini,** Coordenador (a) da Linha de pesquisa *"Ação não hemodinâmica da angiotensina II sobre a liberação de TGFbeta e IL-6 em artérias cardíacas de camundongos"* do qual participam o(s) aluno(s) **Thais Cristina de Souza Oliveira, Tatiane Oliveira Ferreira e** a estagiaria **Cintia Taniguti Lima** e a pesquisadora **Maria Claudia Irigoyen,** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **10.03.2014, com validade de 4 anos**.

São Paulo, 12 de março de 2014.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA- ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

Dedico está Tese a Deus, ao Giuliano meu companheiro da vida e aos meus Pais:

Muitas vezes na vida somos muito clichês e previsíveis, mas em algumas situações é até necessário, dentro da minha crença e fé, a minha certeza é plena da presença de Deus me guiando e impulsionando na realização e conclusão de mais essa fase da minha vida.

A você Giuliano, meu companheiro de todas as horas só tenho a agradecer, por me compreender muitas vezes sem saber ao certo o porquê, sua paciência, carinho, amor, tudo isso a sua moda com seu jeitinho particular que preenche as pessoas sem ao menos elas perceberem, quando nos damos conta já estamos encantados. Saiba que você é uma das escolhas especiais da minha vida e tenho certeza que ao seu lado sou uma pessoa melhor.

Meus pais são pessoas tão especiais que seria impossível definir em palavras, mas a tentativa seria: doação, dedicação, amor, princípios, valores. A vida passa muito rápido, já chegou àquela fase que sou eu que tenho que cuidar de vocês mais do que vocês de mim, mesmo sendo um momento difícil porque essa inversão de papéis é muito difícil. Mas se tem algo que me ensinaram com excelência é ser forte e conquistar meus objetivos. Por isso sigo lutando, forte mesmo em alguns momentos fraquejando, mas jamais desistindo. A vocês minha eterna gratidão, respeito, amor.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente **Deus**, por me presentear com a vida e colocar no meu caminho pessoas as quais me fizeram crescer e aprender, pela força de conseguir vivenciar tantas experiências e superar as dificuldades sempre.

A Profa. **Silvia LACCHINI**, minha orientadora pessoa especial que tem um lado humano como poucos seres são capazes de ter, sua compreensão é sem dúvida uma das suas maiores virtude e qualidade, meu muito obrigada por compreender, até mesmo o momento que a vida toma um rumo diferente e fazemos escolhas diferentes, saiba que seus ensinamentos vão me acompanhar sempre.

Ao Prof. **Luciano de Figueiredo Borges**, meu co-orientador por sua contribuição, sempre um diferencial a mais, resultado de sua competência e excelência indiscutível.

Ao Amigo **Ricardo Bandeira**, a participação dele torna-se mais do que importante e ele mais do que ninguém sabe do que estou falando, existem amigos que não precisamos conviver todos os dias, tão pouco demonstrar aos outros esse sentimentos, os verdadeiros sabem o lugar que ocupa.

Ao Amigo **Fabio Lucas França** ¨Guerreiro¨, pessoa especial, amigo leal, bom ouvinte, conselheiro, me ajudou em muitos momentos nessa longa jornada, ¨tamu junto sempre¨.

Aos colaboradores parceiros do Instituto do Coração-Incor do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular e do Laboratório de Hipertensão Experimental, em especial **Thaís Girão, Valério Garrone Barauna ¨Jaú¨, Ayumi Aurea Miyakawa.**

Aos membros da banca do exame de qualificação, Prof. Dr. **Luciano de Figueiredo Borges, Prof. Dr. Richard Halti Cabral e Profa. Dra. Patrícia Castelucci**.

Aos queridos colegas e companheiros de laboratório **Tati 1, Tati 3, Juliane, Cintia, Thúlio.** E todos aqueles que passaram e que estão chegando no grupo, mesmo aqueles que não tive oportunidade de conviver. Por toda dedicação e carinho.

Em especial a minha amiga **Tati 2,** pessoa companheira, esforçada, carinhosa, sonhadora, nossas vidas acabaram tomando rumos bem diferentes, mas isso não interfere em nada o carinho especial que tenho por você.

Aos Funcionários do Biotério do Departamento de anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, **Rodrigo, Fábio e Renivaldo**

Aos Funcionários do bloco didático da Anatomia, por toda atenção.

Aos Funcionários do multiusuário de histologia.

Aos Funcionários do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

As secretárias do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Ensino Superior (CAPES) pelo apoio na concessão da Bolsa de Estudos .

Aos meus pais amados **José e Dalva**, inspiração de vida, por todo amor, dedicação, educação e valores que sempre me deram minha eterna gratidão, amo vocês demais.

Ao meu companheiro de vida **Giuliano Henrique**, sei que em muitos momentos a vida não é nada fácil, mas vamos seguindo vivendo um dia após o outro, caindo, levantando e sempre nos apoiando um no outro, Amo Você.

A minha família irmãos, cunhados, cunhadas, sobrinhos, tios.

A minha terapeuta **Isaura Naufel**, por ser uma pessoa especial capaz de me fazer acreditar sempre mais em meu potencial e virtudes.

A minha amiga **Katia Viegas**, que mesmo a distância ainda assim se fez e se faz presente na minha vida e neste trabalho.

A todos meus pacientes pela compreensão neste momento de conclusão, onde por muitas vezes foi necessário remarcar nossos horários.

E faço também um agradecimento geral, existem pessoas que moram em meu coração, e que talvez por esquecimento ou até mesmo por impossibilidades particulares, não estão citadas, porém deixo aqui registrada a minha gratidão.

“Não é o mais forte que sobrevive. Nem o mais inteligente. Mas o que melhor se adapta às mudanças.”

Charles Darwin

RESUMO

OLIVEIRA T. C. S. **Efeito da exposição intermitente à angiotensina II em doses não pressoras sobre a liberação cardíaca de TGFβ e IL-6 em camundongos.** 2015. 98 f. Tese (Doutorado em Ciências Morfofuncionais) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Neste estudo, avaliou-se o efeito da exposição intermitente à Ang II, levando em consideração uma dose que tenha uma ação não pressora, sobre a liberação de citocinas inflamatórias como a interleucina-6 (IL-6) e fator de crescimento transformante beta (TGFβ), bem como PAI-1 e plasminogênio/plasmina. O estudo foi realizado em camundongos machos C57Bl/6, submetidos ao tratamento com Ang II (30ng/kg), com losartan (30mg/kg) ou uma combinação destes, nos tempos de: 30 minutos, 1, 3 e 10 dias. As avaliações mostraram que a Ang II não altera pressão arterial, sugerindo que os aumentos observados de IL-6 e TGFβ sejam decorrentes de ação direta da Ang II. A Ang II promove aumento tanto agudo de TGFβ, possivelmente associado à ação proteolítica da plasmina e alterações vasculares transitórias compatíveis com aumento de permeabilidade, como crônico de TGFβ, possivelmente associado ao aumento da expressão gênica, levando ao aumento da deposição de colágeno vascular.

Palavras-chave: Angiotensina II. Inflamação. TGFβ. IL-6. Sistema renina angiotensina.

ABSTRACT

OLIVEIRA T. C. S. **Effect of intermittent exposure to angiotensin II in non-pressor doses on cardiac release of TGFb and IL-6 in mice.** 2015. 98 p. Ph. D. thesis (Morphological Sciences) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

This study, evaluated the effect the intermittent exposure to Angiotensin II (Ang II), taking in account a non-pressor dose on the release of inflammatory cytokines such as interleukin-6 (IL-6), transforming growth factor beta (TGFβ) as well PAI-1 and plasminogen /plasmin. The study was conducted on male mice C57BL/6 subjected to the treatment with angiotensin II (30 ng/kg), losartan (30 mg/kg) or a combination thereof, at times: 30 minutes, 1, 3 and 10 days. The evaluations showed that Ang II did not change blood pressure, suggesting that the increases of IL-6 and TGFβ may be by due to direct action of Ang II. Ang II promotes both acute increase of TGFβ, possibly associated with the proteolytic action of plasmin and transient vascular changes consistent with increased permeability, such as chronic increase of TGFβ, possibly associated with increased gene expression, leading to increased vascular collagen deposition.

Keywords: Angiotensin II. Inflammation. TGFβ. IL-6. Renin-angiotensin system.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Apresentação dos componentes do Sistema Renina Angiotensina: 24
Figura 2 - Esquema do sistema de medida direta utilizado nos experimentos: 38
Figura 3 – Representação dos pesos moleculares das proteínas estudadas: 41
Figura 4 – Esquema de procedimentos histológicos e análises microscópicas: 43
Figura 5– Fotografia do histotécino utilizado para processamento dos tecidos estutados em microscopia de luz e imunohistoquímica: 44
Figura 6 – Esquema representativo das medidas dos cardiomiócitos: 45
Figura 7 – Representação da medida da deposição de fibras colágenas perivasculares: 46
Figura 8– Valores médios de pressão arterial curtos períodos: 53
Figura 9 – Valores médios de pressão arterial todos tempos tratados: 54
Figura 10 – Valores médios do peso corporal: 56
Figura 11- Valores médios do peso relativo do coração: 57
Figura 12- Valores médios do peso relativo dos rins: 58
Figura 13- Valores médios do peso relativo dos pulmões: 59
Figura 14 - Valores médios da espessura de cardiomiócitos: 61
Figura 15- Relação de área de colágeno/área do vaso tempo de tratamento 30 minutos: 62
Figura 16– Relação de área de colágeno/área do vaso tempo de tratamento 1 dia: 63
Figura 17– Relação de área de colágeno/área do vaso tempo de tratamento 3 dias: 64
Figura 18– Relação de área de colágeno/área do vaso tempo de tratamento 10 dias: 64
Figura 19- Valores médios da relação percentual das detecções proteícas para IL-6 em 30 minutos: 65
Figura 20- Valores médios da relação percentual das detecções proteícas para IL-6 tratamento 10 dias: 67
Figura 21 – Valores médios dos escores de imunomarcação para IL-6 nas artérias cardíacas dos grupos tratados após 30 minutos: 68
Figura 22– Valores médios dos escores de imunomarcação para IL-6 nas 69

artérias cardíacas dos grupos controle e Ang II tratados por 1 dia:
Figura 23 – Valores médios dos escores de imunomarcação para IL-6 nas artérias cardíacas dos grupos controle e Ang II tratados por 3 dias: 70
Figura 24– Valores médios dos escores de imunomarcação para IL-6 nas artérias cardíacas dos grupos controle e Ang II tratados por 10 dias: 71
Figura 25- Análise proteica da relação percentual TGFβ tempo de tratamento 30 minutos: 73
Figura 26- Análise proteica da relação percentual TGFβ tempo de tratamento 1 dia: 74
Figura 27- Análise proteica da relação percentual TGFβ tempo de tratamento 3 dias: 75
Figura 28- Análise proteica da relação percentual TGFβ tempo de tratamento 10 dias: 76
Figura 29 – Valores médios dos escores de imunomarcação para TGFβ em artérias cardíacas dos animais tratados após 30 minutos: 77
Figura 30 – Valores médios dos escores de imunomarcação para TGFβ em artérias cardíacas dos animais tratados após 10 dias: 77
Figura 31 – Valores médios dos escores de imunomarcação para Plasminogênio nas artérias cardíacas dos grupos tratados de 30 minutos: 79
Figura 32 – Valores médios dos escores de imunomarcação para Plasminogênio nas artérias cardíacas dos grupos tratados por 10 dias: 80
Figura 33 – Valores médios dos escores de imunomarcação para PAI-1 nas artérias cardíacas dos grupos tratados de 30 minutos: 81
Figura 34 – Valores médios dos escores de imunomarcação para PAI-1 nas artérias cardíacas dos grupos tratados por 10 dias: 82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- apresentação dos grupos experimentais, tratamentos e doses: 34
Tabela 2 – Tempos estudados e tratamentos realizados: 36
Tabela 3 – apresentação dos grupos de tratamentos e tempos estudados: 36
Tabela 4– Anticorpos primários, recuperação antigênica e diluições utilizadas para marcação Imunohistoquímica: 48
Tabela 5 – Anticorpos secundários (Ac2º) e diluições utilizadas na Imunohistoquímica: 49
Tabela 6 – Descrição do significado do escore da marcação Imunohistoquímica: 50
Tabela 7 – número de animais por grupo avaliados: 52
Tabela 8 - peso corporal (medido em grama): 55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Amp e D-Amp - aminopeptidase
Ang I - angiotensina I
Ang II – angiotensina II
Ang III - angiotensina III
Ang IV - angiotensina IV
Ang (1-7) - angiotensina (1-7)
ANOVA – teste de variância
AT1 – receptor para angiotensina II do tipo 1
AT2 - receptor para angiotensina II do tipo 2
BSA - albumina sérica bovina
Cbp - carboxipeptidase
CML - célula muscular lisa
DCNT - doença crônica não transmissível
ECA - enzima conversora de angiotensina I
ECA2 - enzima conversora de angiotensina 2
ELISA - Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EROs - espécies reativas de oxigênio
FC – frequência cardíaca
ICB – Instituto de Ciências Biomédicas
IHC – imunohistoquímica
IL-6 – interleucina-6
IP3 - inositol trifosfato
Kg - quilograma
kDa – quilo Dalton
LAP - peptídio associado à latência
Los - losartan
mg – miligrama
mM - milimolar
MEC - matriz extracelular
MCP-1 - proteína quimiotática de monócitos
NEP - endopeptidase neutra
NO – óxido nítrico

OMS - organização mundial da saúde

PAM – pressão arterial média

PAS – pressão arterial sistólica

PAD – pressão arterial diastólica

PAI-1 – inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1

PEP - prolilendopeptidase

PLC - fosfolipase C

pH – potencial de hidrogênio

SRA - sistema renina-angiotensina

VCAM – molécula de adesão de célula vascular

VEGF – fator de crescimento derivado de endotélio vascular

TNF-α - fator de necrose tumoral tipo alfa

μL – microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **19**

1.1 Doenças Vasculares **19**

1.2 Relação da Integridade Vascular e da Resposta Inflamatória **19**

1.3 Sistema Renina Angiotensina **22**

1.4 Angiotensina II e Inflamação **26**

1.5 Doença Arterial Coronariana **29**

2 JUSTIFICATIVA **31**

3 OBJETIVO **33**

3.1 Objetivos Gerais **33**

3.2 Objetivos Específicos **33**

4 MATERIAIS E MÉTODOS **34**

4.1 Animais e manutenção **34**

4.2 Tempos de tratamento e grupos **34**

4.3 Canulação e Avaliação da Pressão Arterial e Frequência Cardíaca **37**

4.4 Avaliação do peso corporal e do peso relativo de coração, rins e pulmões **39**

4.5 Avaliação de TGFβ e IL-6 locais por *Western Blot* **39**

4.6 Preparação dos tecidos para analises histoquímica, imunohistoquímica e morfométrica **42**

4.7 Morfometria **44**

4.7.1 Avaliação dos cardiomiócitos ***44***

4.7.2 Análise da deposição de fibras colágenas perivasculares ***44***

4.8 Avaliação de IL-6, TGFβ, Plasminogênio e PAI-1 locais por Imunohistoquímica (IHQ) **47**

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA **51**

6 RESULTADOS **52**

6.1 Avaliação de pressão arterial e frequência cardíaca – avaliação direta **52**

6.2 Análise Biométrica **55**

6.3 Avaliação dos cardiomiócitos **60**

6.4 Análise da deposição de fibras colágenas perivasculares **61**

6.5 Estudo de marcadores Inflamatórias **65**

6.5.1 Avaliação da expressão de IL-6 por western blotting e imunohistoquímica 65
6.5.2 Avaliação da expressão de TGFβ por western blotting, e análise imunohistoquímica de TGFβ, PAI-1 e plaminogênio/plasmina 72
7 DISCUSSÃO 83
7.1 Achados hemodinâmicos 83
7.2 Achados morfométrico 83
7.3 Ação da Ang II subpressora sobre a liberação de IL-6 85
7.4 Ação da Ang II subpressora sobre a Presença do TGFβ, PAI-1 e Plasminogênio/Plasmina 87
8 CONCLUSÃO 90
REFERÊNCIAS 91

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doenças Vasculares

Nas últimas décadas, inúmeros estudos têm sido feitos a respeito das doenças vasculares, tendo em vista que são elas as principais causas de morbidade e mortalidade na sociedade ocidental. As doenças cardiovasculares representam cerca de 245 mortes a cada 100.000 habitantes no mundo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2013). Já no Brasil, doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) representam 72,4% das causas de óbito registradas, sendo as doenças cardiovasculares responsáveis por cerca de 80,7% de tais mortes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Os desfechos mais comuns destas doenças são: infartos do miocárdio e cerebral, aneurisma de aorta e doença vascular periférica, geralmente decorrente de arterioesclerose, que contribui para lesões degenerativas e fibrose em pequenas artérias, ou aterosclerose, doença de artérias elásticas principalmente artérias coronárias, aorta, carótidas, artérias cerebrais e grandes artérias periféricas (ROSS, 1995).

Os mecanismos que determinam ou levam ao desenvolvimento de tais doenças ainda não estão completamente esclarecidos devido à grande complexidade das interações celulares, tanto em situações fisiológicas quanto patológicas.

1.2 Relação da Integridade Vascular e da Resposta Inflamatória

A parede vascular é caracterizada pela presença de três túnicas, com particularidades próprias conforme a função desempenhada. Estas túnicas, partindo da mais interna, são denominadas túnicas íntima, média e adventícia. Vasos de grande calibre têm túnicas médias e adventícias nutridas por vasos próprios denominados *vasa vasorum* (WILTING, 2002), e a configuração geral das túnicas é diferente para as redes de alta pressão (artérias) e a de baixa pressão (veias).

As artérias são órgãos complexos, capazes de se adaptar a estímulos mecânicos e químicos de diferentes naturezas, cuja parede é um conjunto ativo e integrado composto por células endoteliais, células musculares lisas e fibroblastos, interligados uns aos outros por uma rede de interações autócrinas e parácrinas

(GIMBRONE et al., 1997). Além dos componentes celulares, a parede vascular é composta de matriz extracelular, produzida especialmente pelas células musculares lisas e é essencial na regulação da homeostasia e arquitetura tecidual (STAMENKOVIC, 2003). Assim, o vaso é capaz de modificar sua estrutura e função em resposta a estímulos fisiológicos ou lesivos (TULIS, 1998).

A túnica íntima (também chamada de túnica interna) é composta por camadas de células epiteliais e componentes de matriz extracelular, o tecido conjuntivo. O epitélio estratificado simples é chamado de endotélio, e se apresenta contínuo ao longo de todo o sistema vascular, incluindo as câmaras cardíacas. Adjacente ao endotélio, encontra-se a membrana ou lâmina basal, que fornece força, mantém flexibilidade, e é também permeável (KIERSZENBAUM, 2012). A fina camada exterior à camada íntima contém uma pequena quantidade de fibras elásticas para proporcionar flexibilidade, e também contém algumas fibras de colágeno para proporcionar resistência adicional. Em artérias de maior calibre, há também uma camada distinta constituída de fibras elásticas conhecidas como a membrana elástica interna (também chamada lâmina elástica interna) no limite com a túnica média (WAGENSEIL, 2009). Abaixo do endotélio existe uma camada denominada de subendotelial, a qual possui filamentos de conexão e ancoragem constituídos por fibrina e fibras de colágeno, sendo que em ratos e camundongos não há a presença de células nesta camada (GERRITY, 1972).

A túnica média situa-se na sequência da camada íntima e precede a túnica adventícia, ou seja, é a camada intermediária da parede vascular. Ela é geralmente a camada mais espessa nas artérias, e é muito mais espessa nas artérias do que nas veias (WAGENSEIL, 2009). A túnica média é composta por camadas de músculo liso sustentadas por uma matriz extracelular (MEC), essencialmente constituída por macromoléculas como colágeno, glicoproteínas não colagênicas, proteoglicanos e lâminas e fibras elásticas, a maioria das quais dispostas em camadas circulares concêntricas. A contração e o relaxamento da camada muscular lisa diminui e aumenta respectivamente o diâmetro da luz do vaso (METTOUCHI, 2012; WAGENSEIL, 2009). O colágeno é encontrando de forma abundante na MEC atuando na manutenção da integridade e resistência à tensão na parede vascular (BOSMAN, 2003). Os tipos de colágeno mais presentes na parede vascular são os colágenos tipos I, III, IV, V e VI (PLENZ et al., 2003).

A túnica adventícia (também chamada de túnica externa) é uma bainha substancial de tecido conjuntivo composta principalmente de fibras de colágeno. Algumas faixas de fibras elásticas são também encontradas (STENMARK et al., 2013). As camadas exteriores da túnica adventícia são ricas em colágeno dos tipos I e III, o que fortalece a parede do vaso e previne da ruptura do mesmo.

Tanto em processos patológicos vasculares, como também no envelhecimento, a deposição de colágeno na rede arterial encontra-se alterada, levando ao enrijecimento vascular (STENMARK et al., 2013). Assim, em estados patológicos como de hipertensão arterial e diabetes, o aumento da deposição de colágeno em longo prazo contribui para o enrijecimento da parede arterial, comprometendo a distensibilidade vascular e contribuindo para o desenvolvimento do processo hipertensivo (CAMPBELL et al., 2011; WEISSBERG, 1999).

Um fato importante para a função vascular é que a túnica íntima é capaz de funcionar como um sensor, detectando alterações hemodinâmicas e humorais, além de funcionar como um efetor podendo eventualmente afetar a estrutura do vaso (GIMBRONE, 1999). Assim, o endotélio é capaz de detectar e responder a sinais mecânicos, físicos ou químicos, processar as informações e liberar fatores que modificam o tônus vascular, a função plaquetária, a adesão de moléculas, levar a alterações metabólicas locais e a modificar a permeabilidade através das junções intercelulares (VIEGAS; LACCHINI, 2008).

Dessa forma, o endotélio é extremamente importante para manter a integridade dos vasos, e pode estar intimamente relacionado com o início de um processo inflamatório, já que este é capaz de produzir vários moduladores inflamatórios (SANTORO, 2010). Por exemplo, as moléculas de adesão, expressas no endotélio agem como iniciadores críticos para a resposta inflamatória, mediando a diapedese de leucócitos, da luz vascular para o interstício, além de produtos de bactérias, hormônios vasocontritores e produtos de metabolismo intermediário, como de oxigênio e citocinas pró-inflamatórias (ELLIS, 2003; GIBBONS; DZAU, 1994; LIBBY, 2005).

O conhecimento sobre a função da célula endotelial mudou muito a partir de 1980, quando Furchgott e Zawadzki demonstraram que as células endoteliais são capazes de modular o tônus vascular (CHERRY et al., 1982). A célula endotelial participa ativamente não apenas o tônus vascular, como também a coagulação, trombólise, remodelamento vascular e a resposta inflamatória e imune. Neste

contexto, uma série de trabalhos mostrou que as células endoteliais regulam a proliferação de monócitos (PAKALA; BENEDICT, 1999), tônus vascular (MONCADA, 1991) metabolismo lipídico (GIMBRONE, 1999), crescimento celular, migração celular e integração com matriz extracelular e inflamação (WEII, 1999).

Quando temos uma doença instalada, a partir das alterações geradas pela inflamação, inicia-se um processo de lesão vascular, onde as células musculares lisas têm papel essencial em doenças como aterosclerose e restenose; após a injúria da parede arterial, células musculares lisas migram da camada média para a íntima e proliferam (NAFTILILAN, 1994; ROSS, 1999).

Vale salientar que a migração dos leucócitos para o espaço subendotelial depende, principalmente, da expressão de citocinas quimioatrativas (como a MCP-1). Além disso, a atividade destas células leva à produção de mediadores como prostanóides e outros derivados do ácido araquidônico, além da liberação de histamina, que leva ao aumento da permeabilidade vascular. A maior consequência deste processo inflamatório vascular é a migração das células musculares lisas para a íntima formando a camada chamada neoíntima ou mioíntima, o que vai gerar um espessamento e a deposição de matriz extracelular (VIEGAS; LACCHINI, 2008).

1.3 Sistema Renina Angiotensina

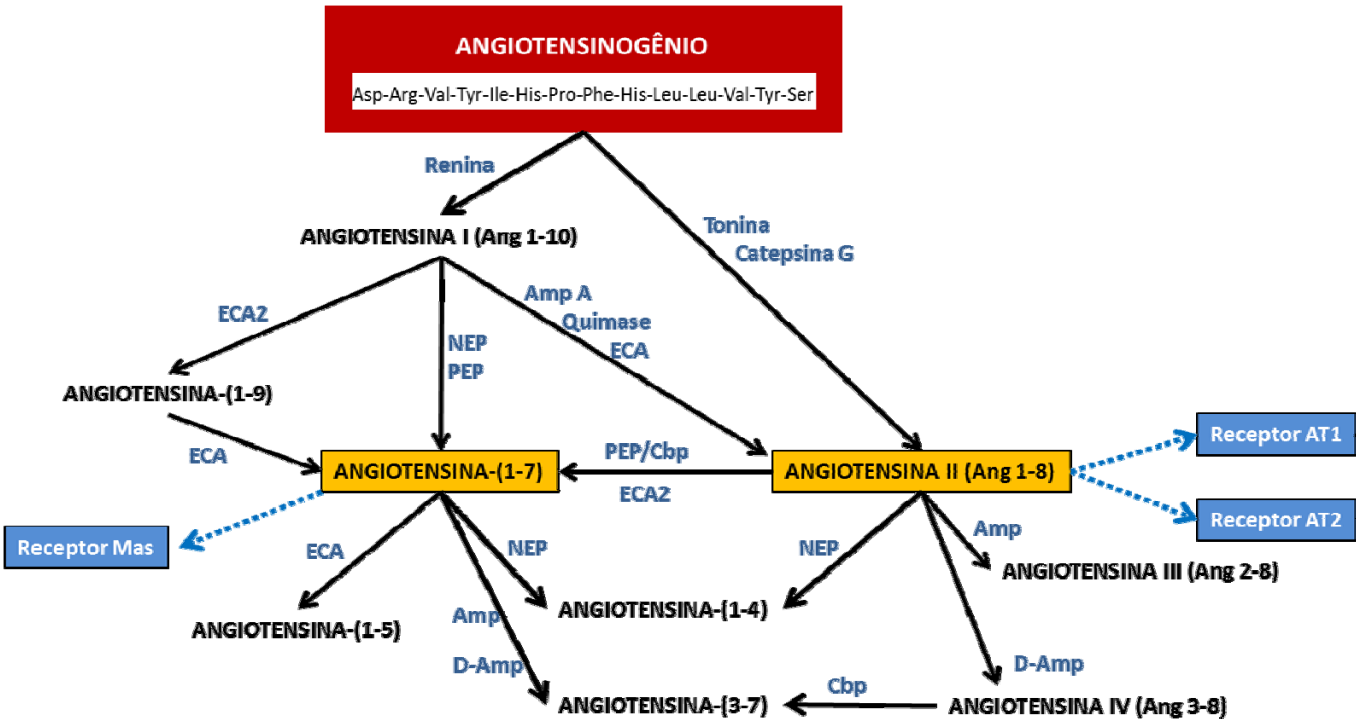
Classicamente, o Sistema Renina-Angiotensina (SRA) é descrito como uma cascata de reações bioquímicas cuja atuação é essencial para a homeostasia cardiovascular. Neste caso, a cascata enzimática se inicia a partir da clivagem do angiotensinogênio, produzido principalmente no fígado, pela enzima renina produzida por células justaglomerulares renais, e liberada diante de situações de redução da pressão arterial, do aumento da atividade de nervosa simpática renal ou da redução acentuada de sódio (PUTNAM et al., 2012). A partir da clivagem do angiotensinogênio forma-se a angiotensina I (Ang I) a qual é convertida em Ang II pela ação da Enzima Conversora de Angiotensina I (ECA) produzida principalmente pelo endotélio pulmonar. Hoje se sabe que este sistema apresenta tanto disposição e atividade circulante (sistêmica), como é encontrado em tecidos e células, trazendo a ideia de sistemas renina-angiotensina locais (CAT; TOUIZ, 2011). A Figura 1 apresenta um esquema do SRA, onde ocorre a formação de diferentes angiotensinas após ação de enzimas, como a renina, ECA, ECA2, e outras.

A ECA, uma dipeptidilcarboxipeptidase, pertence à família de zinco-metalopeptidase, e tem como cofator um íon zinco alinhado em seus sítios ativos, essencial para a catálise. Ela se apresenta como uma ectoenzima ligada à membrana por seu segmento hidrofóbico carboxi-terminal ou como molécula circulante nos fluidos orgânicos (HOOPER, 1991). Na literatura, são descritas classicamente duas formas de ECA: a somática e a testicular, além da forma da ECA solúvel. A ECA somática (150-180kDa) possui dois domínios catalíticos, N- e C-domínios e pode ser encontrada em células endoteliais, epiteliais e neuronais (CAMPBELL, 1987). A ECA testicular ou germinal (90-110kDa) é similar à porção C-terminal da ECA somática e é encontrada unicamente nos testículos, onde é expressa durante a maturação dos espermatozóides. A ECA solúvel é detectada no fluido ileal, seminal, na urina e no líquido amniótico (ERDOS, 1990).

A angiotensina II (AngII) é o principal agente efetor na homeostasia e função cardiovascular, através dos receptores do tipo 1 (AT1) e do tipo 2 (AT2). Além dos efeitos envolvidos nos processos hemodinâmicos, a AngII pode ativar vias de sinalização intracelular, indutoras da produção de mediadores pró-inflamatórios (CARVALHO et al., 1987; TADDEI et al., 2002). Hoje são conhecidas outras formas de produção de Ang II, que ocorrem no endotélio, na musculatura lisa e nos tecidos cerebrais, adrenais, renais e ovarianos assim como no plasma, sendo estes processos independentes da ação da ECA (CARVALHO et al., 1987; SKRBC; IGIC, 2009).

Ang II também é substrato gerador de outros peptídeos bioativos como: Angiotensina III (Ang III), Angiotensina IV (Ang IV) e Angiotensina (1-7) (Ang (1-7). A Ang (1-7) possui funções frequentemente opostas às funções atribuídas à Ang II, e sua origem pode se dar além da formação a partir da Ang II ou diretamente da Ang I, a partir de outras vias enzimáticas têm sido descritas, e que envolve um novo homólogo da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA), a ECA-2 (CAT; TOUIZ 2011).

Figura 1. Apresentação dos componentes do Sistema Renina Angiotensina.



Fonte: Figura adaptada de SKRBC E IGIC, 2009, Capettini et al., 2012.

A enzima renina cliva o angiotensinogênio em angiotensina I; a angiotensina I é convertida em angiotensina II pela enzima conversora de angiotensina II (ECA) ou também pode ser formada por ação direta da tonina e da catepsina G sobre o angiotensinogênio. A angiotensina II pode ser metabolizada por outras peptidases como as aminopeptidases (Amp e D-Amp), carboxipeptidases (Cbp) e prolilendopeptidase (PEP), além da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2). Uma importante angiotensina produzida pela clivagem seja da angiotensina I (por ação de endopeptidase neutra (NEP) e PEP) como da angiotensina II (por ação de ECA2, PEP e Cbp) é a angiotensina-(1-7). A angiotensina-(1-7), liga-se ao receptor Mas e tem efeitos predominantemente antagônicos aos da angiotensina II, ao de ligar ao seu receptor AT1 (levando à vasoconstrição, proliferação celular, hipertrofia, etc). Outros peptídeos do sistema são: angiotensina III, angiotensina IV,

angiotensina-(1-9), angiotensina-(1-4), angiotensina-(3-7) e angiotensina-(1-5), normalmente formados por ação de ECA, Amp, D-Amp, Cbp e NEP.

Os mecanismos que determinam ou que levam ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares ainda não estão completamente elucidados, devido à grande complexidade das interações celulares tanto em situações fisiológicas como patológicas. Porém, o papel do Sistema Renina-Angiotensina (SRA) nas fisiopatologias cardiovasculares vem sendo bastante pesquisado.

As inúmeras funções do SRA têm sido descritas nos últimos anos, especialmente em modelos relacionados à regulação da pressão arterial. A rápida expansão das técnicas de biologia molecular permitiu que os componentes do SRA fossem clonados e sequenciados (DZAU; LOPEZ-LLASACA, 2005), determinando a sua distribuição tecidual.

A definição endócrina, sistêmica e clássica do SRA considera-o componente de uma cascata enzimática produzida em locais bem definidos, tendo como seu principal peptídeo efetor a Ang II (MA et al., 2010; RUGGENENTI, 2010). Já a Angiotensina II produzida localmente exerce suas ações sobre células próximas, reforçando o conceito de “sistemas renina-angiotensina teciduais” com funções autócrinas e parácrinas, não-hemodinâmicas (TAMURA et al., 1995). Neste caso, seus componentes foram identificados em muitos tecidos, especialmente os de interesse cardiovascular.

Existem hoje diversas evidências relacionando os componentes do sistema renina-angiotensina à lesão vascular. A ativação do SRA vascular em seguida à lesão ou disfunção endotelial tem papel importante na patogênese do remodelamento vascular e aterosclerose, verificando-se o aumento da expressão de angiotensinogênio na camada média e na neoíntima de artérias (RAKUGI et al., 1993). Além disso, encontrou-se forte associação entre o aumento da expressão da enzima conversora de angiotensina I (ECA) e lesões ateroscleróticas (OHISHI et al., 1997). Embora evidências sugiram a existência de enzimas semelhantes à ECA (quimases) na média e na adventícia de vasos e outros tecidos, demonstrou-se que não ocorre a co-localização entre a Ang II e quimases, apontando que a Ang II é produzida por ação direta da ECA no processo aterosclerótico (OHISHI et al., 1997).

A ECA é importante na contratilidade da musculatura lisa vascular e também para o crescimento desta musculatura, contribuindo para o desenvolvimento da hiperplasia da camada íntima e hipertrofia da média (DZAU; LOPEZ-LLASACA,

2005). Neste sentido, demonstrou-se em camundongos geneticamente modificados (contendo um número crescente de cópias do gene da ECA) submetidos à lesão vascular, que esta pode ser considerada um fator de susceptibilidade à lesão vascular. Observou-se que tanto o grau de lesão quanto a atividade da ECA na região da lesão, aumentavam concomitantemente ao maior número de cópias do gene (LACCHINI et al., 2009).

A associação da disfunção endotelial com o Sistema Renina-Angiotensina mostra um aumento da quantidade de Ang II quando comparada à fisiológica, como na lesão aterosclerótica e renal associadas a aumentos crônicos da concentração de Ang II (WATANABE, 2005), o que reforça a ideia da ação local da Ang II, desencadeando processos inflamatórios relacionados.

Hutchinson e colaboradores (1999) demonstraram a importância funcional dos receptores da angiotensina II (AT_1 e AT_2) na lesão vascular, verificando re-expressão de fenótipo neonatal para estes receptores após a injúria da carótida. Hoje se sabe que existem vários tipos de receptor AT, que estão envolvidos em ações específicas da Angiotensina II e das outras Angiotensinas. As ações dos receptores AT_2 funcionalmente se opõem àquelas dos receptores AT_1 (NAVAR et al., 2002), podendo a própria angiotensina II agir simultaneamente sobre ambos os receptores, de modo a permitir uma modulação de seus efeitos (ARIMA, 2001).

1.4 Angiotensina II e Inflamação

Segundo Taubman (2003), estudos recentes sugerem que seu papel biológico é amplo, capaz de gerar modificações aos níveis sistêmico e intracelular. A Angiotensina II também tem sido identificada como um fator de aceleração de doenças cardiovasculares, como a aterosclerose, através de seu efeito sobre a síntese de colesterol por macrófagos (KEIDAR et al., 1999). Como já citado, a Angiotensina II, além de ser um peptídeo que exerce um papel central na homeostase cardiovascular, regulando a vasoconstrição e a pressão arterial (TAUBMAN, 2003), vem sendo considerada uma citocina multifuncional com propriedades não-hemodinâmicas, entre as quais a de fator de crescimento, de citocina pró-fibrinogênica e pró-inflamatória (WOLF, 2003), modulando da resposta imunológica, levando à quimiotaxia, à proliferação e à diferenciação de monócitos em macrófagos (RUIZ-ORTEGA et al., 2001).

Embora grande parte destes dados provenha de estudos em rim, podem-se postular os processos pelos quais a Angiotensina II funcionaria como citocina pró-inflamatória no vaso, micro-ambiente normalmente influenciado pelo SRA (IRIGOYEN et al., 2005). A Angiotensina II é produzida na parede vascular (DZAU E LOPEZ-LLASACA, 2005) e é capaz de gerar hiperplasia da íntima independentemente de efeitos hemodinâmicos ou neurohumorais (NAFTILAN, 1994; ROSS, 1999). Além de estimular a ativação de programas de transcrição para diversos genes de proteínas e moléculas que levam a modificações na função vascular, como MMPs, MCP-1, V-CAM, VEGF e PAI-1 (DZAU; LOPEZ-LLASACA, 2005), interleucinas, TNF-α e TGF-β.

Foi verificado anteriormente por nós que pequenos aumentos de Ang II, independentemente de seus efeitos sobre a pressão arterial, são capazes de estimular a liberação de mediadores inflamatórios, tais como TGFβ e IL-6 de forma aguda (SOUZA, 2010).

O entendimento da ativação de processos inflamatórios pela Ang II é de fundamental importância no estudo da fisiopatologia cardiovascular. Neste sentido, demonstramos que ocorre aumento da concentração de TGFβ e IL-6 num aumento muito sutil de Angiotensina II em tempos agudos, onde observamos que tanto o TGFβ como a IL-6 tiveram aumento de suas expressões na vasculatura cardíaca 30 minutos após única injeção intraperitoneal de Angiotensina II (30 ng/kg), mantendo-se elevadas até 60 minutos após a injeção; já sistemicamente foi observado o aumento significativo de IL-6 no soro 60 minutos após a injeção de Angiotensina II (OLIVEIRA et al., artigo submetido para publicação).

Esta pronta resposta vascular sugere uma rápida liberação destes fatores, que poderiam ser previamente sintetizados e armazenados dentro da célula (como no caso da IL-6), como ocorre em mastócitos (KANDERE-GRZYBOWSKA et al., 2003) e tecido músculo esquelético (LAURITZEN et al., 2013) ou sintetizados e armazenados junto à matriz extracelular como no caso do TGFβ (BENKE et al., 2013; BONETTI, 2009), estando estes prontos para sua liberação.

Esta ideia corrobora com evidências que mostram a indução da resposta inflamatória na parede vascular por meio de mecanismos dependentes e independentes da pressão arterial por parte da Ang II (CHENG, 2005). A Angiotensina II induz interações entre os leucócitos e o endotélio, aumentando a

quimiotaxia, e posterior elevação da produção de citocinas, incluindo IL-1, IL-6 e TNF- α (CHENG, 2005).

A IL-6 é uma citocina produzida por uma grande quantidade de tipos celulares, incluindo células musculares lisas, células endoteliais e fibroblastos, e tem sido relacionada a uma série de eventos que contribuem tanto com a formação da placa aterosclerótica como com sua desestabilização e ruptura. Os mecanismos envolvidos incluem a liberação de outras citocinas pró-inflamatórias, oxidação de lipoproteínas e a ativação de metaloproteinases de matriz extracelular (SCHUETT et al., 2009). Sabe-se que a Angiotensina II é capaz de induzir a produção vascular de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF-α (SCHIEFFER et al., 2000). Neste caso, a Angiotensina II leva ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, que por sua vez induzem o aumento da produção de IL-6 (WASSMANN et al., 2004), além de eventos cíclicos e deletérios ao vaso e conhecidos no estado crônico (SCHUETT et al., 2009).

Considerando a grande variedade de vias intracelulares possivelmente desencadeadas pela ativação do receptor AT1 da Ang II, é importante identificar vias potencialmente mais rápidas, que permitem a pronta liberação de citocinas inflamatórias como IL-6 e TGFβ. Desta forma, podemos sugerir que a IL-6 é sintetizada e armazenada na célula em vesículas de secreção (KANDERE-GRZYBOWSKA et al., 2003) e pode ser liberada de forma rápida se a ativação do receptor AT1 levar ao rápido aumento de cálcio intracelular (TOUIZ, 2002). Neste sentido, a via da fosfolipase C (PLC) a inositol trifosfato (IP3) leva, em última análise, à liberação de cálcio intracelular, funcionando como via de ação de uma série de receptores de membrana, incluindo o AT1 (TOUIZ, 2005). Esta via é considerada importante na sobrevida celular, metabolismo e reorganização do citoesqueleto, tendo também importante participação na promoção de crescimento e anti-apoptose (TOUIZ, 2002).

Outra importante citocina inflamatória observada na resposta aguda a Ang II é o TGFβ. Sabe-se que o TGFβ é uma proteína com ações multifuncionais, participando da regulação da divisão celular, diferenciação, migração, adesão celular, produção de matriz extracelular, entre outros, estando envolvida em diversas patologias, inclusive as doenças cardiovasculares (RUIZ-ORTEGA et al., 2007*)*. É importante ressaltar que o TGFβ é sintetizado como proteína inativa, tendo em sua estrutura o peptídio associado à latência (LAP). Esta proteína interage com proteínas

de ligação do TGFβ latente (LTBP), que o ancoram à matriz extracelular. Este TGFβ é ativado pela clivagem proteolítica pela plasmina, microambiente ácido e metaloproteinases de matriz (como a MMP-2 e MMP-9) (ANNES, 2003; GIBBONS, 1992).

1.5 Doença Arterial Coronariana

Os mecanismos inflamatórios vasculares estão intimamente relacionados com a progressão das doenças cardiovasculares, e têm recebido atualmente maior ênfase no que diz respeito aos processos que levam ao desenvolvimento de patologias como aterosclerose.

Desde a década de 1980, houve um importante avanço sobre o conhecimento dos conceitos da aterogênese, elucidando diversos fenômenos da doença arterial coronariana. Até o início do século XX, havia duas fortes correntes em torno da etiologia da aterosclerose: 1) A teoria de Rokitansky, mais antiga, a qual responsabilizava a trombose e a organização de trombos aderentes à parede vascular aterosclerótica, e 2) segundo a linha de Virchow, a aterosclerose decorria da degeneração da camada íntima (DOCK, 1958).

Contudo, é importante destacar a inflamação como um fenômeno presente em todas as fases de desenvolvimento de uma lesão aterosclerótica (ROSS, 1999). Portanto, após duas décadas de estudos sobre as complexas interações entre monócitos/macrófagos e linfócitos T, e dessas células com o endotélio e as células musculares lisas em lesão aterosclerótica, o envolvimento da inflamação na fisiopatologia da aterosclerose se tornou consenso. A inflamação é a resposta a uma perturbação da homeostase de um órgão ou tecido e isso torna necessário o entendimento das condições que resultam desta reação da parede vascular arterial, obrigatório para o avanço no conhecimento da aterogênese.

A resposta endotelial à lesão como base para a origem da aterosclerose foi proposta há mais de trinta anos (ROSS, 1976). As observações iniciais enfatizavam a desnudação endotelial como primeiro passo na gênese da aterosclerose. Segundo a versão mais recente, a simples presença de um endotélio disfuncional já representa uma grande variável, um fator de grande relevância para o desenvolvimento da aterosclerose (ROSS, 1995).

O endotélio normal participa de modo essencial na regulação do tônus vascular, na resposta inflamatória, na coagulação/fibrinólise e na resposta imune. Seu principal produto vasodilatador, o óxido nítrico (NO) protege esse vaso contra lesão vascular, inflamação e trombose. O NO inibe a adesão leucocitária ao endotélio, evita a proliferação das células musculares lisas (CML) e é antitrombótico porque limita a agregação plaquetária. No entanto, na presença de fatores de risco, como a hipercolesterolemia, tabagismo, diabete melito ou hipertensão arterial, essas defesas do endotélio entram em colapso e começam a alterar a função natural (DINH, 2014).

Processos patológicos diversos podem perturbar a função endotelial, destacando-se a dislipidemia, o diabetes, a hipertensão arterial e o tabagismo. Através de mecanismos comuns, como estresse oxidativo, os chamados fatores de risco são capazes de promover a disfunção endotelial, caracterizada por alteração das suas propriedades homeostáticas. Ao contrário de uma superfície predominantemente antiadesiva, antiproliferativa e anticoagulante (características que promovem a manutenção de deslocamento de fluido, células e moléculas sem geração de lesão) ganha espaço um endotélio apresentado por uma distorção desse perfil estável, passando a um fenótipo propício para recrutamento de células inflamatórias circulantes e formação de trombos (características de resposta inflamatória, de resolução de desafio, promotor de lesão) (DINH, 2014).

2 JUSTIFICATIVA

A partir das informações apresentadas na literatura, ressaltam-se, alguns pontos como: pacientes hipertensos apresentam aumento de moléculas de adesão no soro e em células inflamatórias (RUIZ-ORTEGA et al., 2001), fato que deve estar diretamente associado às ações inflamatórias da Ang II. Vias de sinalização intracelular como da PLC-IP3 deve levar a rápidas respostas induzidas pela Ang II, o que ativaria uma via que promove a sobrevida celular a estímulos estressores, com a liberação da IL-6 (TOUIZ, 2002, 2005).

Embora diversos estudos tenham mostrado a ação da Ang II sobre a liberação de TGFβ (BUJAK, 2007) e sua participação no balanço fibrinolítico, esta ainda não é bem compreendida. Um fator que dificulta esta compreensão se dá pela maioria dos estudos envolver hipertensão ou alguma outra patologia cardiovascular; além disso, estes estudos geralmente dizem respeito a tempos longos, gerando modificação da expressão gênica, síntese protéica e mecanismos regulatórios posteriores. Em tempos mais crônicos de exposição à Ang II como de dias ou mesmo semanas, ou a momentos repetidos de incremento de Ang II, é possível que outras proteínas atuem sobre a formação final do TGFβ até sua liberação para a MEC.

Assim começa acontecer uma deposição de leucócitos sobre o endotélio, e a Angiotensina II passa a estimular a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), aumenta a expressão de interleucina-6 (IL-6) e proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) e hiper-regula moléculas de adesão da célula vascular (VCAM-1). Essas modificações do vaso vão promover um ambiente favorável a um processo inflamatório inicial, com potencial evolução para doenças vasculares como a aterosclerose (BONETTI, 2003; LERMAN, 1992; ZHANG, 2010).

Diante dessas observações, é possível perceber que há vias que levam potencialmente à:

1 - ação direta da Ang II sobre a liberação de IL-6, TGFβ, PAI-1 e na geração de plasmina

2 - aumentos discretos de Ang II podem ocorrer diariamente em indivíduos sadios, sem acarretar em alterações hemodinâmicas e que estas oscilações de Ang II podem estimular momentaneamente a liberação de fatores inflamatórios,

3 - além disso, é essencial entender qual seria o efeito de pequenos incrementos recorrentes de Ang II sobre a resposta inflamatória, visto que estes podem ocorrer ao longo do dia e tornam-se fatores potenciais de susceptibilidade cardiovascular.

Desta forma, a hipótese do presente projeto é a de que a Ang II atua diretamente sobre a liberação de IL-6 e TGFβ através de sua ligação ao receptor AT1, desencadeando o início da resposta inflamatória de forma aguda, podendo também agir cronicamente mantendo tais vias ativas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Visando responder a hipótese apresentada, propôs-se assim estudar o efeito das oscilações de angiotensina II por 30 minutos e 1dia, bem como seu efeito cumulativo por 3 e 10 dias sobre características hemodinâmicas, biométricas e morfométricas, bem como sobre a presença de TGFβ, IL-6, plasminogênio/plasmina e PAI-1 cardíacos.

3.2 Objetivos específicos

Para tanto, os objetivos específicos foram:

- Estudar e feito da angiotensina II sobre a pressão arterial e a freqüência cardíaca.
- Avaliar o efeito da angiotensina II sobre características biométricas e morfométricas vasculares, bem como a deposição de colágeno.
- Investigar a presença de TGFβ, IL-6, plasminogênio/plasmina e PAI-1 como efeito da administração de Ang II e sua ação via receptor AT1.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais e manutenção

Foram usados camundongos isogênicos adultos machos com cerca de 60 dias de vida, da linhagem C57BL/6, provenientes do Biotério do Departamento de Anatomia, ICB/USP. Os animais foram mantidos em sala com ciclo claro-escuro de 12 horas e temperatura controlada de 22 a 24 ºC, com dieta padrão e água administradas *ad libitum*. Os estudos foram conduzidos de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do ICB/USP.

4.2 Tratamentos

Manteve-se um número amostral de 6 animais por grupo experimental, sendo que todos os camundongos receberam tratamento correspondente ao grupo, como apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 – apresentação dos grupos experimentais, tratamentos e doses usadas.

Grupo experimental	Tratamento
1) Cont	grupo controle – recebendo solução salina 0,9%
2) Ang II	tratado com Angiotensina II – 30 ng/kg
3) Los	tratado com losartan (antagonista do receptor AT_1 da Ang II 20mg/kg)
4) Los + Ang II	tratado concomitantemente losartan e Angiotensina II

Para todos os tratamentos, os animais receberam injeção intraperitoneal de solução salina, angiotensina II, losartan ou a combinação losartan+angiotensina II, sendo o volume total de cada injeção de 300µl. A escolha destas doses e vias de administração se baseou em estudos realizados anteriormente em nosso laboratório (LACCHINI et al., 2009; OLIVEIRA 2010).

4.2.1 Tempos de tratamentos e grupos

Considerando os resultados obtidos em estudo anterior avaliando a curva temporal de resposta inflamatória à angiotensina II e a hipótese de que pode haver um efeito cumulativo dos insultos promovidos por aumentos diários de angiotensina II, os tempos de estudo realizados neste projeto envolveram uma avaliação precoce da resposta em 30 minutos após a aplicação dos tratamentos e períodos mais tardios, de 1, 3 e 10 dias. Desta forma, para cada um dos 4 tratamentos experimentais, avaliamos os animais em 4 tempos distintos, como apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 – Tempos estudados e tratamentos realizados.

Tempo de estudo	**Tratamento**
30 minutos	Os animais foram avaliados 30 minutos após as injeções com os tratamentos
1 dia	Os animais foram avaliados 24 horas após as injeções com os tratamentos
3 dias	Os animais receberam injeções com os tratamentos durante 3 dias seguidos (em mesmo horário) e foram avaliados 24 horas após a última aplicação de tratamento
10 dias	Os animais receberam injeções com os tratamentos durante 10 dias seguidos (em mesmo horário) e foram avaliados 24 horas após a última aplicação de tratamento

Vale ressaltar que os tratamentos utilizados diariamente nesses tempos experimentais foram: solução salina 0,9%, AngII 30 ng/kg e Losartan (20 mg/kg). Desta forma, obtivemos, ao final, um total de 16 grupos experimentais, sendo 4 tratamentos e 4 tempos de avaliação, como apresentado na Tabela 3:

Tabela 3 – apresentação dos grupos de tratamentos e tempos estudados.

Grupo/tempo				
Cont	30 minutos	1 dia	3 dias	10 dias
Ang II				
Los				
Los + Ang II				

4.3 Canulação e Avaliação da Pressão Arterial e Frequência Cardíaca

Para a avaliação da pressão arterial e frequência cardíaca, foram preparados novos grupos experimentais, que receberam os tratamentos conforme descrito anteriormente e que foram usados apenas pera estas medidas. A preparação destes grupos separadamente se deve ao fato de que o próprio procedimento cirúrgico envolve um processo cicatricial e inflamatório que pode alterar a quantificação dos fatores estudados.

Para a canulação, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal, com quetamina (90 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) para colocação de cânulas de polietileno (PE–10, com diâmetro interno de 0,01 mm conectadas a uma peça de PE-50, com diâmetro interno de 0,05 mm). As cânulas foram preenchidas com soro fisiológico, e posicionadas no interior da artéria carótida esquerda para registro da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC). A extremidade a ser conectada ao transdutor de pressão foi fechada com pino de aço inoxidável. A seguir, a cânula foi fixada na artéria, enquanto sua extremidade mais calibrosa foi passada subcutaneamente e exteriorizada da região cervical posterior e fixada na pele. Após o término da cirurgia, os animais ficaram em recuperação por ao menos 48 horas.

Para o registro das medidas, a cânula foi conectada a um tubo de polietileno (PE 50) e este a um transdutor eletromagnético (P23 Db; *Gould-Statham*), que por sua vez foi conectado a um amplificador (*General Purpose Amplifier-Stemtech, Inc.*). O sinal analógico da pressão arterial foi convertido para um sinal digital (*Stemtech,Inc.*), registrado em tempo real em microcomputador com sistema Windaq, com frequência de amostragem de 2000Hz por canal (Figura 2).

Os procedimentos relativos à canulação e ao registro de variáveis hemodinâmicas foram feitos no Laboratório de Hipertensão Experimental da Unidade de Hipertensão do Instituto do Coração (InCor, HC.FMUSP), sob supervisão da Profa. Dra. Maria Claudia Irigoyen.

Figura 2 – Esquema do sistema de medida direta utilizado nos experimentos.

A análise dos valores de pressão arterial foi realizada utilizando-se um programa comercial associado ao sistema de aquisição de sinais. Este programa permitiu a detecção de valores máximos e mínimos da curva de pressão arterial pulsátil batimento-a-batimento, fornecendo os valores de pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM). A frequência cardíaca (FC) foi determinada a partir do intervalo entre dois picos sistólicos. As planilhas de dados obtidas foram dispostas em programa comercial para análise (Excel), onde foram calculados os valores médios de PAM, PAS, PAD e FC para cada animal.

Como o objetivo da presente avaliação foi de isolar ao máximo possível os fatores hemodinâmicos, a medida da pressão arterial e freqüência cardíaca torna-se importante, porque a mesma nos confirma se as doses utilizadas nos tratamentos são ou não capazes de alterar a pressão arterial, sabidamente capaz de interferir na resposta inflamatória, ou seja, gerando interferências e vieses ao trabalho.

Para esta análise, foram então avaliados inicialmente a pressão arterial e a frequência cardíaca em diferentes tempos na fase aguda logo após as injeções de salina ou angiotensina II (nos períodos basal, após 10, 30, 60, 120 minutos e 6 horas), de forma a verificar alterações muito precoces na pressão arterial e que podem vir a interferir em avaliações mais tardias.

Num segundo momento, foram preparados novos animais para a avaliação hemodinâmica na fase mais crônica (após 1, 3 e 10 dias). As avaliações na fase crônica foram feitas respeitando-se sempre o horário das injeções e seguiram os 4 tratamentos, conforme descrito anteriormente. Todos os tempos avaliados possuíam 5 animais por grupo.

4.4 Avaliação do peso corporal e do peso relativo de coração, rins e pulmões

No sentido de reduzir e otimizar o uso de animais no presente trabalho, após os tempos de tratamento de novos grupos preparados (para as avaliações de expressão proteica), foi feita a pesagem dos animais, procedendo-se depois a eutanásia por excesso de anestésico (quetamina, 180 mg/kg e xilazina, 20 mg/kg). Após a eutanásia, os animais tiveram sangue e tecidos coletados e congelados. Antes do congelamento, estes tecidos de interesse cardiovascular foram pesados para avaliação de peso relativo. Além dos corações, também foram retirados pulmões e rins, sendo todos pesados para estabelecer o peso relativo dos órgãos.

O peso corporal foi medido antes dos animais serem eutanasiados. Os valores de peso corporal e dos diferentes órgãos foram obtidos para se traçar uma relação do percentual de massa cardíaca/massa corporal, massa renal/massa corporal e massa pulmonar/massa corporal. Essa relação percentual foi obtida através da fórmula abaixo:

$$(g/g)x100$$

4.5 Avaliação de TGFβ e IL-6 cardíacos por *Western Blotting*

Para este estudo, foram considerados apenas os corações, visto que anteriormente já havíamos demonstrado a maior liberação de marcadores inflamatórios precoces (IL-6 e TGF-β) nas artérias cardíacas de camundongos, induzida pela angiotensina II. As proteínas analisadas foram IL-6 e TGFβ, e a avaliação foi realizada pela técnica de *Western Blotting*; a proteína usada como normalizador foi a β-tubulina. Esta avaliação foi feita no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração (InCor, HC.FMUSP), sob supervisão do Prof. Dr. José Eduardo Krieger.

Para a realização desta avaliação, foram usados os animais que tiveram os tecidos coletados e pesados, já que nesta situação é necessário que os corações sejam coletados a fresco e congelados imediatamente em nitrogênio líquido. Posteriormente, foi feita a extração das proteínas, lisando-se o tecido em meio RIPA (1mM EDTA, 1mM EGTA, 2mM $MgCl_2$, 5mM KCl, 25mM Hepes pH 7,5, 2mM DTT, 1

mM PMSF, 0,1% Triton X_100, 1:100 coquetel de inibidores de proteases) com agitação por 30 minutos a 4 ^{o}C. Os homogenatos foram centrifugados a 10000RPM por 10 min a 4 ^{o}C. O sobrenadante foi coletado para dosagem de proteínas utilizando o reagente de Bradford diluído em água destilada na proporção de 1:5. Foram utilizados 190 µL desta solução para dosagem de 10µL de amostra previamente diluída 30 vezes, para detecção de proteína total por absorbância a 595 nm pelo kit *DC Protein* (BioRad). As amostras foram colocadas em tampão de amostra (H_2O; Tris–HCl200mM; pH 6,8; glicerol 40%; sulfato dodecil de sódio 8%; DDT; azul bromofenol a 0,4%) a 100 °C por 5 min, sendo submetidas em seguida à eletroforese em gel de poliacrilamida 12% utilizando o sistema *Mini-Protean Tetra-Protean Cell (Bio-Rad®).*

Utilizamos o marcador de peso molecular *Precision Plus Protein Standart Kaleidoscope (Bio-Rad®)* para verificar o peso molecular das proteínas. Após a eletroforese transferimos as proteínas para membrana de nitrocelulose *Hybond-C Extra* (GE Healthcare) em meio de transferência (0,025M TRIS, 0,192M GLICINA, 0,1% SDS, 20% METANOL) utilizando o sistema *TransBlot SD Semi-Dry Transfer Cell* (*Bio-Rad*®). A membrana foi lavada em solução de TBS-T 1X 3 vezes (5 minutos cada lavagem). Em seguida a membrana foi bloqueada com albumina sérica bovina (*BSA*) a 5% por 30 minutos, depois lavada 3 vezes em TBS-T e após, incubada *overnight* com anticorpos primários (anti-IL-6, Abcam ab6672 em diluição de 1:500, o peso molecular deste marcador é de 21-28kDa; anti-TGF-β1 Santa Cruz sc-8104; e anti-β tubulina, Santa Cruz sc-9104 e diluição 1:1.000, o peso molecular deste marcador é de 55 kDa, Figura 3). Em seguida fez-se a lavagem da membrana em TBS-T seguida de incubação com anticorpo secundário anti-coelho (goat anti-rabbit IgG-HRP sc-2030) por 1 hora em temperatura ambiente. Após nova lavagem, foi feita a exposição com *ECL WB Detection Reagents* (*GE Healthcare*) para revelação de filme fotográfico em equipamento *Image Quant LAS 4000 mini (GE Healthcar*e).

As bandas foram quantificadas por análise computadorizada de imagem (com auxílio do software *Image J* (versão 1.32j domínio público http://rsb.info.nih.gov.ij/) onde a densidade óptica de cada banda foi aferida.

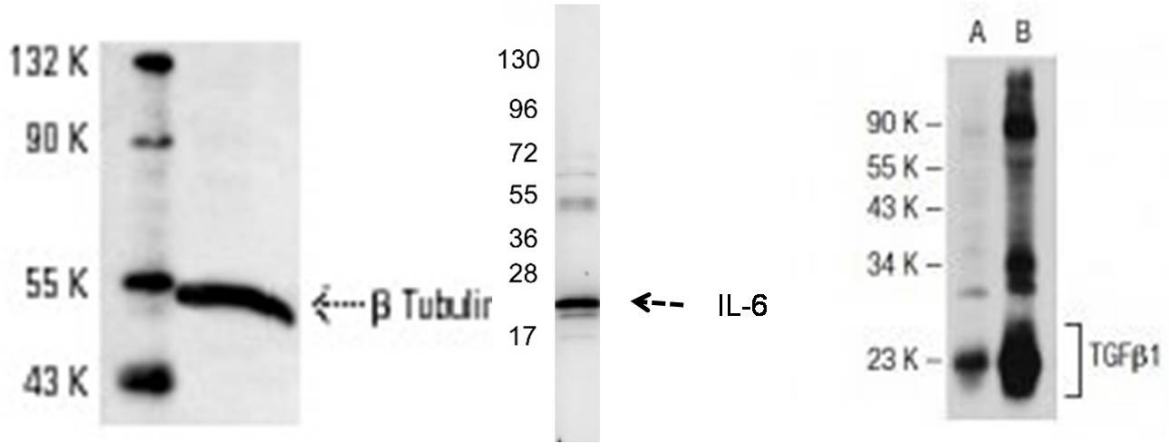
Inicialmente, o sistema de análise calcula a densidade óptica para a região delimitada pelo operador. Esta região deve ter uma área suficiente para abrigar cada banda (uma de cada vez) visível no filme revelado, não devendo ser alterada,

quando se passa a analisar uma outra banda. Os valores foram expressos a partir da densidade dos pixels das bandas marcadas para β-tubulina (normalizador), IL-6 e TGF-β1. Os valores para quantificação da expressão proteica das amostras de cada um dos grupos foram determinados da área da banda para proteína-alvo em relação à área da banda da β-tubulina. Para este cálculo foi aplica a seguinte fórmula:

$$\frac{\textit{densidade da banda da proteína-alvo}}{\textit{densidade da bandada } \beta\textit{-tubulina}}$$

Em seguida, os valores obtidos na quantificação de IL-6 e TGF-β foram expressos em gráficos de barras em relação ao grupo controle.

Figura 3 – Representação dos pesos moleculares das proteínas estudadas. Onde a imagem da marcação para β-tubulina foi obtida em tecido cardíaco, IL-6 marcação obtida em células do sangue periférico humano e TGFβ marcação obtida na coluna A- glândula adrenal de rato e B- tecido uterino de rata.



Fonte: Figura adaptada a partir dos respectivos *data sheets* anticorpos utilizados.

Para este experimento em dimensão tecidual, utilizou-se extratos de todo o coração, uma vez que há a limitação técnica de não se conseguir isolar o montante

arterial cardíaco desses corações estudados, tendo em vista seus tamanhos muito reduzidos, também sua disposição não só superficial mas intramural.

4.6 Preparação dos tecidos para analises histoquímica, imunohistoquímica e morfométrica

Para estas análises, foram preparados novos grupos de animais, sendo que a coleta dos corações se procedeu de forma diferente daquela usada para o western blotting, visto que os tecidos precisam ser perfundidos com solução fisiológica e fixados em formol.

Depois de efetuados os tratamentos, os animais foram eutanasiados por excesso de anestésico (quetamina, 180 mg/kg e xilazina, 20 mg/kg) acrescido de 10U de heparina. Para o procedimento de perfusão foi feita toracotomia e exposição de coração e pulmões. A perfusão ocorreu por punção ventrículo esquerdo e secção do átrio direito, e mantida sob pressão constante de 80-90 mmHg. A manutenção dessa pressão foi garantida pela altura da coluna de líquido (pressão aferida com o uso de transdutor de pressão) e esta se faz importante, visto que permite que os vasos sejam perfundidos sob pressão próxima das condições fisiológicas. A lavagem do sistema vascular foi feita com solução salina (NaCl 0,9%) e KCl (14mmol), de forma a garantir a parada do coração em diástole. Em seguida, o animal foi perfundido com formol a 4% tamponado (tampão fosfato, pH 6,8-7,2; 0.1M).

Na sequência, foram coletados os corações, que foram mantidos em formol a 4% tamponado por 24 horas. Após este período os fragmentos dos corações foram dispostos em cassete plástico (figura 4A), processados em histotécnico (figura 5) com ciclo total de 8 horas onde se realiza a desidratação, diafanização e parafinização dos tecidos. A seguir estes são emblocados em parafina.

A seguir, foi feita a microtomia obtendo-se cortes de 5μm sendo estes dispostos em lâminas. Estas lâminas foram preparadas tanto para as análises morfométricas como para a avaliação pela técnica de imunohistoquímica.

Figura 4 – Esquema de procedimentos histológicos e análises microscópicas. A) colocação do tecido em cassete após processamento; B) inclusão em bloco de parafina; C) corte de blocos realizados em micrótomo e colocados em lâminas histológicas; D) análise microscópica e fotografia das lâminas; e E) análise das imagens fotografadas

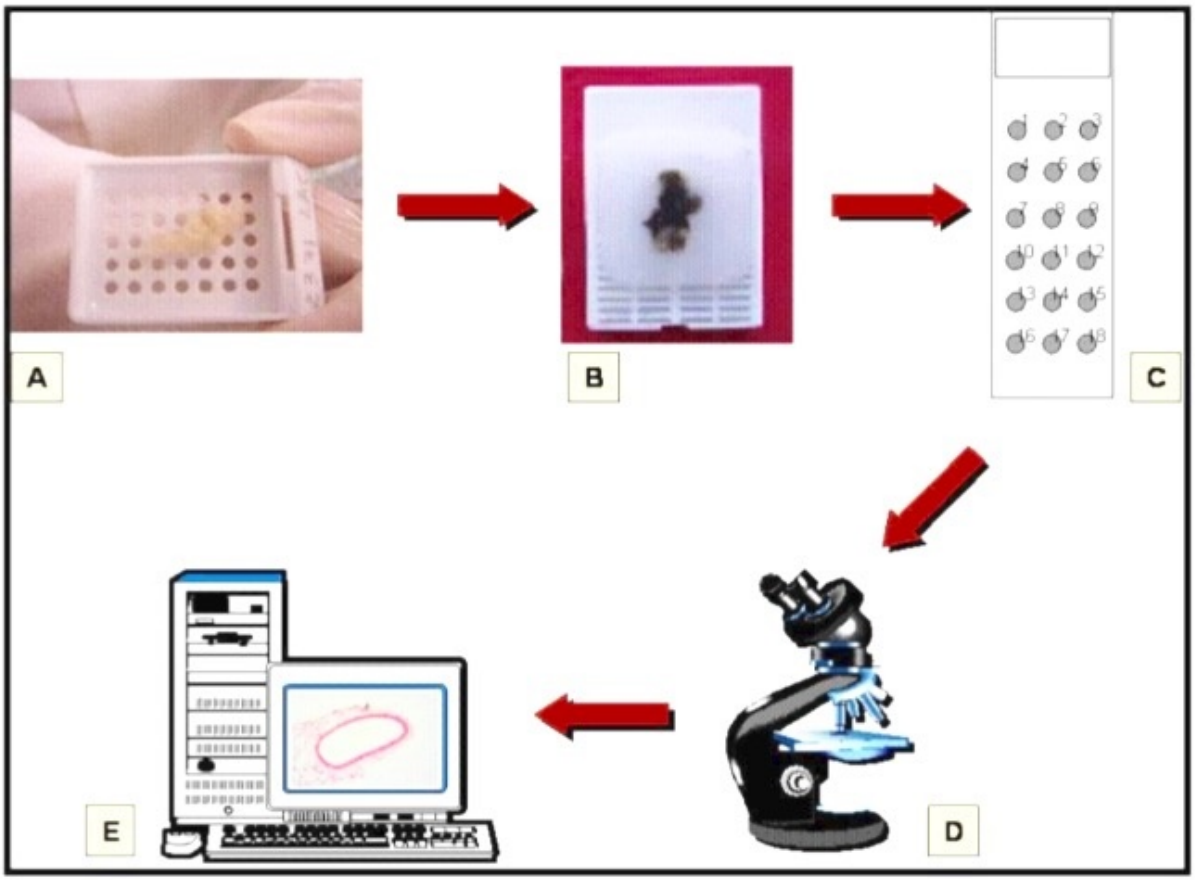
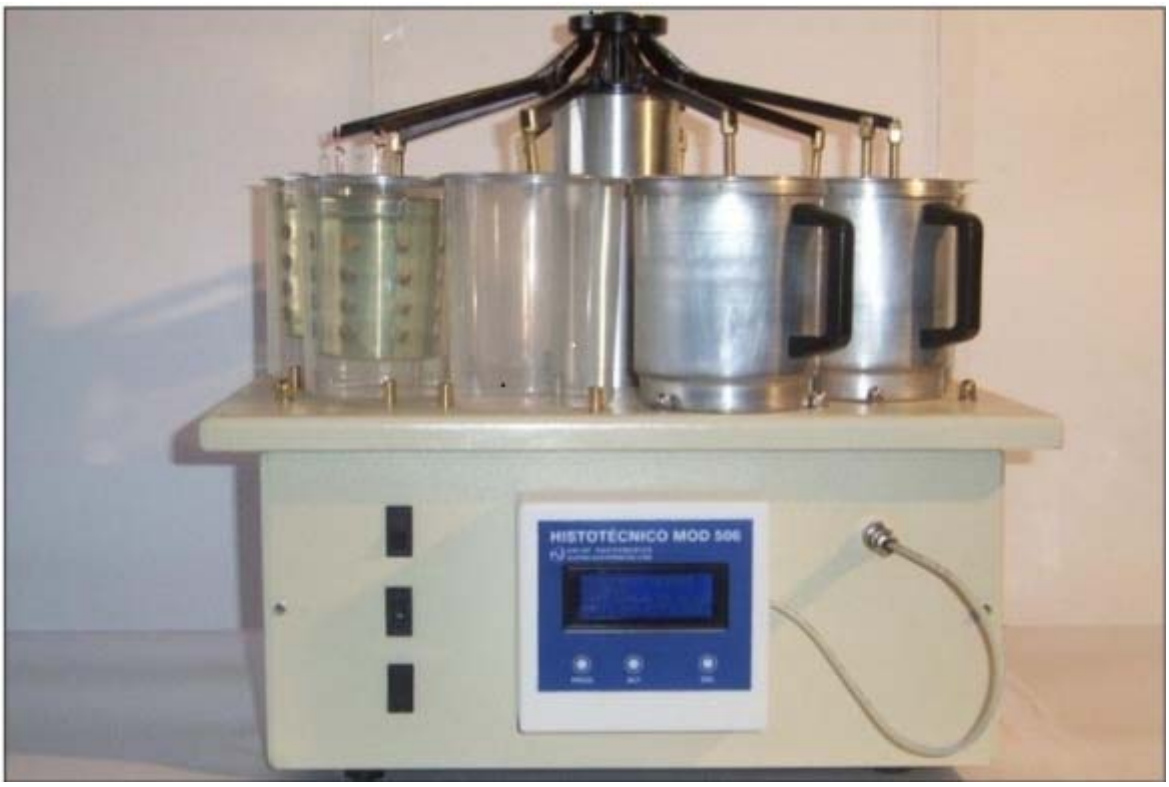


Figura 5– Fotografia do histotécnico utilizado para processamento dos tecidos estudados em microscopia de luz e imunohistoquímica.

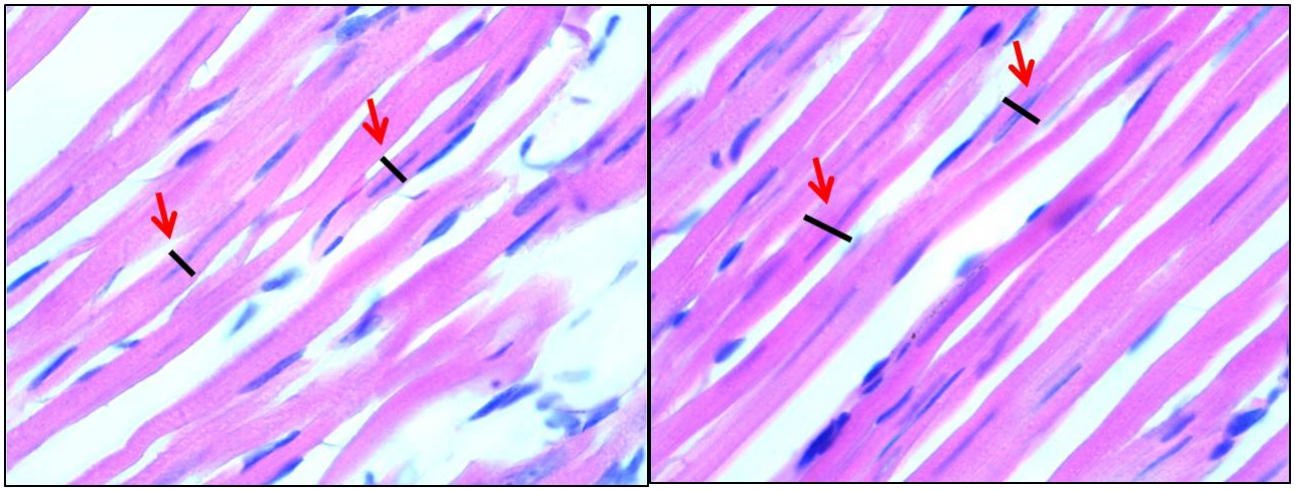


4.7 Morfometria

4.7.1 Avaliação dos cardiomiócitos

Foi realizada coloração pela Hematoxilina-Eosina, em todos os tempos experimentais, o que possibilitou a realização das medidas do diâmetro transverso dos cardiomiócitos. Foram obtidas fotomicrografias em uma objetiva de 40x (campo claro) e foram estudados 20 cardiomiócitos por corte, sendo realizada a medida da espessura deste em micrômetros, na altura dos núcleos (Figura 6). O programa de digitalização e análise de imagem usado foi o *Axiovision (Rel 4.8, Zeiss)*.

Figura 6 – Esquema representativo das medidas dos cardiomiócitos, as setas vermelhas indicam as células medidas, tendo como referência a posição dos núcleos.(Aumento: 400X)



4.7.2 Análise da deposição de fibras colágenas perivasculares

A avaliação da deposição das fibras de colágeno perivasculares foi feita através da coloração pelo picrossírius, com contra-coloração pela hematoxilina para visualização dos núcleos. Esta coloração permite a análise qualitativa e quantitativa das fibras de colágeno presentes nos tecidos (JUNQUEIRA et al., 1999; BORGES et al., 2007).

A análise morfométrica foi realizada baseando-se na estrutura vascular e realizando as seguintes medidas apresentadas na Figura 7: 1- a área total do vaso (representada pela letra A) e 2- a área da luz do vaso (representada pela letra D). A partir das medidas obtidas, é realizado o seguinte cálculo:

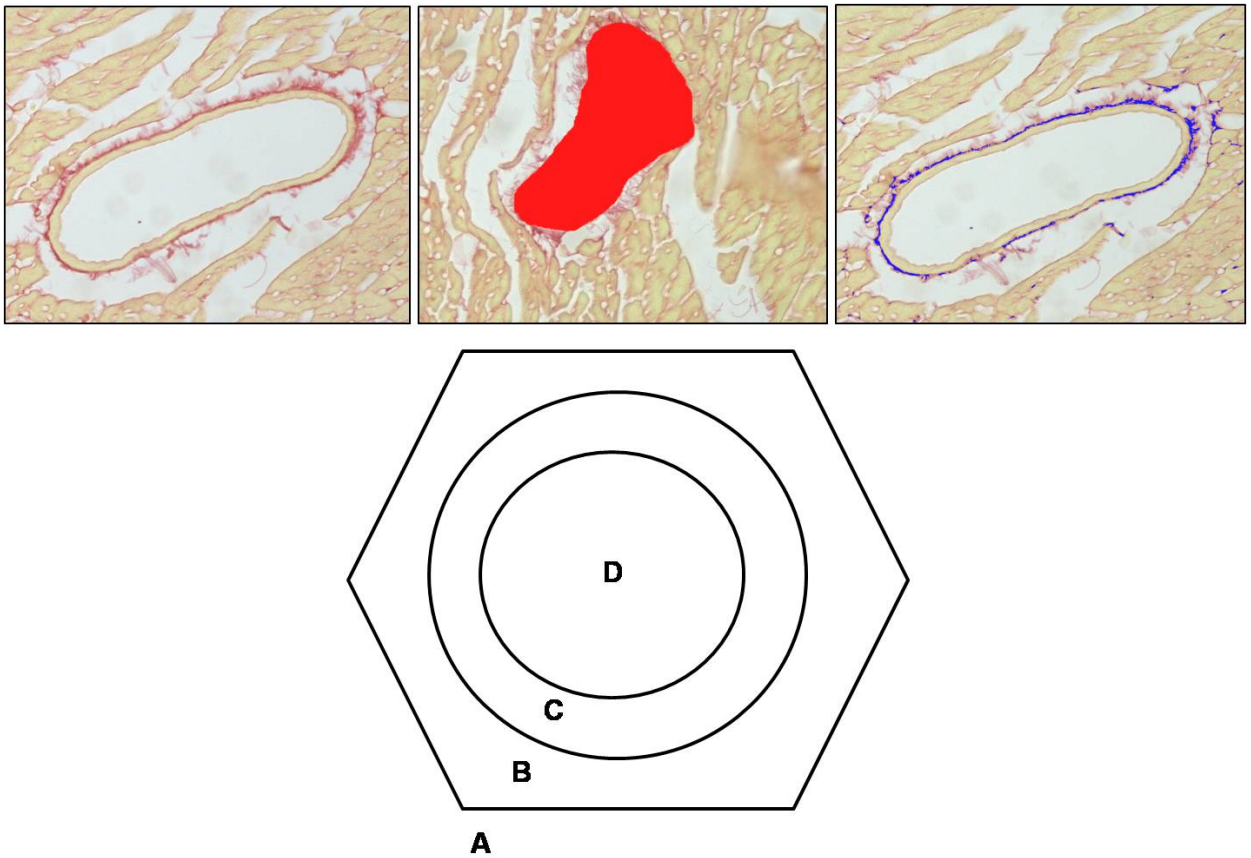
área da parede do vaso = A – D

Além da medida da área da parede do vaso, foi mensurada a deposição de colágeno vascular, evidenciado pela própria coloração pelo picrossírius. Usando uma ferramenta do software *Leica QWin Plus V.3.5.1*, informamos a tonalidade de interesse e este determina todos os pontos onde essa tonalidade é encontrada. Após isso, é feita manualmente a delimitação da região de interesse (no presente caso, os vasos) e o software informa automaticamente a área total positiva de colágeno no vaso por completo.

Tendo-se então a área da parede do vaso e a área de marcação positiva de colágeno, é feito o cálculo da porcentagem de colágeno naquele vaso.

Para cada animal, foram medidos 3 vasos íntegros observados em 3 a 5 cortes do coração. Esta medida feita em lâminas coradas com picrossírius nos informa a deposição das fibras colágenas na parede do vaso.

Figura 7 – Representação da medida da deposição de fibras de colágeno perivasculares. Fotomicrografias representativas das medidas e desenho esquemático de como são obtidas as medidas de parede. A = limite da adventícia; B = limite da lâmina elástica externa; C = limite da lâmina elástica interna; D = luz vaso



4.8 Avaliação de IL-6, TGFβ, plasminogênio/plasmina e PAI-1 locais por Imunohistoquímica (IHQ)

A técnica de imunohistoquímica foi realizada para o detecção de IL-6, TGFβ, plasminogênio/plasmina e PAI-1.

Cortes histológicos de 5μm obtidos dos corações fixados em formol a 4% foram dispostos em lâminas silanizadas. O processo de silanização permite que os cortes histológicos fiquem fortemente aderidos as lâminas. O procedimento foi realizado da seguinte forma: as lâminas de vidro foram deixadas de molho no álcool 99% por 24 horas; após esse tempo, limpas uma a uma com gaze de algodão, colocadas em berços (suportes) de alumínio e mergulhadas em um banho contendo Acetona P.A. e Silano, seguindo o mergulho em 5 banhos de água destilada. Então, colocadas para secar em estufa a 37 °C durante 24 horas, ficando prontas para uso.

Os cortes foram submetidos à desparafinização e hidratação em série de alcoóis de concentração decrescente e água destilada. Em seguida foi feita a recuperação antigênica que consiste em métodos para expor o antígeno que se deseja estudar e facilitar a ligação deste com o anticorpo específico. Na recuperação antigênica, a substância tampão apropriada para cada proteína de interesse (Tabela 4) é colocada em recipiente próprio e levado ao banho-maria até que o tampão atinja a temperatura de 98 ºC. Então, os cortes são colocados em suportes e estes na substância tampão aquecida permanecendo nesta por 30 minutos. Após isso, o recipiente é retirado do banho e deixado na bancada para esfriar, até que atinja a temperatura ambiente. Daí segue-se o procedimento de imuhistoquímica como descrito a seguir.

O método de IHQ utilizado foi o tipo A-B-C (Estreptoavidina – Biotina – Peroxidase). O bloqueio de peroxidase endógena foi feito com H_2O_2 a 3%. Os tecidos foram incubados a temperatura de 4 ºC com anticorpos primários (Ac 1º), diluídos em um bloqueador (BSA - Albumina de Soro Bovino) a 3% por 16-18 horas (*overnight*).

O estudo imunohistoquímico foi feito usando-se os anticorpos primários, recuperação antigênica e diluições descritos na tabela 4**.**

Após a recuperação antigênica e incubação *overnight* com o anticorpo primário (Ac 1º), seguiu-se a incubação com o anticorpo secundário (Ac 2º) de acordo com a tabela 5**.**

Após a incubação com o Ac 2º, seguiu-se a marcação com estreptoavidina conjugada com HRP. Em seguida, fez-se a contracoloração com Hematoxilina e a revelação da marcação, usando DAB (3,3 diaminobenzidina) como cromógeno. Os controles negativos das reações foram feitos omitindo-se o Ac 1º no primeiro corte de cada lâmina.

Após a montagem das lâminas estas foram avaliadas em microscópio de forma semi-quantitativa usando um escore de marcação de acordo com a intensidade da coloração marrom obtida com o cromógeno DAB (tabela 6). Neste caso, um observador cego (desconhecedor dos grupos experimentais referente a cada amostra analisada) para o grupo ao qual pertence cada lâmina aplica um escore de intensidade de marcação da imunohistoquímica para cada artéria íntegra na lâmina.

Tabela 4– Anticorpos primários, recuperação antigênica e diluições utilizadas para marcação Imunohistoquímica.

Anticorpo Primário (Ac 1°)	Espécie do Ac 1°	Recuperação Antigênica	Concentração do Anticorpo	Diluição para IHQ	Fabricante
IL-6	Rabbit	-		1:300	Abcam
TGF-β	Rabbit	Tampão citrato pH 6,2	200µg/ml	1:250	Santa Cruz Biotech
Plasmina/plasminogênio	Mouse	Tampão citrato pH 6,2	100µg/ml	1:100	Santa Cruz Biotech
PAI-1	Rabbit	Tampão citrato pH 6,2	200µg/ml	1:100	Santa Cruz Biotech

Tabela 5 – Anticorpos secundários (Ac2º) e diluições utilizadas na Imunohistoquímica

Ac 1°	Ac 2°	Concentração do Anticorpo	Diluição do Ac 2° para IHQ	Fabricante
IL-6	Mouse anti-rabbit	(2-10µg/ml)	1:1000	Vector®
TGF-β	Mouse anti-rabbit	(2-10µg/ml)	1:1000	Vector®
Plasmina/plasminogênio	Anti-mouse	(2-10µg/ml)	1:300	Vector®
PAI-1	Mouse anti-rabbit	(2-10µg/ml)	1:300	Vector®

TABELA 6 – Descrição do significado do escore da marcação Imunohistoquímica

ESCORE	SIGNIFICADO
0	Nenhuma Marcação
1	Marcação leve
2	Marcação entre leve e moderada
3	Marcação Moderada
4	Marcação Intensa

Neste caso, um observador cego (desconhecedor dos grupos experimentais referente a cada amostra analisada) para o grupo ao qual pertence cada lâmina aplica um escore de intensidade de marcação da imunohistoquímica para cada artéria íntegra na lâmina.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores obtidos dos experimentos foram expressos como média±desvio padrão da média (DPM); avaliados estatisticamente utilizando o programa *GraphPadPrism 5®.* Para promover sensibilidade as análises comparou-se os grupos experimentais por análise de variância de duas vias (ANOVA) uma vez que os dados não assumem distribuição homogênea obrigatória; por sua vez seguida por teste capaz de identificar pequenos contrastes nos dados nos pares de grupos, como no método *de Bonferroni.* Para todas as análises foi adotado o nível de significância de $p \leq 0,05$.

6 RESULTADOS

Os resultados obtidos são provenientes dos grupos de camundongos tratados nos seguintes tempos: 30 minutos e 1, 3 e 10 dias, cujos tecidos foram utilizados para as três avaliações e o número total de animais em cada tempo estudado está apresentado na Tabela 7. É importante ressaltar que foram preparados grupos diferentes de animais conforme necessidade específica de cada método utilizado, onde para a avaliação hemodinâmica foram utilizadas 40 animais, para avaliações morfométricas e imunohistoquímicas 96 animais e avaliações proteicas 96 animais.

Tabela 7 – número de animais por grupo avaliados.

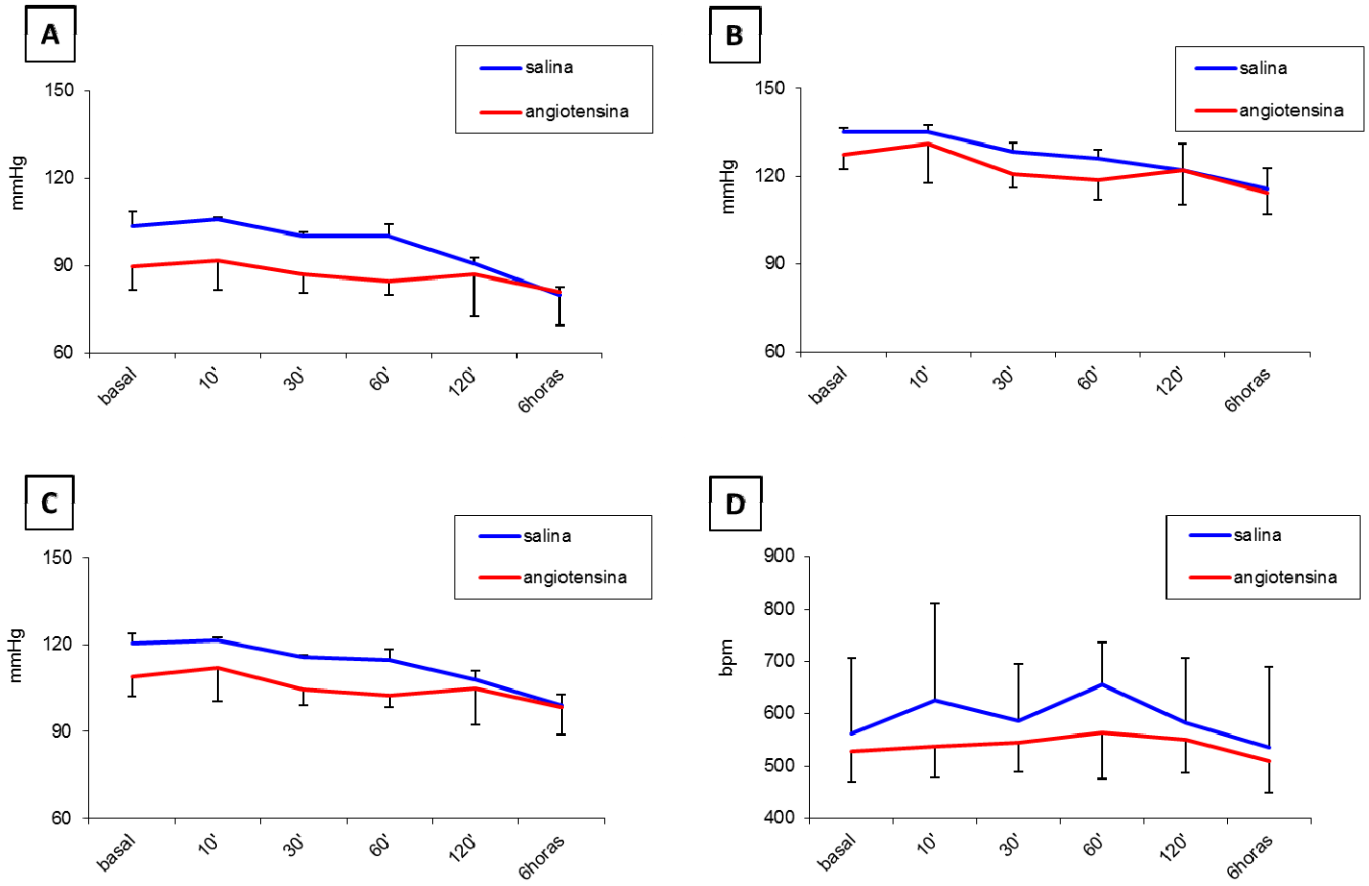
Tratamentos	**30 minutos**	**1 dia**	**3 dias**	**10 dias**
Controle (salina)	N = 17	N = 12	N= 12	N= 17
Angiotensina II	N = 17	N = 12	N= 12	N= 17
Losartan	N = 17	N = 12	N= 12	N=17
Los + AngII	N = 17	N = 12	N= 12	N=17
Total de animais	**68**	**48**	**48**	**68**

6.1 Avaliação de pressão arterial e frequência cardíaca – avaliação direta

Num primeiro momento, foi avaliado o efeito de uma injeção de Ang II sobre pressão arterial e frequência cardíaca em um período agudo de até 6 horas após a injeção, comparado a uma avaliação basal destas variáveis.

Os resultados de pressão arterial diastólica, sistólica e média, bem como de frequência cardíaca obtidos são apresentados na Figura 8, a qual demonstra que, os animais tratados com Ang II apresentaram um desenvolvimento semelhante aos animais que receberam solução salina, sejam nas diferentes variáveis hemodinâmicas seja ao longo do tempo avaliado.

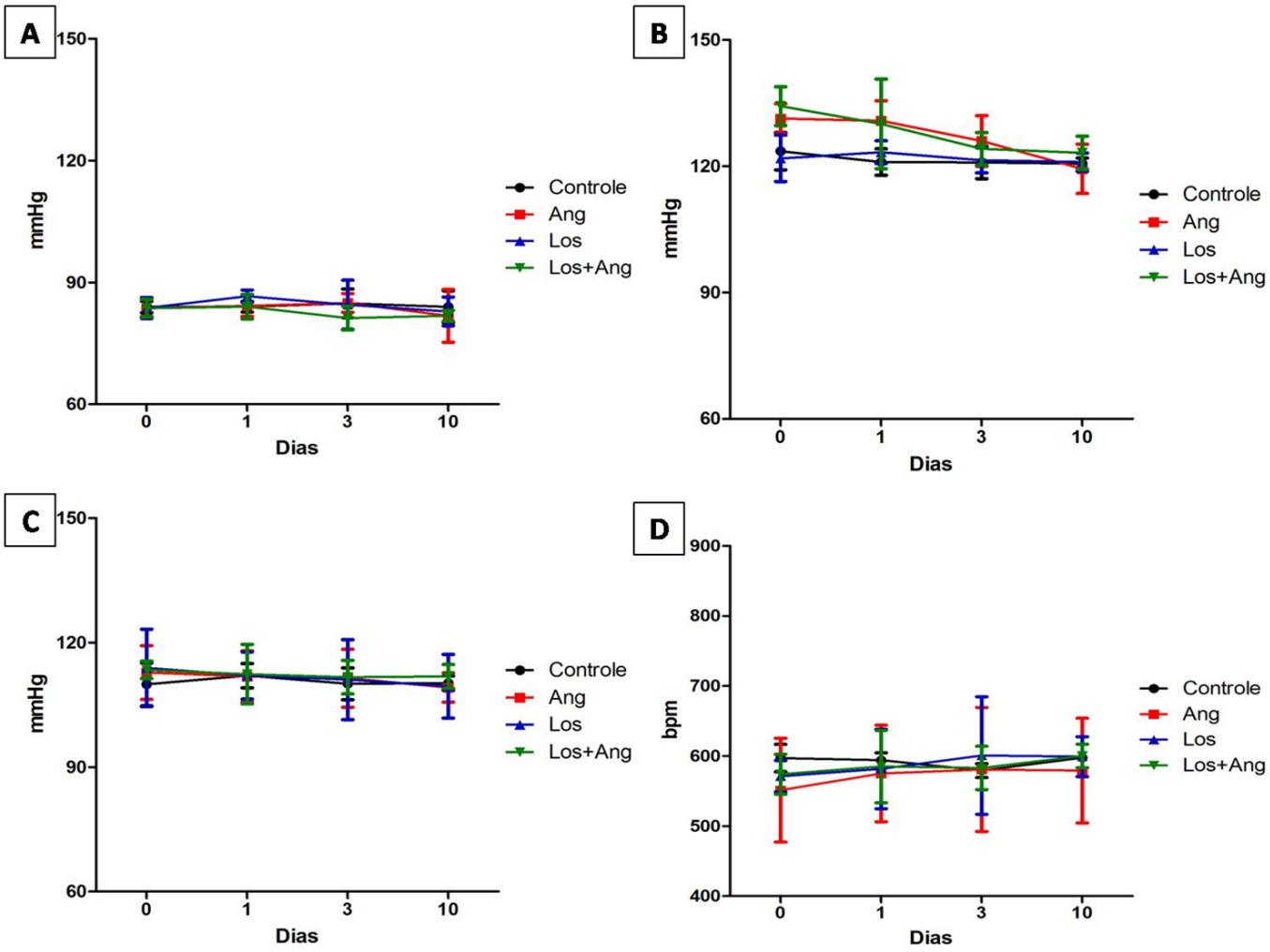
Figura 8– Valores médios de pressão arterial diastólica (A), sistólica (B) e média (C), e da freqüência cardíaca (D), nos períodos basal e após 10, 30, 60 e 120 minutos e 6 horas da injeção de salina 0,9% ou Ang II. Não foram verificadas diferenças significantes entre tratamentos e tempos de estudo. * p≤0,05 (n= 5/tratamento).



Quando, numa segunda avaliação, comparamos as mesmas variáves nos momentos basal (0) com os tempos de 1, 3 e 10 dias, podemos verificar que os tratamentos não modificaram a PAD, PAM e PAS nem nos animais que receberam angiotensina II, losartan ou a combinação destes (Figura 9).

A FC também não apresentou alterações nos tratamentos em qualquer tempo avaliado, seja em relação a variável tempo (ao longo dos dias) acompanhando os grupos separadamente, seja quando comparados entre si; notar que as escalas numéricas, nos dados de pressão arterial não apresentam flutuação maior que 20 mmHg entre os dados mais díspares, o que se repetiu nos dados de FC, demonstrando que não houve variação maior que 30 bpm de diferença entre os grupos.

Figura 9 – Valores médios de pressão arterial diastólica (A), sistólica (B) e média (C), e da freqüência cardíaca (D), nos períodos basal e após 1, 3 e 10 dias de injeção de salina 0,9%, losartan, Ang II ou tratamento combinado. Não foram verificadas diferenças significantes entre tratamentos e tempos de estudo. * p≤0,05 (n= 5/tratamento).



6.2 Análise Biométrica

Conforme descrito na metodologia, foi feita a medida de peso corporal, e foram coletados e pesados coração, pulmões e rins, sendo feitos os cálculos de pesos relativos.

Quando avaliamos os pesos corporais dos 4 grupos experimentais nos tempos determinados de estudo, verificamos que, de forma geral, não houve alteração significante no peso corporal destes animais em função do tratamento aplicado, dessa maneira, considerando os dados de peso corporal conforme os tempos analisados temos que, no tempo inicial 30 minutos os animais tinham pesos corporais muito parecidos (28,19g Controle; 29,69g AngII; 30,17g Los; e 29,23g Los+AngII), o que persistiu no tempo final de 10 dias (21,99g Controle; 19,51g AngII; 22,56g Los; e 18,65g Los+AngII).

Contudo, em relação ao tempo de tratamento, o peso corporal apresentou variância significativa e mostrou que os grupos (independentemente do tratamento) de 3 e 10 dias apresentaram redução do peso corporal, como pode ser visto na Tabela 8.

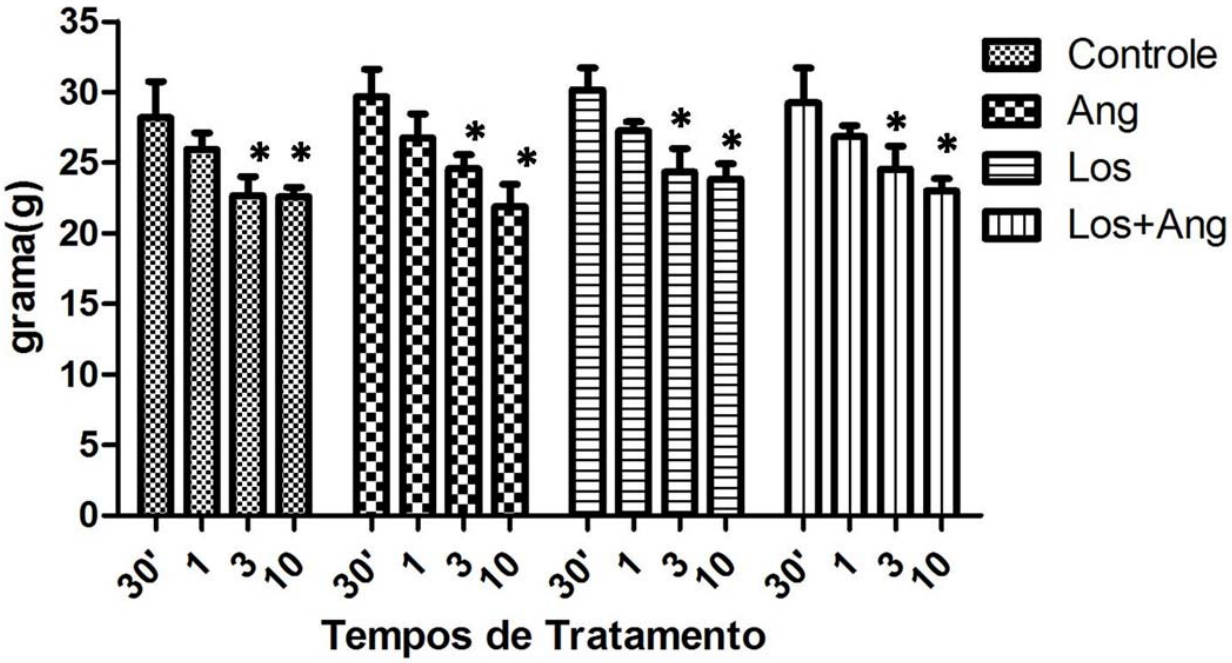
Tabela 8 - peso corporal (medido em grama).

	Controle	Ang II	Losartan	Los+Ang II
30 minutos	28,19±2,6 (n=6)	29,69±1,9 (n=6)	30,17±1,5 (n=5)	29,23±2,6 (n=5)
1 dia	27,97±2,4 (n=6)	27,58±2,1 (n=5)	30,24±1,0 (n=4)	27,55±1,4 (n=6)
3 dias	22,67±1,3 (n=6)	25,25±1,8 (n=6)	25,49±2,1 (n=6)	24,54±1,6 (n=6)
10 dias	21,99±1,3 (n=5)	19,51±2,7 (n=5)	22,56±0,7 (n=5)	18,65±2,0 (n=4)

A figura 10 apresenta os pesos corporais dos tratamentos no tempo de 30 minutos, 1, 3 e 10 dias e mostra uma diferença significante no peso corporal dos grupos tratados por 3 e 10 dias, algo evidenciado pela demonstração anterior (dados contidos na tabela 8).

Percebe-se também nesta demonstração que os animais iniciaram os períodos de tratamento com pesos maiores (da ordem de 30 g de peso) e ao longo do tempo de tratamento perderam peso, possivelmente devido à manipulação diária destes.

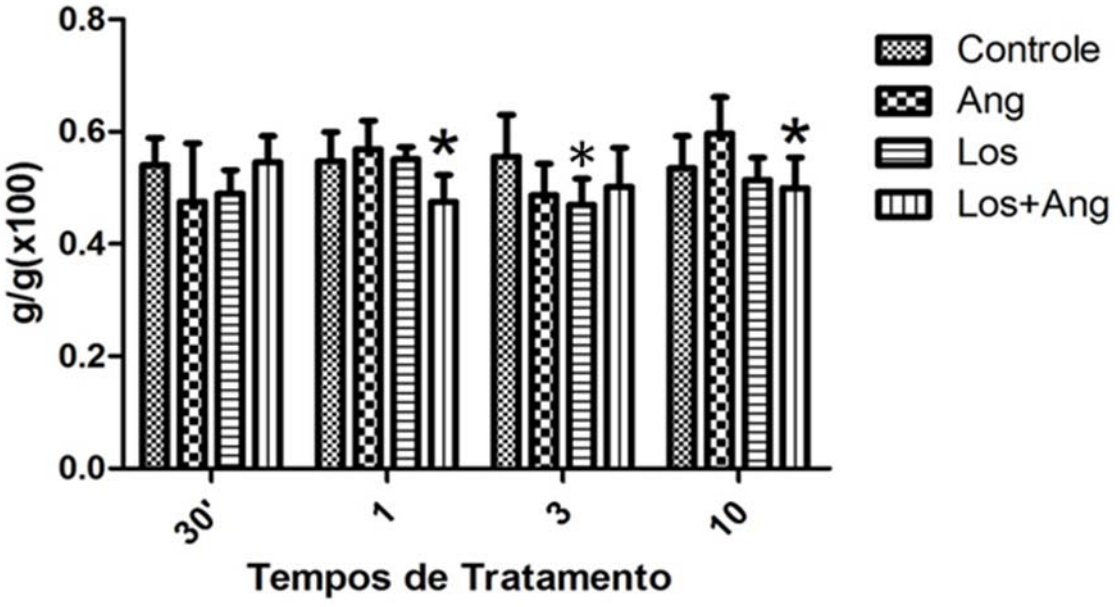
Figura 10 – Valores médios do peso corporal dos grupos tratados por 30 minutos (n= 5/tratamento), 1 dia (n= 5/tratamento), 3 dias (n= 5/tratamento) e 10 dias (n= 5/tratamento). Os grupos tratados por 3 e 10 dias apresentaram valores de peso inferiores aos respectivos tratamentos feitos por 30 minutos e 1 dia. * p≤0,05.



Quando foi calculado o peso relativo do coração, verificou-se não haver importante variação no peso cardíaco nos tratamentos e tempos de estudo; ou seja, se considerados os valores brutos temos variações de ordem menores que 0,05 g, em um órgão de peso total de 0,50 g.

Verificamos também que o peso relativo do coração se apresenta menor nos animais Los+Ang II tratados por 1 dia e nos animais que receberam o mesmo tratamento por 3 e 10 dias.

Figura 11- Valores médios do peso relativo do coração nos grupos tratados por 30 minutos (n= 5/tratamento), 1 dia (n= 5/tratamento), 3 dias (n= 5/tratamento) e 10 dias (n=5/tratamento). Os grupos los+Ang tratados por 1 e 10 dias apresentaram valores de peso do coração inferiores aos grupos Ang tratados pelos mesmos tempos. * p≤0,05.



A avaliação dos pesos relativos dos rins mostrou não haver diferença significante nem em função dos tratamentos e nem em função dos tempos, como apresentado na Figura 12. Isso ser verificado se considerarmos por exemplo pontualmente o tempo de 30 minutos, nos diferentes grupos (Controle 1,33±0,24; AngII 1,36±0,09; 1,42±0,14 Los; e Los+AngII 1,49±0,36). Resultado semelhante foi obtido quando os pesos relativos dos pulmões foram calculados, onde não foram verificadas diferenças significantes entre grupos e tratamentos (Figura 13), ou seja, considerando também o mesmo tempo, no período experimental de 30 minutos, verificou-se: 0,87±0,26 Controle; 0,64±0,16 AngII; 0,80±0,13 Los; e Los+AngII 0,77±0,39.

Figura 12- Valores médios do peso relativo dos rins nos grupos tratados por 30 minutos (n= 5/tratamento), 1 dia (n= 5/tratamento), 3 dias (n= 5/tratamento) e 10 dias (n= 5/tratamento). Não foram verificadas diferenças significantes entre tratamentos e tempos de estudo.

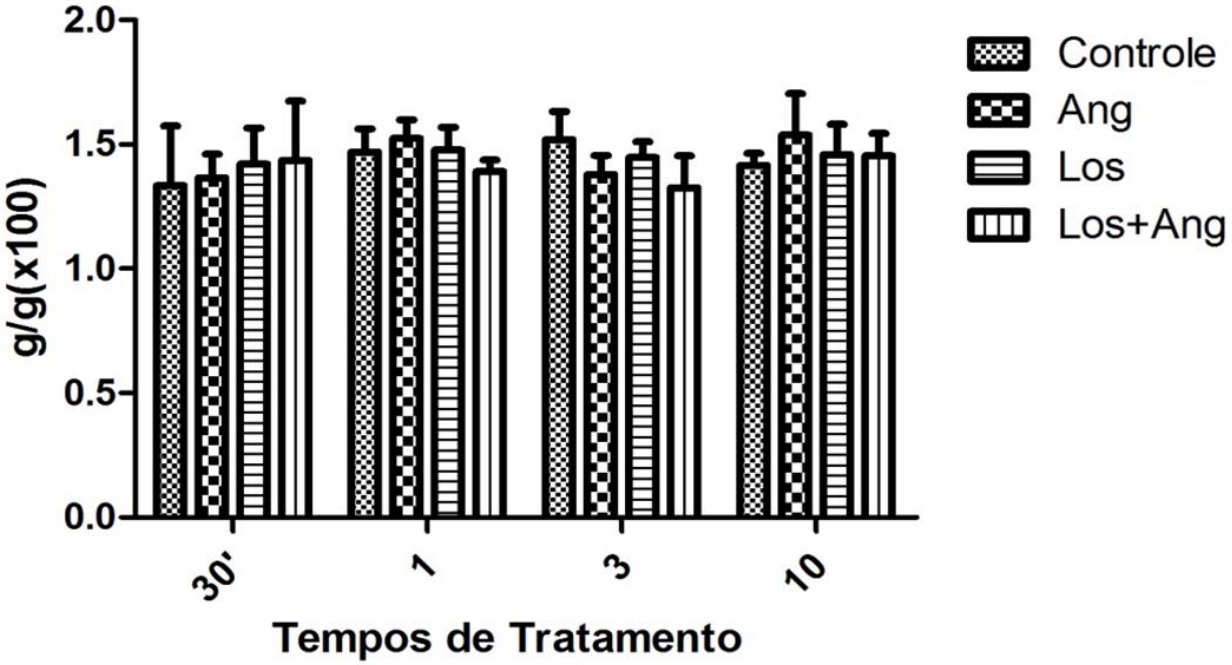
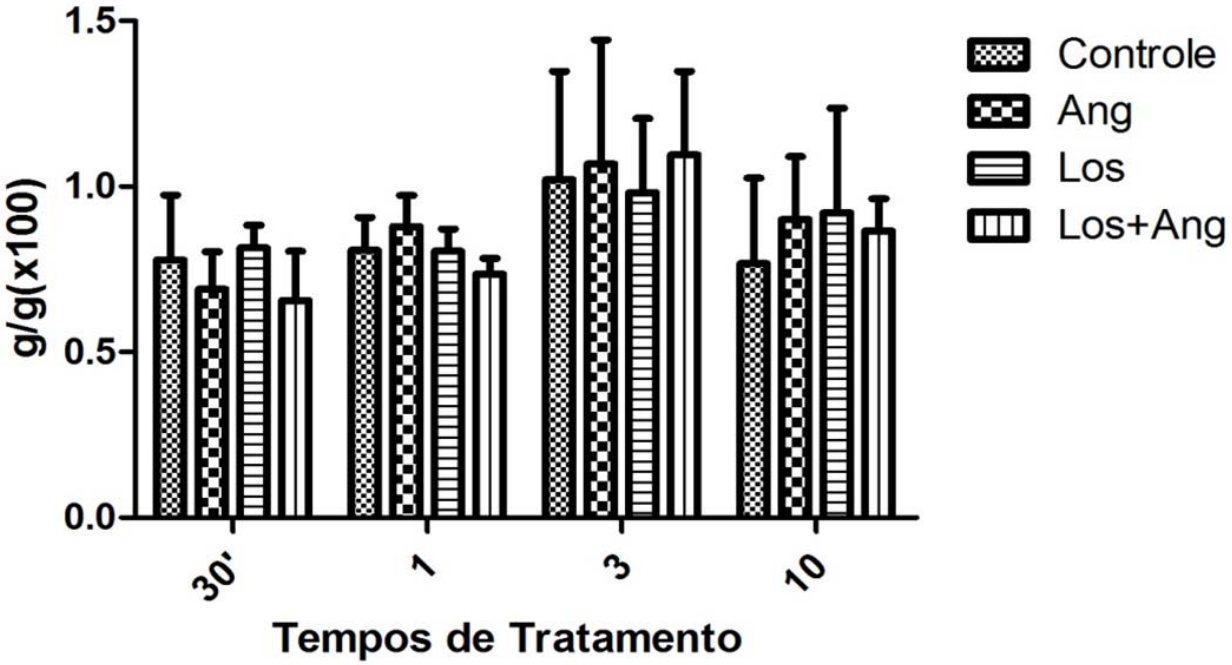


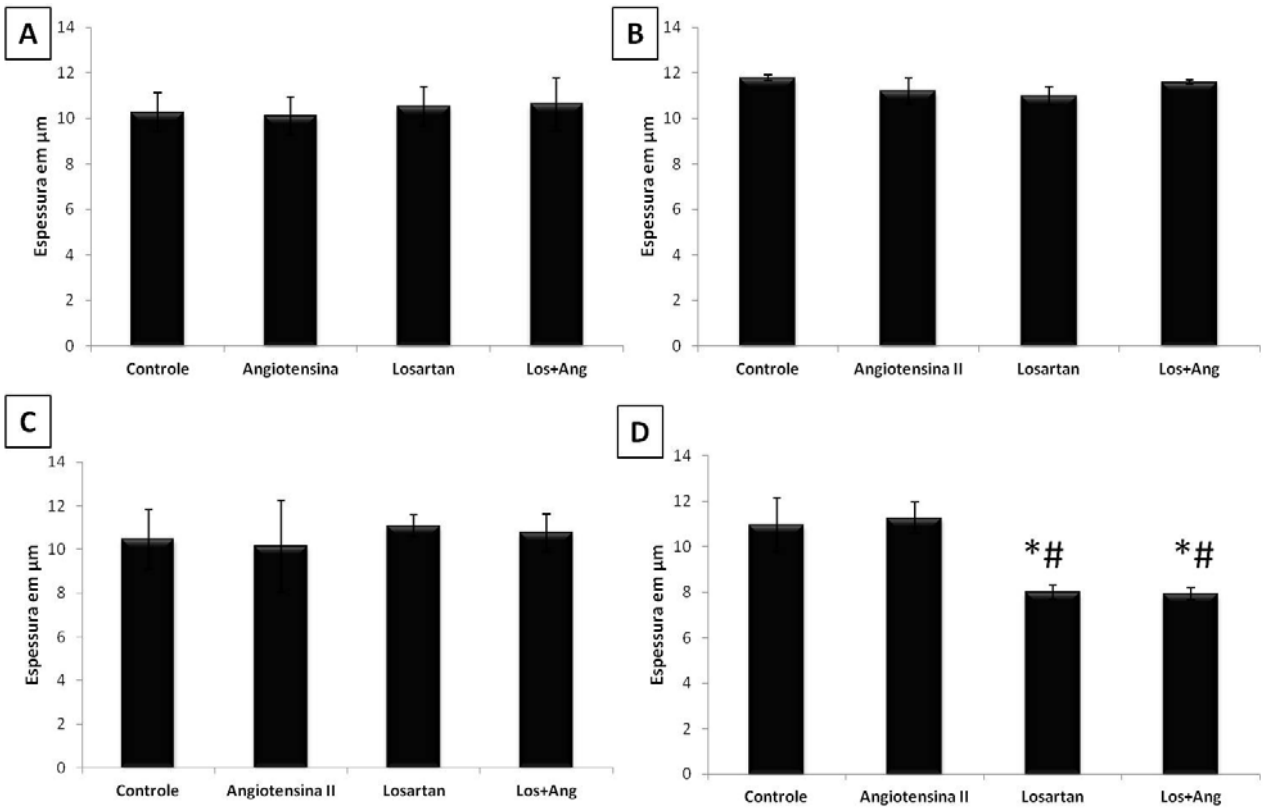
Figura 13- Valores médios do peso relativo dos pulmões nos grupos tratados por 30 minutos (n= 5/tratamento), 1 dia (n= 5/tratamento), 3 dias (n= 5/tratamento) e 10 dias (n= 5/tratamento). Não foram verificadas diferenças significantes entre tratamentos e tempos de estudo



6.3 Avaliação dos cardiomiócitos

As medidas de espessura de cardiomiócitos foram realizadas em lâminas coradas pela Hematoxilina-Eosina. A Figura 14 apresenta os valores médios obtidos para os quatro tratamentos nos tempos estudados. Na análise estatística realizada, podemos observar que ocorre uma redução no diâmetro dos cardiomiócitos dos grupos que receberam tratamento com losartan e combinado los+Ang por 10 dias, sendo este último significante; assim, verificamos diâmetro de 10,95±1,19 µm nos animais controle, e 8,00±0,28 µm nos animais tratados isoladamente com Losartan e 7,93±0,24 µm nos animais com tratamento combinado após 10 dias de tratamento.

Figura 14 - Valores médios da espessura de cardiomiócitos nos grupos tratados por 30 minutos (n= 5/tratamento), 1 dia (n= 5/tratamento), 3 dias (n= 5/tratamento) e 10 dias (n= 5/tratamento). A – Tempo de Tratamento 30 minutos, B – Tempo de Tratamento 1 dia, C – Tempo de Tratamento 3 dias e D – Tempo de Tratamento 10 dias. Os grupos los e Los+Ang tratados por 10 dias apresentaram valores de espessura de cardiomiócitos inferiores aos grupos controle e Ang tratados pelo mesmo tempo. * # p≤0,05.



6.4 Análise da deposição de fibras de colágeno perivasculares

Foi realizada a coloração pelo picrossírius, em todos os tempos experimentais; e analisados todos os grupos. Na avaliação foram consideradas, relação de área de colágeno/área do vaso.

As observações referentes a essa relação de área de colágeno/área do vaso, sugerem que não ocorre alteração significante nos tratamentos após 30 minutos, 1 e 3 dias (figuras 15,16 e 17). Contudo, a análise realizada no tempo de tratamento de 10

dias mostrou-se diferente, onde se observa um aumento da relação área de colágeno/área do vaso dos animais que receberam Ang II por 10 dias (figura 18).

Figura 15- Relação de área de colágeno/área do vaso tempo de tratamento 30 minutos.

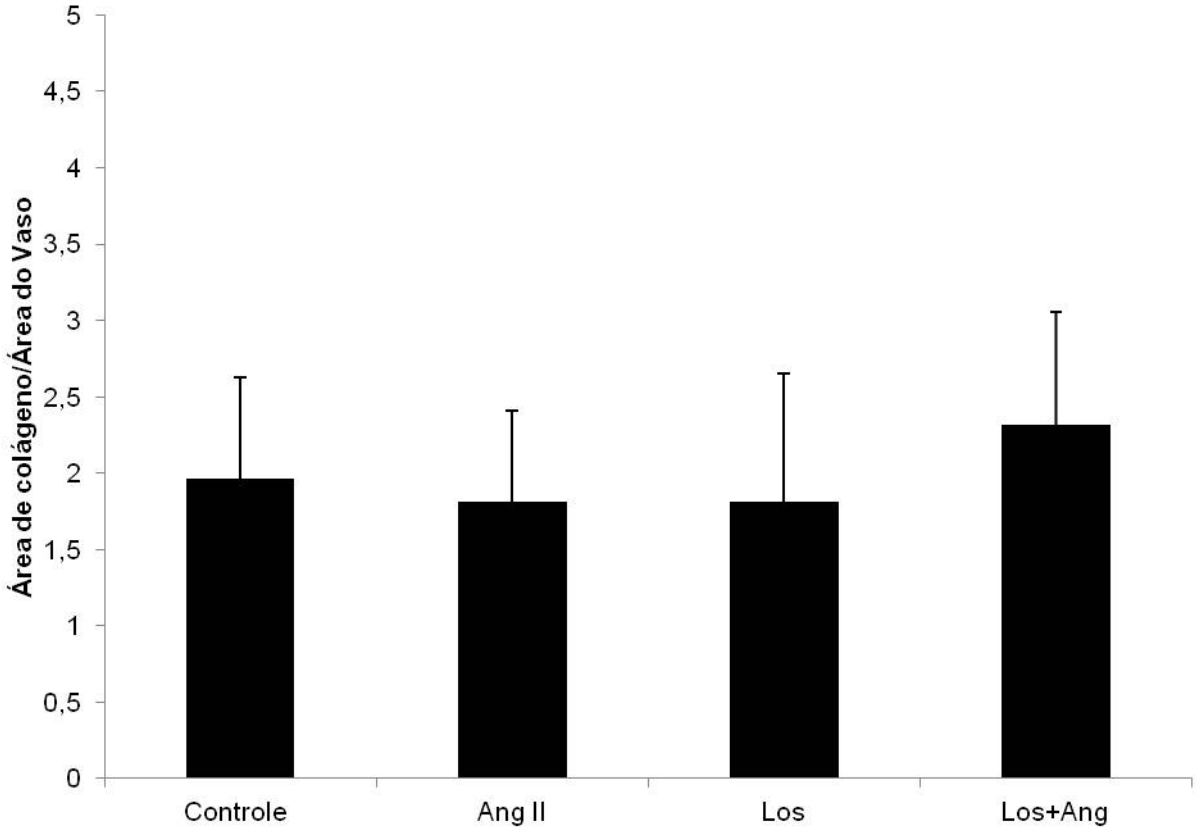


Figura 16– Relação de área de colágeno/área do vaso tempo de tratamento 1 dia.

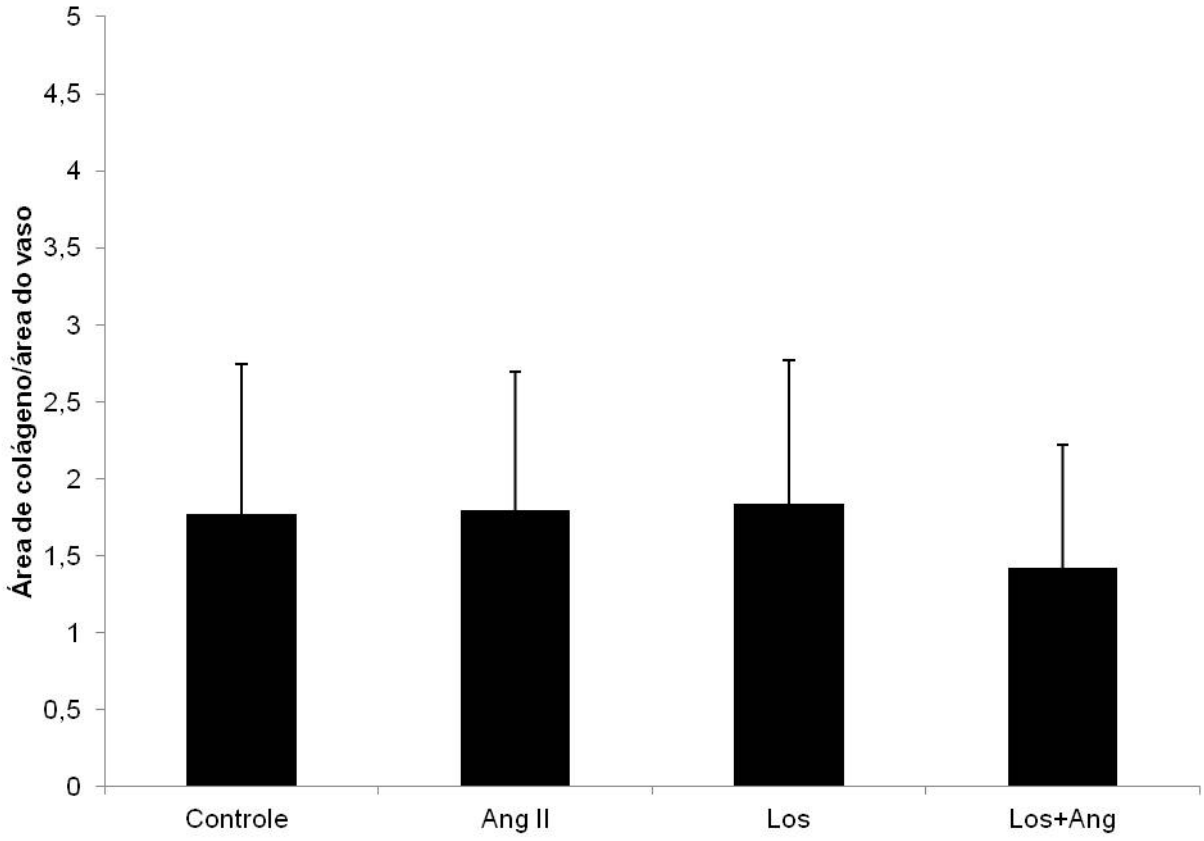


Figura 17– Relação de área de colágeno/área do vaso tempo de tratamento 3 dias.

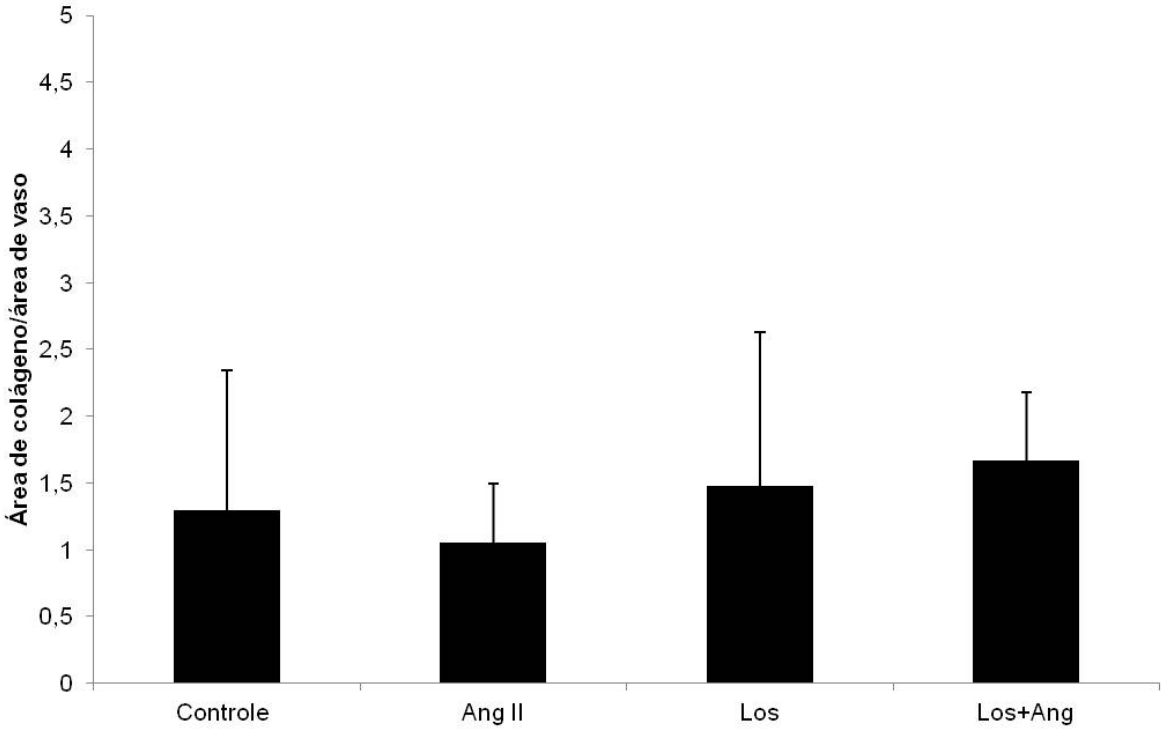
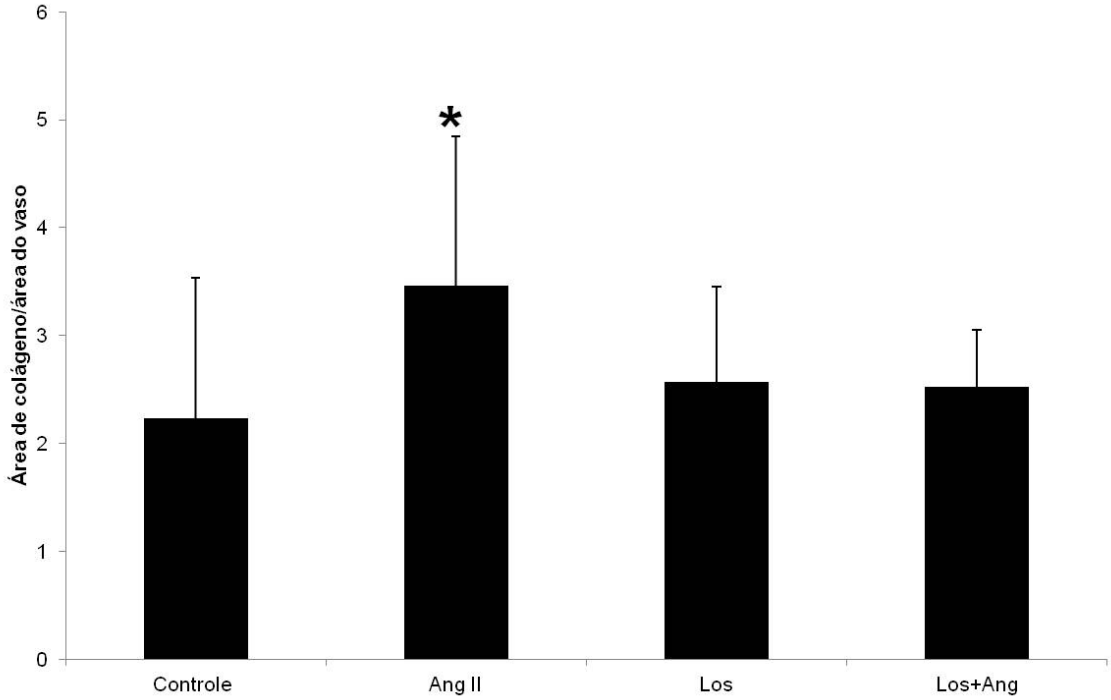


Figura 18– Relação de área de colágeno/área do vaso tempo de tratamento 10 dias. * p≤0,05 comparado ao controle.

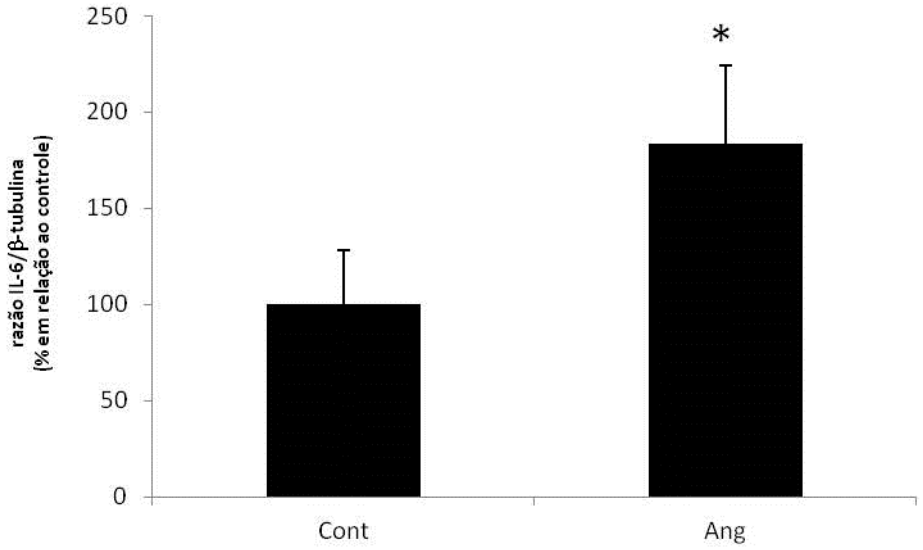


6.5 Estudo de marcadores Inflamatórias

6.5.1 Avaliação da expressão de IL-6 por western blotting e imunohistoquímica

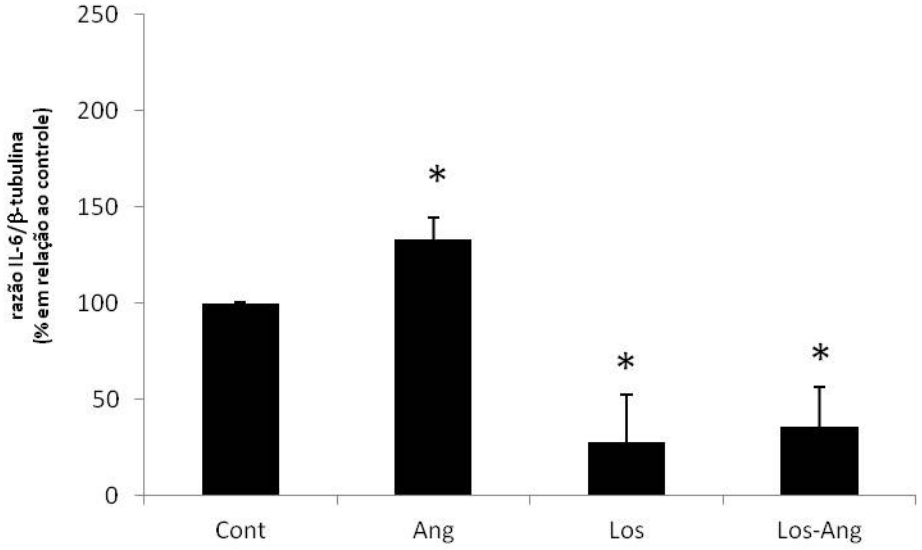
A análise da IL-6 apresenta resultados bastante semelhantes quando observamos as duas técnicas utilizadas para sua avaliação,onde em 30 minutos pela técnica de *western blotting*, já foi possível observar diferença significante na relação IL-6/β-tubulina nos animais tratados com Ang II. A expressão proteica apresenta-se aumentada, como podemos obsevar na figura 19.

Figura 19- Valores médios da relação percentual das detecções proteícas para IL-6 e β-tubulina comparando grupos controle (n= 5) e Ang II (n= 5). Tempo de tratamento 30 minutos. * p≤0,05 comparado ao controle.



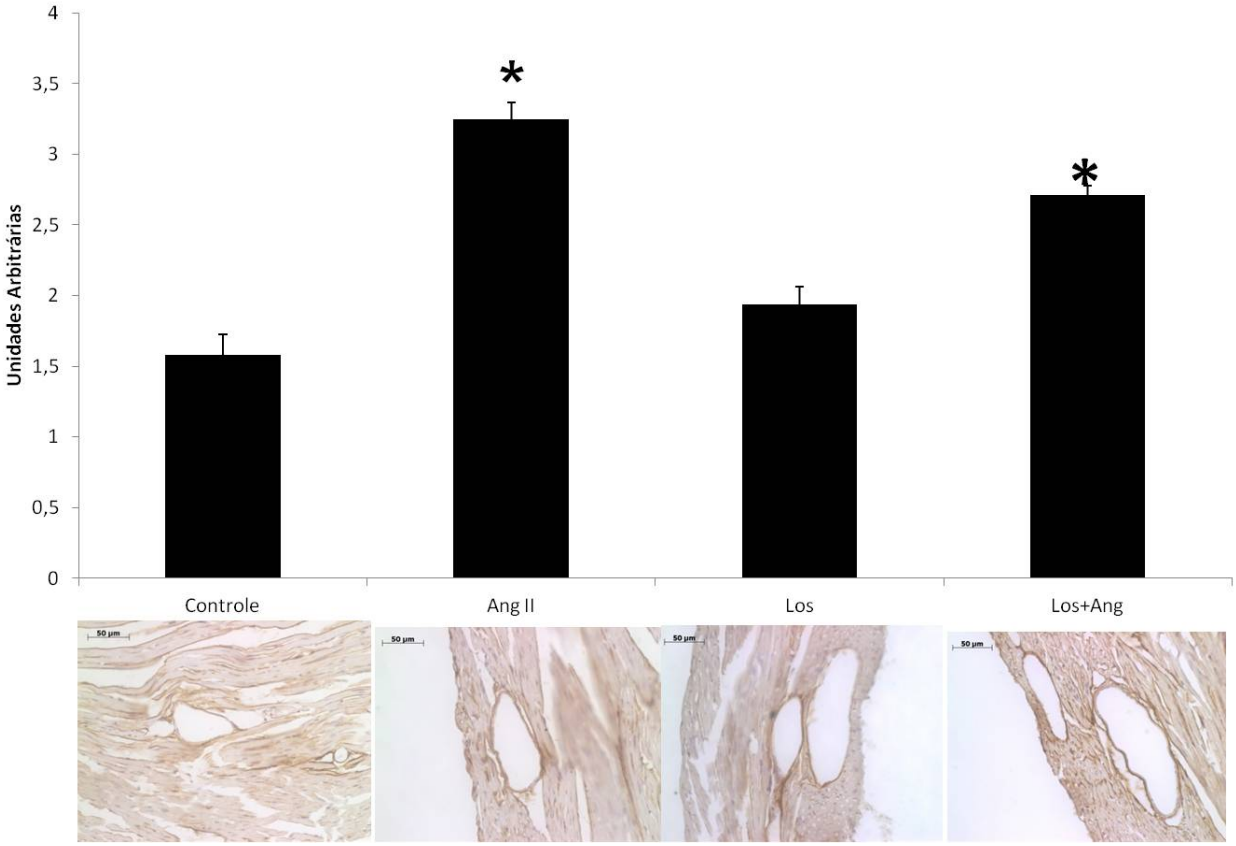
Na Figura 20 podemos observar os 4 grupos experimentais após 10 dias de tratamento. Nesse tempo, verificamos que o tratamento com Ang II aumenta de forma significante a expressão de IL-6 no tecido cardíaco quando comparada aos grupos controle e tratado com losartan. Embora o tratamento com losartan reduza esta expressão, os valores não foram diferentes do grupo controle. Por outro lado, o tratamento combinado de Ang II e losartan aparentemente impede o aumento da expressão de IL-6 induzido pela Ang II.

Figura 20- Valores médios da relação percentual das detecções proteícas para IL-6 e β-tubulina comparando grupos controle (n= 5), Ang II (n= 5), Los (n= 5) e Los+Ang (n= 5). Tempo de tratamento de 10 dias. * p≤0,05 comparado ao controle.



Já nas avaliações relacionadas à imunomarcação de IL-6 (figura 21), os resultados obtidos para os animais tratados com Ang II e avaliados após 30 minutos apresentaram aumento de marcação frente o grupo controle. O grupo Losartan apresentou queda acentuada no escore de marcação. Por outro lado, o grupo Los+Ang apresentou aumento no escore de marcação comparado ao controle.

Figura 21 – Valores médios dos escores de imunomarcação para IL-6 nas artérias cardíacas dos grupos tratados após 30 minutos. * p≤0,05 comparado aos demais grupos; ** p≤0,05 comparado ao grupo los+Ang (n=6).



Ainda, nas avaliações de escore de marcação para IL-6 nas artérias cardíacas, para os tempos experimentais de 1, 3 e 10 dias (figuras 22, 23 e 24, respectivamente) verificamos que o grupo Ang II apresenta um aumento de marcação nas artérias cardíacas. É interessante observar que os grupos tratados combinadamente ou isoladamente com losartan não apresentam variação significante de escore de marcação quando comparados aos animais controle.

Figura 22– Valores médios dos escores de imunomarcação para IL-6 nas artérias cardíacas dos grupos controle e Ang II tratados por 1 dia. * p≤0,05.

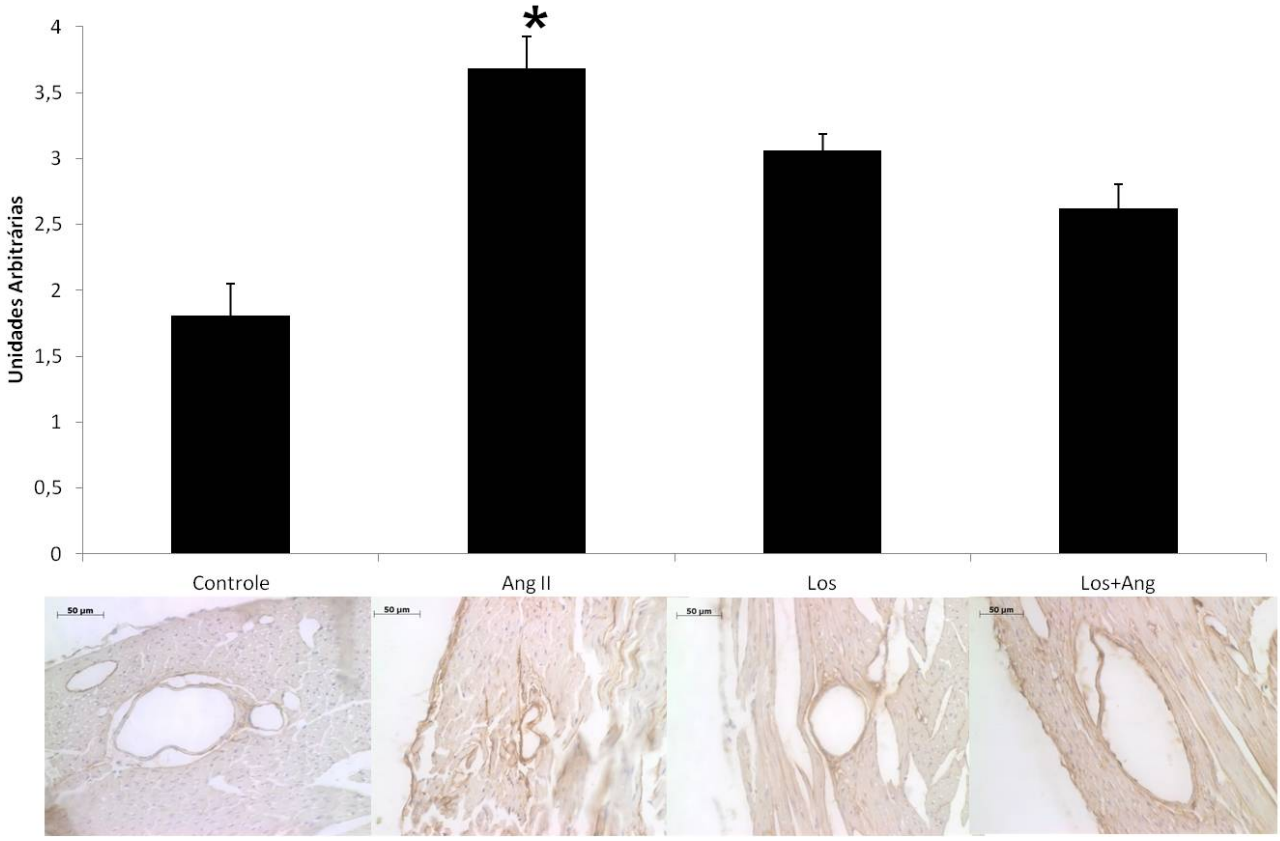


Figura 23 – Valores médios dos escores de imunomarcação para IL-6 nas artérias cardíacas dos grupos controle e Ang II tratados por 3 dias; * p≤0,05.

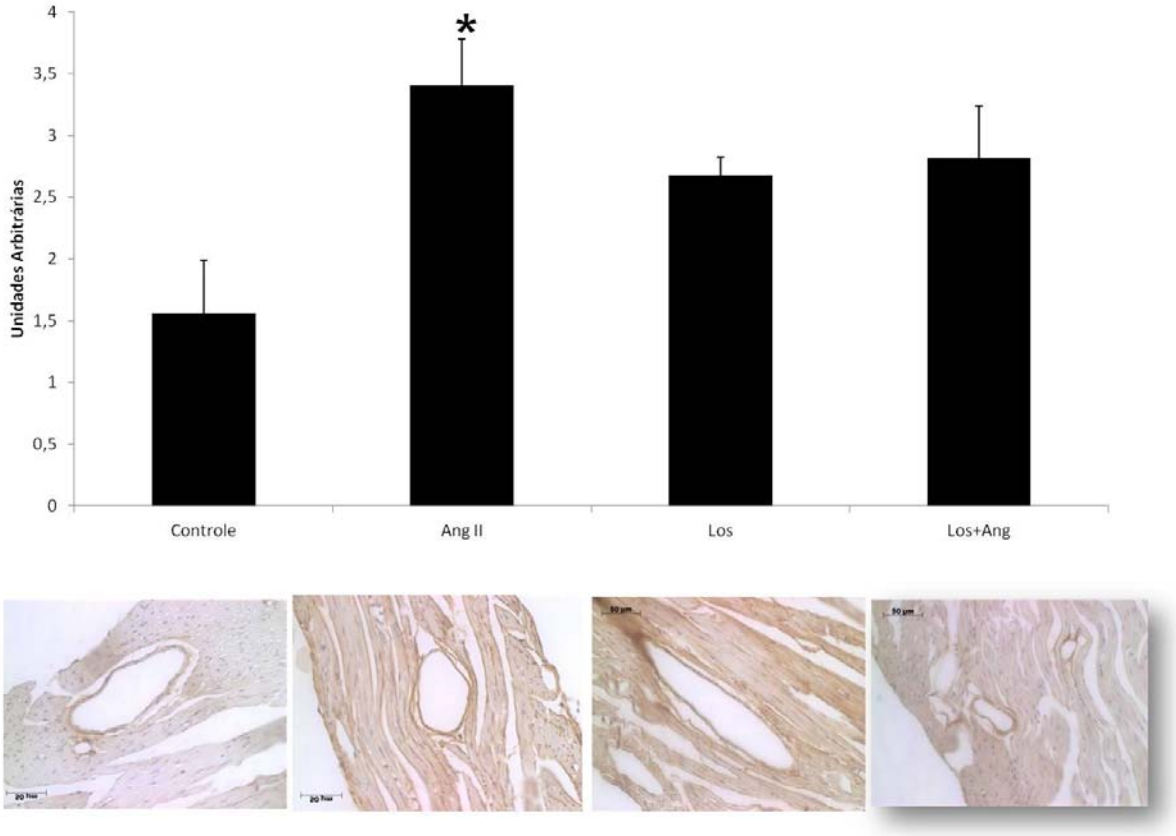
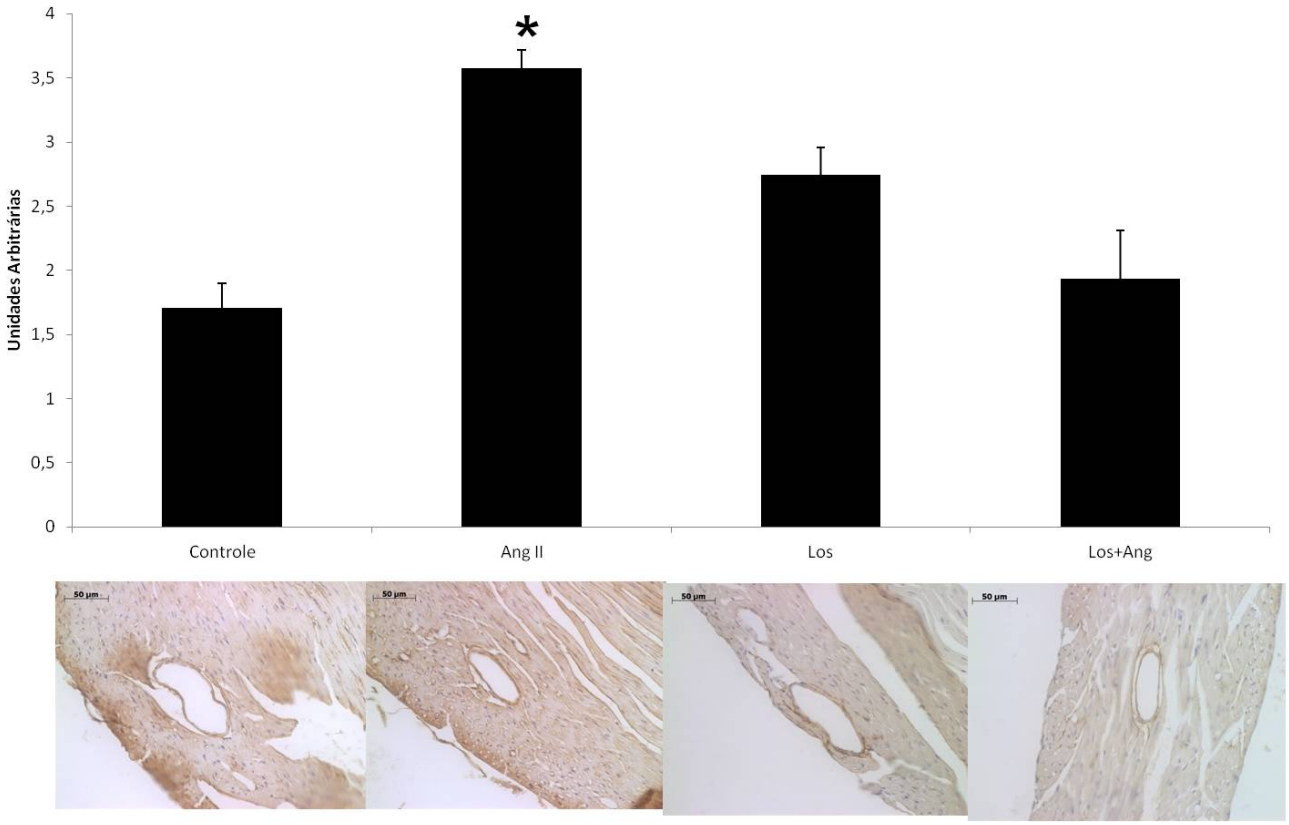


Figura 24– Valores médios dos escores de imunomarcação para IL-6 nas artérias cardíacas dos grupos controle e Ang II tratados por 10 dias; * p≤0,05.



.

6.5.2 Avaliação da expressão de TGFβ por western blotting, e análise imunohistoquímica de TGFβ, PAI-1 e plaminogênio/plasmina

As análises de TGFβ, PAI-1 e plasminogênio/plasmina apresentam resultados bastante interessantes, como iremos observar a seguir. Foi realizada a avaliação da razão de expressão de TGFβ corrigida pela β-tubulina para os tempos de tratamento de 30 minutos,1 dia, 3 dias e 10 dias. De maneira geral, em todos os tempos de tratamento este marcador se comportou de forma semelhante à IL-6, ou seja, apresentou um aumento de expressão nos animais tratados com Ang II e, havendo bloqueio isolado ou combinado pelo Losartan, verificou-se que há respectiva redução da expressão deste marcador.

Ainda, a relação de expressão TGFβ/β-tubulina, nos animais tratados combinadamente com Los+Ang apresentou os menores valores entre todos os grupos estudados, demonstrando diminuições de expressão de TGFβ nos tempos de 30 minutos (figura 25), de 1 dia (figura 26) e 3 dias (figura 27). Contudo, após 10 dias, a expressão de TGFβ manteve-se semelhante àquela do grupo controle (figura 28).

Figura 25- Análise proteica da relação percentual TGFβ/β-tubulina comparando grupos controle, Ang II, los e los+Ang II, no tempo de tratamento 30 minutos(n= 5/tratamento). * p≤0,05 comparado ao controle.

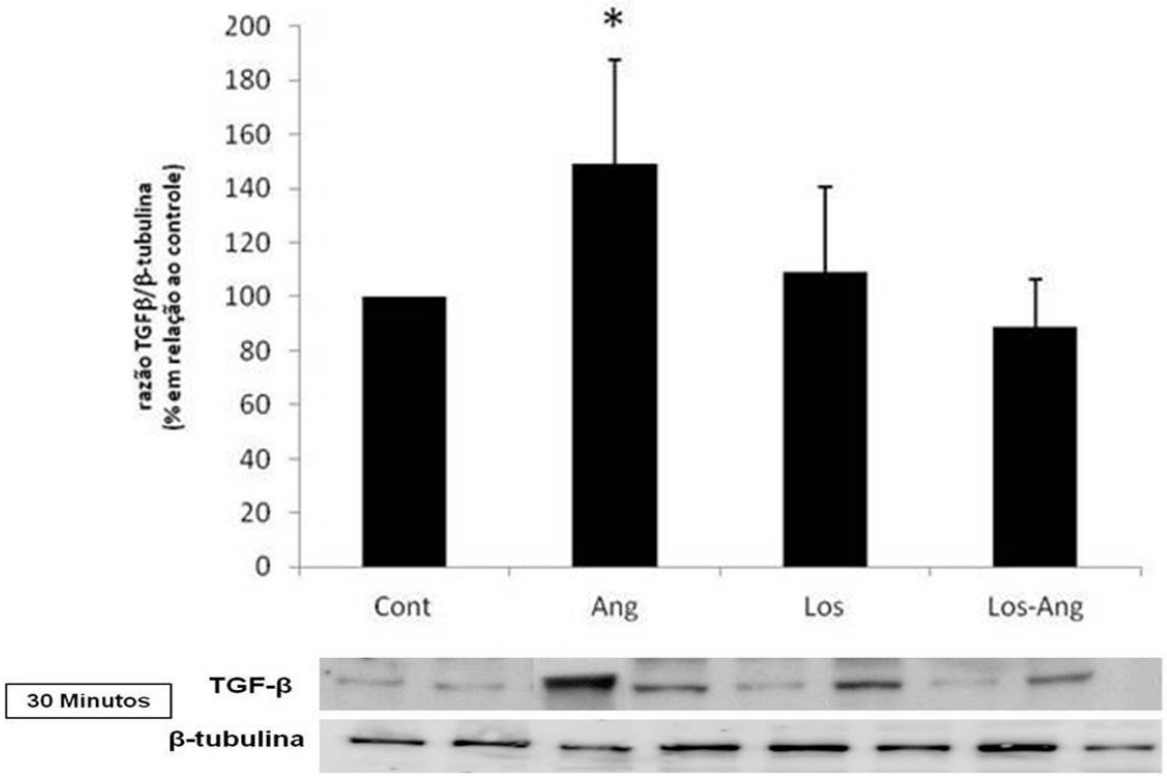


Figura 26- Análise proteica da relação percentual TGFβ/β-tubulina comparando grupos controle, Ang II, los e los+Ang II, no tempo de tratamento 1 dia(n= 5/tratamento). * p≤0,05 comparado ao controle.

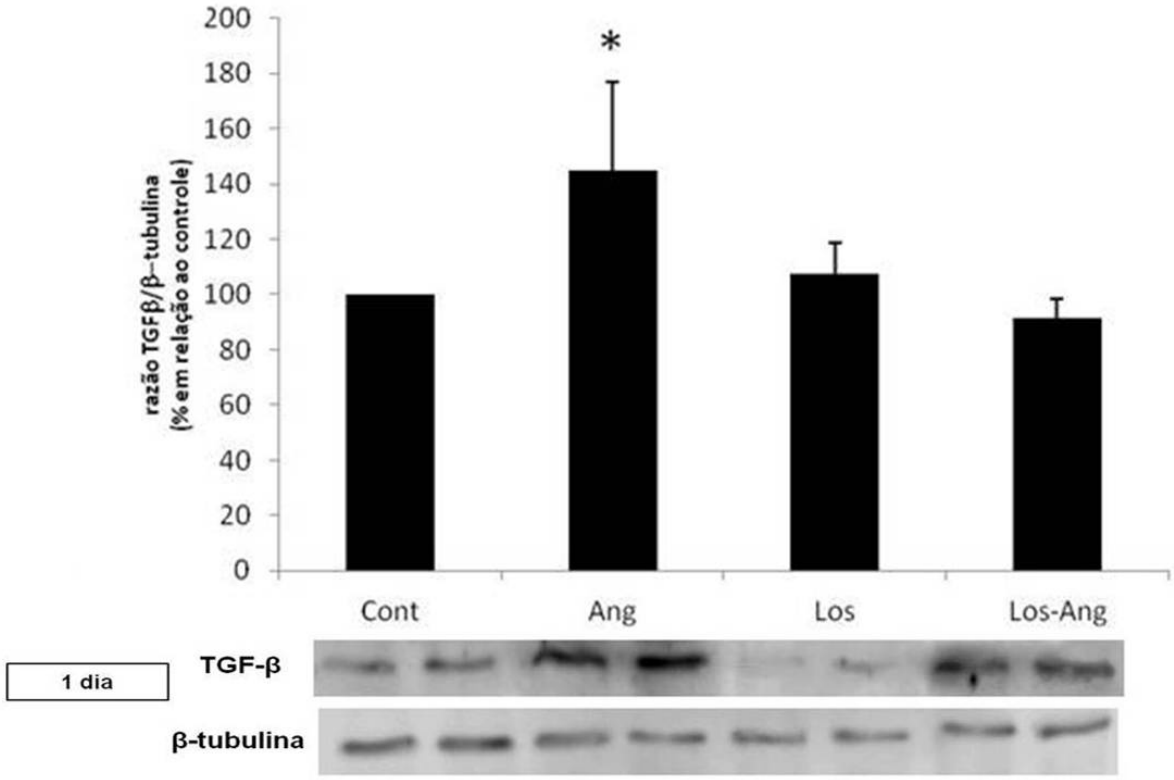


Figura 27- Análise proteica da relação percentual TGFβ/β-tubulina comparando grupos controle, Ang II, los e los+Ang II, no tempo de tratamento 3 dias(n= 5/tratamento). * p≤0,05 comparado ao controle.

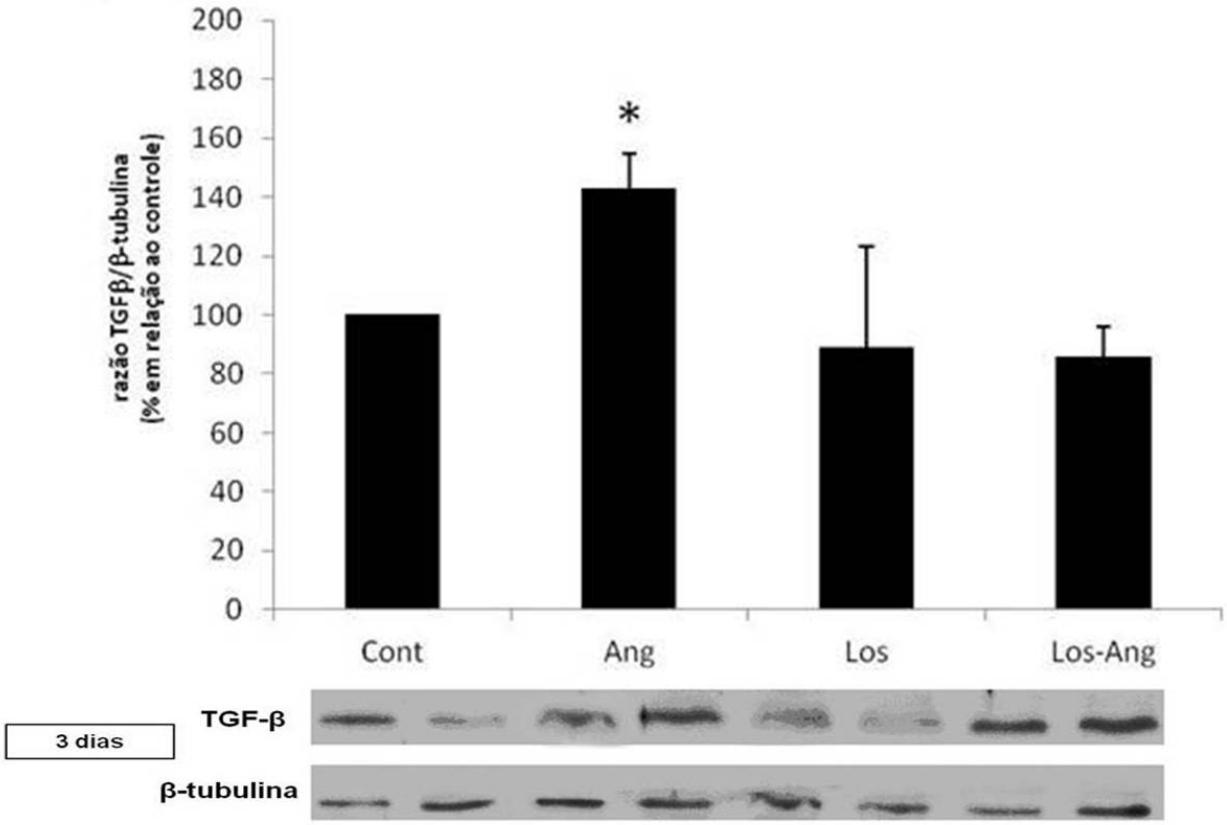
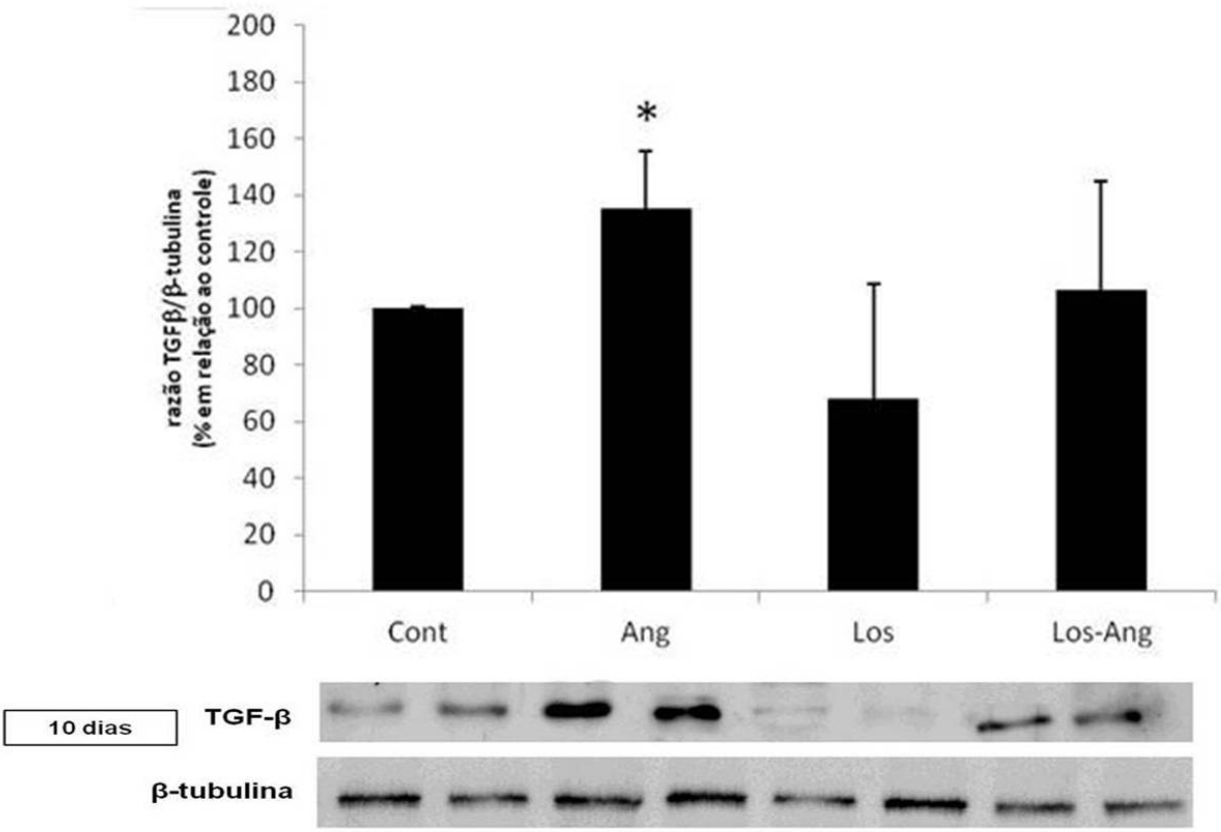


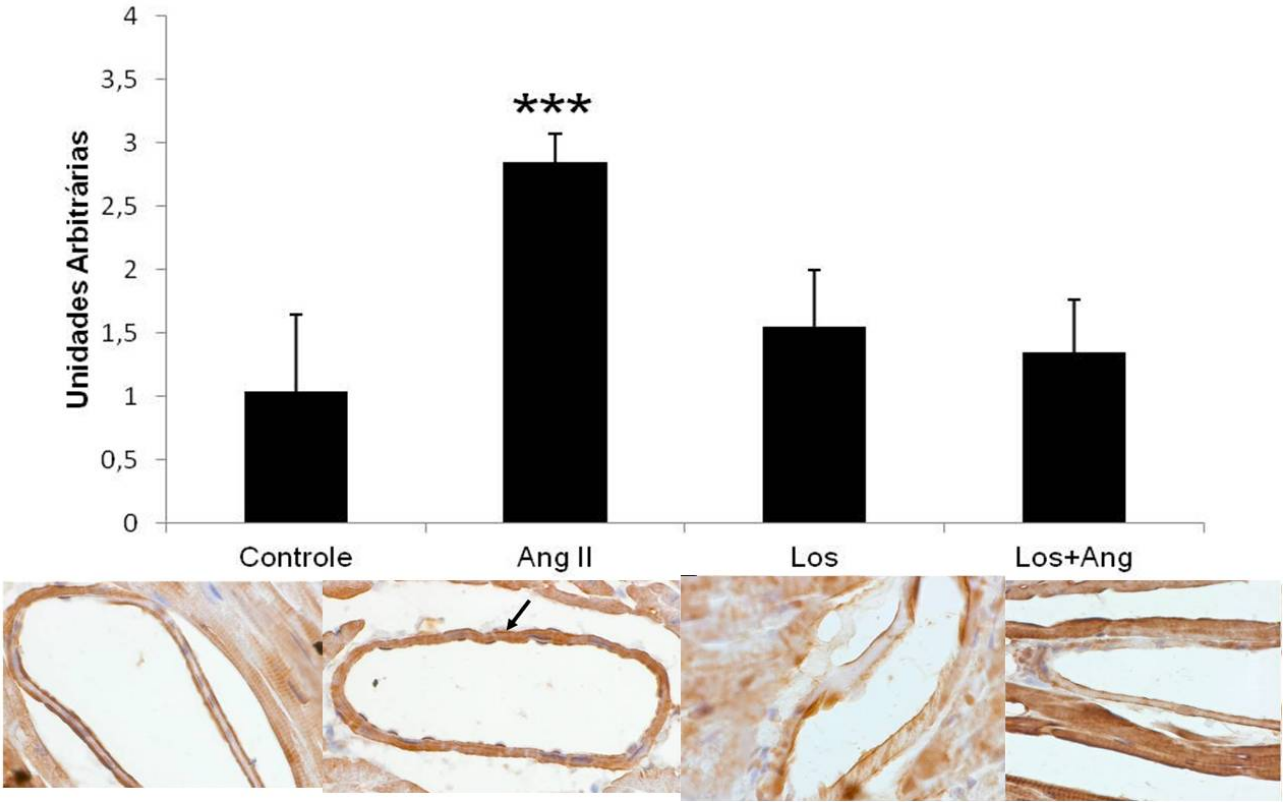
Figura 28- Análise proteica da relação percentual TGFβ/β-tubulina comparando grupos controle, Ang II, los e los+Ang II, no tempo de tratamento 10 dias (n= 5/tratamento). * p≤0,05 comparado ao controle.



Ao avaliar a imunomarcação para TGFβ, de forma semelhante ao obtido pelo método de western blotting, verificou-se que existe marcação positiva nas artérias cardíacas tratados com Ang II nos tempos de 30 minutos e 10 dias, isso quando comparado ao controle e demais grupos.

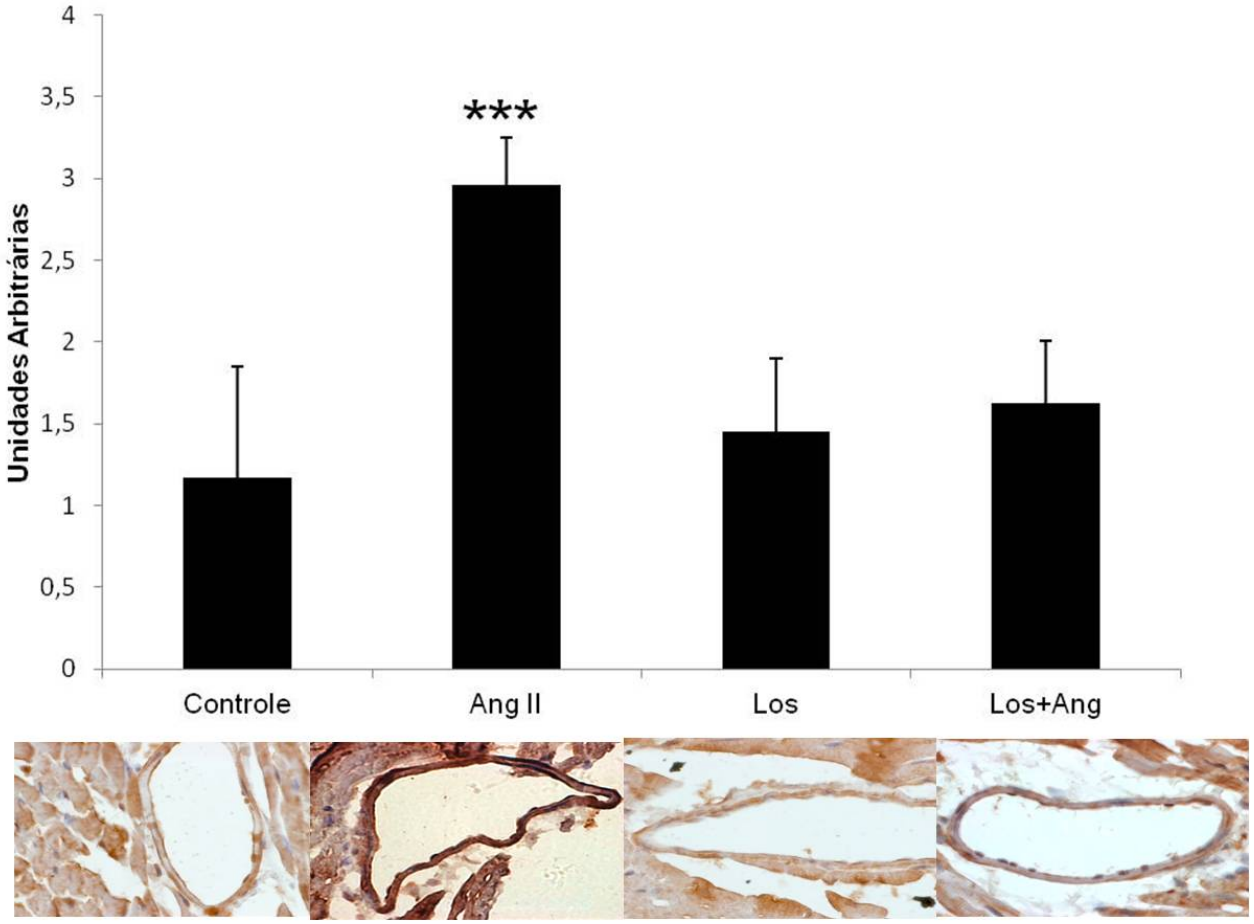
Ao considerar os valores de escore de marcação, verificamos que os animais tratados com Ang II após 30 minutos já apresentam imunomarcação positiva, enquanto por outro lado, os animais que receberam losartan não apresentaram alteração na imunomarcação (se comparados aos do grupo controle). Além disso, o tratamento concomitante mostrou que os animais que receberam losartan também tiveram escores semelhantes ao grupo controle, como podemos observar na figura 29.

Figura 29 – Valores médios dos escores de imunomarcação para TGFβ em artérias cardíacas dos animais tratados após 30 minutos. *** p≤ 0,001 comparado aos demais tratamentos (n=6). (Aumento: 1000X)



A figura 30 apresenta a análise dos animais tratados por 10 dias, mostrando um padrão bastante semelhante ao que ocorre em 30 minutos, onde a Ang II aumenta a imunomarcação; já o losartan isolado e de forma concomitante não apresentaram alteração na imunomarcação, se comparados ao grupo controle.

Figura 30 – Valores médios dos escores de imunomarcação para TGFβ em artérias cardíacas dos animais tratados após 10 dias. *** p≤ 0,001 comparado aos demais tratamentos (n=5). (Aumento: 1000X)



A partir dos resultados observados para TGFβ, analisamos também a imunomarcação para plasminogênio/plasmina, e observamos no grupo AngII um aumento quando comparado aos demais grupos, tanto no curto período de 30 minutos, como no grupo tratado por 10 dias (figuras 31 e 32, respectivamente). Novamente, após o tratamento com losartan e na associação Ang+los, os valores se apresentam semelhantes aos do grupo controle.

Figura 31 – Valores médios dos escores de imunomarcação para plasminogênio/plasmina nas artérias cardíacas dos grupos tratados de 30 minutos; ***p≤0,002 comparado aos demais tratamentos (n=4).(Aumento: 1000X)

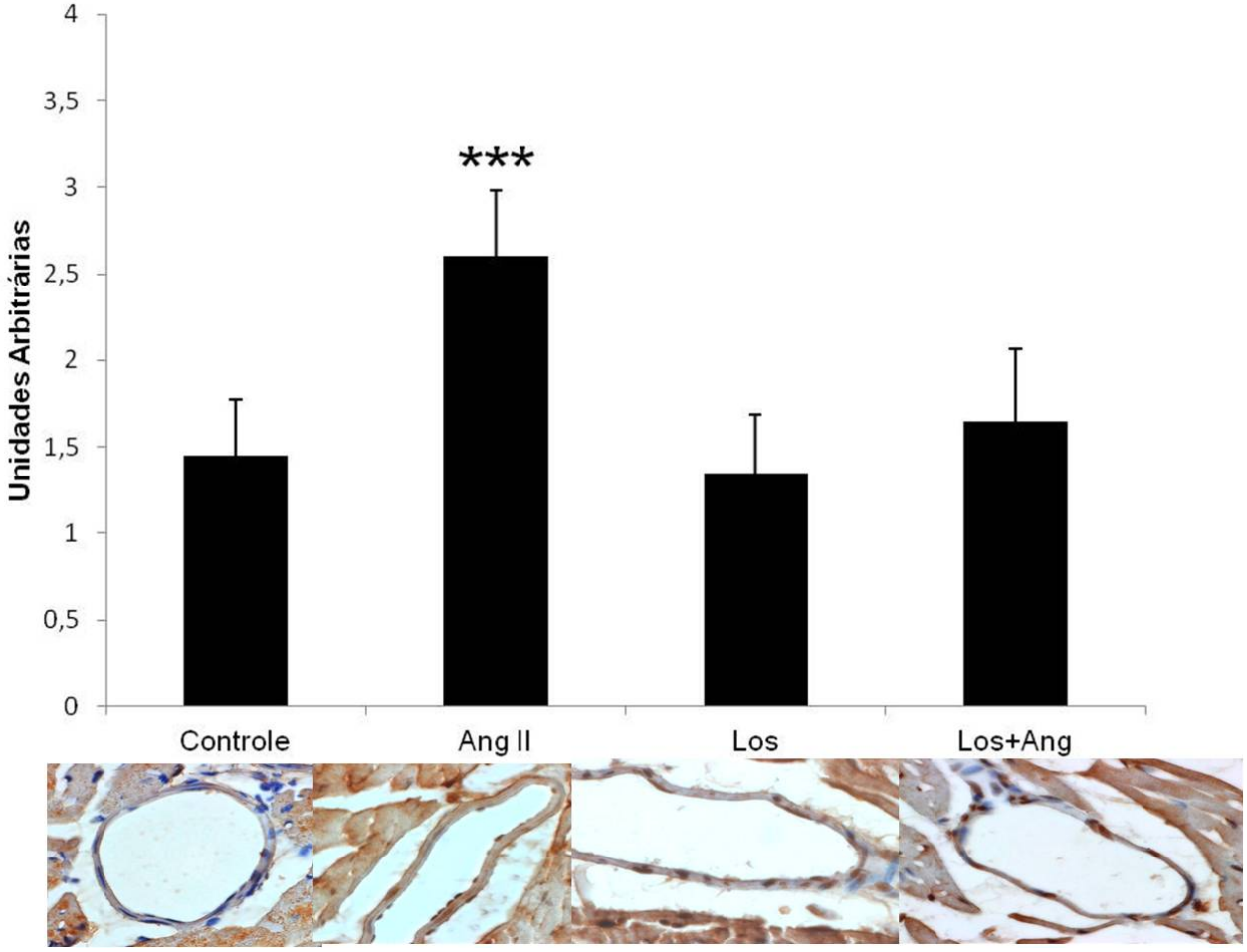
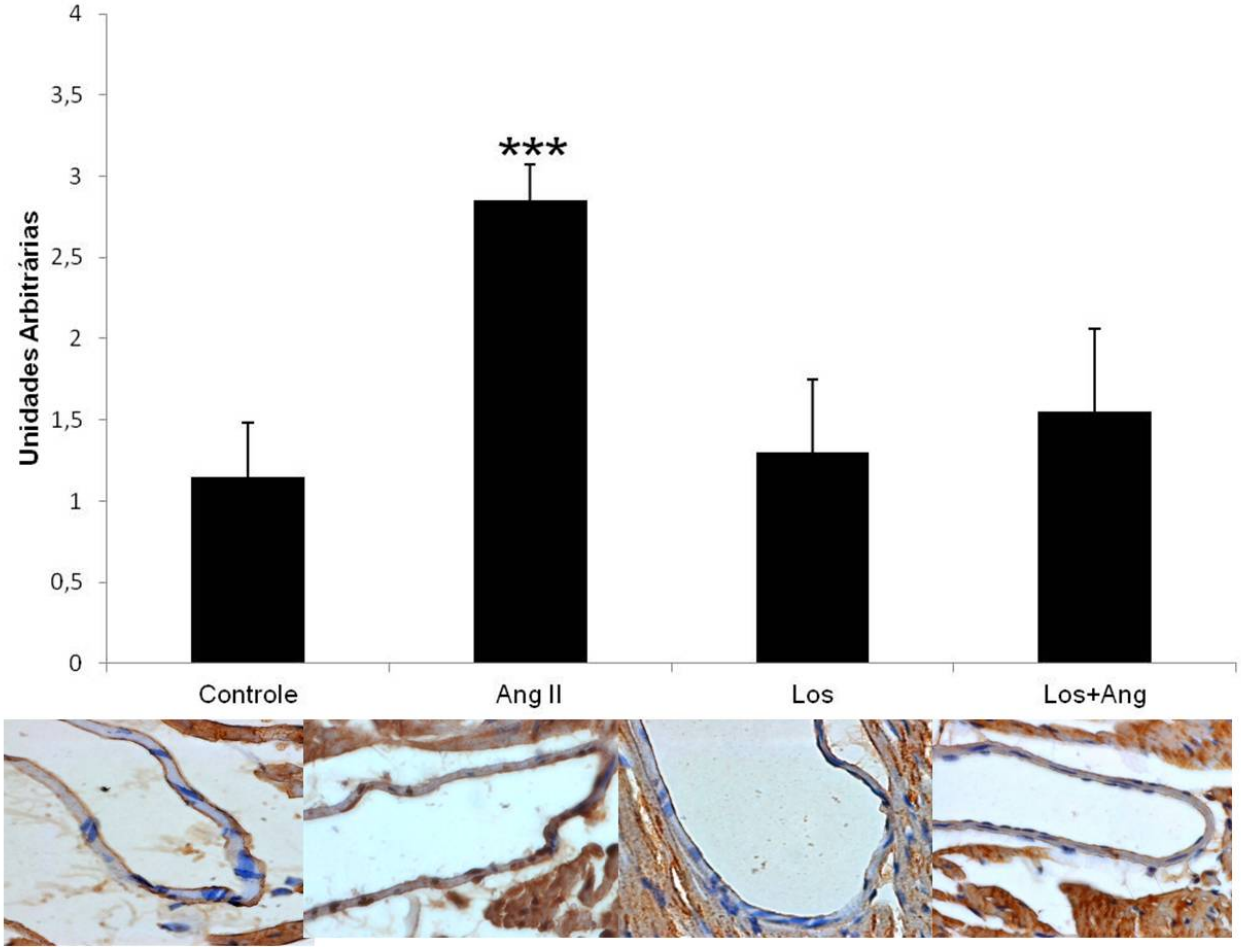


Figura 32 – Valores médios dos escores de imunomarcação para plasminogênio/plasmina nas artérias cardíacas dos grupos tratados por 10 dias; *** p≤0,001 comparado aos demais tratamentos (n=4). (Aumento: 1000X)



É interessante observar que na avaliação da imunomarcação para PAI-1 em ambos tempos experimentais de 30 minutos e 10 dias, não houve alteração para qualquer tratamento realizado (figuras 33 e 34, respectivamente).

Figura 33 – Valores médios dos escores de imunomarcação para PAI-1 nas artérias cardíacas dos grupos tratados de 30 minutos. Não houve alteração significativa quando comparado os tratamentos (n=4). (Aumento: 1000X)

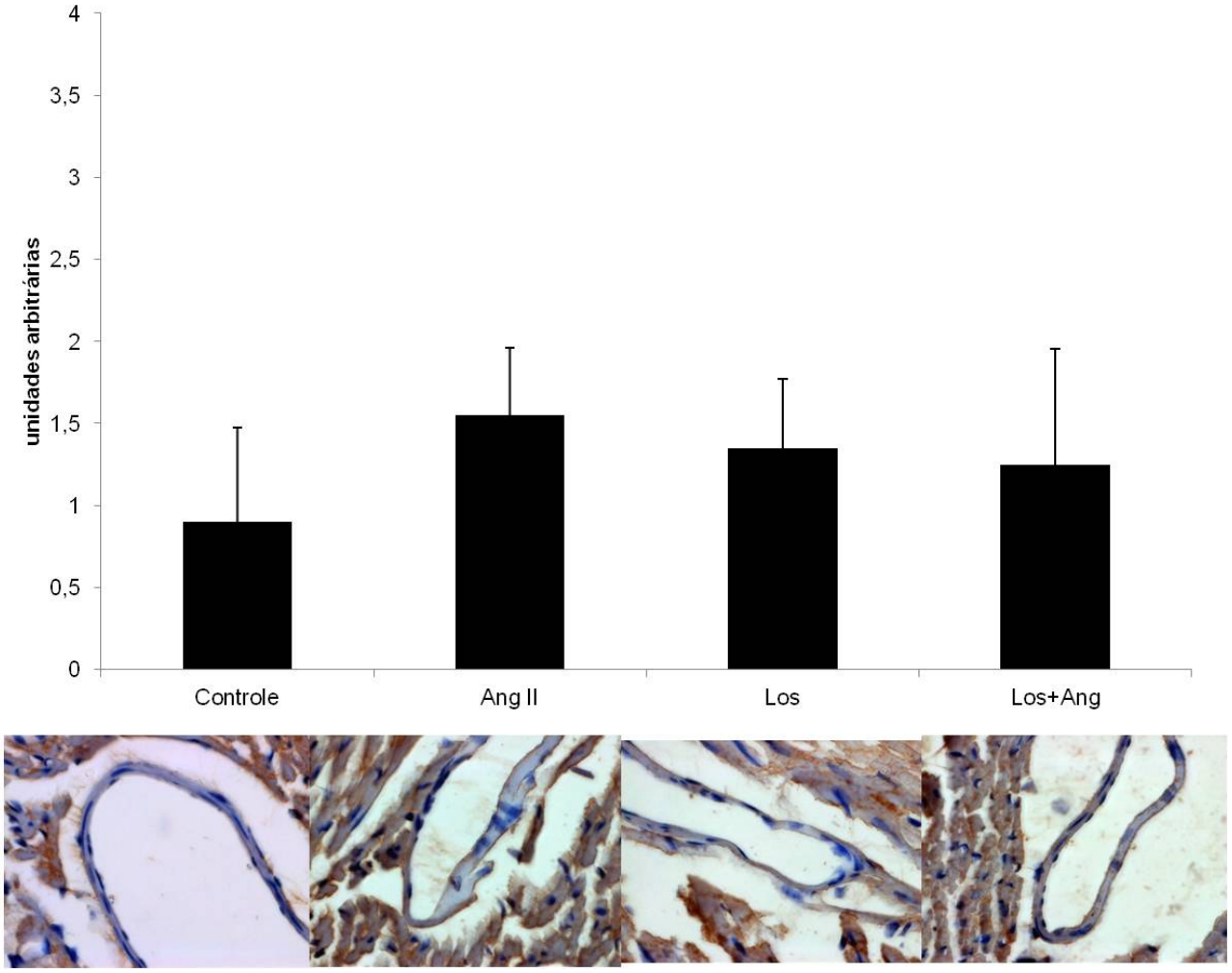
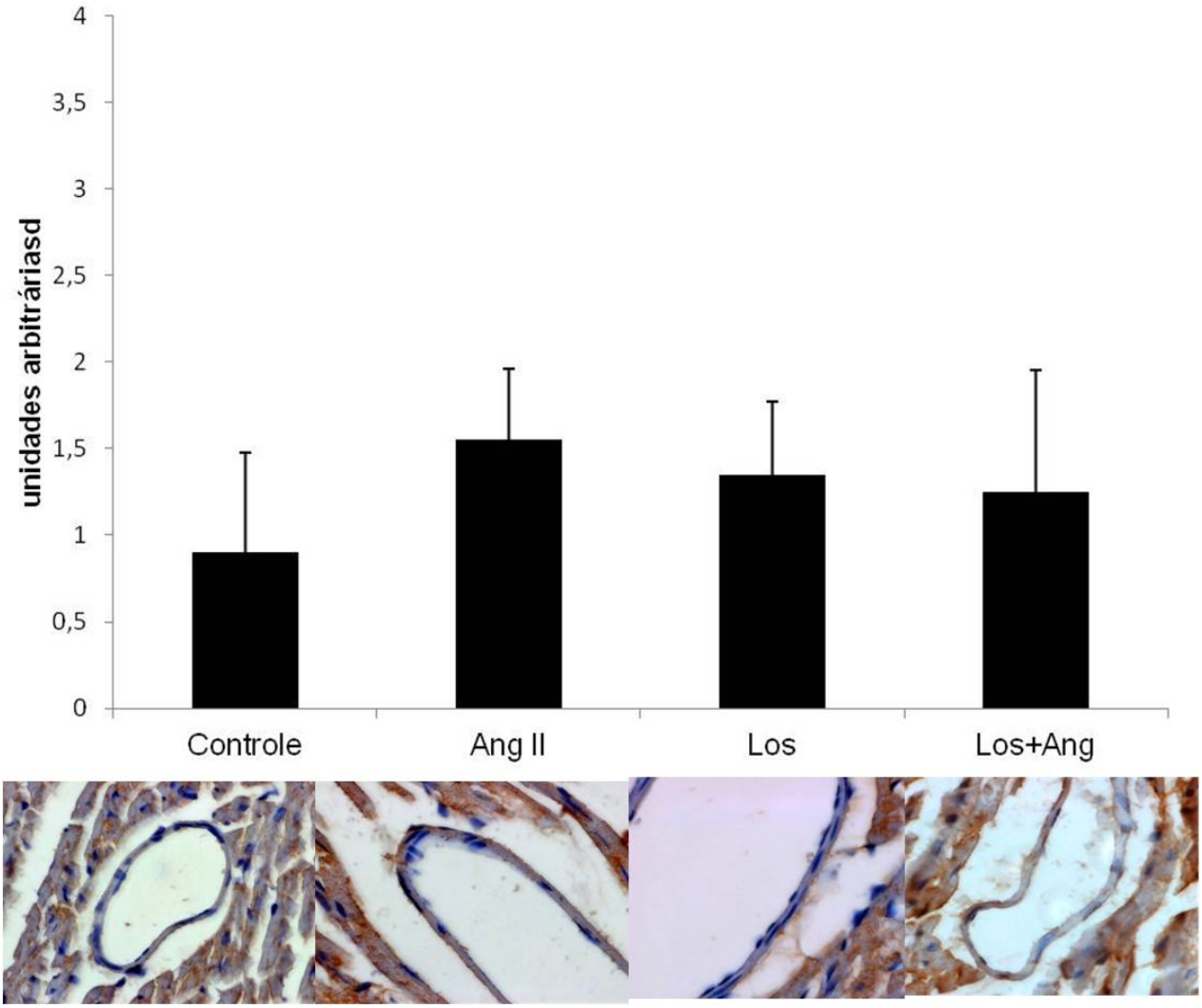


Figura 34 – Valores médios dos escores de imunomarcação para PAI-1 nas artérias cardíacas dos grupos tratados por 10 dias. Não houve alteração significativa quando comparado os tratamentos (n=4). (Aumento: 1000X)



7 DISCUSSÃO

7.1 Achados hemodinâmicos

A partir dos dados obtidos pode-se constatar que os tratamentos com Ang II na dose de 30 ng/kg em camundongos não levam a alteração de forma significativa na pressão arterial ou na frequência cardíaca. Como era esperado para o tratamento com uma dose subpressora, não foram verificadas alterações tanto na PAD, PAM e PAS como na FC (Figura 7), até mesmo em períodos precoces (como 10 e 30 minutos após a injeção). Também foi possível observar que não houve alterações de pressão arterial ou na frequência cardíaca dos animais que receberam losartan 20 mg/kg. Estes achados sugerem que não há efeito hemodinâmico sistêmico com as doses usadas de Ang II e losartan e, portanto, as alterações verificadas apontam a um efeito não hemodinâmico da Ang II. Esses estão de acordo com avaliações anteriores feitas em nosso laboratório, onde se verificou que estas doses de Ang II e losartan que não apresentam efeitos hemodinâmicos são capazes ter ação importante sobre a parede arterial em processos de lesão vascular (LACCHINI et al., 2009). Ainda, o fato da pressão arterial ter-se mantido dentro de valores semelhantes ao grupo controle pode ter sido determinante para não termos verificado aumentos significantes de peso cardíaco relativo.

7.2 Achados morfométricos

Quando se verificou a influência dos tratamentos em relação à análise biométrica em estudo anterior feito em nosso laboratório, observou-se que os tratamentos não alteram nem o peso corporal e nem os pesos relativos dos rins e pulmões (SOUZA, 2010).

Os resultados obtidos no presente estudo corroboram essas observações e indicam o possível aumento do peso do coração, em relação ao peso corpóreo do grupo que recebeu Ang II por 10 dias. Este achado poderia ser devido a edema tecidual ou uma resposta hipertrófica cardíaca independente da pressão arterial, visto que a hipertrofia cardíaca é bem descrita em animais que recebem Ang II e apresentam aumento algo apontado por (CROWLEY et al., 2006). Porém, um fator que deve ser levado em consideração e que estes estudos avaliam doses de Ang II que induzem

hipertensão, desta maneira não é possível distinguir o efeito *per se* da Ang II do efeito da hipertensão. Sabe-se que a Ang II é capaz de promover a hipertrofia de cardiomiócitos, além de estimular a proliferação de fibroblastos e a expressão de proteínas da MEC via AT1, como já foi observado em estudos anteriores (BUJAK, 2007). Embora não tenhamos observado aumento no diâmetro dos cardiomiócitos nos grupos tratados com angiotensina II, é possível que um aumento neste diâmetro não significativo já se repercuta no peso tecidual. Um outro ponto importante está na redução observada do diâmetro dos cardiomiócitos dos grupos tratados com losartan (los e los+ang) por 10 dias, visto que esses resultados também reforçam a ideia de que a angiotensina II tem papel sobre a massa cardíaca, onde o antagonismo do receptor AT1 apresenta efeito oposto (de redução do peso relativo cardíaco).

Quando se avaliou a morfometria das artérias cardíacas, verificou-se que parece haver uma resposta aguda aos tratamentos e uma resposta mais tardia, após 10 dias de tratamento. Assim sendo, pode-se observar que tanto a Ang II como o tratamento combinado com losartan parecem induzir uma resposta rápida em 30 minutos, levando ao aumento da área da parede do vaso, enquanto que o losartan parece diminuir essa área. Não se pode pensar que em 30 minutos ocorra um processo relacionado à proliferação ou crescimento celular e nem em deposição de matriz extracelular. Porém, pode-se pensar que a angiotensina II aplicada tenha sido suficiente para induzir um extravasamento de líquido para a matriz extracelular. De fato, há estudos mostrando que a Ang II, agindo sobre seu receptor AT1 é capaz de aumentar a permeabilidade, levando a um extravasamento vascular (NEWTON, 2004). Nesse contexto, estudo mais recente mostrou que a Ang II também é capaz de induzir a permeabilidade microvascular cerebral (ZHANG et al., 2010). Embora as nossas observações tenham sido feitas em um tempo muito breve, é possível que mecanismos similares aos observados na literatura estejam ocorrendo. Além disso, a observação do mesmo efeito no grupo que recebeu losartan pode ser devida ao fato da dose não ser efetiva para inibir este fenômeno, visto que em períodos mais prolongados de estudo (após 1 e 3 dias) esses efeitos devem ser contrabalançados por outros mecanismos que estabilizam tanto a pressão intersticial como a permeabilidade. Apesar desta possibilidade não tenha sido testada no presente estudo, as informações da literatura nos permitem inferir a existência deste processo, que pode vir a ser testado em estudos subsequentes.

Já após 10 dias de tratamento, observamos novamente um aumento de área de parede vascular associado à Ang II, onde é possível pensar que esse aumento seja devido a uma alteração na matriz extracelular ou até mesmo no número ou tamanho de células da parede vascular. A hipertrofia vascular induzida pela Ang II é bem descrita na literatura, tanto em estudos *in vivo* (KUANG et al., 2013) como em estudos *in vitro* (GENG et al., 2009; ZHAO et al., 2009). Dessa forma, pode-se pensar em um efeito direto da Ang II sobre a parede vascular, levando à hipertrofia, mesmo sem alteração da pressão arterial. Além disso, em estudo anterior desenvolvida em nosso laboratório (VIEGAS, 2012), se observou que a Ang II em dose subpressora leva ao aumenta da deposição de diferentes elementos da MEC como colágeno total, colágeno IV, colágeno VII em alterações cardíacas após 14 dias. Desta forma, pode-se entender que a Ang II, mesmo em doses subpressoras, pode levar ao aumento da área das artérias cardíacas tanto por proliferação de células musculares lisas vasculares (CMLV) como por deposição de elementos da MEC.

Quando se observa o efeito do losartan sobre a área da parede vascular, verifica-se uma redução nesta em 30 minutos. Contudo, a matriz extracelular não se altera de forma tão rápida, e pode-se então pensar no efeito inverso, onde possivelmente haveria uma redução de fluidos na matriz extracelular vascular, reduzindo a área da parede vascular. Neste sentido, a variação da porcentagem de colágeno observada em 30 minutos no grupo que recebeu losartan pode ser devida à redução da área da parede vascular mais do que a um aumento real de fibras de colágeno. Já no tratamento por 10 dias com Ang II, verificou-se um aumento da porcentagem de colágeno na parede do vaso, o que acompanha o aumento de área do vaso, sugerindo, neste caso, que a Ang II levaria à deposição de colágeno vascular. Estudo realizado em camundongos com hipertrofia de aorta mostrou que o losartan, agindo sobre o receptor AT1, é capaz de reduzir a área da parede vascular, evidenciando um efeito direto da angiotensina sobre as células vasculares e a deposição de matriz extracelular (KUANG et al., 2013).

7.3 Ação da Ang II subpressora sobre a liberação de IL-6

Como já comentado, em trabalho anterior (SOUZA, 2010) notou-se a relação direta entre o conteúdo de Ang II e a IL-6 sérica e local, o que levou à proposta deste presente trabalho. Utilizamos a mesma metodologia aplicada anteriormente e vimos que este aumento de IL-6 se manteve, ou seja, a administração em doses supressoras da Ang II em diferentes períodos levou ao aumento dos níveis de IL-6, tanto em curto período de exposição (30 minutos) quanto em períodos mais longos de exposição à Ang II (animais tratados por 10 dias consecutivos). Isso foi detectado pelos experimentos de *Western Blotting* (figuras 13 e 14). Esta observação corrobora a de outros estudos, tanto em modelos de células isoladas (GELINAS, 2011) como com pacientes com instabilidade coronariana (SOUZA, 2008).

Ainda, contando com os resultados obtidos pelas observações teciduais (pela técnica de imunohistoquímica, figuras 21 e 22) vimos que este processo tem participação parcial do receptor AT1, uma vez que a administração de seu bloqueador não aboliu totalmente a ação da Ang II em liberar a IL-6, fato que aponta para uma possível participação de outras vias celulares participantes neste processo, algo que não é encontrado na literatura. A compreensão dos mecanismos envolvidos com este bloqueio parcial necessita de outros estudos, eventualmente com cultura de células ou mesmo realizados em animais, em tempo agudos.

Somando-se a esta última observação, vale considerar que conforme o decorrer do tempo com o tratamento do bloqueador, esta inibição é mais efetiva em impedir a ação da Ang II em liberar a IL-6, algo visto na literatura, tanto em modelos animais (OKAWADA, 2011) como demonstrado em estudos com humanos (OGINO, 2010).

7.4 Ação da Ang II subpressora sobre a Presença de TGFβ, PAI-1 e Plasminogênio/Plasmina

O TGFβ é secretado em sua forma latente onde se encontra ligado a um pró-peptídeo (LAP). Em muitas células, entre elas as células musculares lisas, o TGFβ + LAP é secretado juntamente com a LTBP como um "*grande complexo latente"* que permanece na matriz extracelular ligado à outras proteínas como a fibronectina. O TGFβ + LAP também pode interagir diretamente com proteoglicanos, como o decorin e biglican (KOLI et al., 2001).

O TGFβ tem importante função no controle do balanço proteolítico celular e na regulação da síntese de componentes da matriz extracelular. Ele estimula a síntese de fibronectina, colágenos, proteoglicanos e impede a degradação de componentes da matriz extracelular diminuindo a expressão dos ativadores do plasminogênio e das próprias proteases parietais (colagenases, estromelisinas) ou mesmo induzindo a síntese de inibidores dos ativadores do plasminogênio (PAI) e inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs). A LTBP e/ou pequenos proteoglicanos como decorin e biglican participam da ativação do TGFβ na matriz extracelular. A LTBP por sua vez possui domínios capazes de interagir com outras moléculas da matriz extracelular como a fibrilina e a fibronectina. A LTBP seria a molécula responsável pela ligação do "*grande complexo latente"* à matriz extracelular e consequentemente mantendo o TGFβ em seu estado latente. Logo, a ativação do TGFβ seria resultado da perda de sua ligação com a matriz extracelular (Saharinen et al., 1999). Após se liberar dos elementos da matriz extracelular o TGFβ se liga ao seus receptores (TGF-βRII/TGF-βRI) na superfície celular, conduzindo à fosforilação de proteínas intracelulares conhecidas como SMADS. Uma vez fosforiladas, as SMADs2/3 se ligam a SMAD4 e formam um complexo protéico que se transloca até o núcleo, desencadeando a expressão gênica.

A plasmina responde como principal via de ativação das pró-metaloproteinases teciduais. A ativação do plasminogênio em plasmina pode-se dar pericelularmente via u-PA, ligado à membrana celular por meio de seu receptor (u-PAR) ou na matriz extracelular via t-PA. Entretanto, a ação do t-PA somente é possível se este estiver fixado à matriz extracelular, sobretudo à fibrina (MEILHAC et al., 2003). Nossos resultados demonstraram um aumento significativo da presença de plasminogênio/plasmina na parede vascular dos animais tratados com AngII, apos 30

minutos e 10 dias após a sua administração. Cabe aqui ressaltar que o anticorpo reconhece tanto a forma ativa como a forma inativa dessa molécula, tornando assim difícil afirmar sua ação. É possível que a Ang II promova um aumento na permeabilidade vascular permitindo uma maior difusão do plasminogênio sérico para dentro da parede. Faz-se necessário uma avaliação da expressão e presença dos seus ativadores, o que nos permitiria afirmar com maior segurança a presença da forma ativa ou inativa desta protease.

Em estudo anterior, ao avaliarmos o efeito agudo da angiotensina II sobre marcadores inflamatórios em camundongos, considerou-se que o aumento de TGFβ pôde ocorrer de forma rápida e transitória em resposta à Ang II, sendo este processo não dependente da transcrição gênica e síntese proteica, mas possivelmente devido à liberação desta proteína já sintetizada e armazenada na MEC (SOUZA, 2010).

No presente estudo, ao avaliarmos a expressão proteica de TGFβ no tecido cardíaco, verificamos um aumento após 30 minutos e 1, 3 e 10 dias de tratamento com Ang II, este aumento foi verificado tanto pela avaliação de western blotting como por imunohistoquímica. A partir destes dados e com as informações vigentes na literatura, pode-se levantar a hipótese de que a Ang II influencia não apenas a liberação de TGFβ já sintetizado e ancorado na MEC como também a produção de TGFβ, a partir da transcrição gênica e síntese proteica.

Com relação ao mecanismo de liberação, uma via molecular possivelmente recrutada a se considerar a de que a plasmina seja um importante fator de liberação do TGFβ latente (KHALIL et al., 1996) e que a Ang II age sobre o balanço fibrinolítico vascular (NAKAMURA et al., 2000). Assim, pode-se postular que a forma pela qual a Ang II leva à rápida liberação de TGFβ se daria pela sua ação sobre a via fibrinolítica.

Ainda que incerto, dentro deste contexto, pequenas flutuações na concentração de Ang II poderiam provocar alterações na estrutura cardiovascular, interferindo na estrutura da MEC vascular, além de estimular possíveis respostas inflamatórias, via liberação de TGFβ (WANG et al., 2010). Nos resultados obtidos no grupo que recebeu concomitantemente angiotensina II e losartan, se verifica que o antagonismo do receptor AT1 abole o aumento de TGFβ, o que reforça esta ideia da ação da Ang II.

Embora o presente estudo tenha demostrado um aumento da presença do TGFβ na parede vascular dos animais tratados com Ang II, 30 minutos e 10 dias após administração, é bem provável que sua via não esteja totalmente ativada. Esta hipótese é reforçada tendo em vista que um dos genes alvo da via do TGFβ é o PAI-1 e este

não apresentou aumento expressivo. Cabe ressaltar que, o SRA compartilha da mesma via de sinalização intracelular das SMADs e portanto sendo capaz de desencadear eventos intracelulares dependentes ou independentes do TGFβ.

8 CONCLUSÕES

A partir dos achados obtidos neste estudo, pode-se concluir que a exposição intermitente à Ang II em doses de 30 ng/kg em camundongos:

1) Não altera nem valores de pressão arterial e nem de frequência cardíaca, indicando que as oscilações observadas das demais variáveis se dão por efeito direto da Ang II e não por variações da pressão arterial.
2) Promove alterações vasculares transitórias compatíveis com aumento de permeabilidade, e alterações crônicas e levando área de parede vascular e deposição de colágeno.
3) Leva a liberação tanto precoce como crônica de IL-6.
4) Promove aumento tanto agudo de TGFβ, possivelmente promovido pela ação proteolítica da plasmina, como crônico de TGFβ, possivelmente promovido por aumento da expressão gênica.

REFERÊNCIAS*

ANNES, J. P.; MUNGER, J. S.; RIFKIN, D. B. Making sense of latent TGFbeta activation. **J. Cell. Sci.**, v. 116, p. 217-224, 2003.

ARIMA, S.; ITO, S. New insights into actions of the renin-angiotensin system in the kidney: concentrating on the Ang II receptors and the newly described Ang-(1-7) and its receptor. **Semin. Nephrol**., v. 21, n. 6, p. 535-543, 2001.

BENKE, K.; AGG, B.; SZILVESZTER, B.; TARR, F.; NAGY, Z. B.; POLOS, M.; DAROCZI, L.; MERKELY, B.; SZABOLCS, Z. The role of transforming growth factor-beta in Marfan syndrome. **Cardiol. J.**, v. 20, n. 3, p. 227-234, 2013.

BONETTI, M. I. Microfibrils: a cornerstone of extracellular matrix and a key to understand Marfan syndrome. **Ital. J. Anat. Embryol.**, v. 114, n. 4, p. 201-224, Oct-Dec 2009.

BONETTI, P. O.; LERMAN, L. O.; LERMAN, A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.,** v. 23, n. 2, p. 168-175, Feb 2003.

BORGES, L. F.; GUTIERREZ, P. S.; MARANA, H. R. C.; TABOGA, S. R. Picrossírius-polarization staining method as an efficient histopathological tool for collagenolysis detection in vesical prolapse lesions. **Micron**, v. 38, p. 580-583, 2007.

BOSMAN, F. T.; STAMENKOVIC, I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. **J. Pathol.,** v. 200, n. 4, p. 423-428, Jul 2003.

BUJAK, M.; FRANGOGIANNIS, N. G. The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. **Cardiovasc. Res.,** v. 74, n. 2, p. 184-195, May 2007.

CAMPBELL, D. J. Circulating and tissue angiotensin systems. **J. Clin. Invest.,** v. 79, n. 1, p. 1-6, Jan 1987.

CAMPBELL, D. J.; SOMARATNE, J. B.; JENKINS, A. J.; YII, M.; KENNY, J. F.; NEWCOMB, A. E.; SCHALKWIJK, C. G.; BLACK, M. J.; KELLY, D. J. Impact of type 2 diabetes and the metabolic syndrome on myocardial structure and microvasculature of men with coronary artery disease. **Cardiovasc. Diabetol.,** v. 10, p. 80, 2011.

CAPETTINIA, L. S. A.; MONTECUCCOB, F.; MACHB, F.; STERGIOPULOSA, N.; SANTOS, R. A. S.; SILVA, R. F. Role of renin-angiotensin system in inflammation, immunity and aging. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, p. 963-970, 2012

---

* De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CARVALHO, M. H.; SCIVOLETTO, R.; FORTES, Z. B.; NIGRO, D.; CORDELLINI, S. Reactivity of aorta and mesenteric microvessels to drugs in spontaneously hypertensive rats: role of the endothelium. **J. Hypertens.,** v. 5, n. 3, p. 377-382, Jun 1987.

CAT, A. N. D.; TOUIZ, R. M. A new look at the renin-angiotensin system- focusing on the vascular system. **Peptides**, v. 32, p. 2141-2150, Set 2011.

CHENG, Z. J.; VAPAATALO, H.; MERVAALA, E. Angiotensin II and vascular inflammation. **Med. Sci. Monit.,** v. 11, n. 6, p. RA194-205, Jun 2005.

CHERRY, P. D. et al. Role of endothelial cells in relaxation of isolated arteries by bradykinin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v. 79, n. 6, p. 2106-10, Mar 1982.

CROWLEY, S. D. et al. Angiotensin II causes hypertension and cardiac hypertrophy through its receptors in the kidney. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v. 103, n. 47, p. 17985-90, Nov 2006.

DAUGHERTY, A.; MANNING, M. W.; CASSIS, L. A. Antagonism of AT2 receptors augments Angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysms and atherosclerosis. **British Journal of Pharmacology,** v. 134, p. 865-870, 2001.

DE GRAAF, J. C. et al. Nitric oxide functions as an inhibitor of platelet adhesion under flow conditions. **Circulation,** v. 85, n. 6, p. 2284-2290, Jun 1992.

DINH, Q. N.; DRUMMOND, G. R.; SOBEY, C. G.; CRISSOBOLIS, S. Roles of inflammation, oxidative stress, and vascular dysfunction in hypertension. **Biomed. Res. Int.**, p. 1-11, 2014.

DZAU, V. J.; KRIEGER, J. E.; HUTCHINSON, H. G. Molecular mechanisms of hypertension. In: HABER, E. (Ed.) **Molecular Cardiovascular Medicine.** New York: Scientific American Inc., 1995. Chap.15. p. 225-442.

ELLIS, A.; TRIGGLE, C. R. Endothelium-derived reactive oxygen species: their relationship to endothelium-dependent hyperpolarization and vascular tone. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 81, p. 1013–1028, 2003.

ERDOS, E. G. Angiotensin I converting enzyme and the changes in our concepts through the years. Lewis K. Dahl memorial lecture. **Hypertension,** v. 16, n. 4, p. 363-70, Oct 1990.

GAUTHIER, T. W. et al. Nitric oxide protects against leukocyte-endothelium interactions in the early stages of hypercholesterolemia. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.,** v. 15, n. 10, p. 1652-1659, Oct 1995.

GELINAS, L.; FLAKERNHAM, A.; OXNER, A. Highly purified human peripheral blood monocytes produce IL-6 but not TNF-alfa in response to angiotensin II. **Jraas**, v. 12, p. 295-303, 2011.

GENG, J. et al. Hypertrophic response to angiotensin II is mediated by protein kinase D-extracellular signal-regulated kinase 5 pathway in human aortic smooth muscle cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.,** v. 388, n. 3, p. 517-522, Oct 23 2009.

GERRITY, G.; CLIFF, W. J. The aortic tunica intima in young and aging rats. **Exp. Mol. Pathol.,** v. 16, n. 3, p. 382-402, Jun 1972.

GIBBONS, G. H.; DZAU, V. J. The emerging concept of vascular remodeling. **N. Engl. J. Med.,** v. 330, n. 20, p. 1431-1438, May 1994.

GIBBONS, G. H.; PRATT, R. E.; DZAU, V. J. Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs. hyperplasia. Autocrine transforming growth factor-beta 1 expression determines growth response to angiotensin II. **J. Clin. Invest.,** v. 90, n. 2, p. 456-461, Aug 1992.

GIMBRONE, M. A. Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis. **Am. J. Pathol.,** v. 155, n. 1, p. 1-5, Jul 1999.

GIMBRONE, M. A.; NAGEL, T.; TOPPER, J. N. Biomechanical activation: an emerging paradigm in endothelial adhesion biology. **J. Clin. Invest.,** v. 99, n. 8, p. 1809-1813, Apr 1997.

GRANDE, M. T.; PÉREZ-BARRIOCANAL, F.; LÓPEZ-NOVOA, J. M. Role of inflammation in túbulo-interstitial damage associated to obstructive nephropathy. **J. Inflam**., v. 7, p. 19-32, 2010.

GOLDIN, A. et al. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. **Circulation,** v. 114, n. 6, p. 597-605, Aug 2006.

FERRARIO, C. M.; STRAWN, W. B. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system and proinflammatory mediators in cardiovascular disease. **Am. J. Cardiol.,** v. 98, p. 121–128, 2006.

FORD, C. M.; SHAOHUA, L.; PICKERING, J. G. Angiotensin II stimulates collagen synthesis in human vascular smooth muscle cells. Involvement of the AT1 receptor, transforming growth factor-*b*, and tyrosine phosphorylation. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.,** v. 19, p. 1843-1851, 1999

HORIUCHI, M. et al. Stimulation of different subtypes of angiotensin II receptors, AT1 and AT2 receptors, regulates STAT activation by negative CROSStalk. **Circ. Res.,** v. 84, p. 876-882, 1999.

HOOPER, N. M. Angiotensin converting enzyme: implications from molecular biology for its physiological functions. **Int. J. Biochem.,** v. 23, n. 7-8, p. 641-647, 1991.

HUBY, A.; RASTALDI, M. P.; CARON, K.; SMITHIES, O.; DUSSAULE, J. Restoration of Podocyte Structure and Improvement of Chronic Renal Disease in Transgenic Mice Overexpressing Renin. **PLoS One**, v. 4, n. 8, p. e 6721, 2009.

HUTCHINSON, H. G.; HEIN, L.; FUJINAGA, M.; PRATT, R. E. Modulation of vascular development and injury by angiotensin II. **Cardiovasc. Res.,** v. 41, p. 689-700, 1999.

IRIGOYEN, M. C. et al. **Tratado de cardiologia SOCESP**. São Paulo: Manole, 2005.

KEIDAR, S.; ATTIAS, J.; HEINRICH, R.; COLEMAN, R.; AVIRAM, M. Angiotensin II atherogenicity in apolipoprotein E deficient mice is associated with increased cellular cholesterol biosynthesis. **Atherosclerosis,** v. 146, p. 249–257, 1999.

KHALIL, N. et al. Plasmin regulates the activation of cell-associated latent TGF-beta 1 secreted by rat alveolar macrophages after in vivo bleomycin injury. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.,** v. 15, n. 2, p. 252-259, Aug 1996.

KIERSZENBAUM, A. L.; TRES, L. L. **Histologia e biologia celular**: uma introdução à patologia. In: LTDA, E. E. (Ed.). 3. ed. 2012. cap. 12. p. 367-381.

KOBAYASHI, H.; TAKEI, Y. **The renin-angiotensin system**: comparative aspects. Berlin: Spring-Verlag, 1996.

KOLI, K. ; SAHARINEN, J. ; HYYTIÄINEN, M. ; PENTTINEN, C.; KESKI-OJA, J. Latency, activation, and binding proteins of TGF-beta. **Microsc. Res. Tech.,** v. 15, n. 4, p. 354-362, 2001.

KUANG, S. Q. et al. Aortic remodeling after transverse aortic constriction in mice is attenuated with AT1 receptor blockade. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.,** v. 33, n. 9, p. 2172-2179, Sep 2013.

LACCHINI, S.; IRIGOYEN, M. C. Estrutura e função do sistema cardiovascular. In: AYRES, M. M. (Ed.). **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. 2007.

LACCHINI, S. et al. Cuff-induced vascular intima thickening is influenced by titration of the Ace gene in mice. **Physiol. Genomics,** v. 37, n. 3, p. 225-230, May 2009.

LACCHINI, S. Óxido nítrico: perspectivas clínicas na função endotelial. **Rev. Soc. Cardiol. Rio Gd. Sul**, p. 1-4, 2004.

LAURITZEN, H. P. et al. Contraction and AICAR Stimulate IL-6 vesicle depletion from skeletal muscle fibers in vivo. **Diabetes**, Jun 2013.

LERMAN, A.; BURNETT, J. C. Intact and altered endothelium in regulation of vasomotion. **Circulation,** v. 86, n. 6, p. III12-19, Dec 1992. Suppl.

LIBBY, P.; THEROUX, P. Pathophysiology of coronary artery disease. **Circulation.** v. 111, p. 3481-3488, 2005.

LÜSCHER, T. F.; NOLL, G. The endothelium as a regulator of vascular tone and growth. In: LÜSCHER, T. F. (Ed.). **The endothelium in cardiovascular disease**. Berlin: Springer-Verlag, 1995. p. 1-25

MA, T. K. W.; KAM, K. K. H.; YAN, B. P.; LAM, Y. Y. Renin–angiotensin–aldosterone system blockade for cardiovascular diseases: current status. **British Journal of Pharmacology**, v. 160, p.1273–1292, 2010.

MEILHAC, O.; HO-TIN-NOE, B.; HOUARD, X.; PHILIPPE, M.; MICHEL, J. B.; ANGLES-CANO, E. Pericellular plasmin induces smooth muscle cell anoikis. **Faseb J**., v. 17, p. 1301-1303, 2003.

METTOUCHI, A. The role of extracellular matrix in vascular branching morphogenesis. **Cell. Adh. Migr.**, v. 6, p. 528-534, 2012. ISBN 1933-6918 (Print) 1933-6926 (Electronic).

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). **Saúde Brasil 2010:** uma análise da situação de saúde e de evidências. 2011.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, v. 43, n. 2, p.109-142, 1991.

NAFTILAN, A. J. Role of the tissue renin-angiotensin sysntem in vascular remodeling and smooth muscle cell growth. **Curr. Opinion Nephrol. Hypert.**, v. 3, p. 218-227, 1994.

NAKAMURA, S.; NAKAMURA, I.; LIJUN MA; VAUGHAN, D. E.; FOGO, A. B. Plasminogen activator inhibitor-1 expression is regulated by the angiotensin type 1 receptor in vivo1. **Kidney. International**, v. 58, p. 251–259, 2000.

N KHALIL, S.; CORNE, C.; WHITMAN, C.; YACYSHYN. Plasmin regulates the activation of cell-associated latent TGF-beta 1 secreted by rat alveolar macrophages after in vivo bleomycin injury. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol**., v. 15, n. 2, p. 252-259, 1996.

NAVAR, L. G.; HARRISON-BERNARD, L. M.; NISHIYAMA, A.; KOBORI, H. Regulation of intrarenal angiotensin II in hypertension. **Hypertension,** v. 239, p. 316-322, 2000.

NEWTON, C. R.; CURRAN, B.; VICTORINO, G. P. Angiotensin II type 1 receptor activation increases microvascular hydraulic permeability. **Surgery,** v. 136, n. 5, p. 1054-1060, Nov 2004.

OGINO, K.; KATO, M.; FURUSE, Y.; KINUGASA, Y.; MIZUTA, E.; SUGIHARA, S.; ISHIDA, K.; IANAGIHARA, K.; HISATOME, I.; SHIGEMASA, C. Addiiotn os losartan to angiotensin-converting enzyme inhibitors improves insulin resistance in patients with chronic heart failure treated without beta-blockers. **Circulation Journal**, p. 2347-2352, 2010.

OHISHI, M.; UEDA, M.; RAKUGI, H. Relative localization of angiotensina-converting enzyme, chymase and angiotensin II in human coronary atherosclerotic lesions. **J. Hypertens.**, v. 17, p. 547-553, 1999.

OHISHI, M.; UEDA, M.; RAKUGI, H. Enhanced expression of angiotensina-converting enzyme is associated with progression of coronary atherosclerosis in humans. **J. Hypertens.,** v. 15, n. 11, p.1295-1302, 1997.

OLIVEIRA A. F. G. Testes estatísticos para comparação de médias. **Rev. Eletr. Nutritime.** v. 5, n. 6, p. 777-788, 2008.

OKAWADA, M.; KOGA, H.; LARSEN, S. D.; SHOWALTER, H. D.; TURBIAK, A. J.; JIN, X.; LUCAS, P. C.; LIPKA, E.; HILLFINGER, J.; KIM, J. S.; TEITELBAUM, D. H. Use of enterally delivered angiotensin II type 1a receptor antagonists to reduce the severity of colitis. **Dig. Dis. Sci.**, v. 56, p. 2553-2565, 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **World health statistics.** 2013.

PAKALA, R.; BENEDICT, C. R. Endothelial cells regulate the proliferation of monocytes in vitro. **Atherosclerosis,** v. 147, p. 25-32, 1999.

PLENZ, G. A. et al. Vascular collagens: spotlight on the role of type VIII collagen in atherogenesis. **Atherosclerosis,** v. 166, n. 1, p. 1-11, Jan 2003.

PUTNAM, K. et al. The renin-angiotensin system: a target of and contributor to dyslipidemias, altered glucose homeostasis, and hypertension of the metabolic syndrome. Mar, 2012.

ESPINOSA, E.; OEMAR, B. S.; LÜSCHER, T. F. Bimodal effects of angiotensin II on migration of human and rat smooth muscle cells. **Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 17, p. 1251-1257, 1997.

RAKUGI, H. et al. Vascular injury induces angiotensinogen gene expression in the media and neointima. **Circulation,** v. 87, p. 283-290, 1993.

RIBICHINI, F. et al. Angiotensin-converting enzyme tissue activity in the diffuse in-stent restenotic plaque. **Circulation,** v. 101, p. e33-35, 2000.

ROSS, R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. **New. Engl. J. Med.,** v. 340, p. 115-126, 1999.

ROSS, R. Arteriosclerosis: an overview. In: HABER, E. (Ed.). **Molecular cardiovascular medicine.** New York: Scientific American, 1995. Chap. 2. p. 11-30.

RUGGENENTI, P.; CRAVEDI, P.; REMUZZI, G. The RAAS in the pathogenesis and treatment of diabetic nephropathy. **Nature Reviews,** v. 6, p. 319- 330, 2010.

RUIZ-ORTEGA, M. TGF-β signaling in vascular fibrosis. **Cardiol. Res.,** v. 74, p. 196-206, 2007.

RUIZ-ORTEGA, M. et al. Role of the renin-angiotensin system in vascular disease – expanding the field. **Hypertension,** v. 38, p. 1382-1387, 2001.

SAHARINEN, J.; HYYTIÄINEN, M. ; TAIPALE, J.; KESKI-OJA, J. Latent transforming growth factor-beta binding proteins (LTBPs)--structural extracellular matrix proteins for targeting TGF-beta action. **Cytokine Growth Factor Rev.,** v. 10, n. 2, p. 99-117, 1999.

SAKUTA, T. Involvement of the renin–angiotensin system in the development of vascular damage in a rat model of arthritis effect of angiotensin receptor blockers. **Arthritis. Rheum.,** v. 62, p. 1319–1328, 2010.

SANO, M. et al. Interleukin-6 family of cytokines mediate angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in rodent cardiomyocytes. **J. Biol. Chem.,** v. 275, n. 38, p. 29717-29723, Sep, 2000.

SANTORO, D.; CONTI, G. B. G.; PAZZANO, D.; SATTA, E.; COSTANTINO, G.; SAVICA, V. Endothelial Dysfunction in Chronic Renal Failure. **Journal of Renal Nutrition**, Italy, v. 20, n. 5S, p. S103–S108, 2010.

SATA, M.; FUKUDA, D. Crucial role of rennin-angiotensin system in the pathogenesis of atherosclerosis. **J. Med. Inverstig.,** v. 57, p. 12-25, 2010.

SCHIEFFER, B. et al. Role of NAD(P)H oxidase in angiotensin II-induced JAK/STAT signaling and cytokine induction. **Circ. Res.,** v. 87, p. 1195-1201, 2000.

SCHUETT, H.; LUCHTEFELD, M.; GROTHUSEN, C.; GROTE, K.; SCHIEFFER, B. How much is too much? Interleukin-6 and its signaling in atherosclerosis. **Thromb. Haemost.,** v. 102, p. 215-222, 2009.

SCHULTZ, J. E. L. J. et al. TGF-beta1 mediates the hypertrophic cardiomyocyte growth induced by angiotensin II. **J. Clin. Invest.,** v. 109, n. 6, p. 787-796, Mar 2002.

SKRBIC, R.; IGIC, R. Seven decades of angiotensin (1939-2009). **Peptides,** v. 30, n. 10, p. 1945-1950, Oct 2009.

SOUZA, J. R. M.; OLIVEIRA R. T.; BLOTTA, M. H. S. L.; COELHO, O. R. Serum levels of IL-6, IL-18 and CRP in patientes with type-2 diabetes and acute coronary syndrome without ST-Segment Elevation. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 2, p. 86-90, 2008.

SOUZA-OLIVEIRA T. C. **Ação da angiotensina II associada ao bloqueio dos receptores AT_1 e AT_2 no processo inflamatório das lesões vasculares**. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

STAMENKOVIC, I. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. **J. Pathol.,** v. 200, p. 448-464, 2003.

STENMARK, K. R. et al. The adventitia: essential regulator of vascular wall structure and function. **Annu. Rev. Physiol.,** v. 75, p. 23-47, 2013.

TADDEI, S. et al. Effects of antihypertensive drugs on endothelial dysfunction: clinical implications. **Drugs,** v. 62, n. 2, p. 265-84, 2002.

TAMURA, K. et al. Recent advances in the study of renin and angiotensinogen genes: from molecules to the whole body. **Hypertens. Res.,** v. 18, p. 7-18, 1995.

TAUBMAN, M. B. Angiotensin II – a vasoactive hormone with ever-increasing biological roles. **Circ. Res.,** v. 92, p. 9-11, 2003.

TOUIZ, R. M. Reactive oxygen species as mediators of calcium signaling by angiotensin II: implications in vascular physiology and pathophysiology. **Antioxid. Redox. Signal.,** v. 7, n. 9-10, p. 1302-1314, Set, 2005.

TOUIZ, R. M.; BERRY, C. Recent advances in angiotensin II signaling. **Braz. J. Med. Biol. Res.,** v. 35, n. 9, p. 1001-1015, Sep 2002.

TSUTAMOTO, T. et al. Angiotensin II type 1 receptor antagonist decreases plasma levels of tumor necrosis factor alpha, interleukin-6 and soluble adhesion molecules in patients with chronic heart failure. **J. Am. Coll. Cardiol.,** v. 35, n. 3, p. 714-721, Mar 2000.

TULIS, D. A.; UNTHANK, J. L.; PREWITT, R. L. Flow-induced arterial remodeling in rat mesenteric vasculature. **Am. J. Physiol.,** v. 274, p. H874-H882, 1998.

VIEGAS, K. A. S.; LACCHINI, S. Injúria vascular e reestenose. In: KRIEGER, J. E. (Ed.). **Bases moleculares das doenças cardiovasculares:** a integração entre a pesquisa e a prática clínica. São Paulo: Atheneu, 2008. p. 415-432.

VIEGAS, K. A. S. **Ação da angiotensina II no remodelamento da matriz extracelular perivascular em camundongos**. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2012.

WAGENSEIL, J. E.; MECHAM, R. P. Vascular extracellular matrix and arterial mechanics. **Physiol. Rev.,** v. 89, n. 3, p. 957-989, Jul 2009.

WANG, Y.; AIT-OUFELLA, Y.; HERBIN, O.; BONNIN, P.; RAMKHELAWON, B.; TALEB, S.; HUANG, J.; OFFENSTADT, G.; COMBADIÈRE, C.; RÉNIA, L. J. L.; THARAUX, P. L.; TEDGUI, A.; MALLAT, Z. TGF-β activity protects against inflammatory aortic aneurysm progression and complications in angiotensin II–infused mice. **The Journal of Clinical Investigation,** v. 120, n. 2, p. 422-432, 2010.

WANG ,Y.; MARTIN-MCNULTY, B.; FREAY, A. D.; SUKOVICH, DA., HALKS-MILLER, M.; LI, W.; VERGONA, R.; SULLIVAN, M. E.; MORSER, J.; DOLE, W. P.; DENG, G. G. Angiotensin II Increases urokinase-type plasminogen activator expression and induces aneurysm in the abdominal aorta of apolipoprotein e-deficient mice. **American Journal of Pathology,** v. 159, p. 1455-1464, 2001

WASSMANN, S. et al Interleukin-6 induces oxidative stress and endothelial dysfunction by overexpression of the angiotensin II type 1 receptor. **Circ. Res.**, v. 94, p. 534-541, 2004.

WATANABE, T.; BARKER, T. A.; BERK, B. C. Angiotensin II and the endothelium: diverse signals and effects. **Hypertension,** v. 45, p. 63-169, 2005.

WEII, P. Mechanisms modifying atherosclerotic disease – from lipids to vascular biology. **Atherosclerosis,** v. 147, p. S3-S10, 1999. Suppl. 1.

WILTING, J. Integrated vascular anatomy. In: LANZER, P.; TOPOL, E. J. (Ed.). **Pan Vascular Medicine**: integrated clinical management. Berlin: Springer. 2002. p. 50-75.

WOLF, G. Renal injury due to renin–angiotensin–aldosterone system activation of the transforming *growth factor-β pathwayRAAS and TGF-β.* **Kidney International,** v. 70, p. 1914-1919, 2006.

WOLF, G.; BUTZMANN, U.; WENZEL, U. O. The rennin-angiotensin system and progression of renal disease: from hemodynamics to cell biology. **Nephron. Physiol.,** v. 93, p. 3-13, 2003.

ZACCHIGNA, L.; VECCHIONE, C.; NATTE, A.; CORDENONSI, M.; DUPONT, S.; MARETTO SILVIA, M.; CIFELLI, G.; FERRARI, A.; MAFFEI, A.; FABBRO, C.; BRAGHETTA, P.; MARINO, G.; SELVETELLA, G.; ARETINI, A.; COLONNESE, C.; BETTARINI, U.; RUSSO, G.; SOLIGO, S.; ADOMO, M.; BONALDO, P.; VOLPIN, D.; PICCOLO, S.; LEMBO, G.; BRESSAN, G. M.; Emilin 1 links TGF-_ maturation to blood pressure homeostasis. **Cell,** v. 124, p. 929-942. 2006.

ZHANG, M. et al. Angiotensin II induced cerebral microvascular inflammation and increased blood-brain barrier permeability via oxidative stress. **Neuroscience,** v. 171, n. 3, p. 852-858, Dec 2010.

ZHAO, Z. et al. Activation of ERK5 in angiotensin II-induced hypertrophy of human aortic smooth muscle cells. **Mol. Cell Biochem.,** v. 322, n. 1-2, p. 171-178, Feb 2009.