MARIA ALICIA CARRILLO SEPULVEDA

**PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR AT2 DA
ANGIOTENSINA II NO RELAXAMENTO VASCULAR
PROMOVIDO PELO HORMÔNIO TIROIDEANO**

Tese apresentada ao 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 Maria Luiza Morais Barreto de Chaves

**São Paulo
2009**

RESUMO

Carrillo-Sepulveda MA. Participação do receptor AT2 da angiotensina II no relaxamento vascular promovido pelo hormônio tiroideano [Tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

Os hormônios tiroideanos (HT) exercem grande efeito sobre o sistema cardiovascular. É bem caracterizado que a vasodilatação promovida pela triiodotironina (T3) ocorre por ação direta deste hormônio sobre o relaxamento das células musculares lisas vasculares (CMLV), porém os mecanismos envolvidos neste efeito ainda são desconhecidos. Antes de iniciarmos os experimentos com as culturas primárias de CMLV de aorta de rato, certificamos se o fenótipo nativo contrátil destas células estava preservado. Nós encontramos que CMLV sofrem modulação fenotípica, mudança do fenótipo contrátil para o sintético, após serem submetidas a várias passagens e congelamento prévio em nitrogênio líquido. Como a partir da quarta passagem estas células assumiram um fenótipo sintético acompanhado por inativação da via da ERK1/2 que, por consequência, diminuiu significativamente os níveis de fosforilação da miosina de cadeia leve (MCL), marcador de contração, utilizamos estas culturas apenas em terceira passagem, estágio em que o fenótipo contrátil ainda está conservado. Nossos resultados revelaram que o T3 rapidamente relaxa as CMLV através da geração de óxido nítrico (NO), com participação da óxido nítrico sintase neuronal e induzível (nNOS e iNOS), e que a via da PI3K/Akt está envolvida neste efeito. Em paralelo, ensaios funcionais mostraram que anéis de aorta sem endotélio incubados com T3 apresentam uma menor resposta contrátil a Fenilefrina (FE) em relação às aortas incubadas com veículo, efeito este revertido na presença de L-NAME, inibidor de NOS. Estes dados fortemente sugerem que um dos mecanismos pelo qual o T3 rapidamente causa relaxamento das CMLV é dependente de NO, porém independente do endotélio. Além disso, considerando a interação entre os HT e o sistema renina angiotensina (SRA) local e que a ativação do receptor da angiotensina II (AngII) do tipo 2 (AT2) promove vasodilatação, testamos a hipótese de que a vasodilatação encontrada no hipertireoidismo ocorre via receptor AT2. Aortas de animais hipertiroideos apresentaram aumento significativo na expressão do receptor AT2, acompanhado de

diminuição de proteínas contráteis. Estudos in vitro mostraram que a diminuição das proteínas contráteis nas CMLV promovida pelo T3 foi revertida na presença de PD123319, antagonista de AT2, sugerindo assim a participação do AT2 neste evento. Ainda, nossos dados mostram que as aortas sem endotélio dos animais hipertiroideos apresentam uma menor reatividade a AngII e um maior relaxamento ao nitroprussiato de sódio (NPS), ambas respostas ocorrendo com participação do receptor AT2. Por fim, sabendo que o receptor AT2 pode induzir vasodilatação via NO, nossos resultados revelaram que a geração de NO nas CMLV promovida pelo T3 foi revertida na presença de inibidor da PI3K/Akt e PD123319. Além disso, a ativação da PI3K/Akt nas CMLV promovida pelo T3 foi abolida na presença de PD123319. Coletivamente, estes achados além de confirmarem nossa hipótese inicial de que o T3 promove relaxamento vascular via receptor AT2, também sugerem que este efeito é mediado via PI3K/Akt.

Palavras-Chave: Sistema renina-angiotensina. Receptor AT2 da angiotensina II. Hormônios tiroideanos. Vasodilatação. Óxido nítrico.

ABSTRACT

Carrillo-Sepulveda MA. Thyroid hormone induces vascular relaxation via angiotensin II type 2 receptor (AT2) [Tese] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

Thyroid Hormone (TH) has broad effects on cardiovascular system. It is also known that 3,3',5-triiodo-L-thyronine (T3)-induced vasodilation is the consequences of direct action of T3 on vascular smooth muscle cells (VSMC) relaxation. However, the mechanisms involved in this phenomenon are still unclear. Before we perform our studies with VSMC primary cultures from rat aortas, we determine whether the native contractile phenotype of these cells were preserved. We found that VSMC undergo phenotypic modulation from contractile to synthetic phenotype after repeated passages and freezing in liquid nitrogen. Because from passages 4 VSMC showed synthetic phenotype accompanied by decreased levels of phosphorylated myosin light chain (MLC), marker of contraction, and inactivation of ERK1/2, we only used these cultures until passage 3. In our study, we showed that T3 causes rapid relaxation of VSMC via increased NO production from neuronal and inducible nitric oxide synthase (nNOS and iNOS) and that PI3K/Akt signaling pathway is involved in this phenomenon. Vascular reactivity studies showed that endothelium-denuded aortas treated with T3 displayed a decreased response to phenylephrine which was reserved by L-NAME, NOS inhibitor. These data strongly indicates that T3-induced VSMC relaxation is NO-dependent but endothelium independent. Considering the crosstalk between TH and renin angiotensin system (RAS) local and that activation of angiotensin II (AngII) type 2 receptor (AT2) promotes vasodilatation, we also hypothesize that TH-induced vasodilation may occur via action of AngII on AT2 receptor. Aortas from experimental hyperthyroidism rats showed increased AT2 receptors and decreased contractile proteins. In our *in vitro* studies, we observed that T3-induced decreased contractile proteins in VSMC was reversed by AT2 blockade, PD123319, suggesting the participation of AT2 receptor. Our data also demonstrated that endothelium-denuded aortas from hyperthyroid rats displayed a decreased response to AngII and increased response to sodium nitroprusside (NPS) which was mediated by AT2 receptor. It is known that AT2 receptor can induces vasodilation via

increasing NO production. Our results revealed that T3 induced-NO generation in VSMC was reversed by AT2 blockade and PI3k/Akt inhibitors. Further more activation of PI3K/Akt by T3 was also abolished by PD123319 suggesting that AT2 activation might be upstream of PI3K/Akt signaling pathway. Collectively, these findings confirm our hypothesis that T3-induced vascular relaxation occur via AT2 receptor and also suggests the important role of PI3K/Akt signaling pathway in this event.

Key-words: Renin angiotensin system. Angiotensin type 2 receptor (AT2). Thyroid hormone. Vasodilation. Nitric oxide.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Características Gerais do Leito Arterial

O leito vascular é um componente representativo dentro do sistema cardiovascular, composto por células musculares lisas vasculares (CMLV), células endoteliais (CE) e fibroblastos, e por componentes não celulares, como a matriz extracelular. Trata-se de uma estrutura não estática, uma vez que seus componentes interagem e mudam dinamicamente aumentando, diminuindo ou reorganizando-se em resposta a estímulos fisiopatológicos (Dubey, *et al.*, 1997). Três camadas de tecido, concêntricas distintas, ou túnicas, formam a parede das artérias: a túnica íntima, a túnica média e a túnica adventícia (**Figura 1**).

Figura 1: Esquema representativo das túnicas de um leito arterial. Adaptado de School of Anatomy and Human Biology - University of Western Austrália.

A **túnica íntima** é a camada mais interna do vaso que está em contato direto com o fluxo sanguíneo, e é constituída por uma camada de células endoteliais achatadas que, no conjunto, é denominada endotélio, e por uma lâmina basal. As células endoteliais, além de sintetizarem e secretarem fatores dilatadores e constritores que atuam diretamente sobre as células da túnica média controlando o tônus vascular, também produzem moléculas que atuam nos processos inflamatórios. Furchgott e colaboradores (Furchgott e Zawadzki, 1980; Furchgott e

Vanhoutte, 1989) foram os primeiros a identificar que o gás óxido nítrico (NO) é um dos principais fatores relaxantes derivados do endotélio e responsável por estimular a guanilato ciclase nas CMLV, resultando na produção de guanosina 3'-5' monofosfato cíclico (GMPc) e, conseqüentemente, no relaxamento do músculo liso (Ortiz e Garvin, 2003). Desde então este gás tornou-se um dos principais alvos de estudo, não só no que se refere à sua síntese, como também às suas ações no leito vascular. Já a **túnica média** é a camada intermediária localizada logo abaixo da camada íntima, formada basicamente por CMLV que são as responsáveis pelo estado contrátil do vaso. A **túnica adventícia**, a mais externa, consiste principalmente de tecido conjuntivo, com fibras colágenas tipo I e elásticas. Esta se continua gradativamente com o tecido conjuntivo das estruturas vizinhas, as quais apóiam estruturalmente o vaso quando este se distende.

Uma vez que o músculo liso das artérias, composto por CMLV, é o componente responsável pelo estado contrátil do leito vascular, ele corresponde ao objeto do presente estudo.

As CMLV são altamente especializadas, expressam uma variedade de proteínas contráteis, canais iônicos e moléculas sinalizadoras que regulam a contração. No estado contrátil, as CMLV diminuem de tamanho promovendo uma diminuição no diâmetro do leito vascular e, conseqüentemente, regulando o fluxo sanguíneo e a pressão arterial.

A principal função das CMLV é, portanto, a contração, sendo que a concentração intracelular de cálcio ($[Ca^{++}]$) tem sido o principal fator desencadeante da regulação do tônus vascular (Bukoski, *et al.*, 1989; Berridge, 1997), uma vez que pequenas mudanças na $[Ca^{++}]$ citoplasmático já são capazes de acarretar mudanças significativas no tônus vascular (Meininger, *et al.*, 1991). O aumento dos níveis citoplasmáticos de Ca^{++} , pela entrada através de canais específicos na membrana plasmática, ou por saída de Ca^{++} do retículo sarcoplasmático e/ou mitocôndrias, desencadeia uma série de processos fisiológicos que conduzem à contração do músculo liso vascular. Primeiramente, o Ca^{++} se liga a uma proteína citoplasmática (com quatro sítios de ligação para o cálcio) denominada calmodulina. Uma vez formado o complexo Cálcio-Calmodulina, este é capaz de ativar a enzima quinase da miosina de cadeia leve (MCLK) que, então, fosforila primeiramente o resíduo serina na posição 19 e em seguida o resíduo treonina na posição 18 da miosina de cadeia leve (MCL) (Ikebe, *et al.*, 1986). Esta proteína fosforilada consegue interagir com a

actina, e assim, o vaso contrai (Walsh, 1994). Portanto, a atividade contrátil do músculo liso vascular é primeiramente determinada pelo estado de fosforilação da MCL (Kamm e Stull, 1985), fato este que confere ser a MCL Fosforilada o marcador mais utilizado para investigar o estado contrátil do músculo liso vascular (Hartshorne, *et al.*, 1992; Gallagher, *et al.*, 1997; Ying, *et al.*, 2006).

Quando os níveis intracelulares de Ca^{++} diminuem ocorre inativação da MCLK, e ativação das Fosfatases da Miosina de Cadeia Leve (MCLP) que, por sua vez, desfosforilam a MCL, causando então o relaxamento das CMLV (Okubo, *et al.*, 1994), mostrando que a remoção de Ca^{++} do citosol e a estimulação de fosfatases são fatores que promovem o relaxamento do músculo liso vascular. Embora o papel do cálcio já esteja bem estabelecido, recentemente tem-se demonstrado que o NO e nucleotídeos cíclicos reduzem os níveis de fosforilação da MCL e assim promovem o relaxamento do músculo liso, independentemente da diminuição dos níveis de Ca^{++} citosólico (Schlossmann, *et al.*, 2003); (Somlyo e Somlyo, 2003), fenômeno este denominado de desensibilização ao Ca^{++} (Choudhury, *et al.*, 2004).

Ainda, considerando que o músculo liso não contém troponina, proteína responsável pela inibição da interação da actina com a miosina no músculo esquelético e cardíaco, infere-se que a calponina, uma proteína localizada apenas no músculo liso, exerça função similar. A calponina corresponde a uma proteína de 34KDa; foi isolada pela primeira vez a partir de extratos de moela de galinha e de aorta bovina (Takahashi, *et al.*, 1986; Takahashi, *et al.*, 1987) e, da mesma forma que a troponina, está ligada aos filamentos de actina, impedindo a interação com a miosina.

Nos últimos anos, a calponina tem sido considerada uma proteína enigmática dentro do aparato contrátil do músculo liso, motivo pelo qual tem aumentado o interesse pelo seu estudo. A função precisa da calponina ainda segue indeterminada, mas há um corpo de evidências demonstrando o seu envolvimento em mecanismos secundários reguladores da contração do músculo liso, possivelmente por regulação contrátil dos filamentos finos (Adam, *et al.*, 1992; Winder e Walsh, 1993). Além disso, a calponina participa da organização do citoesqueleto, o que confere a esta proteína ser um marcador de diferenciação de CMLV (North, *et al.*, 1994).

Apesar da função primordial da CMLV ser a contração, este tipo celular pode assumir, frente a determinados estados fisiopatológicos, outras funções que

garantem a manutenção do leito vascular. Tem-se demonstrado que sob determinados estímulos e situações de 'desordem vascular' as CMLV são capazes de sofrer apoptose (Li, *et al.*, 2004; Pan, *et al.*, 2004) e também hiperplasia (Gibbons, *et al.*, 1992), fatores que contribuem para o remodelamento vascular. Assim, a CMLV é considerada um dos tipos celulares que mais exhibe plasticidade funcional. Originalmente, a CMLV possui um fenótipo contrátil, no entanto, frente a determinados estímulos mitogênicos, as células perdem a sua capacidade contrátil e assumem um fenótipo sintético capaz de migrar, proliferar e secretar componentes da matriz extracelular, como colágeno tipo I e III, elastina e proteoglicanos (Thyberg, *et al.*, 1983; Sjolund, *et al.*, 1986; Worth, *et al.*, 2001). Essas características podem ser nitidamente observadas quando estas células são isoladas em culturas, o que ressalta a importância de utilizar um eficaz modelo experimental que garanta a conservação do fenótipo nativo/contrátil destas células em cultura antes de submetê-las a estímulos relaxantes e/ou contráteis.

Embora não seja recente que uma série de estudos utilize as culturas de CMLV para responder a questões que ocorrem no leito vascular como um todo, este modelo ganha ainda maior destaque uma vez que um dos grandes questionamentos e alvos de investigação atual na fisiologia vascular se refere aos eventos vasculares que ocorrem independentemente do endotélio. Assim, embora grande parte dos eventos vasodilatadores seja mediada pelo endotélio, relatos recentes demonstram que o relaxamento do músculo liso pode também ocorrer na ausência da ação parácrina das CE sobre as CMLV (Ojamaa, *et al.*, 1996; Fukada, *et al.*, 2005), tornando essencial a investigação destes mecanismos.

1.2 Sistema Renina-Angiotensina no Leito Arterial

O Sistema Renina Angiotensina (SRA) é considerado um dos mais importantes reguladores do sistema vascular, no qual o seu hormônio efetor, a angiotensina II (Ang II), age mantendo um balanço entre vasoconstrição e vasodilatação, o que resulta em um tônus vasomotor mínimo (Muller e Luft, 1998; Dzau, *et al.*, 2002) e, conseqüentemente, na regulação do volume intravascular e da arquitetura do vaso (Re, 2004). Classicamente este sistema, que atua controlando a

pressão arterial e a homeostasia hidroeletrolítica do organismo (Menard, 1993), segue uma cascata de eventos: o angiotensinogênio circulante, peptídeo proveniente do fígado, é convertido no decapeptídeo Angiotensina I (Ang I) pela ação da renina, uma aspartil protease sintetizada e estocada nas células justaglomerulares dos rins. A Ang I, por sua vez, é clivada em um octapeptídeo, a Ang II, por ação da Enzima Conversora de Ang I (ECA), proveniente das células endoteliais dos capilares pulmonares. Assim, uma vez sintetizada, a Ang II se liga aos seus receptores específicos, o receptor da AngII do tipo 1 (AT1) e o receptor da AngII do tipo 2 (AT2), deflagrando uma série de ações fisiológicas no sistema cardiovascular. Ao interagir com o receptor AT1, a Ang II promove vasoconstrição e efeitos proliferativos, enquanto que via AT2 os efeitos ainda não são bem estabelecidos, mas há fortes evidências mostrando que a Ang II promove vasodilatação, efeitos anti-proliferativos e anti-inflamatórios, o que confere um importante papel cardiovascular protetor deste receptor (Siragy, 2009).

Durante muito tempo este sistema foi tido como SRA circulante ou endócrino, porém, desde que componentes deste sistema e os seus respectivos RNAs mensageiros foram detectados em alguns tecidos como aorta, rins e coração, revelou-se a existência de SRA Locais. Hoje se sabe que vários tecidos possuem seu próprio SRA com regulação particular, muitas vezes independente do SRA circulante (Dzau, 1989; Danser, 1996).

Com a identificação da presença do SRA no leito vascular e a produção de Ang II localmente, foi possível observar o potencial papel deste peptídeo na fisiopatologia vascular, através da sua ação autócrina, parácrina (Campbell, 1987; Johnston, *et al.*, 1992) e ainda intrácrina (Kumar, *et al.*, 2007; Kumar, *et al.*, 2008) nas células vasculares (**Figura 2**). Assim, a produção local deste peptídeo pode levar a alterações tanto no tônus (Oliver e Sciacca, 1984) como no remodelamento vascular, o qual envolve mudanças estruturais e funcionais (Morishita, *et al.*, 1994; Ruiz-Ortega, *et al.*, 2001), já que a Ang II pode atuar como um fator de crescimento autócrino no vaso (Dzau, 1988).

Figura 2: Esquema representativo da interação da Ang II aos seus receptores AT1 e AT2 em CMLV. A Ang II, após sair da circulação, pode ligar-se a receptores AT1 e AT2 presentes na membrana plasmática das CMLV (ação endócrina); após produzida localmente pode ligar-se a receptores presentes em células vizinhas (ação parácrina) ou na mesma célula (ação autócrina), ou ainda, antes de exportada para o meio extracelular, a Ang II pode exercer ações intracelulares (ação intrínseca).

Uma vez formada no leito arterial, a Ang II pode promover ações distintas ao se ligar aos receptores AT1 e AT2, pertencentes à família dos receptores acoplados à proteína G, constituídos por sete domínios transmembrânicos e com aproximadamente 40% de homologia entre si.

O receptor AT1 está conjugado ao subtipo Gq da proteína G (Berk e Corson, 1997) e está presente em grandes quantidades nas CMLV, e em pequenas nas células da adventícia, sendo indetectável no endotélio (Zhuo, *et al.*, 1998; Allen, *et al.*, 2000). Um dos primeiros efeitos observados após ativação dos receptores AT1 é a vasoconstrição. Esta ação se deve à ativação imediata, dentro de alguns segundos, de cascatas intracelulares como a da ativação da Fosfolipase C (PLC) (Berk e Corson, 1997), a da Proteína Quinase C (PKC) (Touyz e Schiffrin, 2000), entre outras.

Ainda, a interação da Ang II com o receptor AT1 pode levar à ativação mais tardia, de algumas vias de sinalização que regulam estruturalmente e funcionalmente o vaso em longo prazo, como: crescimento, migração, deposição de

matriz extracelular e produção de fatores de crescimento, sendo exemplos destes últimos o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento tumoral (TGF- β), que apresentam suas expressões aumentadas após a ativação do receptor AT1 pela Ang II na musculatura lisa (Wang, *et al.*, 1995; Dubey, *et al.*, 1997; Peifley e Winkles, 1998). Dentre estas vias de sinalização se destaca a via das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), pertencente à superfamília de proteínas quinases que, uma vez ativadas, promovem crescimento do músculo liso vascular e cardíaco (Sadoshima, *et al.*, 1995; Touyz, *et al.*, 2001).

Já o receptor AT2, acoplado ao subtipo Gi da proteína G (Carey, *et al.*, 2000), é altamente expresso durante o desenvolvimento fetal e, após o nascimento, sua expressão diminui significativamente (Horiuchi, *et al.*, 1999). No adulto, a expressão de AT2 no leito vascular é bem baixa, porém detectável na camada média, onde se encontram as CMLV (Nora, *et al.*, 1998; Zhuo, *et al.*, 1998; Fukada, *et al.*, 2005). Em certas condições, como lesão vascular e infarto do miocárdio, o receptor AT2 pode ser reexpresso no leito vascular (Horiuchi, *et al.*, 1999), atuando como um mecanismo compensatório, que antagoniza as ações mediadas pelo AT1 (Nakajima, *et al.*, 1995; Tsutsumi, *et al.*, 1999).

A ligação da Ang II aos receptores do tipo AT2 induz a apoptose, vasodilatação e a efeitos antiproliferativos (Tsuzuki, *et al.*, 1996), ou seja, ações antagônicas àquelas observadas após ligação ao receptor AT1. Uma das principais vias de sinalização envolvida com a ativação dos receptores AT2 é a das proteínas tirosina fosfatases, responsáveis pela desfosforilação de algumas proteínas da via das MAPK (Bottari, *et al.*, 1992; Horiuchi, *et al.*, 1999). Além disso, a interação da Ang II com este receptor ativa a via de produção do NO (Siragy e Carey, 1997) e GMPc (Siragy e Carey, 1996), vias estas envolvidas no processo de relaxamento da CMLV e, conseqüentemente, vasodilatação. Ainda em relação às vias de sinalização, estudos recentes demonstraram que o receptor AT2 é capaz de ativar a via da PI3K/Akt (Caruso-Neves, *et al.*, 2005), a qual está diretamente relacionada à síntese de NO (Han, *et al.*, 2007) e à diferenciação das CMLV (Brown, *et al.*, 2005). Curiosamente, a via da PI3K/Akt foi descrita, até pouco tempo atrás, como sendo ativada apenas através do receptor AT1 (Takahashi, *et al.*, 1999; Dai, *et al.*, 2007; Yamamoto, *et al.*, 2009).

Ainda, considerando o fundamental papel do receptor AT2 na regulação do tônus vascular, trabalho recente utilizando anéis isolados de aorta torácica de ratos,

sem endotélio, demonstrou que a Ang II promoveu vasodilatação, via receptores AT₂, na musculatura lisa da aorta e não por dependência de substâncias dilatadoras derivadas do endotélio (Fukada, *et al.*, 2005).

Atualmente, uma questão bastante discutida na literatura é sobre a comunicação que existe entre os receptores AT₁ e AT₂. Pesquisadores demonstraram que o receptor AT₂ sofre heterodimerização com o receptor AT₁, e esta dimerização antagoniza os efeitos promovidos pelo receptor AT₁, independentemente da ativação e sinalização do receptor AT₂, ou seja, o receptor AT₂ pode ser ativado mesmo na ausência da Ang II (AbdAlla, *et al.*, 2001). Outro grupo de pesquisadores (Galindo, *et al.*, 2005) também mostrou que a co-expressão dos receptores AT₁ e AT₂ em fibroblastos humanos oferece um mecanismo de resistência a Ang II. Embora os achados sobre os efeitos do balanço entre os receptores AT₁ e AT₂ ainda sejam prematuros, o melhor entendimento desse mecanismo poderá oferecer subsídios para compreender o papel do SRA em tecidos que co-expressam os receptores AT₁ e AT₂ de maneira semelhante e que podem ser ativados na ausência da Ang II.

Diante do exposto, podemos notar que os receptores AT₁ e AT₂ podem ser ativados no leito vascular, na presença ou não da Ang II, sendo que cada um deles atua de maneira distinta sobre o leito vascular, o que revela a importância do conhecimento da expressão desses receptores frente a determinados estímulos fisiopatológicos, principalmente no que se refere ao receptor AT₂, o qual apresenta um papel ainda indefinido (Kim e Iwao, 2000; Widdop, *et al.*, 2003; Utsunomiya, *et al.*, 2005).

1.3 Hormônio Tiroideano

A glândula tireóide secreta os hormônios tiroxina (T₄) e triiodotironina (T₃), sendo este último considerado o hormônio tiroideano mais ativo, porém liberado em menor quantidade na circulação sistêmica, em relação ao T₄. Para exercer a sua atividade biológica, o T₄ liberado na circulação sistêmica precisa ser convertido em T₃ pela ação das desidases: a do tipo I, presente em alguns tecidos periféricos, e a do tipo II, presente em CMLV de aorta e artéria coronária de humanos (Mizuma, *et*

al., 2001). Uma vez formado, o T3 atravessa a membrana plasmática, entra na célula e se liga ao receptor nuclear de hormônio tireoideano (TR), uma nucleoproteína associada ao DNA, formando o complexo T3+TR, que ativa os elementos responsivos ao hormônio tireoideano (TRE) localizados no DNA e, com isso, ocorre à regulação positiva ou negativa da transcrição de determinados genes (Yen, 2001), fato este que confere ao hormônio tireoideano (HT) sua ação clássica, a ação genômica.

Há dois genes que codificam TRs, α e β , localizados nos cromossomos 17 e 3, respectivamente (Freedman, 1992). As isoformas TR α 1, TR β 1 e TR β 2 se ligam ao T3, enquanto a isoforma TR α 2 não se liga ao T3.

Os HT aumentam a atividade metabólica de quase todos os tecidos do organismo e, quando em concentrações aumentadas ou diminuídas, causam efeitos significativos sobre o sistema cardiovascular, promovendo mudanças hemodinâmicas (Klein e Ojamaa, 2001). O hipo e o hipertireoidismo correspondem a duas formas distintas de adaptação do organismo frente a um desequilíbrio causado por alterações nos níveis de HT (Eynan, *et al.*, 2002). No hipertireoidismo, quando os níveis de HT estão aumentados, ocorre um hiperdinamismo circulatório com aumento do fluxo sanguíneo, frequência cardíaca, pressão arterial sistólica e diminuição da resistência vascular sistêmica (RVS), enquanto que no hipotireoidismo, quando os hormônios tireoideanos estão diminuídos, os efeitos observados são opostos àqueles que ocorrem no estado hipertireoideo. A diminuição da resistência vascular sistêmica (RVS) que ocorre no hipertireoidismo se deve às ações do T3 que, além de promover vasodilatação, também inibe a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL), que é considerada potente fator para o desenvolvimento da aterosclerose (Perk e O'Neill, 1997). Somando-se a isso, o T3 também aumenta a expressão da proteína de matriz Gla (MGP) que tem ação anti- calcificação vascular (Sato, *et al.*, 2005), fato este que confere ao T3 seu papel antiaterosclerótico (Ojamaa, *et al.*, 1996; Mizuma, *et al.*, 2001).

O mecanismo pelo qual o HT promove diminuição da RVS não é totalmente compreendido e um dos principais questionamentos está em torno da participação ou não do endotélio neste evento. Estudos *in vitro* demonstram que o T3 causa relaxamento das CMLV por ação direta, independente do endotélio (Ojamaa, *et al.*, 1996). Já em estudos *in vivo*, os resultados obtidos são os mais variados. Enquanto

alguns estudos demonstraram que aortas de ratos hipertiroideos apresentaram atividade de NO sintase (NOS) aumentada, o que disponibiliza mais NO e assim promove relaxamento vascular, ou seja, ações estas dependentes do endotélio (Delp, *et al.*, 1993; Quesada, *et al.*, 2002), outras investigações já relatam evidências de que a vasodilatação promovida pelo T3 pode ser independente do endotélio (McAllister, *et al.*, 1998, 2000).

Além desta questão em aberto sobre a dependência ou não do endotélio na vasodilatação promovida pelo T3, outro ponto em questionamento é sobre as ações genômicas ou não-genômicas dos HT nos eventos vasculares, já que uma ação nuclear, com transcrição de genes alvos, não explica alguns dos efeitos rápidos causados pelos HT. Neste sentido, alguns estudos com animais e humanos têm demonstrado ocorrer uma rápida diminuição da RVS mesmo antes de ocorrer alteração da frequência e contratilidade cardíaca, após administração aguda de T3 (Kapitola e Vilimovska, 1981; Klemperer, *et al.*, 1995). De acordo com estudos de Davis e Davis (1996), essa ação rápida do HT em promover vasodilatação se deve a uma ação não genômica, ou extranuclear, que independe da transcrição de genes alvo (Davis e Davis, 1996). Os autores sugerem que há receptores transmembrânicos para o HT e que ao serem ativados pela ligação do T4 ou T3 poderiam desencadear uma cascata de sinalização citoplasmática, bem mais rápida quando comparada à ação nuclear do T3, o que explica, em parte, os efeitos rápidos promovidos pelos hormônios tiroideanos.

Para elucidar os efeitos rápidos do HT os estudos em torno das ações não-genômicas tornaram-se crescentes e uma das vias envolvidas neste processo é a via da PI3K/Akt. Em células endoteliais o T3 exerce uma ação não genômica, dentro de 20 minutos, na qual é capaz de promover síntese de NO via ativação da PI3K/Akt (Hiroi, *et al.*, 2006), o que explica parcialmente a vasodilatação aguda promovida pelo T3.

Embora achados recentes confirmem que o HT induz mudanças na reatividade vascular levando à diminuição da RVS, os mecanismos associados à vasodilatação deflagrados pelo T3 seguem inconclusivos, principalmente no que se refere à participação ou não do endotélio neste evento, sendo assim necessários novos estudos que contribuam para a compreensão desta ação hormonal.

1.4 Sistema Renina Angiotensina e Hormônio Tiroideano

O sistema cardiovascular é controlado basicamente pelo Sistema Nervoso Autônomo Simpático e SRA, ambos podendo ser modulados pelos HT (Dzau e Herrmann, 1982; Ganong, 1982; Crozatier, *et al.*, 1991). Quando ocorre um aumento nos níveis séricos dos HT, o organismo trabalha de forma mais acelerada, caracterizando um estado de hipertireoidismo onde ocorre a ativação do SRA (Kobori, *et al.*, 1997; Klein e Ojamaa, 2001; Dillmann, 2002). Desde que se evidenciou o importante papel do HT como regulador fisiológico do SRA, uma série de estudos vêm sendo desenvolvidos pelo nosso grupo, e por outros, no intuito de esclarecer como esses dois sistemas hormonais interagem. Pesquisadores demonstraram diminuição nos níveis plasmáticos de renina em ratos tireoidectomizados (Bouhnik, *et al.*, 1981). Já outros autores evidenciaram um aumento da síntese de angiotensinogênio frente ao estímulo com T3 (Dzau e Herrmann, 1982). Ainda, estudos demonstraram que ratos hipertiroideos apresentam aumento da síntese de renina com conseqüente elevação dos níveis plasmáticos de Ang II, independente da participação do sistema nervoso simpático (Kobori, *et al.*, 1997). Neste sentido, Hu, *et al.*, (2003) mostraram que a administração de inibidores do SRA foi capaz de prevenir o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca induzida pelo T4, confirmando a interação entre estes dois sistemas hormonais (Hu, *et al.*, 2003).

Além de agirem no SRA circulante ou cardíaco, os HT são capazes de atuar sobre o SRA do leito vascular, como foi demonstrado recentemente (Fukuyama, *et al.*, 2003). Este estudo mostrou que o T3 em concentrações supra-farmacológicas causou relaxamento das CMLV através da diminuição da expressão gênica e protéica do receptor AT1.

No entanto, frente aos poucos relatos na literatura sobre a interação do HT e o SRA vascular e ainda considerando que o receptor AT2 é o responsável pelos eventos vasodilatadores e, portanto um potencial candidato a participar dos efeitos vasodilatadores promovidos pelo HT, tornam-se necessários mais estudos que elucidem esta possível associação.

6 CONCLUSÕES

- 1) Culturas primárias de CMLV de aorta de rato correspondem a um excelente modelo experimental para avaliar função contrátil, desde que utilizadas até a quarta passagem e sem prévio processo de congelamento, o que preserva seu fenótipo nativo contrátil em cultura;
- 2) A modulação fenotípica que ocorre com as CMLV em cultura está associada ao prejuízo na ativação da via da ERK1/2, o que reflete comprometimento do funcionamento ideal da maquinaria contrátil deste tipo celular;
- 3) Um dos mecanismos pelo qual o T3 promove rápido relaxamento das CMLV é através da geração de NO mediada pela ativação da via de sinalização PI3K/Akt;
- 4) O receptor AT2 participa da vasodilatação encontrada no hipertireoidismo experimental, ativando a via da PI3K/Akt e por consequência gerando NO, independentemente do endotélio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS*

AbdAlla S, Lothar H, Abdel-tawab AM, Quitterer U. The angiotensin II AT2 receptor is an AT1 receptor antagonist. *J Biol Chem*. 2001; 276(43): 39721-6.

Adam LP, Gapinski CJ, Hathaway DR. Phosphorylation sequences in h-caldesmon from phorbol ester-stimulated canine aortas. *FEBS Lett*. 1992; 302(3): 223-6.

Allen AM, Zhuo J, Mendelsohn FA. Localization and function of angiotensin AT1 receptors. *Am J Hypertens*. 2000; 13(1 Pt 2): 31S-38S.

Alves GM, Barao MA, Odo LN, Nascimento Gomes G, Franco Md Mdo C, Nigro D, Lucas SR, Laurindo FR, Brandizzi LI, Zaladek Gil F. L-Arginine effects on blood pressure and renal function of intrauterine restricted rats. *Pediatr Nephrol*. 2002; 17(10): 856-62.

Bacakova L, Pellicciari C, Bottone MG, Lisa V, Mares V. A sex-related difference in the hypertrophic versus hyperplastic response of vascular smooth muscle cells to repeated passaging in culture. *Histol Histopathol*. 2001; 16(3): 675-84.

Bakhach J, Casoli V, Guimberteau JC. [The cryopreservation of composite tissues: principle, literature review and preliminary results of our own experiments.]. *Ann Chir Plast Esthet*. 2007; 52(5): 531-547.

Barreto-Chaves ML, Carrillo-Sepulveda MA, Carneiro-Ramos MS, Gomes DA, Diniz GP. The crosstalk between thyroid hormones and the Renin-Angiotensin System. *Vascul Pharmacol*. 2009.

Biondi B, Palmieri EA, Lombardi G, Fazio S. Effects of thyroid hormone on cardiac function: the relative importance of heart rate, loading conditions, and myocardial contractility in the regulation of cardiac performance in human hyperthyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002; 87(3): 968-74.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

Bochaton-Piallat ML, Gabbiani F, Ropraz P, Gabbiani G. Age influences the replicative activity and the differentiation features of cultured rat aortic smooth muscle cell populations and clones. *Arterioscler Thromb*. 1993; 13(10): 1449-55.

Berk BC, Corson MA. Angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle: role of tyrosine kinases. *Circ Res*. 1997; 80(5): 607-16.

Berridge MJ. Elementary and global aspects of calcium signalling. *J Physiol*. 1997; 499 (Pt 2): 291-306.

Bottari SP, King IN, Reichlin S, Dahlstroem I, Lydon N, de Gasparo M. The angiotensin AT₂ receptor stimulates protein tyrosine phosphatase activity and mediates inhibition of particulate guanylate cyclase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992; 183(1): 206-11.

Bouhnik J, Galen FX, Clauser E, Menard J, Corvol P. The renin-angiotensin system in thyroidectomized rats. *Endocrinology*. 1981; 108(2): 647-50.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72: 248-54.

Brown DJ, Rzucidlo EM, Merenick BL, Wagner RJ, Martin KA, Powell RJ. Endothelial cell activation of the smooth muscle cell phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway promotes differentiation. *J Vasc Surg*. 2005; 41(3): 509-16.

Bukoski RD, Bergmann C, Gairard A, Stoclet JC. Intracellular Ca²⁺ and force determined simultaneously in isolated resistance arteries. *Am J Physiol*. 1989; 257(5 Pt 2): H1728-35.

Campbell DJ. Circulating and tissue angiotensin systems. *J Clin Invest*. 1987; 79(1): 1-6.

Carey RM, Wang ZQ, Siragy HM. Role of the angiotensin type 2 receptor in the regulation of blood pressure and renal function. *Hypertension*. 2000; 35(1 Pt 2): 155-63.

Carey RM, Siragy HM. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr Rev*. 2003; 24(3): 261-71.

Carrillo-Sepulveda MA, Ceravolo GS, Fortes ZB, Carvalho MH, Tostes RC, Laurindo FR, Webb RC, Barreto-Chaves ML. Thyroid hormone stimulates NO production via activation of the PI3K/Akt pathway in vascular myocytes. *Cardiovasc Res*. 2009.

Caruso-Neves C, Kwon SH, Guggino WB. Albumin endocytosis in proximal tubule cells is modulated by angiotensin II through an AT2 receptor-mediated protein kinase B activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102(48): 17513-8.

Christen T, Bochaton-Piallat ML, Neuville P, Rensen S, Redard M, van Eys G, Gabbiani G. Cultured porcine coronary artery smooth muscle cells. A new model with advanced differentiation. *Circ Res*. 1999; 85(1): 99-107.

Clempus RE, Sorescu D, Dikalova AE, Pounkova L, Jo P, Sorescu GP, Schmidt HH, Lassegue B, Griendling KK. Nox4 is required for maintenance of the differentiated vascular smooth muscle cell phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007; 27(1): 42-8.

Choudhury N, Khromov AS, Somlyo AP, Somlyo AV. Telokin mediates Ca²⁺-desensitization through activation of myosin phosphatase in phasic and tonic smooth muscle. *J Muscle Res Cell Motil*. 2004; 25(8): 657-65.

Crozatier B, Su JB, Corsin A, Bouanani Ne-H. Species differences in myocardial beta-adrenergic receptor regulation in response to hyperthyroidism. *Circ Res*. 1991; 69(5): 1234-43.

Dai Q, Xu M, Yao M, Sun B. Angiotensin AT1 receptor antagonists exert anti-inflammatory effects in spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol*. 2007; 152(7): 1042-8.

D'Angelo G, Adam LP. Inhibition of ERK attenuates force development by lowering myosin light chain phosphorylation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002; 282(2): H602-10.

Danser AH. Local renin-angiotensin systems. *Mol Cell Biochem*. 1996; 157(1-2): 211-6.

Danzi S, Klein I. Thyroid hormone and the cardiovascular system. *Minerva Endocrinol*. 2004; 29(3): 139-50.

Davis PJ, Davis FB. Nongenomic actions of thyroid hormone. *Thyroid*. 1996; 6(5): 497-504.

Davis PJ, Leonard JL, Davis FB. Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. *Front Neuroendocrinol*. 2008; 29(2): 211-8.

Delp MD, McAllister RM, Laughlin MH. Exercise training alters endothelium-dependent vasoreactivity of rat abdominal aorta. *J Appl Physiol*. 1993; 75(3): 1354-63.

Dillmann WH. Cellular action of thyroid hormone on the heart. *Thyroid*. 2002; 12(6): 447-52.

Diniz GP, Carneiro-Ramos MS, Barreto-Chaves ML. Angiotensin type 1 receptor mediates thyroid hormone-induced cardiomyocyte hypertrophy through the Akt/GSK-3beta/mTOR signaling pathway. *Basic Res Cardiol*. 2009.

Dubey RK, Jackson EK, Rupprecht HD, Sterzel RB. Factors controlling growth and matrix production in vascular smooth muscle and glomerular mesangial cells. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 1997; 6(1): 88-105.

Dzau VJ. Circulating versus local renin-angiotensin system in cardiovascular homeostasis. *Circulation*. 1988; 77(6 Pt 2): I4-13.

Dzau VJ. Multiple pathways of angiotensin production in the blood vessel wall: evidence, possibilities and hypotheses. *J Hypertens*. 1989; 7(12): 933-6.

Dzau VJ, Herrmann HC. Hormonal control of angiotensinogen production. *Life Sci*. 1982; 30(7-8): 577-84.

Dzau VJ, Bernstein K, Celermajer D, Cohen J, Dahlof B, Deanfield J, Diez J, Drexler H, Ferrari R, Van Gilst W, Hansson L, Hornig B, Husain A, Johnston C, Lazar H, Lonn E, Luscher T, Mancini J, Mimran A, Pepine C, Rabelink T, Remme W, Ruilope L, Ruzicka M, Schunkert H, Swedberg K, Unger T, Vaughan D, Weber M. Pathophysiologic and therapeutic importance of tissue ACE: a consensus report. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2002; 16(2): 149-60.

Escano CS, Jr., Keever LB, Gutweiler AA, Andresen BT. Angiotensin II activates extracellular signal-regulated kinase independently of receptor tyrosine kinases in renal smooth muscle cells: implications for blood pressure regulation. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008; 324(1): 34-42.

Eynan M, Knubuvetz T, Meiri U, Navon G, Gerstenblith G, Bromberg Z, Hasin Y, Horowitz M. Heat acclimation-induced elevated glycogen, glycolysis, and low thyroxine improve heart ischemic tolerance. *J Appl Physiol.* 2002; 93(6): 2095-104.

Freedman LP. Anatomy of the steroid receptor zinc finger region. *Endocr Rev.* 1992; 13(2): 129-45.

Fukada SY, Tirapelli CR, de Godoy MA, de Oliveira AM. Mechanisms underlying the endothelium-independent relaxation induced by angiotensin II in rat aorta. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2005; 45(2): 136-43.

Fukuyama K, Ichiki T, Takeda K, Tokunou T, Iino N, Masuda S, Ishibashi M, Egashira K, Shimokawa H, Hirano K, Kanaide H, Takeshita A. Downregulation of vascular angiotensin II type 1 receptor by thyroid hormone. *Hypertension.* 2003; 41(3): 598-603.

Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980; 288(5789): 373-6.

Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *Faseb J.* 1989; 3(9): 2007-18.

Galindo M, Santiago B, Palao G, Gutierrez-Canas I, Ramirez JC, Pablos JL. Coexpression of AT1 and AT2 receptors by human fibroblasts is associated with resistance to angiotensin II. *Peptides.* 2005; 26(9): 1647-53.

Gallagher PJ, Herring BP, Stull JT. Myosin light chain kinases. *J Muscle Res Cell Motil.* 1997; 18(1): 1-16.

Ganong WF. Thyroid hormones and renin secretion. *Life Sci.* 1982; 30(7-8): 561-9.

Gibbons GH, Pratt RE, Dzau VJ. Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs. hyperplasia. Autocrine transforming growth factor-beta 1 expression determines growth response to angiotensin II. *J Clin Invest.* 1992; 90(2): 456-61.

Glukhova MA, Frid MG, Koteliansky VE. Developmental changes in expression of contractile and cytoskeletal proteins in human aortic smooth muscle. *J Biol Chem.* 1990; 265(22): 13042-6.

Han G, Ma H, Chintala R, Miyake K, Fulton DJ, Barman SA, White RE. Nongenomic, endothelium-independent effects of estrogen on human coronary smooth muscle are mediated by type I (neuronal) NOS and PI3-kinase-Akt signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; 293(1): H314-21.

Hartshorne DJ, Matsushima S, Ito M, Guerriero V, Jr., Kawamura T. Myosin light chain kinase: structure-function relationships. *Jpn J Pharmacol.* 1992; 58 Suppl 2: 17P-22P.

Hashimoto T, Kihara M, Sato K, Imai N, Tanaka Y, Sakai M, Tamura K, Hirawa N, Toya Y, Kitamura H, Umemura S. Heparin recovers AT1 receptor and its intracellular signal transduction in cultured vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* 2005; 579(1): 281-4.

Hashimoto T, Kihara M, Ishida J, Imai N, Yoshida S, Toya Y, Fukamizu A, Kitamura H, Umemura S. Apelin stimulates myosin light chain phosphorylation in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26(6): 1267-72.

Hattori Y, Hattori S, Kasai K. Lipopolysaccharide activates Akt in vascular smooth muscle cells resulting in induction of inducible nitric oxide synthase through nuclear factor-kappa B activation. *Eur J Pharmacol.* 2003; 481(2-3): 153-8.

Hayashi K, Saga H, Chimori Y, Kimura K, Yamanaka Y, Sobue K. Differentiated phenotype of smooth muscle cells depends on signaling pathways through insulin-like growth factors and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem.* 1998; 273(44): 28860-7.

Hiroi Y, Kim HH, Ying H, Furuya F, Huang Z, Simoncini T, Noma K, Ueki K, Nguyen NH, Scanlan TS, Moskowitz MA, Cheng SY, Liao JK. Rapid nongenomic actions of thyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103(38): 14104-9.

Horiuchi M, Akishita M, Dzau VJ. Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. *Hypertension.* 1999; 33(2): 613-21.

Hu LW, Benvenuti LA, Liberti EA, Carneiro-Ramos MS, Barreto-Chaves ML. Thyroxine-induced cardiac hypertrophy: influence of adrenergic nervous system versus renin-angiotensin system on myocyte remodeling. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003; 285(6): R1473-80.

Ikebe M, Hartshorne DJ, Elzinga M. Identification, phosphorylation, and dephosphorylation of a second site for myosin light chain kinase on the 20,000-dalton light chain of smooth muscle myosin. *J Biol Chem*. 1986; 261(1): 36-9.

Johnston CI, Burrell LM, Perich R, Jandeleit K, Jackson B. The tissue renin-angiotensin system and its functional role. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl*. 1992; 19: 1-5.

Kahaly GJ, Dillmann WH. Thyroid hormone action in the heart. *Endocr Rev*. 2005; 26(5): 704-28.

Kamm KE, Stull JT. The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1985; 25: 593-620.

Kapitola J, Vilimovska D. Inhibition of the early circulatory effects of triiodothyronine in rats by propranolol. *Physiol Bohemoslov*. 1981; 30(4): 347-51.

Kilian P, Campbell S, Bilodeau L, Guimond MO, Roberge C, Gallo-Payet N, Payet MD. Angiotensin II type 2 receptor stimulation increases the rate of NG108-15 cell migration via actin depolymerization. *Endocrinology*. 2008; 149(6): 2923-33.

Kim S, Iwao H. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev*. 2000; 52(1): 11-34.

Klein I, Ojamaa K. Thyroid hormone and the cardiovascular system. *N Engl J Med*. 2001; 344(7): 501-9.

Kleinert H, Pautz A, Linker K, Schwarz PM. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol*. 2004; 500(1-3): 255-66.

Klemperer JD, Klein I, Gomez M, Helm RE, Ojamaa K, Thomas SJ, Isom OW, Krieger K. Thyroid hormone treatment after coronary-artery bypass surgery. *N Engl J Med*. 1995; 333(23): 1522-7.

Kobori H, Ichihara A, Suzuki H, Miyashita Y, Hayashi M, Saruta T. Thyroid hormone stimulates renin synthesis in rats without involving the sympathetic nervous system. *Am J Physiol*. 1997; 272(2 Pt 1): E227-32.

Kumar R, Singh VP, Baker KM. The intracellular renin-angiotensin system: a new paradigm. *Trends Endocrinol Metab*. 2007; 18(5): 208-14.

Kumar R, Singh VP, Baker KM. The intracellular renin-angiotensin system: implications in cardiovascular remodeling. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2008; 17(2): 168-73.

Kuo PC, Schroeder RA. The emerging multifaceted roles of nitric oxide. *Ann Surg*. 1995; 221(3): 220-35.

Kuzman JA, Vogelsang KA, Thomas TA, Gerdes AM. L-Thyroxine activates Akt signaling in the heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2005; 39(2): 251-8.

Lee JH, Ragolia L. AKT phosphorylation is essential for insulin-induced relaxation of rat vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006; 291(6): C1355-65.

Lee JH, Xia S, Ragolia L. Upregulation of AT2 receptor and iNOS impairs angiotensin II-induced contraction without endothelium influence in young normotensive diabetic rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008; 295(1): R144-54.

Li RC, Cindrova-Davies T, Skepper JN, Sellers LA. Prostacyclin induces apoptosis of vascular smooth muscle cells by a cAMP-mediated inhibition of extracellular signal-regulated kinase activity and can counteract the mitogenic activity of endothelin-1 or basic fibroblast growth factor. *Circ Res*. 2004; 94(6): 759-67.

McAllister RM, Luther KL, Pfeifer PC. Thyroid status and response to endothelin-1 in rat arterial vessels. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000; 279(2): E252-8.

McAllister RM, Grossenburg VD, Delp MD, Laughlin MH. Effects of hyperthyroidism on vascular contractile and relaxation responses. *Am J Physiol*. 1998; 274(5 Pt 1): E946-53.

McAllister RM, Albarracin I, Price EM, Smith TK, Turk JR, Wyatt KD. Thyroid status and nitric oxide in rat arterial vessels. *J Endocrinol*. 2005; 185(1): 111-9.

Meininger GA, Zawieja DC, Falcone JC, Hill MA, Davey JP. Calcium measurement in isolated arterioles during myogenic and agonist stimulation. *Am J Physiol.* 1991; 261(3 Pt 2): H950-9.

Menard J. Anthology of the renin-angiotensin system: a one hundred reference approach to angiotensin II antagonists. *J Hypertens Suppl.* 1993; 11(3): S3-11.

Mizuma H, Murakami M, Mori M. Thyroid hormone activation in human vascular smooth muscle cells: expression of type II iodothyronine deiodinase. *Circ Res.* 2001; 88(3): 313-8.

Montagnani M, Chen H, Barr VA, Quon MJ. Insulin-stimulated activation of eNOS is independent of Ca²⁺ but requires phosphorylation by Akt at Ser(1179). *J Biol Chem.* 2001; 276(32): 30392-8.

Morishita R, Gibbons GH, Ellison KE, Lee W, Zhang L, Yu H, Kaneda Y, Ogihara T, Dzau VJ. Evidence for direct local effect of angiotensin in vascular hypertrophy. In vivo gene transfer of angiotensin converting enzyme. *J Clin Invest.* 1994; 94(3): 978-84.

Muller DN, Luft FC. The renin-angiotensin system in the vessel wall. *Basic Res Cardiol.* 1998; 93 Suppl 2: 7-14.

Nakajima M, Hutchinson HG, Fujinaga M, Hayashida W, Morishita R, Zhang L, Horiuchi M, Pratt RE, Dzau VJ. The angiotensin II type 2 (AT₂) receptor antagonizes the growth effects of the AT₁ receptor: gain-of-function study using gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92(23): 10663-7.

Nakatsubo N, Kojima H, Kikuchi K, Nagoshi H, Hirata Y, Maeda D, Imai Y, Irimura T, Nagano T. Direct evidence of nitric oxide production from bovine aortic endothelial cells using new fluorescence indicators: diaminofluoresceins. *FEBS Lett.* 1998; 427(2): 263-6.

Nora EH, Munzenmaier DH, Hansen-Smith FM, Lombard JH, Greene AS. Localization of the ANG II type 2 receptor in the microcirculation of skeletal muscle. *Am J Physiol.* 1998; 275(4 Pt 2): H1395-403.

North AJ, Gimona M, Cross RA, Small JV. Calponin is localised in both the contractile apparatus and the cytoskeleton of smooth muscle cells. *J Cell Sci.* 1994; 107 (Pt 3): 437-44.

Ojamaa K, Klemperer JD, Klein I. Acute effects of thyroid hormone on vascular smooth muscle. *Thyroid*. 1996; 6(5): 505-12.

Ojamaa K, Kenessey A, Klein I. Thyroid hormone regulation of phospholamban phosphorylation in the rat heart. *Endocrinology*. 2000; 141(6): 2139-44.

Okubo S, Ito M, Takashiba Y, Ichikawa K, Miyahara M, Shimizu H, Konishi T, Shima H, Nagao M, Hartshorne DJ, et al. A regulatory subunit of smooth muscle myosin bound phosphatase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994; 200(1): 429-34.

Oliver JA, Sciacca RR. Local generation of angiotensin II as a mechanism of regulation of peripheral vascular tone in the rat. *J Clin Invest*. 1984; 74(4): 1247-51.

Ortiz PA, Garvin JL. Cardiovascular and renal control in NOS-deficient mouse models. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003; 284(3): R628-38.

Owens GK, Loeb A, Gordon D, Thompson MM. Expression of smooth muscle-specific alpha-isoactin in cultured vascular smooth muscle cells: relationship between growth and cytodifferentiation. *J Cell Biol*. 1986; 102(2): 343-52.

Ozono R, Wang ZQ, Moore AF, Inagami T, Siragy HM, Carey RM. Expression of the subtype 2 angiotensin (AT2) receptor protein in rat kidney. *Hypertension*. 1997; 30(5): 1238-46.

Pan SL, Guh JH, Chang YL, Kuo SC, Lee FY, Teng CM. YC-1 prevents sodium nitroprusside-mediated apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res*. 2004; 61(1): 152-8.

Peifley KA, Winkles JA. Angiotensin II and endothelin-1 increase fibroblast growth factor-2 mRNA expression in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 242(1): 202-8.

Perk M, O'Neill BJ. The effect of thyroid hormone therapy on angiographic coronary artery disease progression. *Can J Cardiol*. 1997; 13(3): 273-6.

Pfitzer G. Invited review: regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle. *J Appl Physiol*. 2001; 91(1): 497-503.

Pohl J, Winder SJ, Allen BG, Walsh MP, Sellers JR, Gerthoffer WT. Phosphorylation of calponin in airway smooth muscle. *Am J Physiol.* 1997; 272(1 Pt 1): L115-23.

Quesada A, Sainz J, Wangensteen R, Rodriguez-Gomez I, Vargas F, Osuna A. Nitric oxide synthase activity in hyperthyroid and hypothyroid rats. *Eur J Endocrinol.* 2002; 147(1): 117-22.

Re RN. Tissue renin angiotensin systems. *Med Clin North Am.* 2004; 88(1): 19-38.

Rendal E, Santos MV, Rodriguez M, Sanchez J, Segura R, Matheu G, Filgueira P, Pertega S, Andion C. Effects of cryopreservation and thawing on the structure of vascular segment. *Transplant Proc.* 2004; 36(10): 3283-7.

Rodriguez-Gomez I, Sainz J, Wangensteen R, Moreno JM, Duarte J, Osuna A, Vargas F. Increased pressor sensitivity to chronic nitric oxide deficiency in hyperthyroid rats. *Hypertension.* 2003; 42(2): 220-5.

Ross R. The smooth muscle cell. II. Growth of smooth muscle in culture and formation of elastic fibers. *J Cell Biol.* 1971; 50(1): 172-86.

Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Esteban V, Suzuki Y, Mezzano S, Plaza JJ, Egido J. Role of the renin-angiotensin system in vascular diseases: expanding the field. *Hypertension.* 2001; 38(6): 1382-7.

Sadoshima J, Qiu Z, Morgan JP, Izumo S. Angiotensin II and other hypertrophic stimuli mediated by G protein-coupled receptors activate tyrosine kinase, mitogen-activated protein kinase, and 90-kD S6 kinase in cardiac myocytes. The critical role of Ca(2+)-dependent signaling. *Circ Res.* 1995; 76(1): 1-15.

Sato Y, Nakamura R, Satoh M, Fujishita K, Mori S, Ishida S, Yamaguchi T, Inoue K, Nagao T, Ohno Y. Thyroid hormone targets matrix Gla protein gene associated with vascular smooth muscle calcification. *Circ Res.* 2005; 97(6): 550-7.

Schini-Kerth VB, Vanhoutte PM. Nitric oxide synthases in vascular cells. *Exp Physiol.* 1995; 80(6): 885-905.

Scivoletto R, Fortes ZB, Garcia-Leme J. Thyroid hormones and vascular reactivity: role of the endothelial cell. *Eur J Pharmacol.* 1986; 129(3): 271-8.

Schlossmann J, Feil R, Hofmann F. Signaling through NO and cGMP-dependent protein kinases. *Ann Med*. 2003; 35(1): 21-7.

Shanahan CM, Weissberg PL, Metcalfe JC. Isolation of gene markers of differentiated and proliferating vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 1993; 73(1): 193-204.

Siragy HM. The potential role of the angiotensin subtype 2 receptor in cardiovascular protection. *Curr Hypertens Rep*. 2009; 11(4): 260-2.

Siragy HM, Carey RM. The subtype-2 (AT₂) angiotensin receptor regulates renal cyclic guanosine 3', 5'-monophosphate and AT₁ receptor-mediated prostaglandin E₂ production in conscious rats. *J Clin Invest*. 1996; 97(8): 1978-82.

Siragy HM, Carey RM. The subtype 2 (AT₂) angiotensin receptor mediates renal production of nitric oxide in conscious rats. *J Clin Invest*. 1997; 100(2): 264-9.

Sjolund M, Madsen K, von der Mark K, Thyberg J. Phenotype modulation in primary cultures of smooth-muscle cells from rat aorta. Synthesis of collagen and elastin. Differentiation. 1986; 32(2): 173-80.

Skalli O, Bloom WS, Ropraz P, Azzarone B, Gabbiani G. Cytoskeletal remodeling of rat aortic smooth muscle cells in vitro: relationships to culture conditions and analogies to in vivo situations. *J Submicrosc Cytol*. 1986; 18(3): 481-93.

Somlyo AP, Somlyo AV. Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev*. 2003; 83(4): 1325-58.

Song K, Kurobe Y, Kanehara H, Wada T, Inada Y, Nishikawa K, Miyazaki M. Mapping of angiotensin II receptor subtypes in peripheral tissues of spontaneously hypertensive rats by in vitro autoradiography. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl*. 1995; 22(1): S17-9.

Su JZ, Fukuda N, Jin XQ, Lai YM, Suzuki R, Tahira Y, Takagi H, Ikeda Y, Kanmatsuse K, Miyazaki H. Effect of AT₂ receptor on expression of AT₁ and TGF- β receptors in VSMCs from SHR. *Hypertension*. 2002; 40(6): 853-8.

Takahashi K, Hiwada K, Kokubu T. Isolation and characterization of a 34,000-dalton calmodulin- and F-actin-binding protein from chicken gizzard smooth muscle. *Biochem Biophys Res Commun*. 1986; 141(1): 20-6.

Takahashi K, Hiwada K, Kokubu T. Occurrence of anti-gizzard P34K antibody cross-reactive components in bovine smooth muscles and non-smooth muscle tissues. *Life Sci*. 1987; 41(3): 291-6.

Takahashi T, Taniguchi T, Konishi H, Kikkawa U, Ishikawa Y, Yokoyama M. Activation of Akt/protein kinase B after stimulation with angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol*. 1999; 276(6 Pt 2): H1927-34.

Tamajusuku AS, Carrillo-Sepulveda MA, Braganhol E, Wink MR, Sarkis JJ, Barreto-Chaves ML, Battastini AM. Activity and expression of ecto-5'-nucleotidase/CD73 are increased by thyroid hormones in vascular smooth muscle cells. *Mol Cell Biochem*. 2006; 289(1-2): 65-72.

Thyberg J, Palmberg L, Nilsson J, Ksiazek T, Sjolund M. Phenotype modulation in primary cultures of arterial smooth muscle cells. On the role of platelet-derived growth factor. *Differentiation*. 1983; 25(2): 156-67.

Touyz RM, He G, Deng LY, Schiffrin EL. Role of extracellular signal-regulated kinases in angiotensin II-stimulated contraction of smooth muscle cells from human resistance arteries. *Circulation*. 1999; 99(3): 392-9.

Touyz RM, Schiffrin EL. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev*. 2000; 52(4): 639-72.

Touyz RM, He G, El Mabrouk M, Diep Q, Mardigyan V, Schiffrin EL. Differential activation of extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 and p38 mitogen activated-protein kinase by AT1 receptors in vascular smooth muscle cells from Wistar-Kyoto rats and spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 2001; 19(3 Pt 2): 553-9.

Tsutsumi Y, Matsubara H, Masaki H, Kurihara H, Murasawa S, Takai S, Miyazaki M, Nozawa Y, Ozono R, Nakagawa K, Miwa T, Kawada N, Mori Y, Shibasaki Y, Tanaka Y, Fujiyama S, Koyama Y, Fujiyama A, Takahashi H, Iwasaka T. Angiotensin II type 2 receptor overexpression activates the vascular kinin system and causes vasodilation. *J Clin Invest*. 1999; 104(7): 925-35.

Tsuzuki S, Matoba T, Eguchi S, Inagami T. Angiotensin II type 2 receptor inhibits cell proliferation and activates tyrosine phosphatase. *Hypertension*. 1996; 28(5): 916-8.

Utsunomiya H, Nakamura M, Kakudo K, Inagami T, Tamura M. Angiotensin II AT2 receptor localization in cardiovascular tissues by its antibody developed in AT2 gene-deleted mice. *Regul Pept*. 2005; 126(3): 155-61.

Viswanathan M, Tsutsumi K, Correa FM, Saavedra JM. Changes in expression of angiotensin receptor subtypes in the rat aorta during development. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991; 179(3): 1361-7.

Voyta JC, Via DP, Butterfield CE, Zetter BR. Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated-low density lipoprotein. *J Cell Biol*. 1984; 99(6): 2034-40.

Walsh MP. Regulation of vascular smooth muscle tone. *Can J Physiol Pharmacol*. 1994; 72(8): 919-36.

Wang DH, Prewitt RL, Beebe SJ. Regulation of PDGF-A: a possible mechanism for angiotensin II-induced vascular growth. *Am J Physiol*. 1995; 269(1 Pt 2): H356-64.

Watanabe M, Oike M, Ohta Y, Nawata H, Ito Y. Sustained contraction and loss of NO production in TGFbeta1-treated endothelial cells. *Br J Pharmacol*. 2006; 149(4): 355-64.

Weissberg PL, Cary NR, Shanahan CM. Gene expression and vascular smooth muscle cell phenotype. *Blood Press Suppl*. 1995; 2: 68-73.

Wheatley AM, Butkow N, Grote J, Musiker J, Rosendorff C. The effect of propranolol, verapamil and dantrolene treatment on cardiac hypertrophy, enhanced myocardial contractility and tachycardia in the hyperthyroid rat. *Pharmacol Res*. 1990; 22(3): 307-18.

Widdop RE, Jones ES, Hannan RE, Gaspari TA. Angiotensin AT2 receptors: cardiovascular hope or hype? *Br J Pharmacol*. 2003; 140(5): 809-24.

Winder SJ, Walsh MP. Calponin: thin filament-linked regulation of smooth muscle contraction. *Cell Signal*. 1993; 5(6): 677-86.

Winder SJ, Allen BG, Clement-Chomienne O, Walsh MP. Regulation of smooth muscle actin-myosin interaction and force by calponin. *Acta Physiol Scand*. 1998; 164(4): 415-26.

Wirth A, Benyo Z, Lukasova M, Leutgeb B, Wettschureck N, Gorbey S, Orsy P, Horvath B, Maser-Gluth C, Greiner E, Lemmer B, Schutz G, Gutkind JS, Offermanns S. G12-G13-LARG-mediated signaling in vascular smooth muscle is required for salt-induced hypertension. *Nat Med*. 2008; 14(1): 64-8.

Worth NF, Rolfe BE, Song J, Campbell GR. Vascular smooth muscle cell phenotypic modulation in culture is associated with reorganisation of contractile and cytoskeletal proteins. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2001; 49(3): 130-45.

Xu J, Liu X, Jiang Y, Chu L, Hao H, Liua Z, Verfaillie C, Zweier J, Gupta K, Liu Z. MAPK/ERK signalling mediates VEGF-induced bone marrow stem cell differentiation into endothelial cell. *J Cell Mol Med*. 2008; 12(6A): 2395-406.

Yamamoto K, Ohishi M, Ho C, Kurtz TW, Rakugi H. Telmisartan-Induced Inhibition of Vascular Cell Proliferation Beyond Angiotensin Receptor Blockade and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Activation. *Hypertension*. 2009.

Yan C, Kim D, Aizawa T, Berk BC. Functional interplay between angiotensin II and nitric oxide: cyclic GMP as a key mediator. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23(1): 26-36.

Yen PM. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev*. 2001; 81(3): 1097-142.

Ying Z, Jin L, Palmer T, Webb RC. Angiotensin II up-regulates the leukemia-associated Rho guanine nucleotide exchange factor (RhoGEF), a regulator of G protein signaling domain-containing RhoGEF, in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol*. 2006; 69(3): 932-40.

Zargham R, Thibault G. Alpha 8 integrin expression is required for maintenance of the smooth muscle cell differentiated phenotype. *Cardiovasc Res*. 2006; 71(1): 170-8.

Zhu Z, Arendshorst WJ. Angiotensin II-receptor stimulation of cytosolic calcium concentration in cultured renal resistance arterioles. *Am J Physiol*. 1996; 271(6 Pt 2): F1239-47.

Zhuo J, Moeller I, Jenkins T, Chai SY, Allen AM, Ohishi M, Mendelsohn FA. Mapping tissue angiotensin-converting enzyme and angiotensin AT1, AT2 and AT4 receptors. *J Hypertens*. 1998; 16(12 Pt 2): 2027-37.