KATIA APARECIDA DA SILVA VIEGAS

**“AÇÃO DA ANGIOTENSINA II NO REMODELAMENTO DA
MATRIZ EXTRACELULAR PERIVASCULAR EM
CAMUNDONGOS”**

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

São Paulo
2012

KATIA APARECIDA DA SILVA VIEGAS

**“AÇÃO DA ANGIOTENSINA II NO REMODELAMENTO DA MATRIZ
EXTRACELULAR PERIVASCULAR EM CAMUNDONGOS”**

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

Área de Concentração: Ciências Morfofuncionais.

Orientadora: Profª Drª Silvia Lacchini

Versão original

São Paulo
2012

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

© reprodução total

Viegas, Katia Aparecida da Silva.

Ação da Angiotensina II no remodelamento da matriz extracelular
perivascular em camundongos / Katia Aparecida da Silva Viegas. --
São Paulo, 2012.

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: Sistema Renina-
Angiotensina e Lesão Muscular.

Versão do título para o inglês: Action of angiotensin II in perivascular
extracellular matrix remodeling in mice.

1. Angiotensina II 2. Matrix Extracelular 3. Vasos sanguíneos
4. Remodelamento vascular 5. Sinalização Intracelular 6. Receptores
de Angiotensina I. Lacchini, Profa. Dra. Silvia II. Universidade de São
Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação
em Ciências Morfofuncionais III. Título.

ICB/SBIB0116/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Katia Aparecida da Silva Viegas.

Título da Tese: Ação da Angiotensina II no remodelamento da matriz extracelular perivascular 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 - telefax : (55) (011) 3091 7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA.44.10
NOSC/mcgn

São Paulo, 28 de julho de 2010.

REF.: Protocolo nº111/07.

"Ação da angiotensina II no remodelamento da matriz extracelular perivascular em camundongos"

Prezada Professora,

Informo que a sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, **foi prorrogada até 22.11.2013.**

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA/ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

Prof. Dr. NIELS OLSEN SARAIVA CÂMARA
Vice-Coordenador da Comissão de Ética
no Uso de Animal - ICB /USP

Ilma.Sra.

Profa Dra. SILVIA LACCHINI

Departamento de Anatomia

Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Àquele que sempre teve muito orgulho dos meus estudos...

Que na sua simplicidade, quando eu terminei a graduação em Biologia, falava para os seus conhecidos: - Agora eu tenho uma filha professora!

E, com a mesma simplicidade - apesar de não entender direito o que é que eu fazia - o ouvi dizer a uma pessoa: - Minha filha vai ser doutora!

Pai, sei que a distância nos impediu de viver tanta coisa, mas nos poucos instantes em que estava contigo tudo era festa. Até as coisas mais difíceis ficavam leves quando nos encontrávamos...

...e foi num momento bem difícil da minha vida o nosso último encontro.

Pai, queria que sua morte tivesse sido mais um daqueles “causos mentirosos” de pescador que você contava, mas infelizmente não foi.

E você foi me pregar essa peça bem no fim da minha tese? Quis fazer igual a minha avó que me pregou na véspera da minha seleção para o Doutorado?

E como me lembro de você me falar ao telefone naquele dia da ida da minha avó, sua mãe:
- Você não vai perder a prova do doutorado, pois sua avó ficaria triste. Vá fazer a prova e ela estará no céu te ajudando! Ela sempre sentiu orgulho de você!

A você, meu querido e saudoso pai, dedico este trabalho.

(Francisco da Silva Viegas - 04/08/1955 – 14/06/2012)

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ela fez tudo para que eu conseguisse fazer o Doutorado e chegar até a conclusão. Muitas foram as vezes em que tive vontade de desistir por causa dos percalços da minha vida!! Mas ela estava sempre pronta, com palavras de ânimo, para não deixar que isso acontecesse. Ajudou-me em tudo!!! Tivemos ótimos e péssimos momentos, vitórias e fracassos, boas conversas e algumas discussões. Mas tudo, sem tirar nem pôr, valeu muito a pena! A você, mestre e amiga, orientadora em todas as situações que passei nestes 6 anos... As palavras são simples e contam muito pouco do que eu gostaria de falar, mas como sempre te digo: minha admiração, respeito e gratidão serão prá vida toda! Meu agradecimento especial a você **Sílvia Lacchini** que foi um anjo que Deus me enviou.

À minha querida amiga, companheira de todas as horas, **Thaís Cristina de Souza-Oliveira**, por me ensinar que posso ter amiga de verdade no trabalho (uma raridade que eu encontrei em você), por me ensinar que o camundongo não é um bicho tão indomável assim (rs!!), por ajudar em tudo que precisei, por ser minha cúmplice na bancada (quanto sofrimento com as imunohistoquímicas que não davam certo!), por se alegrar comigo, por chorar comigo, por sofrer o meu sofrimento, por me acolher em sua casa, por me escolher como irmã... amiga (já estou em lágrimas)... escreveria um capítulo todo nesta tese em agradecimento a você!!! Há um provérbio que diz: “Existem amigos mais chegados que irmãos”; você é assim prá mim!

Minha inspiração, minha força, minha razão de estar viva. Meu respirar, meu sonhar, minha esperança, meu tudo... a você **Miguel**, meu querido e amado filho, agradeço por ter suportado desde quando estava no meu ventre todas as viagens, todos os compromissos, todo o meu cansaço e também meu estresse. Agradeço, porque além de Deus, foi você quem esteve comigo em tudo. Obrigada por aguentar os momentos distantes. Essa vitória é prá você, meu príncipe, meu amor! Te amo até o arco-íris!

A minha mãe, **Creusa**, e ao meu irmão **Robson**, obrigada pelo apoio, por me ajudar com o Miguel em todas as vezes que precisei, por batalharem junto comigo este sonho. Por suportarem mais do que tinham a obrigação de suportar... Apesar de todas as dificuldades vencemos!

A você querido **Davi Ricardo Reche Nunes**, pai do meu filho, por me fazer perceber que um obstáculo pode virar uma ponte quando a gente tem determinação. É uma pena que você não suportou até o fim a minha caminhada, mas sou grata por tudo o que vivemos juntos...

Aos avós paternos do Miguel, **D. Cidinha e Sr. Joaquim**, obrigada pelo apoio nestes anos.

Àquele que até aqui me sustentou. Fez-me tirar forças de onde não existia mais. Que me deu a mão quando tudo desmoronava... Que foi fiel comigo em tudo. Meu amigo quando muitos me viraram as costas. Meu **Deus**, meu protetor, meu porto seguro.

AGRADECIMENTOS

A FAPESP- Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2007/58208-5) pelo subsídio dado na forma de bolsa de Doutorado e Reserva Técnica.

Ao diretor do Instituto de Ciências Biomédicas, Profº Dr. Ruy Curi.

Ao Chefe do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas/USP, Profº Dr. Edson Ap. Liberti, pela confiança, pela amizade, pelo apoio, por todas as palavras de incentivo e sabedoria com as quais me presenteou. Mais que um grande mestre da Anatomia, és um ser humano especial. Prá mim um privilégio poder dizer que conheço este “Anatomossauro”!!!

À Coordenação do curso de Pós-graduação em Ciências Morfofuncionais, na pessoa da Profª Drª Maria Luíza Moraes Barreto-Chaves e do Profº Dr. Newton Sabino Canteras, pela oportunidade de cursar o Doutorado neste programa.

A todos os professores do Departamento de Anatomia, ICB/USP, os quais tive a oportunidade de conhecer e partilhar alguns momentos, em especial às Professoras Cecília Helena de Azevedo Gouveia Ferreira e Patrícia Castelucci pela amizade.

A vocês queridas e “insubstituíveis” Nara Baptistella Rabechi, Camila de Jesus Piva e Juliane Cristina S. Silva, que me ensinaram o quanto é bom e valioso repassar o conhecimento que o tempo na labuta nos dá de presente. Onde eu estiver nunca me esquecerei de vocês, pois são mais que especiais prá mim! Obrigada pela amizade e por fazer valer a pena ensinar!

A Cíntia Taniguti Lima, pela amizade e por me ensinar que o camundongo é menor que eu (é!!!) e por isso eu posso com ele!! Sem isso não teria saído nenhum experimento! (rs!)

Ao pessoal do laboratório Tatiane Evelyn Barboza, Tatiana Alves, Júnior (Álvaro Batista Martins), André Santana, Bárbara Lobo pela amizade e companheirismo, e àqueles que já passaram por este laboratório no período em que aqui trabalhei.

Aos alunos da Profª Drª Patrícia Castelucci: Kelly Palombit, Cristina Eusébio Mendes, Márcia Mizuno pela amizade nestes anos e por dividirem o dia-a-dia no laboratório. Obrigada pelo apoio, pelas conversas, pelas risadas e pelos choros!!! Cris, muito obrigada pela elaboração da figura das vias de sinalização! Tornou esta parte da minha tese bem mais clara prá todos!!!

Aos amigos do LAFACC-Laboratório de Anatomia Funcional Aplicada à Clínica e Cirurgia (Profº Dr. Edson Ap. Liberti), pela amizade, pelo apoio, pelas conversas agradáveis.

A Márcia Mizuno agradeço pela amizade, pelas emoções que dividimos uma com a outra nos momentos mais difíceis que passamos neste período. Não preciso nem detalhar aqui, pois você e eu sabemos... Você é uma pessoa que foi se tornando especial prá mim com o passar destes anos de convivência. Obrigada por todo o apoio e pelas palavras de conforto no meio das minhas dificuldades pessoais!

A Cristiane Cabral Costa agradeço por cruzar o meu caminho e entrar na minha vida tão sutilmente e com tanto carinho, que parece que faz parte dela há muito tempo. Em tão pouco tempo de amizade ganhou meu coração! E ainda me trouxe uma vovó de presente (a vó Nice). Obrigada por ser este presente de Deus prá mim... especial e querida!

A Gisele Miyamura Martins, pela amizade, pelas vezes que me acolheu em sua casa nestes últimos meses e pelas caronas de São Manuel para São Paulo. Obrigada por me tratar com tanto carinho.

A Marília Bianca Cruz Grecco Teixeira (Mabi), pela amizade, pelo apoio, pelo carinho.

A Aline Marosti Bobna (Monalisa!!!) pela amizade, por ouvir meus desabafos e pelos anos de convivência alegres no laboratório. Obrigada por tornar os dias no laboratório mais angelicais com tua presença. Você fez falta nestes últimos meses!

Ao querido Marcos Vinicius da Silva, pela amizade, pelas ótimas conversas sobre espíritos, sonhos, Deus, etc... que tivemos neste tempo; por me alegrar e também enxugar minhas lágrimas muitas vezes. Sempre estarei torcendo por você, pois és um amigo amado e admirável!

A querida Renatinha Juliana da Silva (do laboratório do Profº Jackson) pela amizade, pelo apoio, pelas divertidas discussões sobre jogos de futebol no facebook! Você conquistou um lugar especial no meu coração. Te admiro! Sua garra é incrível!

A Sílvia Honda Takada, pela amizade, pelas conversas sobre filhos, por todo apoio!

Ao pessoal do laboratório da Profª Drª Maria Luíza M. Barreto-Chaves pelo auxílio ao tirar nossas dúvidas sobre Western Blot, em especial a Priscilla de Souza Monteiro, Caroline Emy Shibata e Ana Paula C. Takano, Caroline Antunes Lino, pela amizade.

A todos os colegas do curso de Pós-graduação em Ciências Morfofuncionais do Departamento de Anatomia, ICB/USP.

Aos técnicos do Biotério Ricardo Bandeira (Tevez, Sheilinha, Bombril...), Fábio França Lucas, Renivaldo Souza e Alessandro Rodrigo Martins, obrigada pela amizade e pelo apoio com os camundongos. Em especial agradeço ao Ricardo pelo apoio, por aguentar meus desabafos e, claro, por me emprestar um colchonete para eu não dormir no chão do laboratório!!!

Aos funcionários Marta Mª da Silva Righetti (Martinha), Sônia Regina Yokomizo, Sebastião Ap. Boleta. Martinha, muito obrigada por tirar minhas dúvidas nas técnicas de histologia.

A Joelcimar Martins (a Jô do laboratório do Prof. Jackson) pela amizade, pelos momentos de desabafo e conversas sobre nossos filhos.

A querida Patrícia Rodrigues de Campos Rocha, Secretária da Pós, pela paciência nestes anos em tirar nossas dúvidas e nos atender com tanta gentileza e tratar nossos assuntos com dedicação. Obrigada também pela amizade!

Às funcionárias Cristiane V. Pinheiro Maciel e Luciana Monteiro pela amizade e pela gentileza com a qual sempre nos atendeu na secretaria do departamento.

A Cristina Freire pela amizade e por toda atenção dada quando das complicadas compras e uso de recursos financeiros. Só você Cris para salvar a gente nestas horas de lidar com o \$\$\$!!!

Cema e Sr Adonil pelos cafezinhos e boas conversas.

A Profª Drª Maria Claudia Irigoyen, do Laboratório de Hipertensão Experimental do InCor-Instituto do Coração, pela amizade, pelos bons conselhos durante algumas de nossas conversas e por nos ceder espaço para trabalhar no seu laboratório durante as medições de pressão arterial dos animais e ao funcionário Leandro Souza por realizar as medidas de pressão.

Ao Profº Dr. José Eduardo Krieger e Ayumi Miyakawa, do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por nos permitir usar a estrutura de seu laboratório para realização da técnica de Western Blot.

A Luciene Cristina Gastalho Campos e Valério Garrone Baraúna (Jaú), do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo do Instituto do Coração (InCor), por todo o apoio e dedicação na realização do Western Blot.

Profº Dr. Luciano Figueiredo Borges (ICB/Universidade Federal de Minas Gerais) e seu orientado João Blindi, pela amizade e pelos ensinamentos sobre a técnica de Imuhistoquímica.

Ao Giuliano Oliveira, marido da minha amiga Thaís, por me acolher na casa de vocês e pela gentileza com a qual sempre me tratou.

A Maristela Caffaro Samaan, querida Psicóloga (Bragança Paulista/SP), que num dos momentos mais duros da minha vida me ouviu, me acolheu, me apoiou, me ajudou a levantar muitas vezes durante a terrível “doença da alma” que passei!

A querida amiga Patrícia C. Rocha e seu marido, meu mestre na graduação, Prof. Dr. Guaracy Tadeu Rocha, pelo apoio durante todos estes anos da minha vida. Obrigada por serem meus amigos!

A amiga e mestre na minha graduação, Profª Drª Maria José Queiroz (Zezé), pela amizade e apoio nestes últimos meses do meu Doutorado nos quais tivemos a oportunidade de nos encontrarmos em alguns trabalhos. É sempre muito bom reencontrá-la!

A Profª Drª Sílvia de Campos Boldrini (*in memoriam*) pela amizade, pelo respeito, pela bondade, pelo sorriso inesquecível...

A minha querida amiga de infância, Mônica Ap. dos Santos, pelo companheirismo, pelo apoio, por me ajudar a passar os momentos mais difíceis da minha vida. Em todos você estava lá! Aliás, você sempre está por perto quando preciso! Ninguém me suportou tanto quanto você me suporta! Não vou contar os anos... são muitos... sou grata a Deus por me presentear com sua amizade. Eu amo muito você!

Aos meus amigos e irmãos, presentes de Deus pra mim, Matheus Matias e Valéria Urbano Matias, Zelma Novembrini e seu marido Branco, Pastor Claudemir e sua esposa Lilian, Silvino Silva, Viviane Bottaro, Letícia Roda, e todos meus queridos irmãos da 2ª Igreja do Evangelho Quadrangular, São Manuel/SP, pelo apoio em palavras, orações e tudo mais que tive o prazer de compartilhar com vocês no final do Doutorado.

A Tereza Cristina Soutto Mayor, bibliotecária da Biblioteca do ICB/USP, pela dedicação e agilidade com a qual revisou minha tese. Muito obrigada por ter sido tão gentil, atenciosa e carinhosa comigo!

A todas as pessoas que participaram direta ou indiretamente deste trabalho e por falha de memória não tenham sido citadas aqui. Deus abençoe a todos!!!

*“Não basta ensinar ao homem uma especialidade,
porque se tornará assim uma máquina utilizável
e não uma personalidade.
É necessário que adquira um sentimento, senso
prático daquilo que vale a pena ser empreendido,
daquilo que é belo, do que é moralmente correto.”*

Albert Einstein

RESUMO

VIEGAS, K. A. S. **Ação da Angiotensina II no remodelamento da matriz extracelular perivascular em camundongos**. 2012. 108 f. Tese (Doutorado em Ciências Morfofuncionais) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Neste estudo avaliou-se a ação da Angiotensina II (Ang II) e do bloqueio dos seus receptores AT₁ e AT₂ no remodelamento da matriz extracelular (MEC) e traçamos o perfil da sinalização intracelular envolvida no processo. O estudo foi feito *in vivo* em camundongos isogênicos C57Bl/6J submetidos a tratamento durante 7 e 14 dias com doses subpressoras de Angiotensina II, bloqueador do receptor AT₁ (Losartan), e uma combinação destes. Após este período, os animais foram sacrificados e procedeu-se a coleta de tecidos de artérias (aorta, carótida e femoral), coração, rins e pulmão para análise da síntese e degradação de componentes da MEC. Foram feitas avaliações hemodinâmicas, morfológicas em microscopia de luz, morfométricas, imunohistoquímicas para os componentes da matriz extracelular: colágeno (tipos I, III, IV e VI), fibronectina, tenascina-C, elastina, metaloproteinases (tipos 2 e 9), e quantificação de algumas proteínas ligadas à sinalização intracelular da via das Proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK - Mitogen-activated protein kinases) usando-se Western Blotting.

Palavras-chave: Angiotensina II. Matriz extracelular vascular. Remodelamento vascular. Sinalização intracelular.

ABSTRACT

VIEGAS, K. A. S. **Action of angiotensin II in perivascular extracellular matrix remodeling in mice.** 2012. 108 p. Ph.D. Thesis (Morphological Sciences) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

In this study we evaluated the action of Angiotensin II (Ang II) and the blockade of AT1 and AT2 receptors in the remodeling of extracellular matrix (ECM) and outlines the process involved in intracellular signaling. The study was done in vivo in C57Bl/6J inbred mice undergoing treatment for 7 and 14 days subpressor doses of Angiotensin II, AT1 receptor blocker (losartan) and a combination thereof. After this period, the animals were sacrificed and proceeded to collect tissues of arteries (aorta, carotid and femoral arteries), heart, kidneys and lungs for analysis of the synthesis and degradation of ECM components. We assessed hemodynamic, morphological light microscopy, morphometry, immunohistochemistry for extracellular matrix components: collagen (types I, III, IV and VI), fibronectin, tenascin-C, elastin, metalloproteinases (types 2 and 9) and quantification of some proteins related to intracellular signaling pathways of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) using Western Blotting.

Keywords: Angiotensin II. Vascular Extracellular Matrix. Vascular remodeling. Intracellular Signaling.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema mostrando a cascata enzimática clássica do Sistema Renina-Angiotensina.....	19
Figura 2 – Estrutura da matriz extracelular com alguns de seus componentes.....	23
Figura 3 – Minibomba osmótica Alzet® utilizada nos experimentos em corte longitudinal para mostrar esquematicamente o seu funcionamento.....	35
Figura 4 – Preparação da minibomba osmótica.....	36
Figura 5 – Implante cirúrgico da minibomba osmótica no camundongo.....	36
Figura 6 – Esquema do sistema de medida de pressão caudal utilizado indireta nos experimentos.....	38
Figura 7 – Esquema de procedimentos histológicos e análises microscópicas.....	40
Figura 8 – Fotografia do histotécnico utilizado para processamento dos tecidos estudados em microscopia de luz e imunohistoquímica.....	40
Figura 9 – Esquema de uma artéria em corte transversal.....	42
Figura 10 – Disposição dos cortes histológicas na lâmina para realização de Imunohistoquímica.....	46
Figura 11 – Avaliação da Pressão Arterial indireta.....	52
Figura 12 – Avaliação da Frequência Cardíaca.....	52
Figura 13 – Avaliação direta da Pressão Arterial Média.....	53
Figura 14 – Avaliação direta da Frequência Cardíaca média	53
Figura 15 – Peso Corporal dos animais tratados durante 7 e de 14 dias.	54
Figura 16 – Peso relativos do coração nos grupos estudados após 7 e 14 dias.	54
Figura 17 – Peso relativo dos pulmões nos grupos estudados após 7 e 14 dias.	55
Figura 18 – Peso relativos dos rins nos grupos estudados após 7 e 14 dias.	56
Figura 19 – Razão entre área de colágeno perivascular e área da média em artérias do coração.....	57
Figura 20 – Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de artérias do coração de animais mostrando a deposição do colágeno perivascular.....	58
Figura 21 – Fotomicrografias representativas de artérias do coração, coradas com Picrossirius, e avaliadas sob luz polarizada.....	58
Figura 22 – Relação entre área de colágeno perivascular e área da média em artérias do pulmão.....	59
Figura 23 – Fotos representativas da deposição do perivascular em artérias do pulmão.....	59
Figura 24 – Relação entre área de colágeno perivascular e área da média em artérias dos rins.....	60

Figura 25 – Avaliação da espessura da camada média das artérias do coração.....	61
Figura 26 – Gráfico mostrando a relação entre área de colágeno perivascular e área da média na aorta.....	61
Figuras 27 – Fotomicrografias representativas da aorta coradas com Picrossirius.....	62
Figura 28 – Avaliação da espessura da camada média da aorta.....	63
Figura 29 – Gráfico mostrando o escore de marcação para colágeno IV em artérias do coração.....	64
Figura 30 – Fotos representativas da marcação imunohistoquímica de Colágeno IV em artérias do coração.....	65
Figura 31 – Fotos representativas da marcação imunohistoquímica de Colágeno IV em capilares do coração.....	65
Figura 32 – Gráfico do escore de marcação de colágeno VII em artérias do coração.....	66
Figura 33 – Fotos representativas da marcação imunohistoquímica de Colágeno VII em artérias do coração.....	66
Figura 34 - Fotomicrografia representativa da marcação imunohistoquímica de colágeno VII em capilares do coração.....	67
Figura 35 – Gráfico do escore de marcação de Fibronectina em artérias do coração.....	68
Figura 36 – Fotomicrografia representativa da marcação de Fibronectina em artérias do coração.....	69
Figura 37 – Gráfico do escore de marcação de Tenascina-C em artérias do coração.....	70
Figura 38 – Fotomicrografia representativa da marcação de Tenascina-C em artérias do coração.....	70
Figura 39 – Gráfico do escore de marcação de Metaloproteinase do tipo 2 (MMP-2) em artérias do coração.....	71
Figura 40 – Fotomicrografias representativas mostrando a marcação de MMP-2 em artérias do coração.....	72
Figura 41 – Gráfico do escore de marcação de Metaloproteinase do tipo 9 (MMP-9) em artérias do coração.....	73
Figura 42 – Fotomicrografias representativas da marcação imunohistoquímica de MMP-9 em artérias do coração.....	73
Figura 43 – Gel mostrando as bandas de GAPDH (proteína normalizadora) nos diferentes tratamentos e períodos estudados.....	74
Figura 44 – Gráfico mostrando a expressão de PAK total (68kDa) nos diferentes tratamentos e períodos no coração.....	75
Figura 45 – Gráfico mostrando a expressão de p-thr-PAK (68kDa) no coração.....	76
Figura 46 – Gráfico mostrando a expressão de PAK fosforilada em serina (68kDa) nos diferentes tratamentos e períodos no coração.....	77
Figura 47 – Gráfico mostrando a expressão de MEK total (45kDa) nos diferentes tratamentos e períodos no coração.....	78

Figura 48 – Gráfico mostrando a expressão de p-thr-MEK total (45kDa) nos diferentes tratamentos e períodos no coração.....	79
Figura 49 – Gráfico mostrando a expressão de Phospho-JNK nos diferentes tratamentos e períodos no coração.....	80
Figura 50 – Gráfico mostrando a expressão de p38 nos diferentes tratamentos e períodos no coração.....	81
Figura 51 – Membrana mostrando a expressão de p38 fosforilada nos diferentes tratamentos e períodos no coração.....	81
Figura 52 – Membrana mostrando a expressão de ERK total nos diferentes tratamentos e períodos no coração.....	82
Figura 53 – Membrana mostrando a expressão de ERK fosforilada total nos diferentes tratamentos e períodos no coração.....	83

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Proteínas da MEC vascular estudadas por Imunohistoquímica e suas respectivas funções básicas.....	43
TABELA 2 – Anticorpos primários, recuperação antigênica e diluições utilizadas para marcação Imunohistoquímica de proteínas da MEC vascular.....	45
TABELA 3 – Anticorpos secundários (AC2º) e diluições utilizados na Imunohistoquímica.....	46
TABELA 4 – Descrição do significado do escore da marcação Imunohistoquímica.....	47
TABELA 5 – Anticorpos utilizados para o Western Blotting.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ang II – Angiotensina II
AT1 – receptor 1 de Angiotensina II
AT2 – receptor 2 de Angiotensina II
ECA – enzima conversora de Angiotensina I
Los – Losartan (inibidor do receptor AT1)
Contr – Controle
DAB – 3,3 diaminobenzidina
FC – frequência cardíaca
PAS – pressão arterial sistólica
HE – hematoxilina-eosina
IHQ – imunohistoquímica
H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
PBS – Tampão Fosfato de Sódio
SRA – Sistema Renina Angiotensina
MEC – Matriz Extracelular
COL – Colágeno
FBN – Fibronectina
TN-C – Tenascina-C
MMPs – Metaloproteinases
WB – Western Blotting
MAPK – Mitogen-activated protein kinases (Proteína quinase ativada por mitógenos)
PAK – p21-activated kinases (Quinase ativada pela proteína 21)
p-thr-PAK – PAK fosforilada em treonina
p-ser-PAK – PAK fosforilada em serina
MEK – Mitogen extracellular kinase (Quinase ativada por mitógenos extracelulares)
p-thr-MEK – MEK fosforilada em treonina
p-JNK – JNK (c-Jun N-terminal kinases) fosforilada
p38 – Mitogen-activated protein kinases 38 (Quinase ativada pela proteína 38)
phospho p-38 – p38 fosforilada
ERK – Extracellular signal-regulated kinases (Quinase regulada por sinal extracelular)
p-ERK – ERK fosforilada
GAPDH – Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1 Sistema Renina-Angiotensina (SRA).....	19
2.2 Ação não-hemodinâmica da Angiotensina II.....	21
2.3 Matriz extracelular: principais componentes e função.....	21
2.4 Evidências da ação do Sistema Renina-Angiotensina sobre a matriz extracelular (MEC) e Remodelamento da MEC Vascular.....	25
2.5 Interação matriz-célula, sinalização intracelular e atuação da Angiotensina II nas vias de sinalização.....	27
3 JUSTIFICATIVA.....	31
4 OBJETIVOS.....	32
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
5.1 Animais e manutenção.....	34
5.2 Grupos e tratamentos.....	34
5.3 Experimentos.....	37
5.4 Avaliação Hemodinâmica.....	37
5.5 Perfusão e coleta dos Tecidos.....	38
5.6 Avaliação do peso relativo de coração, rins e pulmão.....	39
5.7 Microscopia de Luz (ML) e Morfometria.....	39
5.8 Imunohistoquímica (IHQ).....	43
5.9 Western Blotting.....	47
5.10 Análise Estatística dos Resultados.....	49
6 RESULTADOS.....	51
6.1 Medidas de parâmetros hemodinâmicos: Pressão Arterial (PA) de cauda e Frequência Cardíaca (FC).....	52
6.2 Análise Morfométrica para verificação de hipertrofia ou edema.....	54
6.3 Quantificação das fibras de colágeno para verificação de deposição de colágeno perivascular em artérias do coração, rins, pulmão e aorta.....	57
6.4 Imunohistoquímica de componentes da matriz extracelular.....	64
6.5 Western Blotting de proteínas relacionadas às vias de sinalização intracelular.....	74
7 DISCUSSÃO.....	85
8 CONCLUSÕES.....	92
REFERÊNCIAS.....	94
APÊNDICES.....	101
APÊNDICE A -Dados parciais: colágeno perivascular nas artérias femoral e carótida.....	102
APÊNDICE B – Avaliação qualitativa do componente elástico vascular.....	106
ANEXO.....	107
ANEXO A – Representação gráfica da via de sinalização das MAPKs.....	108

*Introdução e
Revisão da Literatura*

1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares têm sido a principal causa de morbidade e mortalidade na sociedade ocidental. No Brasil, em 2007, ocorreram 308.466 óbitos por doenças do sistema circulatório (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2010). Resultam, principalmente, em infarto do miocárdio e cerebral, aneurisma de aorta e doença vascular periférica, geralmente decorrente de arteriosclerose, que contribui para lesões degenerativas e espessamento e endurecimento (fibrose) da camada média de artérias, ou aterosclerose, doença de artérias elásticas, principalmente, coronárias, aorta, carótidas, grandes artérias cerebrais e periféricas, devido à deposição de gordura na luz (ROSS, 1995; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2010; VIEGAS; LACCHINI, 2008).

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

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Sistema Renina-Angiotensina (SRA)

No SRA clássico, há produção de Angiotensinogênio no fígado, que é clivado em Angiotensina I pela enzima Renina, sintetizada nos rins. Esta é hidrolisada à Angiotensina II (Ang II) pela Enzima Conversora de Angiotensina I (ECA1), produzida nos pulmões. A Ang II liga-se aos receptores AT1 ou AT2 nas células, mediando efeitos vasculares (**Figura 1**).

Figura 1 – Esquema mostrando a cascata enzimática clássica do Sistema Renina-Angiotensina.

As inúmeras funções do SRA têm sido descritas nos últimos anos, especialmente em modelos relacionados à regulação da pressão arterial. No entanto, a rápida expansão das técnicas de biologia molecular permitiu que os componentes do SRA fossem clonados e seqüenciados (DZAU et al., 1995), determinando a sua distribuição tecidual. Assim, a

definição endócrina clássica do SRA considera-o uma cascata enzimática, cujos componentes são produzidos em locais bem definidos, e tem como seu principal peptídeo efetor a Angiotensina II (Ang II). A Ang II, dentro do sistema endócrino, exerce suas ações em órgãos-alvo distantes do local de produção. Já a abordagem molecular trouxe a visão do SRA local ou de “sistemas renina-angiotensina teciduais” com funções autócrinas e parácrinas, não-hemodinâmicas, e cujos componentes são observados em muitos tecidos (CAT; TOUYZ, 2011; IRIGOYEN et al., 2005; KOBAYASHI; TAKEI, 1996; TAMURA et al., 1995).

A ativação do SRA vascular seguida à injúria ou disfunção endotelial tem papel importante na patogênese do remodelamento vascular e aterosclerose, verificando-se aumento da expressão de angiotensinogênio na camada média e na neoíntima de artérias após a injúria vascular por balão (RAKUGI et al., 1993). Além disso, encontrou-se forte associação entre o aumento da expressão da enzima conversora de angiotensina I (ECA) - enzima chave na cascata enzimática para a produção de angiotensina II - 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 (DeMEY, 1995), foi demonstrado que não ocorre a co-localização entre a Ang II e quimases, devendo a Ang II ser produzida por ação direta da ECA no processo aterosclerótico (OHISHI et al., 1999).

A ECA é importante na contratilidade da musculatura lisa vascular e também para o crescimento desta musculatura, contribuindo para o desenvolvimento da hiperplasia da íntima e hipertrofia da média (DZAU et al., 1995). No entanto, estudos clínicos apresentam discordância nas respostas, indicando tanto correlações positivas como negativas ou ausentes, com a prevalência das lesões, fazendo-se necessário mostrar uma relação causa-efeito entre a atividade da ECA e a formação da lesão inicial (neoíntima).

Neste sentido, um estudo recente em camundongos geneticamente modificados (contendo um número crescente de cópias do gene da ECA) e submetidos à lesão vascular mostrou 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 exatamente na região da lesão, aumentavam concomitantemente com o número de cópias do gene (LACCHINI et al., 2009).

2.2 Ação não-hemodinâmica da Angiotensina II

A Angiotensina II (Ang II), além de ser um hormônio que exerce um papel central na homeostase cardiovascular, regulando a vasoconstrição e a pressão arterial (TAUBMAN, 2003; WOLF et al., 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 (IRIGOYEN et al., 2005), e modulador 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 renais, podem-se postular os processos pelos quais a Ang II funcionaria como citocina pró-inflamatória no vaso, micro-ambiente normalmente afetado pelo SRA (IRIGOYEN et al., 2005). Ressalta-se que pacientes hipertensos apresentam aumento de moléculas de adesão no soro e em células inflamatórias (RUIZ-ORTEGA et al., 2001), fato que pode estar diretamente associado às ações inflamatórias da Ang II. Além disso, estudos recentes ampliam o conhecimento sobre eventos celulares mediados pela Ang II, sugerindo que seu papel biológico é amplo, indo de intracelular ao tecido ou ao sistema (CAT; TOUYZ, 2011; TAUBMAN, 2003).

A Ang II também foi identificada como um fator de aceleração de patologias cardiovasculares, como a aterosclerose, através de seu efeito sobre a síntese de colesterol por macrófagos (KEIDAR, 1999).

2.3 Matriz extracelular: principais componentes e função

As macromoléculas que constituem a matriz extracelular (MEC) são produzidas localmente pelas células adjacentes, e estas por sua vez auxiliam na sua organização e nas propriedades físicas dos tecidos. Além disso, estas macromoléculas desempenham um papel complexo ativo na regulação do comportamento das células (ALBERTS et al., 2010).

Em condições normais, a perfusão tecidual é garantida pela capacidade dos vasos sanguíneos, especialmente as artérias, de adaptar o seu diâmetro, estrutura da parede vascular e a composição desta em resposta a uma série de estímulos. Tais estímulos levam ao modelamento e remodelamento de forma a manter a estabilidade entre fluxo e tensão de parede. A MEC dos vasos sanguíneos contribui significativamente para as propriedades físicas e biológicas que controlam o fluxo de sangue aos tecidos (FITZSIMMONS; SHANAHAN, 2002).

A parede de vasos normais consiste em três camadas: íntima, média e adventícia; cada qual contendo um tipo celular específico que produz MEC vascular e a integridade desta nas três camadas é essencial para a manutenção das propriedades físicas da vasculatura tais como estiramento, contração e compressão (FITZSIMMONS; SHANAHAN, 2002).

As propriedades elásticas das artérias dependem em grande parte dos componentes da MEC, especialmente a elastina e o colágeno, e da organização espacial destes com as células musculares lisas. Alterações nestes e em outros componentes da parede vascular, em consequência à lesão, estão associadas ao remodelamento arterial (GLAGOV et al., 2002).

O colágeno é o componente mais abundante da matriz extracelular e atua na manutenção da sua integridade e resistência à tensão da parede vascular (PLENZ et al., 2003), formando uma rede de sustentação tanto em vasos sanguíneos de humanos como de outros vertebrados (STHEBENS, 1996; VIEGAS et al., 2001; VIEGAS et al., 2004a; VIEGAS et al., 2004b). O genoma humano contém 42 genes distintos que codificam diferentes cadeias α de colágeno (ALBERTS et al., 2010) e diferentes combinações destes geram cerca de 28 tipos diferentes de colágenos (GORDON; HAHN, 2010). Destes, treze tipos são encontrados em vasos sanguíneos ou expressos por suas células (PLENZ et al., 2003), sendo o tipo I, III e IV predominantes (BOSMAN; STAMENKOVIC, 2003; ELLIOTT et al., 2005; LODISH et al., 2004). Durante o processo de aterogênese também tem sido identificada alta expressão do colágeno do tipo VIII (PLENZ et al., 2003).

A organização espacial das fibrilas de colágeno reflete interações entre estas e outros componentes da matriz, como por exemplo, os proteoglicanos, que formam um gel hidratado, semifluido, no qual estão embebidas as fibras protéicas da MEC (**Figura 2**), que interagem com o colágeno contribuindo para o turgor da MEC (ALBERTS et al., 2010).

Figura 2 – Estrutura da matriz extracelular com alguns de seus componentes.

FONTE: Cell Biology [http://jpkc.scu.edu.cn/ywwy/zbsw\(E\)/edetail4.htm](http://jpkc.scu.edu.cn/ywwy/zbsw(E)/edetail4.htm)

Além do colágeno, outros elementos da MEC interagem com as células adjacentes, como por exemplo, lamininas, elastina, fibronectina, tenascina e outras proteínas de adesão e, todos estes, atuam no processo de remodelamento. A laminina, por exemplo, é uma proteína que atua na adesão celular e é o principal componente da lâmina basal que suporta todo o epitélio e circunda alguns tipos de células não epiteliais; separa as células e o epitélio de camadas subjacentes, organiza as proteínas da membrana plasmática das células adjacentes e determina a polaridade celular, além de promover a sobrevivência, a proliferação, a migração e a diferenciação celular através da interação com as integrinas, via cadeia α (ALBERTS et al., 2010). A desregulação desta ligação é acompanhada por síntese aberrante de matriz, alteração na composição da cadeia α e modificação proteolítica de lâminas (BOSMAN; STAMENKOVIC, 2003).

Além disso, a manutenção da composição da lâmina basal é de extrema importância para a integridade dos tecidos, incluindo os vasos sanguíneos. Desta composição participam, além da laminina, o colágeno IV e nidogênio juntamente com perlecan, os quais, associados ao colágeno XVIII e à fibronectina (proteína fibrosa que adere as células do tecido conectivo a matriz), conferem a força tensora à lâmina basal (ALBERTS et al., 2010).

O componente elástico da MEC também é muito importante na composição estrutural dos vasos sanguíneos. Na estrutura das grandes artérias como a aorta, a elastina é o componente principal que responde pela elasticidade e distensão, propriedade fundamental na função cardiovascular, permitindo o fluxo sanguíneo adequado para a irrigação dos órgãos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; SONG; ROACH, 1985).

No entanto, em artérias de resistência, a elastina é o componente menos abundante (GONZÁLEZ et al., 2005), embora muito importante no estabelecimento de suas propriedades elásticas, no remodelamento e na progressão da hipertensão, aterosclerose e outras doenças cardiovasculares (BRIONES et al., 2003; FAURY et al., 2003; GONZÁLEZ et al., 2005).

Outra proteína importante e bastante estudada da matriz extracelular é a Tenascina (TN), capaz de modular a diferenciação, migração, proliferação e apoptose celular (BOSMAN; STAMENKOVIC, 2003; CHIQUET-EHRISMANN; CHIQUET, 2003). Esta proteína tem várias isoformas (TN-C, TN-W, TN-X, TN-Y, TN-R) sendo a mais estudada a TN-C, que é altamente expressa durante a organogênese, mas não em tecidos normais adultos. No entanto, a TN-C é expressa em cicatrização de ferimentos, neovascularização, e em condições patológicas como inflamações, infecções, doenças vasculares e na gênese de tumores (BOSMAN; STAMENKOVIC, 2003; CHIQUET-EHRISMANN; CHIQUET, 2003). É também encontrada em fibroblastos do miocárdio duas horas após angioplastia e em músculo liso arterial de ratos hipertensos (CHIQUET-EHRISMANN; CHIQUET, 2003).

A TN-C modula a adesão de células à fibronectina. No entanto, pode exercer papel anti-adesivo em determinados tipos celulares, pois impede a ligação de integrina do tipo $\alpha 5 \beta 1$ à fibronectina (CHIQUET-EHRISMANN; CHIQUET, 2003). Camundongos deficientes em fibronectina ou em seu receptor $\alpha 5 \beta 1$ morrem durante a embriogênese devido à organização defeituosa do coração e vasos sanguíneos (DANEN; SONNENBER, 2003). Portanto, a resposta celular à fibronectina é complexa e pode depender do contexto da sinalização local (LARSEN et al., 2006). Por ter restrita distribuição em tecidos normais adultos e ser expressa em situações patológicas a TN-C pode ser usada como um “marcador” em potencial para o estudo do remodelamento do tecido conjuntivo.

O remodelamento constante da MEC envolve quebras de seus componentes por proteases, principalmente, a família das metaloproteinases (MMPs) (BOSMAN; STAMENKOVIC, 2003; MOTT; WERB, 2004). Até o momento, 28 tipos de MMPs já foram identificados (GUPTA; PATIL, 2012), sendo importantes na clivagem de componentes da matriz, como a elastina, a fibronectina, os colágenos e laminina (McCawley; MATRISIAN, 2001; LODISH, 2004). Porém, as MMPs dos tipos 2 e 9 clivam colágenos e elastina e estão envolvidas no desenvolvimento da aterosclerose e do aneurisma cerebral (CAIRD et al., 2006) e hipertensão essencial não tratada (GKALIAGKOUSI et al., 2012). Variantes genéticas das MMPs atuam na aterosclerose da carótida e coronária (ABILLEIRA et al., 2006) e os níveis plasmáticos de MMP-9 em paciente com doença arterial coronária, pode ser um preditor de mortalidade (GKALIAGKOUSI et al., 2012).

Além dos componentes da MEC, as MMPs estão implicadas na regulação funcional de inúmeras outras moléculas não pertencentes à matriz, que incluem fatores de crescimento e seus receptores, citocinas e quimiocinas, receptores de adesão e uma variedade de enzimas. Portanto, as MMPs exercem um importante papel no controle de interações celulares em resposta às mudanças teciduais, sejam elas fisiológicas ou patológicas (McCAWLEY; MATRISIAN, 2001; STAMENKOVIC, 2003), tendo sido identificado, inclusive, seu papel no processo de apoptose celular (McCAWLEY; MATRISIAN, 2001; NEWBY, 2006; RIBEIRO et al., 2006).

2.4 Evidências da ação do Sistema Renina-Angiotensina sobre a matriz extracelular (MEC) e Remodelamento da MEC Vascular

Pesquisas apontam para os efeitos tróficos sobre o sistema cardiovascular como um dos mais importantes mecanismos de ação da Ang II, tendo efeitos diversos no crescimento de músculo liso (NAFTILAN, 1994; ROSS, 1999), gerando hipertrofia ou hiperplasia, independentemente de efeitos hemodinâmicos ou neurohumorais (DZAU et al., 1995) através da estimulação da síntese de pró-colágeno (CHEN; MEHTA, 2006) e colágeno ou a redução da sua degradação, bem como na proliferação e hipertrofia de vasos e do coração (IRIGOYEN et al., 2003). Além disso, a produção de Ang II se encontra aumentada na placa de ateroma, na aorta aterosclerótica e na reestenose após angioplastia ou implante de stent. No entanto, o antagonismo dos receptores de angiotensina (AT1) reduz a disfunção endotelial e o espessamento da íntima em vasos ateroscleróticos (OHISHI et al., 1997; RIBICHINI et al., 2000).

A MEC pode regular as propriedades das células embebidas nela e vice-versa, o que pode levar a alterações funcionais nas células vasculares do endotélio, túnica média, neoíntima e camada adventícia durante a aterogênese, podem contribuir para o remodelamento vascular. Este mecanismo ocorre principalmente através da ativação e migração de miofibroblastos adventiciais (McGRATH et al., 2005; SLOW; CHURCHMAN, 2007).

O desenvolvimento de fisiopatologias como a aterogênese, hipertensão e restenose, em consequência da estimulação trófica da parede vascular, promovida principalmente por ação da Ang II, provoca alterações estruturais vasculares, causadas por modificações na MEC vascular (MULVANY et al., 1996; NAFTILAN, 1994; ROSS, 1999; SIMON et al., 1998). Inicialmente, no sistema cardiovascular, as alterações estruturais da MEC são adaptativas em resposta às modificações hemodinâmicas a longo-prazo. No entanto,

subsequentemente, rearranjos nas células vasculares, principalmente, nas musculares lisas (McGRATH et al., 2005) por ação em receptores específicos, iniciam a modificação da composição estrutural da MEC (remodelamento), que conduz a alterações na túnica média do vaso e no diâmetro luminal (MULVANY et al., 1996), num processo denominado de “remodelamento vascular” (LÜSCHER; NOLL, 1995).

O remodelamento da matriz extracelular (MEC) é um processo dinâmico que envolve síntese protéica, atuação de moléculas do citoesqueleto e degradação proteolítica, e tem considerável importância na morfogênese, fibrose, reparo de tecido e desenvolvimento de tumores (LARSEN et al., 2006). O remodelamento da MEC vascular passa por três etapas: (1) detecção de mudanças hemodinâmicas e fatores humorais desencadeando (2) sinalização autócrina e parácrina com síntese, liberação e ativação de substâncias que influenciam o crescimento, morte ou migração celular, ou a composição da MEC resultando em (3) mudanças estruturais na parede vascular (GIMBRONE, 1999).

A Angiotensina II exerce um papel importante no processo de remodelamento vascular. A Ang II se liga a receptores de angiotensina na superfície celular, cujos subtipos mais bem estudados e caracterizados são dois receptores acoplados a proteína-G denominados AT1 e AT2 (ou AT₁R e AT₂R) (MURPHY et al., 1991; TOUYZ; SCHIFFRIN, 2000; CAT; TOUYZ, 2011). O receptor AT1 contribui consideravelmente para a produção de MEC durante estágios tardios do remodelamento após injúria vascular, sendo que a administração de Candesartan Cilexetil (ETO et al., 2003) e Losartan (ZHU; GAO, 2000) – bloqueadores do receptor AT₁– inibiu a deposição de colágeno em artérias lesadas com balão. Porém, outros estudos mostram que mesmo no tratamento com bloqueadores de AT1, o nível de Ang II no soro é aumentado (NAGANO et al., 1994).

Em humanos, o AT1 é amplamente expresso em vasos sangüíneos, coração, rins, glândulas adrenais e fígado, enquanto o AT2 está presente principalmente em tecidos fetais, diminuindo rapidamente após o nascimento, com expressão relativamente baixa em tecidos normais de adultos (TOUYZ, 2005). As ações dos receptores AT2 funcionalmente se opõem às dos receptores AT1 (NAVAR et al., 2002) e os mecanismos de sinalização ativados por estes dois receptores são diferentes (JIANG et al., 2006) sendo o primeiro associado à estimulação da apoptose e vasodilatação e o outro ao crescimento celular, inflamação e vasoconstrição (TOUYZ; SCHIFFRIN, 2000). A Ang II pode agir simultaneamente sobre ambos os receptores, de modo a permitir uma modulação de seus efeitos (ARIMA; ITO, 2001). No entanto, atualmente sabe-se que a AngII pode induzir o aumento da expressão do receptor AT2 nos fibroblastos cardíacos de rato adulto quando o receptor AT1 é bloqueado (JIANG et al., 2006).

Hutchinson et al. (1999) demonstraram a importância funcional dos receptores da Ang II (AT1 e AT2) na injúria vascular, verificando re-expressão de fenótipo neonatal para estes receptores após lesão da carótida. Além disso, a Ang II agindo sobre seu receptor AT1, pode contribuir na fisiopatologia cardiovascular e renal, além de promover o desenvolvimento de doenças metabólicas, progressão de tumores e metástase através de sua atividade pró-angiogênica e promotora de crescimento celular (HUNYADY; CATT, 2006). O aumento da expressão do AT2 ocorre em condições patológicas, como hipertensão, infarto do miocárdio, insuficiências renal e cardíaca, isquemia cerebral e diabetes, possivelmente como uma resposta ao estresse, reexpressando genes fetais (CAT; TOUYZ, 2011).

2.5 Interação matriz-célula, sinalização intracelular e atuação da Angiotensina II nas vias de sinalização

A interação entre os elementos da MEC e suas células ocorre através de receptores dentre os quais a classe das integrinas é a mais importante (BOSMAN; STAMENKOVIC, 2003). As integrinas constituem uma família de receptores que mediam a adesão de células à MEC e o seu remodelamento (ELICEIRI; CHERESH, 2001), tendo 24 tipos funcionalmente diferentes caracterizados em tecidos humanos (DANEN; SONNENBER, 2003). Em resposta a alterações da MEC a integrina sinaliza a regulação de outros processos inter-relacionados como proliferação, sobrevivência, migração celular e invasão. Ela também funciona como mecanotransdutor, ou seja, pode traduzir forças mecânicas criadas pelos componentes da MEC ou pelo citoesqueleto em sinais químicos (LARSEN et al., 2006; LEHOUX et al., 2006). Estes receptores são amplamente reconhecidos como moduladores de vias de sinalização intracelular e conexão destas com outras vias de transdução de sinais e ativação destas, incluindo a ativação de MAPK (Proteína quinase ativada por mitógenos), FAK (quinases de adesão focal), PKC (proteína quinase C), PI3K (fosfatidilinositol 3-quinase) e Ras, Src, Rac/Rho/cdc42 GTPases (DANEN; SONNENBER, 2003; ELICHERI; CHERESH, 2001) entre outras.

A ligação à MEC inicia-se com o agrupamento de integrinas na membrana plasmática e reorganização do citoesqueleto, promovendo a organização das proteínas associadas que promovem a adesão célula-matriz, e ativando uma cascata de sinalização celular e intracelular (LODISH, 2004). Como existem diversas proteínas que são ativadas durante a sinalização, entre as quais se destacam MAPK, FAK, Erk, Src, p130Cas, ILK (quinase ligada a integrina), a transdução de sinais pode ser fortemente amplificada nestes sítios. As cascatas de MAPK são vias de transdução de sinais utilizadas em diversos

acontecimentos celulares, através de eventos de fosforilação. Elas estão presentes em todos os eucariotos e controlam processos como a proliferação, expressão gênica, diferenciação e apoptose (BROCH, 2004). Vários tipos de MAPK já foram identificados e cada um desencadeia uma resposta celular bem específica, sendo a MAPK1 importante no processo de remodelamento de tecidos (LODISH, 2004).

A quinase de adesão focal (FAK) é uma tirosina quinase citoplasmática que exerce um papel muito importante na trajetória de sinalização via integrina, e sabe-se que a Ang II pode atuar nesta via (MONTIEL et al., 2005). A Ang II estimula a fosforilação da FAK, exercendo papel na motilidade celular em células endoteliais vasculares humanas (MONTIEL et al., 2005). Por outro lado, existem fortes evidências do papel da FAK na hipertrofia cardíaca induzida por Ang II (PENG et al., 2006). Neste contexto, foi demonstrado que a Ang II é capaz de promover a alteração da MEC por intermédio de FAK e de outras proteínas estruturais (MEHTA; GRIENDLING, 2007). Esta cascata de sinalização também leva ao crescimento de células musculares lisas, hipertrofia e migração celular, eventos estes que contribuem para a função vascular normal, mas também para a progressão de doenças (HUNYADY; CATT, 2006).

Os mecanismos celulares que desencadeiam o remodelamento da MEC vascular envolvem uma complexa via de sinalização intracelular, que é estimulada por vários fatores, incluindo a Ang II, que está entre os sistemas mais importantes de regulação cardiovascular (SCHIFFRIN; TOUYZ, 2004). Sabe-se que a Ang II contribui para danos cardiovasculares através da produção de fatores pró-fibróticos como o fator de crescimento de tecido conectivo (CTGF) – um mediador da fibrose vascular – via ativação da quinase RhoA/Rho (RUPEREZ et al., 2007).

Além disso, a Ang II, através do receptor AT1, ativa várias moléculas sinalizadoras incluindo a proteína G derivada de mensageiro secundário, proteína quinase e proteínas G menores (Ras, Rho, Rac, etc) participando do remodelamento vascular (HIGUCHI et al., 2007; MARTIN et al., 2007; NAGASHIMA et al., 2006). Tem sido demonstrado que receptores de fatores de crescimento tais como EGFR (receptor do fator de crescimento epidermal), podem ser ativados pela Ang II em células musculares lisas vasculares (VSMCs) para mediar seu crescimento e migração. Rho e seu efetor Rho-quinase/ROCK também estão implicados nas ações celulares patológicas da Ang II nas VSMCs. Outras proteínas, interagindo seletivamente no receptor AT1, têm sido recentemente identificadas como reguladoras da transdução de sinal via Ang II e suas funções patogênicas em órgãos-alvo, sugerindo que mecanismos de sinalização por meio da Ang II, ainda não totalmente

identificados, mediam o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (HIGUCHI et al., 2007).

O conhecimento das ações patogênicas da Ang II está levando às novas aplicações clínicas de inibidores da enzima de conversão de Angiotensina I e de antagonistas dos receptores AT₁ e AT₂ no estabelecimento de ações terapêuticas para a hipertensão e outras doenças cardiovasculares (HUNYADY; CATT, 2006). Contudo, os mecanismos moleculares de atuação da Ang II ainda precisam ser melhor elucidados.

Justificativa e Objetivos

3 JUSTIFICATIVA

Os achados sobre a ação da Ang II têm auxiliado no desenvolvimento de várias classes de agentes farmacológicos que inibem a síntese de Ang II (por exemplo, inibidores da enzima de conversão de Ang I) ou bloqueiam sua ação (antagonistas do receptor AT1). Estes agentes são amplamente usados no tratamento de várias doenças cardiovasculares, especialmente na hipertensão.

Está muito bem descrita na literatura a importância do Sistema Renina-Angiotensina sobre a regulação hemodinâmica. Da mesma maneira, é claro o efeito da Ang II em processos fisiopatológicos envolvendo o sistema cardiovascular. Contudo, nos últimos anos tem-se demonstrado que a Ang II é capaz de ações sem necessariamente modificar a pressão arterial, evidenciando efeitos não-hemodinâmicos, e revelando papéis importantes sobre processos inflamatórios e de remodelamento tecidual.

A correlação entre o processo de remodelamento da matriz extracelular e a ação da Ang II, bem como os mecanismos moleculares básicos envolvidos e como estes modificam o comportamento celular, evidencia a importância deste estudo.

Este poderá contribuir para melhores intervenções farmacológicas, bloqueando ou minimizando o início e a progressão das lesões vasculares, reduzindo assim a possibilidade de finalização da doença, que culmina com a morte do indivíduo.

Considerando as informações apresentadas, a hipótese do presente projeto é a de que a Ang II, agindo sobre o seu receptor AT1, é capaz de modular a matriz extracelular vascular modificando seus componentes independentemente de efeitos hemodinâmicos.

4 OBJETIVOS

O presente estudo tem por objetivo testar a hipótese de que a Angiotensina II (Ang II) é capaz de modular a composição da matriz extracelular (MEC) vascular, independentemente de efeitos hemodinâmicos, em camundongos normotensos, submetidos à estimulação por Ang II e/ou bloqueio de seu receptor AT1, através dos seguintes estudos:

- a. Avaliação morfométrica vascular para quantificação de colágeno perivascular;
- b. Avaliações de componentes da matriz extracelular usando imunohistoquímica;
- c. Traçar o perfil molecular, com ensaios de expressão protéica, das prováveis vias de sinalização intracelular ativadas, ou não, nos diferentes tratamentos.

Material e Métodos

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animais e manutenção

Foram usados camundongos isogênicos adultos machos 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 °C, 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 (nº 111/07).

5.2 Grupos e tratamentos

Procuramos estabelecer o mínimo de 6 animais por tratamento. Os animais foram submetidos aos tratamentos com doses subpressoras nos tempos de 7 e 14 dias. Os tratamentos administrados foram:

GRUPO	TRATAMENTO
Controle	Água
Angiotensina II	Angiotensina II na dose de 100 ng/kg/min, administrado por minibomba osmótica subcutânea.
Losartan	Diluído na água de beber com dose de 20 mg/kg/dia
Losartan + Angiotensina II	Losartan diluído na água de beber + Ang II em minibomba osmótica subcutânea.

O bloqueador do receptor AT1 (Losartan) foi diluído na água e administrado aos animais em dose de 20 mg/kg/dia (LACCHINI et al., 2009), enquanto o tratamento com Ang II (100 ng/kg/min) (LACCHINI et al., 2009) e a combinação destes foram feitos usando-se minibombas osmóticas subcutâneas de infusão contínua (Alzet® osmotic pumps, Cupertino, CA, EUA) (**Figuras 3, 4 e 5**). Os grupos tratados concomitantemente com Angiotensina II e Losartan, receberam o bloqueador do receptor AT1 diluído na água 1 dia antes da

implantação cirúrgica da minibomba com Angiotensina II, para garantirmos o bloqueio do receptor AT1.

As minibombas osmóticas permitem uma infusão contínua do tratamento desejado, evitando problemas em relação às alterações de concentração plasmática da droga de interesse. Operam através da diferença de pressão osmótica entre o a camada osmótica da bomba (**Figura 3**), que é revestida por sal, e o ambiente do tecido onde esta é implantada.

A alta osmolalidade da camada osmótica da minibomba faz a água tecidual fluir para dentro desta através de uma membrana semi-permeável que forma a sua superfície exterior (**Figura 3**). À medida que a água entra neste compartimento, comprime o reservatório (que é flexível) onde está o agente, deslocando a solução utilizada no experimento para fora da bomba, através do moderador de fluxo (**Figura 3**), a uma taxa controlada, pré-determinada na fabricação. Ou seja, a taxa de liberação é controlada pela permeabilidade à água da membrana exterior da bomba, sendo assim independente da formulação do fármaco distribuído.

Nos nossos experimentos utilizamos os seguintes modelos de minibombas Alzet®: para 7 dias de tratamento modelo 2001, com taxa de liberação de 1,0µl/hr; para 14 dias, modelo 2002, com taxa de liberação de 0,5µl/hr.

Figura 3 – Minibomba osmótica Alzet® utilizada nos experimentos em corte longitudinal para mostrar esquematicamente o seu funcionamento.

FONTE: www.alzet.com

Figura 4 – Preparação da minibomba osmótica.

Para efetuar o implante subcutâneo da minibomba, os animais foram submetidos à anestesia por injeção intraperitoneal com uma mistura de quetamina (90 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). Durante o procedimento, o animal é mantido em mesa aquecida com temperatura regulada e com o auxílio de uma tesoura longa abre-se um espaço abaixo da pele do dorso, e a minibomba é então posicionada entre as escápulas (**Figura 5**). Em seguida, a pele é suturada com fio mononylon 6.0 e os animais deixados em recuperação em ambiente aquecido.

Figura 5 – Implante cirúrgico da minibomba osmótica no camundongo.

A: incisão; **B e C:** abertura do espaço subcutâneo; **D:** implante da minibomba; **E:** minibomba colocada no espaço subcutâneo; **F:** sutura; **G:** minibomba implantada.

5.3 Experimentos

Os experimentos foram divididos e executados da seguinte maneira:

Experimento 1: Avaliação hemodinâmica;

Experimento 2: Análises morfométricas;

Experimento 3: Análises morfológicas por histologia e imunohistoquímica;

Experimento 4: Análises moleculares com ensaios de expressão protéica por Western Blotting.

5.4 Avaliação Hemodinâmica

Como as drogas usadas nos tratamentos (Angiotensina II e Losartan) têm ação sobre a pressão arterial sistólica (PAS), que é um importante fator que atua na estrutura do sistema cardiovascular, medidas deste parâmetro hemodinâmico e da frequência cardíaca (FC) foram feitas para certificar que as doses usadas realmente eram subpressoras e não afetariam os resultados. Para isso, se realizou medida indireta, não invasiva, da pressão caudal utilizando-se esfigmomanômetro em camundongos colocados em caixa restritora aquecida para promover a vasodilatação caudal.

O esfigmomanômetro adaptado para camundongos foi colocado em torno da cauda do animal (**Figura 6**) e insuflado até a obstrução total do fluxo sanguíneo para a artéria caudal e a obstrução do fluxo foi diminuída lentamente até a captação dos primeiros picos de pressão arterial pulsátil.

As medidas de pressão arterial foram detectadas por um transdutor eletromagnético localizado na cauda do animal e conectado a um amplificador, que envia o sinal para um conversor de sinal analógico-digital, que é então armazenado em tempo real em microcomputador (**Figura 6**) e analisado pelo programa WinDaq (DATAQ® Instruments, Akron, OH, EUA) com uma frequência de amostragem 1000Hz por canal.

Figura 6 – Esquema do sistema de medida de pressão caudal utilizado indireta nos experimentos.

O registro da pressão é feito com os animais acordados e consideram-se apenas aqueles valores obtidos em condição de ausência de movimentação espontânea da cauda do animal. Utilizou-se a média de 10 aferições consecutivas, que não diferiam mais do que 5 mmHg da média encontrada. É importante ressaltar que todos os animais são adaptados ao sistema de medida na semana anterior aos experimentos, sendo expostos ao sistema todos os dias.

Além da medida indireta, também utilizamos o método de medida direta e invasiva, onde obtemos os valores da pressão arterial e frequência cardíaca através da canulação da artéria carótida.

As medidas hemodinâmicas foram realizadas no Laboratório de Hipertensão Experimental da Unidade de Hipertensão do InCor, HC/FMUSP, com permissão da Profa. Dra. Maria Cláudia Irigoyen.

5.5 Perfusão e coleta dos Tecidos

Depois de efetuados os tratamentos e avaliada a pressão arterial, os animais foram eutanasiados por overdose de anestésico com injeção intraperitoneal de quetamina (180 mg/kg) + xylazina (20 mg/kg) + heparina sódica (50 U por animal). A lavagem do sistema vascular foi feita com solução fisiológica (NaCl 0.9%) sob pressão constante de 80 a 90 mmHg, através do ventrículo esquerdo e em seguida o animal foi perfundido com formol a 4% tamponado (tampão fosfato, pH 6,8-7,2; 0.1 M). Foram coletados fragmentos das artérias aorta, carótidas e femorais, além do coração, rins e pulmão.

Para o estudo da expressão proteica, foram preparados grupos separados de animais, dos quais se coletaram corações, que foram congelados em nitrogênio líquido e mantidos em freezer a -80 °C até a preparação dos tecidos para os procedimentos de Western Blott. Destes animais foi coletado também soro para posteriores análises de expressão de proteínas sanguíneas.

5.6 Avaliação do peso relativo de coração, rins e pulmão

O peso corporal foi medido antes dos animais serem perfundidos, sendo que depois da coleta de tecidos, o coração, os rins e os pulmões foram também pesados individualmente.

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, verificando-se assim se há hipertrofia ou edema destes órgãos com os diferentes tratamentos. Essa relação percentual obtida através da fórmula abaixo:

$$\frac{\text{peso do órgão em mg}}{\text{peso do animal em g}} \times 100$$

5.7 Microscopia de Luz (ML) e Morfometria

A fixação dos órgãos para a rotina de ML foi feita em formol a 4% tamponado (tampão fosfato, pH 6,8-7,2; 0.1M) por 24 horas. Após este período os órgãos foram dispostos em cassete plástico (**Figura 7A**), processados em histotécnico (**Figura 8**) com ciclo total de 8 horas onde se realiza a desidratação, diafanização e parafinização dos tecidos. A seguir, estes são emblocados em parafina (**Figura 7B**).

A seguir, foi feita a microtomia obtendo-se cortes de 5µm dos tecidos, sendo estes dispostos em lâminas histológicas (**Figura 7C**). Estas foram então coradas com Verhoeff-Van Gieson (para identificação de fibras elásticas) (BANCROFT; STEVENS, 1990) e Picrosirius, para identificação de fibras colágenas, analisado sob luz comum e polarizada, segundo protocolo de Montes; Junqueira (1991), e analisadas morfometricamente.

Figura 7 – Esquema de procedimentos histológicos e análises microscópicas.

A) colocação do tecido em cassete após processo de 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 8 – Fotografia do histotécnico utilizado para processamento dos tecidos estudados em microscopia de luz e imunohistoquímica.

A classificação do colágeno em cortes corados com Picrosirius e analisados sob luz polarizada, seguiu a descrição feita por Montes; Junqueira (1991) de acordo com a birrefringência:

TIPO DE COLÁGENO	CARACTERÍSTICA OBSERVA NA POLARIZAÇÃO
Fibras de Colágeno do tipo I = COL I	Feixes de fibras grossas, fortemente birrefregentes, de cor amarela ou vermelha
Fibras de Colágeno do tipo III = COL III	Fibras finas individuais, fracamente birrefregentes, de cor amarela-esverdeada ou verde

A histomorfometria foi feita tendo em vista verificar as alterações decorrentes dos tratamentos através da obtenção da quantificação do colágeno perivascular (colágeno adventicial) e espessura da camada média, bem como da quantificação de elementos da matriz extracelular. Na avaliação da espessura da camada média, o limite adotado foi da lâmina elástica interna até a externa. Foram analisados cinco cortes por animal e tomadas oito medições por vaso, conforme exemplificado na figura abaixo (**Figura 9**).

A quantificação de componentes da MEC nos cortes histológicos obtidos dos vasos e dos outros órgãos foi feita com o software de análise de imagens Image Pró-Plus (Media Cybernetics®, Bethesda, MD, EUA). Foram quantificadas as áreas coradas de colágeno perivascular, medindo a área total da túnica adventícia e dividindo-se pelo valor da área da túnica média, obtendo-se a relação entre a área marcada e a área total.

Figura 9 – Esquema de uma artéria em corte transversal, mostrando: adventícia, média, lâminas elásticas interna e externa, diâmetro da luz, e pontos que representam onde foram medidas as espessuras (E) da camada média. E fórmula utilizada para o cálculo da espessura da camada média das artérias analisadas.

5.8 Imunohistoquímica (IHQ)

A técnica de Imunohistoquímica foi realizada para o estudo da marcação de Colágenos (COL) dos tipos IV e VII, Fibronectina (FBN), Tenascina-C (TN-C) e Metaloproteinases (MMPs) dos tipos 2 e 9, devido a importância de suas funções básicas (Tabela 1).

TABELA 1 – Proteínas da MEC vascular estudadas por Imunohistoquímica e suas respectivas funções básicas

PROTEÍNA	FUNÇÃO
COL IV	Fibras finas presentes na lâmina basal que sustentam o endotélio
COL VII	Fibras finas que unem células endoteliais ao tecido conjuntivo da matriz
FBN	Glicoproteína adesiva que se liga a receptores protéicos da membrana celular (integrinas); Estabelece ligações com outras moléculas de MEC e interação de sinais extracelulares e células.
TN-C	Modula a adesão de células a Fibronectina; a diferenciação, migração, proliferação e apoptose celular.
MMP-2 e MMP-9	Importantes na clivagem de elastina, fibronectina, colágeno e laminina. Envolvidas no desencadeamento de processo inflamatório durante a aterogênese e hipertensão.

Para este estudo, cortes histológicos de 4µm obtidos de corações fixados em formol a 4% tamponado foram dispostos em lâminas silanizadas de acordo como mostrado na **Figura 10**. O processo de silanização permite que os cortes histológicos fiquem mais fortemente aderidos à lâmina. O procedimento foi realizado da seguinte forma: as lâminas

de vidro foram deixadas de molho no álcool 99% durante 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 (*overnight*), ficando prontas para o uso.

Os cortes foram então 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 2**) é colocada em recipiente próprio e levado ao banho-maria até que o tampão atinja a temperatura de 98 °C. Então, os cortes são colocados em suportes e estes na substância tampão aquecida permanecendo nesta por 20 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 imunoistoquímica 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 H₂O₂ a 3%. Os tecidos foram incubados a temperatura de 4 °C com anticorpos primários (Ac 1º), diluídos em um bloqueador (BSA - Albumina de Soro Bovino) a 3% por 16-18 horas (*overnight*).

O estudo imunohistoquímico dos componentes da matriz extracelular (MEC) vascular foi feito usando-se os anticorpos primários, recuperação antigênica e diluições descritos na **tabela 2**.

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 3**.

Após a incubação com o Ac 2º, seguiu-se a marcação com estreptoavidina conjugada com HRP; para COL IV, COL VII e FBN usou-se o Kit Vectastain Elite ABC Universal (Vector Laboratories®, Burlingame, CA, EUA) e para MMP-2, MMP-9 e TN-C usou-se o Kit Starr Trek Universal HRP Detection System (Biocare Medical®, Concord, CA, EUA). Em seguida, fez-se a contracoloração com Hematoxilina e a revelação da marcação, usando DAB (3,3 diaminobenzidina) como cromógeno, sendo que para COL IV, COL VII e FBN utilizamos o Kit DAB Substrate for Peroxidase (Vector Laboratories®) e, para MMP-2, MMP-9 e TN-C, o DAB incluso no Kit Star Trekk (Biocare Medical®). Os controles negativos das reações foram feitos omitindo-se o Ac 1º no primeiro corte de cada lâmina (**Figura 10**).

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 4**).

TABELA 2 – Anticorpos primários, recuperação antigênica e diluições utilizadas para marcação Imunohistoquímica de proteínas da MEC vascular

Anticorpo Primário (Ac1º)	Espécie do Ac1º	Recuperação Antigênica	Concentração do Anticorpo	Diluição para IHQ	Fabricante
Colágeno IV	Rabbit	Tampão citrato pH6,0	[1mg/ml]	1:300	Chemicon International®
Colágeno VII	Mouse	Tampão tris citrato pH7,2	[0.1mg/ml]	1:100	Chemicon International®
Fibronectina	Mouse	Tampão citrato pH6,0	[200µg/ml]	1:50	Chemicon International®
MMP-2	Rabbit	Tampão tris citrato pH7,2	[1mg/ml]	1:100	Chemicon International®
MMP-9	Rabbit	Tampão tris citrato pH7,2	[1mg/ml]	1:100	Chemicon International®
Tenascina-C	Goat	Tampão citrato pH6,0	[200µg/ml]	1:100	Santa Cruz Biotechnology®

TABELA 3 – Anticorpos secundários (AC2º) e diluições utilizados na Imunohistoquímica

Ac1º	Ac2º	Concentração do Anticorpo	Diluição do Ac2º para IHQ	Fabricante
Colágeno IV	Mouse anti-rabbit	[2-10µg/ml]	1:1000	Vector®
Colágeno VII	anti-mouse	[2-10µg/ml]	1:1000	Vector®
Fibronectina	anti-mouse	[2-10µg/ml]	1:1000	Vector®
MMP2	Kit Starr Trek Universal HRP Detection System	-----	-----	Biocare Medical®
MMP9	Kit Starr Trek Universal HRP Detection System	-----	-----	Biocare Medical®
Tenascina-C	Kit Starr Trek Universal HRP Detection System	-----	-----	Biocare Medical®

Figura 10 – Disposição dos cortes histológicos na lâmina para realização de Imunohistoquímica.

TABELA 4 – 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

5.9 Western Blotting

A expressão das proteínas da via das MAPK: PAK total, p-thr-PAK, p-ser-PAK, MEK total, p-thr-MEK, p-JNK, p38 total, phospho p-38, ERK total, p-ERK (**ver lista de abreviaturas**) foi avaliada pelo método de Western Blot para extratos de tecidos de corações congelados, visto que as artérias deste órgão apresentaram alterações importantes observadas na avaliação imunohistoquímica.

Para se obter as amostras para este estudo foram preparados novos grupos tratados por 7 e 14 dias com Água (Controle), Angiotensina II, Losartan, Losartan+Angiotensina, conforme o descrito anteriormente (Item 5.2). Após os períodos de tratamento, os órgãos (coração, aorta, pulmão, rins, fígado, adrenais) foram retirados, colocados em eppendorfs e congelados em nitrogênio líquido ou gelo seco. Amostras de sangue dos animais de todos os tratamentos e períodos foram coletadas, centrifugadas e o soro foi separado para futuras análises. Apesar de coletados vários órgãos, somente o coração foi processado para avaliação da expressão protéica, pois neste é que até o momento encontramos resultados de imunohistoquímica mais relevantes.

Inicialmente foi feita a extração das proteínas homogeneizando os tecidos em tampão de lise apropriado. A seguir, foi feita a dosagem de proteínas pelo método de Bradford (leitura em espectrofotômetro 595 nm para definir a dosagem de proteína, cálculos da concentração de proteína através de curva padrão traçada usando-se equação da reta e gráfico de dispersão). A dosagem de proteínas por amostra para a aplicação definida foi equivalente a 40 mg de proteínas por poço em gel (SDS-PAGE), sendo depois disso submetidas à migração por diferencial elétrico.

Resumidamente, o procedimento foi realizado da seguinte maneira: a membrana foi submetida ao bloqueio de ligações inespecíficas, incubação com anticorpo primário (Ac 1º) de interesse (**Tabela 5**), incubação com anticorpo secundário (Ac 2º). Após a corrida, o gel foi submetido à transferência das proteínas para uma membrana de PVDF (poli-vinil-pilorrídona). A membrana foi pré-corada em solução de Ponceau para melhor visualização da transferência das proteínas. E, finalmente, submetida à revelação e exposição em filme fotográfico.

A quantificação dos resultados foi feita por densitometria das bandas utilizando-se o software ImageJ 1.44p (Wayne Rasband National Institute of Health, USA, public domain). A quantificação é feita referente à marcação da proteína para cada amostra, dada pela densidade das bandas, normalizada pela expressão de uma proteína padrão que não tem sua expressão alterada pelos tratamentos. Neste estudo utilizou-se como proteína normalizadora o GAPDH.

TABELA 5 – Anticorpos utilizados para o Western Blotting

Ac1º	Diluição do Ac1º	Fabricante	Diluição do Ac2º
PAK total	1:2000	Cell Signaling®	1:2000
p-thr-PAK	1:1000	Cell Signaling®	1:2000
p-ser-PAK	1:1000	Cell Signaling®	1:2000
MEK total	1:2000	Cell Signaling®	1:2000
p-thr-MEK	1:1000	Cell Signaling®	1:2000
p-JNK	1:1000	Cell Signaling®	1:2000
p38 total	1:2000	Cell Signaling®	1:2000
phospho p38	1:1000	Cell Signaling®	1:2000
ERK total	1:2000	Cell Signaling®	1:2000
p-ERK	1:1000	Cell Signaling®	1:2000

5.10 Análise Estatística dos Resultados

Os valores foram expressos como Média $\pm$ Desvio Padrão da Média (DPM). Os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente comparando-se os grupos por Análise de Variância (ANOVA) de 1 ou 2 caminhos, complementada por teste de Bonferroni. Para todas as análises foi adotado o nível de significância de $p \leq 0,05$.

Resultados

6 RESULTADOS

Os resultados serão apresentados conforme os seguintes itens:

6.1 Medidas de parâmetros hemodinâmicos: Pressão Arterial (PA) de cauda e Frequência Cardíaca (FC);

6.2 Morfometria para a verificação de hipertrofia ou edema;

6.3 Quantificação das fibras de colágeno para verificação de deposição de colágeno perivascular em artérias do coração, rins, pulmão e aorta;

6.4 Imunohistoquímica de componentes da matriz extracelular;

6.5 Western Blotting de proteínas relacionadas às vias de sinalização intracelular.

6.1 Medidas de parâmetros hemodinâmicos: Pressão Arterial (PA) de cauda e Frequência Cardíaca (FC)

A avaliação indireta da pressão arterial permitiu acompanhar os grupos ao longo do tratamento. Com isso, pudemos verificar que, desde o início dos tratamentos, não houve diferença significativa nem da PA (**Figura 11**), nem da FC (**Figura 12**) entre os tratamentos.

Figura 11 – Avaliação da Pressão Arterial indireta nos tratamentos durante 7 dias (**semana 1**) e 14 dias (**semana 2**).

Figura 12 – Avaliação da Frequência Cardíaca nos tratamentos durante 7 dias (**semana 1**) e 14 dias (**semana 2**).

Ao final dos experimentos de 14 dias, foi realizada a medida de PA média e FC diretas e os resultados mostraram que estas não se alteraram significativamente em nenhum dos tratamentos realizados (**PA - Figura 13 e FC – Figura 14**).

Figura 13 – Avaliação direta da Pressão Arterial Média no tratamento de 14 dias.

Figura 14 – Avaliação direta da Frequência Cardíaca média nos tratamentos por 14 dias.

6.2 Análise morfométrica para verificação de hipertrofia ou edema

Ao final dos tempos de experimento, foi obtido o peso corporal. Na **Figura 15** pode-se observar que não houve alteração importante nas medidas de peso corporal dos animais, tanto para os grupos tratados por 7 dias como após 14 dias de tratamento.

Figura 15 – Peso Corporal dos animais tratados durante 7 e de 14 dias.

Além do peso corporal, foram avaliados o peso do coração, pulmões e rins. Quanto ao peso relativo do coração (**Figura 16**), não foi verificada nenhuma diferença estatisticamente significativa, tanto após 7 dias como após 14 dias.

Figura 16 – Peso relativos do coração nos grupos estudados após 7 e 14 dias.

A avaliação do peso relativo dos pulmões (**Figura 17**) mostrou que a ativação dos receptores AT1 pela Ang II, parece se relacionar ao aumento do peso relativo, enquanto a ativação dos receptores AT2 (no grupo Los+Ang II) parece se relacionar a redução do peso. Possivelmente, a Ang II induziu edema, o que deve ser confirmado por avaliação mais acurada. Interessantemente, após 14 dias, o tratamento com Angiotensina II mantém o aumento de peso, enquanto o bloqueio do receptor AT1 e ativação do AT2 parece reverter este quadro.

Figura 17 – Peso relativo dos pulmões nos grupos estudados após 7 e 14 dias.

* $p \leq 0,05$, comparado ao grupo controle; # $p \leq 0,05$, comparado aos demais grupos.

Em relação aos rins, a avaliação do peso relativo mostrou que a Angiotensina II leva a um aumento de peso renal após 14 dias (**Figura 18**), possivelmente sob estímulo direto da Ang II local. Embora os animais de 14 dias de tratamento (em todos os grupos) aparentem ter pesos renais maiores.

Figura 18 – Peso relativos dos rins nos grupos estudados após 7 e 14 dias.

* $p \leq 0,05$, comparado ao tratamento 7 dias.

6.3 Quantificação das fibras de colágeno para verificação de deposição de colágeno perivascular em artérias do coração, rins, pulmão e aorta

A quantificação do colágeno perivascular permite avaliar a reação vascular frente a uma situação tanto fisiológica como patológica. O aumento da deposição de colágeno está associado a um desequilíbrio entre sua síntese e degradação. Esta relação síntese-degradação de colágeno está ligada a processos de remodelamento tanto vascular como tecidual (no caso do colágeno intersticial). Estas avaliações foram feitas considerando-se a relação da área da adventícia em função do diâmetro vascular.

Na **Figura 19** está representada a relação entre o colágeno perivascular e o diâmetro arterial para vasos do coração. Verificou-se que os tratamentos não tiveram efeito sobre esta deposição após 7 dias de tratamento. Por outro lado, após 14 dias o tratamento com Angiotensina II aumentou a deposição de colágeno perivascular, mesmo com bloqueio concomitante do receptore AT1.

Figura 19 – Razão entre área de colágeno perivascular e área da média em artérias do coração de animais tratados por 7 e 14 dias.

* $p \leq 0,05$ comparado ao grupo controle; # $p \leq 0,05$ comparado ao tratamento Los+Ang 7 dias.

Na **Figura 20** temos fotos representativas da deposição de colágeno perivascular em artérias do coração nos diferentes tratamentos e tempos.

Figura 20 – Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de artérias do coração de animais tratados por 14 dias, mostrando a deposição do colágeno perivascular (corado em vermelho). Aumento: 200x. Coloração: Picrossirius.

A avaliação sob luz polarizada mostrou um discreto aumento na presença de fibras colágenas espessas, predominantemente do tipo I (vermelhas) tanto no tratamento com Ang II quanto na combinação Los+Ang II (**Figura 21**) comparado ao grupo Controle; e o Losartan reduziu a presença destas comparado aos demais grupos. Já para as fibras colágenas finas, predominantemente do tipo III, que sob luz polarizada tem birrefringência esverdeada, numa análise qualitativa, não mostrou diferença marcante entre os grupos.

Figura 21 – Fotomicrografias representativas de artérias do coração, coradas com Picrosirius, e avaliadas sob luz polarizada mostrando a predominância de fibras colágenas espessas, birrefringentes em amarelo e vermelho, e algumas fibras finas birrefringentes em verde. **Aumentos:** Ang II 200x; Los+Ang II 100x.

A avaliação da deposição de colágeno perivascular nos pulmões (**Figura 22**) apresentou resposta aos tratamentos semelhante ao observado no coração no tratamento com Ang II após 14 dias, ou seja, a deposição encontra-se aumentada neste grupo. Porém, diferentemente do coração, o bloqueio do receptor AT1 com o Losartan durante 14 dias reduziu significativamente a quantidade de colágeno. Já o tratamento concomitante com o Losartan atenua, mas não abole esta deposição. Nas fotomicrografias representativas (**Figura 23**) é possível observar o colágeno perivascular nas artérias do pulmão.

Figura 22 – Relação entre área de colágeno perivascular e área da média em artérias do pulmão com calibre inferior a 50 μ m nos tratamentos de 7 e 14 dias .

* $p \leq 0,05$ comparado ao grupo controle. # $p \leq 0,05$ comparado ao grupo Angiotensina 14 dias.

Figura 23 – Fotos representativas da deposição do perivascular em artérias do pulmão. **A**=controle; **B**=Angiotensina; **C**=Losartan+Angiotensina. Coloração: Picrossirius. Aumento: 400x

Diferente do que foi observado no coração e nos pulmões, embora os rins não tenham apresentado alteração na quantidade de colágeno perivascular em 7 dias (**Figuras 24**), o tratamento com 14 dias mostrou redução na deposição perivascular tanto no tratamento com Angiotensina II como com Losartan, não se alterando quando o tratamento foi concomitante (**Figuras 24**).

Figura 24 – Relação entre área de colágeno perivascular e área da média em artérias dos rins, com calibre inferior a 50 μ m nos tratamentos de 7 e 14 dias.

* $p \leq 0,05$, quando comparado ao Controle.

Considerando esses fatos, podemos perceber que o aumento da tensão de parede está associado com o remodelamento na forma e aumento na quantidade de matriz extracelular. Isto leva à modificação da geometria vascular e à reorganização dos componentes da parede do vaso. De forma inversa, podemos considerar que uma diferente composição na parede vascular pode determinar uma capacidade de resposta diversa para cada vaso. Este ponto é crítico quando consideramos que artérias de diferentes calibres ou leitos vasculares podem responder a estímulos, seja fisiológicos ou patológicos, de forma diferente considerando sua capacidade de reação, como ocorreu nas artérias avaliadas nos rins.

Tal idéia é reforçada pela avaliação da espessura da túnica média feita nas artérias de coração. É interessante observar que tanto após 7 como 14 dias de tratamento, ocorre um nítido aumento da espessura de parede vascular nos grupos tratados com Angiotensina II, sendo que a administração concomitante de Losartan não foi capaz de bloquear ou atenuar tal modificação (**Figura 25**).

Figura 25 – Avaliação da espessura da camada média das artérias do coração após 7 e 14 dias de tratamento.

* $p \leq 0,05$, quando comparado ao grupo controle.

Na artéria aorta foi observado que o tratamento com Angiotensina II tanto por 7 como por 14 dias aumentou a quantidade de colágeno perivascular em relação ao Controle (**Figura 26**) e o tratamento combinado não reverteu esta condição. Porém, só com o bloqueio do receptor AT1 parece reverter.

Figura 26 – Gráfico mostrando a relação entre área de colágeno perivascular e área da média na aorta.

A avaliação da artéria aorta sob luz polarizada mostrou a presença predominante de COL tipo I em todos os tratamentos tanto em 7 como 14 dias (**Figura 27**). Porém, nos tratamentos com Los e Los+Ang 14 dias verificamos a presença de fibrilas de COL III (esverdeadas) (**Figura 27**), característica que não foi observada nos mesmos tratamentos em 7 dias.

Figuras 27 – Fotomicrografias representativas da aorta de animais tratados por 7 e 14 dias onde se evidencia a adventícia com área de deposição de colágeno perivascular (setas). Coloração: Picrossirius. Aumento: 400x.

Figuras a esquerda: microscopia de luz comum; **Figuras a direita:** luz polarizada.

Em relação à análise da camada média da aorta, pode-se observar que nenhum dos tratamentos e tempos alterou, significativamente, a sua espessura (**Figura 28**).

Figura 28 – Avaliação da espessura da camada média da aorta após 7 e 14 dias de tratamento.

Análise parcial da deposição de colágeno nas artérias carótida e femoral foi feita (**APÊNDICE A**), bem como se iniciou o estudo do sistema elástico (**APÊNDICE B**), porém não foram concluídas neste estudo, visto que priorizamos os estudos no coração e na artéria aorta.

6.4 Imunohistoquímica de componentes da matriz extracelular

Em artérias do coração verificou-se que as doses subpressoras de Ang II levaram a uma resposta diferencial para COL IV e VII. Interessantemente, a Ang II levou a um aumento da marcação para COL IV após 7 dias (+166%) e 14 dias (+100%) (**Figuras 29, 30 e 31**); além disso, o tratamento concomitante com LOS não reverteu a ação da Ang II (+166% e + 125%, para 7 e 14 dias, respectivamente) (**Figuras 29**).

Por outro lado, a marcação para COL VII nas artérias do coração apresentou importante aumento no tratamento com Ang II (125% e 100% após 7 e 14 dias, respectivamente) (**Figuras 32 e 33**) e isso também foi verificado nos capilares (**Figuras 34**). Diferentemente do COL IV, o LOS+ANG II abole o aumento do COL VII observado tanto após 7 como 14 dias em arteríolas (**Figuras 32 e 33**) e também capilares (**Figura 34**).

Figura 29 – Gráfico mostrando o escore de marcação para colágeno IV em artérias do coração tratado por 7 e 14 dias.

*p≤0,05 comparado ao Controle

Figura 30 – Fotos representativas da marcação imunohistoquímica de Colágeno IV em artérias do coração tratado por 7 e 14 dias.

Figura 31 – Fotos representativas da marcação imunohistoquímica de Colágeno IV em capilares do coração tratado por 7 e 14 dias.

Figura 32 – Gráfico do escore de marcação de colágeno VII em artérias do coração tratado por 7 e 14 dias.

* $p \leq 0,05$ comparado ao Controle.

Figura 33 – Fotos representativas da marcação imunohistoquímica de Colágeno VII em artérias do coração tratado por 7 e 14 dias. Aumento=200x

Figura 34 - Fotomicrografia representativa da marcação imunohistoquímica de colágeno VII em capilares do coração (**setas**) tratados por 14 dias. Aumento: 1000x.

A: Controle; **B:** Angiotensina II; **C:** Losartan; **D:** Losartan+Angiotensina.

Interessantemente, os nossos resultados até o momento mostram marcação imunohistoquímica semelhante tanto para FBN quanto para TN-C nos tratamentos combinado de Los+Ang II (**Figuras 35 a 38**). A expressão de FBN foi aumentada no tratamento combinado tanto com 7 quanto com 14 dias de tratamento (**Figura 35**). Nossa observação preliminar para a marcação de TN-C mostra o mesmo aumento no tratamento Los+Ang (**Figuras 37 e 38**). Porém, diferente da FBN, a TN-C não marcou o tecido nenhum dos outros tratamentos, o que requer maiores investigações.

Figura 35 – Gráfico do escore de marcação de Fibronectina em artérias do coração tratado por 7 e 14 dias.

* $p \leq 0,05$ comparado ao Controle.

Figura 36 – Fotomicrografia representativa da marcação de Fibronectina em artérias do coração. Aumento=1000X.

Figura 37 – Gráfico do escore de marcação de Tenascina-C em artérias do coração tratado por 7 e 14 dias.

Figura 38 – Fotomicrografia representativa da marcação de Tenascina-C em artérias do coração tratado por 7 dias. Aumento=1000X.

Quanto a marcação de metaloproteinases (MMPs) avaliamos as dos tipos 2 e 9. A marcação para MMP-2 mostrou que a Ang II não altera a sua expressão quando comprado ao Controle, porém o bloqueio do receptor AT1 com Los diminui a marcação com 7 dias de tratamento, mas não com 14 dias, já o tratamento combinado Los+Ang diminui a marcação tanto com 7 quanto com 14 dias de tratamento (**Figuras 39 e 40**). Já a marcação para MMP-9 mostrou aumento no tratamento com Ang II tanto em 7 como em 14 dias (**Figuras 41 e 42**) e bloqueio com Losartan foi bastante efetivo para esta MMP. Porém, no tratamento combinado há aumento da marcação de MMP-9 com 7 dias e diminuição com 14 dias de tratamento, o que pode indicar um escape da ação da Ang II talvez pelo AT2, mas amostras maiores serão avaliadas para termos dados estatisticamente mais significativos.

Figura 39 – Gráfico do escore de marcação de Metaloproteinase do tipo 2 (MMP-2) em artérias do coração tratado por 7 e 14 dias.

* $p \leq 0,05$ comparado ao Controle.

Figura 40 – Fotomicrografias representativas mostrando a marcação de MMP-2 em artérias do coração tratado por 7 dias. Aumento=1000X

Figura 41 – Gráfico do escore de marcação de Metaloproteinase do tipo 9 (MMP-9) em artérias do coração tratado por 7 e 14 dias.

* $p \leq 0,05$ comparado ao Controle.

Figura 42 – Fotomicrografias representativas da marcação imunohistoquímica de MMP-9 em artérias do coração tratado por 7 dias. Aumento=1000X

6.5 Western Blotting de proteínas relacionadas às vias de sinalização intracelular

Este estudo utilizando-se a técnica de Western Blotting foi realizada para a verificação da expressão de algumas proteínas relacionadas a via de sinalização intracelular das MAPK (Proteína quinase ativada por mitógenos) no coração. As proteínas avaliadas foram: PAK total, p-thr-PAK, p-ser-PAK, MEK total, p-thr-MEK, p-JNK, p38 total, phospho p-38, ERK total, p-ERK. Para uma melhor compreensão foi elaborada uma figura esquematizando as vias de sinalização aqui estudadas (**ANEXO A**).

A **Figura 43** mostra as bandas expressas pela GAPDH - proteína constitutiva que não tem sua expressão alterada pelos tratamentos – que foi utilizada como proteína normalizadora nos cálculos da densitometria das bandas expressas pelas proteínas estudadas.

Figura 43 – Gel mostrando as bandas de GAPDH (proteína normalizadora) nos diferentes tratamentos e períodos estudados.

PAK Total e fosforiladas:

A análise da PAK total mostrou que o tratamento com Angiotensina II e Losartan por 7 dias não levou a alteração significativa na sua expressão. Porém, o tratamento combinado Los+Ang II levou um aumento bastante significativo em relação aos grupos Controle e Angiotensina II (**Figura 44**). No entanto, todos tratamentos por 14 dias levaram a uma diminuição bem significativa desta expressão (**Figura 44**).

Figura 44 – Gráfico e membrana mostrando a expressão de PAK total (68kDa) nos diferentes tratamentos e períodos no coração. As setas indicam a banda de 68kDa.

*p ≤ 0,05 comparado ao grupo Controle; # p ≤ 0,05 comparado a Angiotensina II

Quanto à análise da PAK fosforilada em treonina (p-thr-PAK), esta mostrou uma relação inversa comparada à expressão da proteína PAK total, ou seja, os tratamentos por 7 dias não levaram a alteração da expressão quando comparada ao grupo Controle e, todos os tratamentos por 14 dias levaram a um aumento significativo da expressão da p-thr-PAK (**Figura 45**).

Figura 45 – Gráfico e membrana mostrando a expressão de p-thr-PAK (68kDa) no coração.

* $p \leq 0,05$ comparado ao grupo Controle.

A PAK fosforilada em serina (p-ser-PAK) teve um aumento muito grande e significativo nos tratamentos com Ang II e Losartan por 7 dias (**Figuras 46**) e uma redução bastante marcante no grupo tratado com Ang II por 14 dias comparado ao grupo Ang II 7 dias (**Figuras 46**), Losartan e Losartan+Angiotensina também reduziu bastante a expressão de p-ser-PAK em 14 dias, comparado ao tratamento por 7 dias.

Figura 46 – Gráfico e membrana mostrando a expressão de PAK fosforilada em serina (68kDa) nos diferentes tratamentos e períodos no coração.

* $p \leq 0,05$ comparado ao Controle; # $p \leq 0,05$ comparado ao grupo Angiotensina II.

MEK TOTAL (45kDa):

Os tratamentos por 7 dias não alterou a expressão da MEK total, porém, em 14 dias aumentou significativamente a expressão desta em todos os tratamentos (**Figura 47**).

Figura 47 – Gráfico e membrana mostrando a expressão de MEK total (45kDa) nos diferentes tratamentos e períodos no coração.

* $p \leq 0,05$ comparado ao Controle.

p-thr-MEK:

Já em relação à expressão da MEK fosforilada em treonina (p-thr-MEK), podemos observar na **Figura 48** que já em 7 dias de tratamento, em todos os grupos, temos aumentos significativos, tanto em relação Controle (*), quanto em relação a AngII para os tratados com Losartan e Losartan+Angiotensina (#).

Figura 48 – Gráfico e membrana mostrando a expressão de p-thr-MEK total (45kDa) nos diferentes tratamentos e períodos no coração.

* $p \leq 0,05$ comparado ao Controle; # $p \leq 0,05$ comparado a Angiotensina II

p-JNK:

A expressão de JNK fosforilada (p-JNK) teve sua expressão modificada bem significativamente já com 7 dias de tratamento em relação ao grupo Controle (**Figura 49**). Porém, em 14 dias houve diminuição da expressão, sendo esta bastante significativa no grupo Angiotensina II (**Figura 49**).

Figura 49 – Gráfico e membrana mostrando a expressão de Phospho-JNK nos diferentes tratamentos e períodos no coração.

* $p \leq 0,05$ comparado ao Controle.

p38 e phospho p38:

A expressão da p38 não teve sua expressão modificada significativamente em nenhum dos tratamentos e períodos analisados (**Figura 50**). Porém, a p38 fosforilada (p-p38) teve um aumento bastante significativo na sua expressão já em 7 dias, mas em 14 dias reduziu drasticamente. E os tratamentos com Losartan e Losartan+Angiotensina reduziram bastante a expressão da p-p38 tanto em 7 quanto em 14 dias.

Figura 50 – Gráfico e membrana mostrando a expressão de p38 nos diferentes tratamentos e períodos no coração.

Figura 51 – Gráfico e membrana mostrando a expressão de p38 fosforilada nos diferentes tratamentos e períodos no coração.

* $p \leq 0,05$ comparado ao Controle.

ERK e phospho ERK:

A expressão da ERK teve uma redução bastante significativa em relação ao Controle, no grupo Angiotensina II tratado por 7 dias (**Figura 52**), porém em 14 dias nota-se um aumento expressivo desta no mesmo tratamento (**Figura 52**). Interessante, notar que o contrário se deu quanto a expressão desta proteína fosforilada (p-ERK) (**Figura 53**). Nesta também se observou redução expressiva tanto em 7 quanto em 14 dias nos tratados com Losartan e Losartan +Ang II), comparados aos Controles e ao grupo Angiotensina II (**Figura 53**).

Figura 52 – Gráfico e membrana mostrando a expressão de ERK total nos diferentes tratamentos e períodos no coração.

*p≤0,05 comparado ao Controle.

Figura 53 – Gráfico e membrana mostrando a expressão de ERK fosforilada nos diferentes tratamentos e períodos no coração.

* $p \leq 0,05$ comparado ao Controle; # $p \leq 0,05$ comparado ao grupo Angiotensina II.

Discussão e Conclusões

7 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou as modificações da matriz extracelular (MEC) em resposta à Ang II, podendo ser então discutida em três partes, assim dispostas:

- a. Estudo da dose de Ang II sobre peso corporal e tecidual, bem como sobre a pressão arterial e frequência cardíaca;
- b. Avaliação do remodelamento da matriz extracelular induzido pela Ang II;
- c. Estudo das possíveis vias de sinalização intracelular envolvidas nas respostas observadas.

a. Estudo da dose de Ang II sobre o peso corporal e tecidual, bem como sobre a pressão arterial e frequência cardíaca

Os resultados obtidos na avaliação do efeito da Ang II por 7 e 14 dias mostram que a dose de Ang II usada não foi capaz de modificar de forma significativa nem o peso corporal e nem o peso relativo de coração, rins e pulmões. Estudos em ratos usando doses maiores de Ang II também mostram não haver alteração significativa do peso corporal em função do tratamento (SIMON et al., 1998). Contudo, estes estudos, por usarem doses de Ang II que levam ao desenvolvimento de hipertensão, determinam alteração no peso cardíaco, culminando em hipertrofia tanto após 7 como após 14 dias de tratamento (ZHU et al., 2003). No nosso estudo, como não era interesse desenvolver hipertensão arterial, não era esperado o aumento significativo do peso relativo do coração (por hipertrofia) ou de pulmões e rins (por edema).

Além disso, como era também objetivo deste estudo, não esperávamos observar alteração significativa na pressão arterial e na frequência cardíaca. As doses de Ang II e Losartan usadas já foram descritas anteriormente pelo nosso grupo (LACCHINI et al., 2009) como sendo subpressoras, não interferindo na PA. Desta forma, os resultados obtidos mostram que nem a Ang II e nem o Losartan determinaram modificação significativa da PA e da FC após 7 e 14 dias de tratamento contínuo. Esta avaliação, feita de forma indireta, por pletismografia de cauda, foi comprovada por análise em grupo complementar, tratado por 14 dias e cuja medida foi feita de forma direta por meio de cateter implantado na artéria

carótida. Estes resultados confirmam que as avaliações subsequentes são influenciadas pela Ang II de forma independente de efeitos hemodinâmicos.

b. Avaliação do remodelamento da matriz extracelular induzido pela Ang II

A avaliação vascular objetivou verificar se a Ang II altera a parede vascular, seja pela modificação de sua espessura, seja pela modificação de alguns dos principais componentes da MEC. A escolha da avaliação da parede vascular se relacionou diretamente com o controle hemodinâmico, visto que está bem caracterizado o aumento da parede vascular em indivíduos hipertensos (HUMPHREY, 2008; INTENGAN; SCHIFFRIN, 2001; SCHIFFRIN; TOUYZ, 2004). Da mesma forma, estudos relacionados ao efeito da Ang II mostram aumento da espessura da parede vascular (SIMON et al., 1998). Contudo, não se consegue relacionar se o aumento da espessura da parede se deve à Ang II (diretamente) ou ao aumento da PA determinado pela Ang II (indiretamente). Por isso, ao retirarmos neste estudo o efeito da pressão arterial e tensão de parede, podemos verificar que, embora a Ang II não interfira na área relativa da média de artérias cardíacas, após 14 dias este aumento ocorre.

Interessantemente, após 14 dias ocorre aumento na área relativa da média tanto nos animais tratados apenas com Ang II como nos que receberam Ang II e Losartan concomitantemente. Como o Los é um bloqueador dos receptores AT1, esta observação sugere que a Ang II, agindo sobre os receptores AT2, ativa uma via alternativa que leva à hipertrofia de parede vascular. Assim, pode-se perceber que a Ang II, em baixas doses, é capaz de aumentar a área da parede vascular mesmo antes da instauração da hipertensão. Esta é uma observação fundamental para entendermos como os processos de hipertrofia vascular ocorrem e como a Ang II pode participar.

Além da interferência sobre a espessura vascular, este estudo mostrou que a Ang II atua de forma importante na regulação da MEC vascular. Entre os principais componentes da MEC vascular, observamos colágenos e metaloproteinases (PLENZ et al., 2003; ELLIOTT et al., 2005; ABILLEIRA et al., 2006; CAIRD et al., 2006; GKALIAGKOUSI et al., 2012), e durante os processos de lesão vascular, verifica-se o papel de Tenascina-C (TN-C) (BOSMAN; STAMENKOVIC, 2003; CHIQUET-EHRISMANN; CHIQUET, 2003; SAWADA et al., 2007; YAMAMOTO et al., 2005) e Fibronectina (FBN) (DANEN; SONNENBER, 2003;).

A análise da deposição de colágeno perivascular nas artérias cardíacas mostrou que a Ang II determina um aumento na deposição tanto em 7 como em 14 dias, sendo esta

abolida pelo Los. Este efeito da Ang II já foi descrito anteriormente (ZHU; GAO, 2000), porém usando doses hipertensoras de Ang II. No presente estudo, pudemos mostrar o efeito direto, sem influência da PA, sobre a MEC. Ainda no estudo dos colágenos, avaliamos mais especificamente a presença de dois tipos de colágeno importantes para o funcionamento da MEC e a interação célula-a-célula: o colágeno IV e o colágeno VII.

Neste caso, observamos que estes colágenos são regulados de formas diferentes pela Ang II. Como mostrado nos resultados, a Ang II leva a um aumento de colágeno IV nas artérias cardíacas tanto em 7 como em 14 dias, sendo que este aumento não é abolido pelo bloqueio do receptor AT1. Isso sugere que o colágeno IV seja regulado pela Ang II via AT2 ou por alguma via independente dos seus receptores. Já a análise do colágeno VII mostra que a Ang II também determina o seu aumento tanto em 7 como em 14 dias, mas o bloqueio do AT1 abole completamente esta resposta. Estudos já mostraram que miofibroblastos podem primeiro depositar o colágeno IV na membrana basal para suportar a migração celular, após esse processo este seria convertido em colágeno tipo I que é mecanicamente estável (MAIELLARO; TAYLOR, 2007).

Complementando a análise dos colágenos, a avaliação das MMPs revela outra parte do sistema de controle da deposição de colágeno vascular (ABILLEIRA et al., 2006; CAIRD et al., 2006; GKALIAGKOUSI et al., 2012). Tanto a MMP-2 como a MMP-9 são metaloproteínases importantes sintetizadas não apenas pelas células inflamatórias (NEWBY, 2006), como também por células da própria parede vascular (NEWBY, 2006). Neste contexto, observamos que a MMP-2 não apresentou aumento sob estímulo direto da Ang II. Embora este resultado não corrobore as observações apresentadas na literatura (JIMENEZ et al., 2009; LUCHTEFELD et al., 2005; MARTINS-OLIVEIRA et al., 2012), há de se chamar a atenção para o fator hemodinâmico. Outro ponto importante a ser ressaltado é o fato do Losartan reduzir significativamente a presença de MMP-2 tanto em 7 como em 14 dias com ou sem tratamento concomitante de Ang II. Possivelmente, o aumento da MMP-2 deve ocorrer sob doses maiores de Ang II. De qualquer forma, os resultados indicam que o bloqueio do AT1 é importante na modulação da liberação de MMP-2.

Por outro lado, a análise da MMP-9 neste estudo mostrou que a Ang II é capaz de aumentar sua produção tanto em 7 como em 14 dias, e que esta ação se dá via AT1, visto que seu bloqueio nos animais Los+Ang II abole este aumento nos tempos estudados. Esta observação corrobora com estudos da literatura envolvendo o fator hemodinâmico (FLAMANT et al., 2007; GKALIAGKOUSI et al., 2012; LEHOUX et al., 2009;), porém mostra a importância do estudo da Ang II independentemente da elevação da PA, pois o papel da MMP-9 não está bem elucidado (CASTRO et al., 2010). Assim, os resultados da análise

de componentes do sistema colágeno nas artérias cardíacas sugerem que a Ang II é capaz de interferir na deposição de diferentes colágenos, independentemente de variáveis hemodinâmicas como a PA.

Tem sido demonstrado que a transferência de gene adenoviral de TIMP perivascular para a superfície da adventícia em vasos de camundongos inibe a atividade de MMP-2 e reduz significativamente a hiperplasia neointimal. A modulação da atividade das MMPs/TIMPs adventíciais pela transferência de gene perivascular pode ser uma estratégia para limitar o remodelamento em doenças vasculares (SLOW, 2007).

Ainda no estudo do remodelamento da MEC, foi avaliado o efeito a Ang II sobre a presença de TN-C e FBN vascular. A TN-C é muito importante no remodelamento tecidual, principalmente durante o desenvolvimento embrionário, enquanto a FBN é um importante regulador da migração, diferenciação, crescimento e sobrevivência celular (JONES; JONES, 2000). Neste contexto, no presente estudo, observamos de forma muito marcante, que a Ang II, com tratamento concomitante com Los, aumenta a marcação de FBN tanto em 7 como em 14 dias. Esta observação sugere que, em baixas doses, a Ang II não altera a FBN, mas que, com o bloqueio do AT1, esta deve estar atuando sobre o seu receptor AT2. É bem descrita a ação do AT2 em processos de migração celular no desenvolvimento embrionário, bem como em processos de reparo tecidual após uma lesão (HUTCHINSON et al., 1999; LUDWIG et al., 2012).

Ainda, observamos também de forma muito marcante que a TN-C, que não é expressa em condições normais nas artérias do indivíduo adulto, tem expressão marcante sob estímulo da Ang II concomitante ao bloqueio do AT1. Estes resultados indicam que, a semelhança da FBN, a Ang II induz a síntese de TN-C via seu receptor AT2. Esta ação conjunta corrobora com o que se conhece à respeito destas moléculas, visto que a FBN faz a ancoragem da TN-C e diversos estudos mostram que esta promove o crescimento de células tumorais (CHIQUET-EHRISMANN; CHIQUET, 2003; CHIQUET-EHRISMANN; TUCKER, 2004; CHIQUET-EHRISMANN; TUCKER, 2011). Ainda estudo desenvolvido por Ching et al. mostrou que um inibidor da síntese de FBN (pUR4) aplicado de forma periadventicial reduziu a espessura da túnica adventícia (CHING et al., 2009). Desta forma, parece que há uma ação direta da Ang II sobre seu receptor AT2, interferindo sobre FBN e TN-C.

c. Estudo das possíveis vias de sinalização intracelular envolvidas nas respostas observadas

As cascatas de MAPKs (proteínas quinases ativadas por mitógenos) são vias de transdução de sinais utilizadas em diversos acontecimentos celulares, através de eventos de fosforilação. Elas estão presentes em todos os eucariotos e controlam processos como a proliferação, expressão gênica, diferenciação e apoptose (BROCH, 2004; JOHNSON; LAPADAT, 2002). Vários tipos de MAPK já foram identificados e cada um desencadeia uma resposta celular bem específica, sendo a MAPK1 importante no processo de remodelamento de tecidos (LODISH, 2004). A via de sinalização intracelular das MAPKs envolve 3 grupos principais de proteínas: ERK, JNK e p38 (**ANEXO A**), que exercem papéis moleculares importantes na gênese de doenças cardiovasculares, como por exemplo, infarto do miocárdio, aterosclerose e reestenose (MUSLIN, 2008). A ERK (quinase regulada por sinal extracelular) responde a sinais vindos de fora da célula controlando a divisão, proliferação e diferenciação celular, enquanto a JNK e a p38 estão ligadas a respostas celulares ao estresse (JOHNSON; LAPADAT, 2002; QI; ELION, 2005).

Neste estudo, avaliamos os componentes destas três vias, de forma a procurar entender qual destas é ativada pela Ang II e se esta pode estar relacionada aos eventos observados. Para isso, avaliamos a PAK, componente comum às vias da ERK e da JNK, nas formas de proteína total (PAK total) e nas formas ativas, fosforilada em serina (p-ser-PAK) e em treonina (p-thr-PAK). Avaliando os resultados obtidos na análise da PAK, observamos uma relação inversa entre PAK total e p-ser-PAK para os tratamentos de 7 dias e uma relação inversa entre PAK total e p-thr-PAK para os tratamentos de 14 dias. Como a PAK é uma via importante no rearranjo do citoesqueleto e na motilidade celular, as alterações na fosforilação dos sítios da treonina e serina podem inibir o crescimento e a migração celular (BOKOCH, 2003; SZCZEPANOWSKA, 2009) e auxiliar na compreensão das vias que estão sendo ativadas nos tempos estudados.

Ainda considerando os resultados obtidos com a PAK, possivelmente existe associação da p-ser-PAK com a MEK fosforilada (p-thr-MEK) nos tratamentos de 7 dias. Além disso, verificamos que a Ang II não altera a expressão proteica em 7 dias, mas o bloqueio dos receptores AT1 aumenta a quantidade de MEK fosforilada. Já, a avaliação da ERK mostrou um importante aumento de sua forma fosforilada (p-ERK) em resposta à Ang II neste tempo de 7 dias, sugerindo que a Ang II, em baixas doses, estimula a via da ERK. Estes dados corroboram com estudos realizados com doses mais altas, que mostraram que a Ang II induz a fosforilação de Ras e Raf (via da ERK) ativando MEKKs e MEKs (ZHAO et

al., 2005). Essa ativação aumenta a expressão de genes (*c-fos*, *c-myc*, *c-jun*) nas células musculares lisas vasculares (CMLVs) levando ao crescimento e diferenciação celular e reorganização do citoesqueleto (RE et al., 2006) e proliferação das CMLVs (WOOLFOLK et al., 2005; ZHAO et al., 2005).

Por outro lado, o tratamento mais crônico de 14 dias mostrou uma relação inversa da PAK total com a sua forma fosforilada em treonina (p-thr-PAK). Não está bem claro se o aumento da p-thr-PAK se relaciona à fosforilação da MEK ou se está relacionada a alguma outra via não observada neste estudo. A análise da expressão da PAK é importante para determinarmos a via de sinalização ativada no remodelamento perivascular visto que já é descrito em células musculares lisas vasculares que a Ang II age como fator pró-inflamatório atuando através da fosforilação da PAK que ativa a expressão de JNK (SCHMITZ et al., 1998). Provavelmente, isto se dá através da ativação do receptor 2 (AT2) que leva rapidamente à fosforilação de PAK1 promovendo o remodelamento durante o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (WOOLFOLK et al., 2005). Contudo, os nossos resultados ainda não permitem identificar se esta forma ativa da PAK se relaciona com a via da MEK, da JNK ou outra via não estudada. Embora se saiba que a JNK regula o crescimento de células musculares lisas vasculares e cardiomiócitos (JOHNSON; LAPADAT, 2002; QI; ELION, 2005), é possível que a Ang II, em baixas doses, não represente estímulo suficiente para observarmos a ativação desta via ou que a ativação da JNK seja local e o resultado seja mascarado pelo montante de cardiomiócitos durante a análise de Western Blot.

Quanto à via da p38, embora não se tenha observado alteração na proteína total, os resultados mostram um aumento marcante de Ang II sobre a sua forma ativa (p-p38) tanto em 7 como em 14 dias de tratamento. Além disso, o bloqueio dos receptores AT1 reduz de forma marcante a expressão da p-p38 com ou sem tratamento concomitante de Ang II.

Estudo realizado com fibroblastos dérmicos mostrou que a AngII atua na via da p38 regulando o processo de cicatrização e fibrose e que sua inibição diminui a fosforilação de outras proteínas envolvidas neste processo (Smad2 e CTGF – fator de crescimento do tecido conjuntivo) alterando a síntese de pró-colágeno, colágenos tipo I e III e fibronectina via receptor AT1 (ZHANG et al., 2009).

Desta forma, é provável que esta via esteja diretamente relacionada com a deposição de colágeno observada neste estudo. Além disso, a demonstração de que a ativação de p38 não promove a hipertrofia, mas aumenta a fibrose intersticial (MUSLIN, 2008) corrobora com os achados de deposição de colágeno perivascular obtidos. Os

mecanismos celulares que desencadeiam o remodelamento da MEC vascular envolvem uma complexa via de sinalização intracelular, que é estimulada por vários fatores, incluindo a Ang II, que está entre os sistemas mais importantes de regulação cardiovascular (SCHIFFRIN; TOUZY, 2004) e que certamente está atuando mesmo em concentração suficientemente baixa para não interferir na pressão arterial.

8 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, podemos concluir que a Angiotensina II, independentemente da pressão arterial, é capaz de atuar sobre as artérias cardíacas, levando a:

- a. Aumento do espessamento da parede vascular, precedendo os fatores hemodinâmicos, bem descritos como regulando a conformação da parede vascular;
- b. Remodelamento da matriz extracelular vascular, aumentando a deposição de colágenos fibrilares e IV possivelmente via AT2 ou outra via não conhecida, aumentando a deposição de colágeno VII e a presença de MMP-9 via AT1, e induzindo a produção de FBN e TN-C possivelmente via AT2;
- c. Ativação de mecanismos de sobrevivência celular, proliferação e diferenciação provavelmente atuando sobre a via da ERK e a ativação de mecanismos relacionados à inflamação e apoptose, provavelmente atuando sobre a via da p38.

Referências

REFERÊNCIAS*

- ABILLEIRA, S.; BEVAN, S.; MARKUS, H. S. The role of genetic variants of matrix metalloproteinases in coronary and carotid atherosclerosis. **J. Med. Genet.**, v.43, p.897–901, 2006.
- ALBERTS, B. et al. *Biologia molecular da célula*. 5. ed. Porto Alegre: Artmed 2010. 1396p.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.
- BANCROFT, J. D; STEVENS, A. **Theory and practice of histological techniques**. 3. ed. New York: Churchill Livingstone, 1990. 726p.
- BOKOCH, G. M. Biology of the p21-activated kinases. **Annu. Rev. Biochem.**, v.72, p. 743-781, 2003.
- BOSMAN, F. T.; STAMENKOVIC, I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. **J. Pathol.**, v.200, p. 423-428, 2003.
- BORGES, L. F.; TABOGA, S. R.; GUTIERREZ, P. S. Simultaneous observation of collagen and elastin in normal and pathological tissues: analysis of Sirius-red-stained sections by fluorescence microscopy. **Cell Tissue Res.**, v.320, p. 551-552, 2005.
- BRIONES, A. M. et al. Role of elastin in spontaneously hypertensive rat small mesenteric artery remodeling. **Journal Physiol.**, v.552, p.185–195, 2003.
- BROCH, M. C. J. **Vias de sinalização celular ativadas por receptores purinérgicos em astrócitos normais e gliomas**. 2004. 126 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/labsina/Tese%20Carol.pdf> Acessado em 2007.
- BROSNIHAN, K. B.; LI, P.; FERRARIO, C. M. Angiotensin-(1-7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide. **Hypertension**, v. 25, p. 523-528, 1996.
- CAIRD, J. et al. Matrix metalloproteinases 2 and 9 in human atherosclerotic and non-atherosclerotic cerebral aneurysms. **Eur. J. Neurol.**, v.13, p. 1098–1105, 2006.
- CAMPOS, A. H.; ZHAO, Y.; POLLMAN, M. J.; GIBBONS, G. H. DNA Microarray profiling to Identify angiotensin-responsive genes in vascular smooth muscle cells: potential mediators of vascular disease. **Circ. Res.**, v.92, p. 111-118, 2003.
- CASTRO, M. M. et al. Imbalance between matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in hypertensive vascular remodeling. **Matrix Biol.**, v. 29, p. 194–201, 2010.
- CAT, A. N. D.; TOUYZ, R. A new look at the renin–angiotensin system—Focusing on the vascular system. **Peptides**, v.32, p. 2141–2150, 2011.
- CELL BIOLOGY. [http://jpkc.scu.edu.cn/ywww/zbsw\(E\)/edetail4.htm](http://jpkc.scu.edu.cn/ywww/zbsw(E)/edetail4.htm) Acesso em 28/06/2012.
- CHEN, J.; METHA, J. L. Angiotensin II-mediated oxidative stress and procollagen-1 expression in cardiac fibroblasts: blockade by pravastatin and pioglitazone. **Am. J. Physiol.**, v. 291, p. H1738–H1745, 2006.
- CHIANG, H. Y. et al. Fibronectin is an important regulator of flow-induced vascular remodeling. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v.29, n.7, p. 1074-9, 2009.
- CHIQUET-EHRISMANN, R.; CHIQUET, M. Tenascins: regulation and putative functions during pathological stress. **J. Pathology**, v.200, p. 488–499, 2003.
- CHIQUET-EHRISMANN, R.; TUCKER, R. P. Connective tissues: signalling by tenascins. **Int J Biochem Cell Biol.**, v.36, n.6, p. 1085-1089, 2004.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração, Rio de Janeiro, 2012.

- CHIQUET-EHRISMANN, R.; TUCKER, R. P. Tenascins and the importance of adhesion modulation. **Cold Spring Harb Perspect Biol.**, 2011. doi: 10.1101/cshperspect.a004960.
- CHING, H. et al. Fibronectin is an important regulator of flow-induced vascular remodeling. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v. 29, p. 1074-1079, 2009.
- DEMEY, J. G. R. Smooth muscle cell proliferation in hypertension: possible contribution to arterial remodeling. In: SCHWARTZ, S. M. and MECHAM, R. P. (eds.) **The vascular smooth muscle cell – molecular and biological responses to the extracellular matrix**. San Diego: Academic Press, 1995, p. 361-400.
- DANEN, E. H. J.; SONNENBERG, A. Integrins in regulation of tissue development and function. **J. Pathol.**, v.200, p. 471–480, 2003.
- DZAU, V. J. et al. G. Molecular mechanisms of hypertension. IN: HABER E. (ed.) **Molecular cardiovascular medicine**. New York: Scientific American, 1995, Cap.15, p. 225-442.
- ELICEIRI, B. P.; CHERESH, D. A. Adhesion events in angiogenesis. **Current Opin. Cell Biology.**, v.13, p. 563–568, 2001.
- ELLIOTT, J. T. et al. Vascular smooth muscle cell response on thin films of collagen. **Matrix Biol.**, v.24, p. 489–502, 2005.
- ETO, H.; BIRO, S.; MIYATA, M. Angiotensin II type 1 receptor participates in extracellular matrix production in the late stage of remodeling after vascular injury. **Cardiov. Res.**, v.59, p. 200–211, 2003.
- FAURY, G. et al. Developmental adaptation of the mouse cardiovascular system to elastin haploinsufficiency. **J. Clin. Invest.**, v.112, p. 1419–1428, 2003.
- FITZSIMMONS, C. M.; SHANAHAN, C. M. Vascular extracellular matrix. In: LANZER, P.; TOPOL, E. J. (Eds.) **Panvascular medicine**. Berlin – New York: Springer, 2002. p. 217-231.
- FLAMANT, M. et al. Role of matrix metalloproteinases in early hypertensive vascular remodeling. **Hypertension**, v. 50, p. 212–218, 2007.
- GIMBRONE, M. A. Vascular endothelium, hemodynamic forces and atherogenesis. **Am. J. Pathol.**, v.155, p. 1-5, 1999.
- GKALIAGKOUSI, E. et al. Elevated levels of MMP-9 in untreated patients with stage I essential hypertension. **Clin. Exp. Hypertens.**, 2012. DOI: 10.3109/10641963.2012.681726
- GLAGOV, S. et al. Principles of vascular remodeling. In: LANZER, P.; TOPOL, E. J. (Eds.) **Panvascular medicine**. Berlin – New York: Springer, 2002. p. 232-241.
- GONZALEZ, J. M. et al. Influence of elastin on rat small artery mechanical properties. **Exp. Physiol.**, v.90, p. 463-468, 2005.
- GORDON, M. K.; HAHN, R. A. Collagens. **Cell Tissue Res.**, v. 339, p. 247-257, 2010.
- GUPTA, S. P.; PATIL, V. M. Specificity of binding with matrix metalloproteinases. **EXS.**, v. 103, p. 35-56, 2012.
- HIGUCHI, S. et al. Angiotensin II signal transduction through the AT1 receptor: novel insights into mechanisms and pathophysiology. **Clin. Sci.**, v.112, p. 417-428, 2007.
- HORIUCHI, M.; MASATSUGU, M. A.; DZAU, V. J. Recent progress in Angiotensin II Type 2 Receptor research in the Cardiovascular System. **Hypertension**, v.33, p. 613-621, 1999.
- HUANG, J.; LIU, Y.; SUN, P.; LV, X.; BO, K.; FAN, X. Novel strategy for treatment of pulmonary arterial hypertension: enhancement of apoptosis. **Lung**, v.188, p. 179–189, 2010.
- HUMPHREY, J. D. Mechanisms of arterial remodeling in hypertension: coupled roles of wall shear and intramural stress. **Hypertension**, v. 52, p. 195–200, 2008.

HUNYADY, L.; CATT, K. J. Pleiotropic AT₁ receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. **Mol. Endocrinol.**, v.20, p. 953-970, 2006.

HUTCHINSON, H. G. et al. Modulation of vascular development and injury by angiotensin II. **Cardiovasc. Res.**, v. 41, p. 689–700, 1999.

IMAGEJ®. Version 1.44p. Wayne Rasband National Institute of Health. Software of the public domain. Disponível em: <<http://rsbweb.nih.gov/ij/>> Acesso em: julho 2010.

INTENGAN, H. D.; SCHIFFRIN, E. L. Structure and mechanical properties of resistance arteries in hypertension: role of adhesion molecules and extracellular matrix determinants. **Hypertension**, v. 36, p. 312–318, 2000.

IRIGOYEN, M. C. et al. Fisiopatologia da Hipertensão Arterial. In: NOBRE, F.; SERRANO JUNIOR, C.V. (Eds.). **Tratado de cardiologia SOCESP**. São Paulo: Editora Manole, 2005, cap. 3., 1850 p.

JIANG, X. Y. et al. Alteration of signal transduction-associated gene expression in rat cardiac fibroblasts induced by blocking angiotensin II receptors. **Sheng Li Xue Bao**, v.58, p. 556-566, 2006.

JIMENEZ, E. et al. Angiotensin II induces MMP 2 activity via FAK/JNK pathway in human endothelial cells. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 380, p. 769–774, 2009.

JOHNSON, G. L.; LAPADAT, R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. **Science**, v. 298, n.5600, p. 1911-1912, 2002.

JONES, F. S.; JONES, P. L. The Tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. **Dev. Dyn.**, v. 218, p. 235–259, 2000.

JONES, E. S. et al. Angiotensin AT₂ receptor contributes to cardiovascular remodeling of aged rats during chronic AT₁ receptor blockade. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v.37, p. 1023–1030, 2004.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2004. 488 p.

KEIDAR, S. et al. Angiotensin II atherogenicity in apolipoprotein E deficient mice is associated with increased cellular cholesterol biosynthesis. **Atherosclerosis**, v.146, p. 249–257, 1999.

KOBAYASHI, H.; TAKEI, Y. **The Renin-Angiotensin System** – comparative aspects. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 1996. 448p.

LACCHINI, S. et al. Angiotensin I converting enzyme gene confers increased susceptibility to cuff-induced intimal thickening in mice. **Physiol. Genomics**, v.37, p. 225–230, 2009.

LARSEN, M.; ARTYM, V. V.; GREEN, J. A.; YAMADA, K. M. The matrix reorganized: extracellular matrix remodeling and integrin signaling. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v.18, p. 463-471, 2006.

LEFEBVRE, F. et al. Modification of the pulmonary renin-angiotensin system and lung structural remodelling in congestive heart failure. **Clin. Sci.**, v.111, n.3, p. 217-224, 2006.

LEHOUX, S. et al. Pressure-induced matrix metalloproteinase-9 contributes to early hypertensive remodeling. **Circulation**, v. 109, p. 1041–1047, 2004.

LEHOUX, S.; CASTIER, Y.; TEDGUI, A. Molecular mechanisms of the vascular responses to haemodynamic forces. **J. Intern. Med.**, v.259, p. 381-392, 2006.

LODISH, H. et al. **Molecular cell biology**. 5. ed. New York: W.H. Freeman and Company, 2004, 973p.

LUCHTEFELD, M. et al. Angiotensin II induces MMP-2 in a p47phox-dependent manner. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 328, p.183–188, 2005.

- LUDWIG, M. et al. The regenerative potential of angiotensin AT₂ receptor in cardiac repair. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 90, p. 287–293, 2012.
- LÜSCHER, T. F.; NOLL, G. The endothelium as a regulator of vascular tone and growth. In: LÜSCHER TF. **The endothelium in cardiovascular disease**. Berlin: Springer-Verlag, 1995, p. 1-25.
- MAIELLARO, K.; TAYLOR, W. R. The role of the adventitia in vascular inflammation. **Cardiovasc. Res.**, v.75, p. 640-648, 2007.
- MARTIN, M. M. et al. TGF- β 1 stimulates human α 1 receptor expression in lung fibroblasts by cross-talk between the smad, p38 mapk, jnk and pi3k signaling pathways. **Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.**, v.293, n.3, p. L790-799, 2007.
- MARTINS-OLIVEIRA, A. et al. Contrasting effects of aliskiren versus losartan on hypertensive vascular remodeling. **Int. J. Cardiol.**, 2012. doi:10.1016/j.ijcard.2012.03.137
- McCAWLEY, L. J.; MATRISIAN, L. M. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! **Curr. Opin. Cell Biol.**, v.13, p. 534–540, 2001.
- McGRATH, J. C. et al. New aspects of vascular remodeling: the involvement of all vascular cell types. **Exp. Physiol.**, v.90, p. 469-475, 2005.
- MICHEL, J. B. et al. Topological determinants and consequences of adventitial responses to arterial wall injury. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v.27, p. 1259-1268, 2007.
- MEHTA, P. K.; GRIENDLING, K. K. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v.292, p. C82-C97, 2007.
- MONTES, G. S.; JUNQUEIRA, L. C. U. The use of the Picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz [online]**, v.86, suppl.3, p. 1-11, 1991.
- MONTIEL, M.; BLANCA, E. P.; JIMÉNEZ, E. Angiotensin II induces focal adhesion kinase/paxillin phosphorylation and cell migration in human umbilical vein endothelial cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 327, n.4, p. 971-978, 2005.
- MOTT, J. D.; WERB, Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v.15, p. 558-564, 2004.
- MULVANY, M. J. et al. Vascular remodeling. **Hypertension**, v.28, p. 505-506, 1996.
- MURPHY, T. J. et al. Isolation of cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. **Nature**, v.351, p. 233-236, 1991.
- MUSLIN, A. J. MAPK signalling in cardiovascular health and disease: molecular mechanisms and therapeutic targets. **Clinical Science**, v.115, p. 203-218, 2008.
- NAFTILAN, A. J. Role of the tissue renin-angiotensin system in vascular remodeling and smooth muscle cell growth. **Curr. Opin. Nephrol. Hypert.**, v.3, p. 218-227, 1994.
- NAGANO, M. et al. Role of the renin-angiotensin system in hypertension in the elderly. **Blood Press Suppl.**, v.5, p. 30-33, 1994.
- NAKASHIMA, H. et al. Angiotensin II regulates vascular and endothelial dysfunction: recent topics of angiotensin II type 1 receptor signaling in the vasculature. **Curr. Vascul. Pharmacol.**, v.4, p. 67-78, 2006.
- NAVAR, L. G. et al. Regulation of intrarenal angiotensin II in hypertension. **Hypertension**, v.39, p.316-322, 2002.
- NEWBY, A. C. Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates. **Cardiov. Res.**, v.69, p. 614-624, 2006.

- OHISHI, M. et al. 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. et al. Enhanced expression of angiotensina-converting enzyme is associated with progression of coronary atherosclerosis in humans. **J. Hypertens.**, v.15, p. 1295-1302, 1997.
- PENG, X. et al. Inactivation of focal adhesion kinase in cardiomyocytes promotes eccentric cardiac hypertrophy and fibrosis in mice. **J. Clin Invest.**, v.116, p. 217-27, 2006.
- PLENZ, G. Vascular collagens: spotlight on the role of type VIII collagen in atherogenesis. **Atherosclerosis**, v.166, p. 1-11, 2003.
- QI, M.; ELION, E. A. MAP kinase pathways. **J. Cell Sci.**, v.118, p. 3569-3572, 2005.
- RAKUGI, H. et al. Vascular injury induces angiotensinogen gene expression in the media and neointima. **Circulation**, v.87, p. 283-290, 1993.
- RE, R. N.; DIPETTE, D.J.; SCHIFFRIN, E. L.; SOWERS, J. R. **Molecular mechanisms in hypertension**. London: Taylor & Francis Medical Books, 2006. 445 p.
- RIBEIRO, L. A. et al. Gelatinases, endonuclease and Vascular Endothelial Growth Factor during development and regression of swine luteal tissue. **BMC Dev. Biol.**, v.6, p.58, 2006.
- RIBICHINI, F. et al. Angiotensin converting enzyme tissue activity in the diffuse in-stent restenotic plaque. **Circulation**, v.101, p. e33-e35, 2000.
- ROSS, R. Arteriosclerosis: an overview. In: HABER, E.R. (Ed.). **Molecular cardiovascular medicine**. New York: Scientific American, 1995. Cap. 2, p. 11-30.
- ROSS, R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. **New Engl. J. Med.**, v.340, p. 115-126, 1999.
- RUIZ-ORTEGA, A. M. et al. Role of the renin-angiotensin system in vascular disease – expanding the field. **Hypertension**, v.38, p. 1382-1387, 2001.
- RUPÉREZ, M. et al. HMG-CoA reductase inhibitors decrease Angiotensin II-induced vascular fibrosis. Role of RhoA/ROCK and MAPK pathways. **Hypertension**, 2007. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.091264
- SAWADA, Y. et al. Tenascin-C synthesized in both donor grafts and recipients accelerates artery graft stenosis. **Cardiovasc. Res.**, v. 74, p. 366–376, 2007.
- SCHIFFRIN, E. L; TOUYZ, R. M. From beside to bench to bedside: role of renin-angiotensin-aldosterone system in remodeling of resistance arteries in hypertension. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v.287, p. H435-H446, 2004.
- SCHMITZ, U. et al. Angiotensin II stimulates p21-activated kinase in vascular smooth muscle cells: role in activation of JNK. **Circ. Res.**, v. 82, n.12, p.1272-1278, 1998.
- SHAUL, Y. D.; SEGER, R. The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1773, p.1213-1226, 2007.
- SIMON, G.; ILLYES, G.; CSIKY, B. Structural vascular changes in hypertension – role of angiotensin II, dietary sodium supplementation, blood pressure and time. **Hypertension**, v.32, p. 654-660, 1998.
- SIOW, R. C.; CHURCHMAN, A.T. Adventitial growth factor signalling and vascular remodelling: Potential of perivascular gene transfer from the outside-in. **Cardiovasc Res.**, v.75, p. 659-68. 2007.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA / Sociedade Brasileira de Hipertensão / Sociedade Brasileira de Nefrologia. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 95, Supl. 1, p. 1-51. 2010.
- SONG, S. H.; ROACH, M. R. A morphological comparison of aortic elastin from five species as seen with the scanning electron microscope. **Acta Anat.**, v. 123, p. 45-50, 1985.

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

STHEBENS, W.E. Structural and architectural changes during arterial development and the role of hemodynamics. **Acta Anat.**, v. 157, p. 261-274, 1996.

SZCZEPANOWSKA, J. Involvement of Rac/Cdc42/PAK pathway in cytoskeletal rearrangements. **Acta Biochim. Pol.**, v. 56, n.2, p. 225-234, 2009.

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.

TOUYZ, R. M.; SCHIFFRIN, E. L. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensina II in vascular smooth muscle cells. **Pharmacol. Rev.**, v.52, p. 639-672, 2000.

TSAO, P. S. et al. Molecular biology of vascular remodeling. In: LANZER, P.; TOPOL, E. J. (Eds.) **Panvascular medicine**. Berlin – New York: Springer, 2002. p. 243-264.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Pró Reitoria de Pós-Graduação. **Regimento da pós-graduação da USP**. São Paulo: USP. Disponível em <<http://www.usp.br/leginf/resol/r5473c.htm>> Acesso em 01.Jul.2012.

_____. Sistema Integrado de Bibliotecas. **Diretrizes para apresentação de dissertação e teses do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo**: documento eletrônico: ABNT. São Paulo: SIBI-USP, 2012.

VIEGAS, K. A. S et al. Características estructurales de la aorta de conejo (*Oryctolagus cuniculus*). **Revista Chilena de Anatomía**, 2001. doi: 10.4067/S0716-98682001000200002

VIEGAS, K. A. S; ORSI, A. M.; SIMÕES, K.; CROCCI, A.J. Histoarquitetura das artérias subclávia e vertebral esquerdas no cão (*Canis familiaris*). **Bioscience Journal**, v. 20, p. 163-169, 2004a.

VIEGAS, K. A. S.; ORSI, A.M.; SIMÕES, K.; DOMENICONI, R.F.; NATALI, M. R. M. Características estruturais da parede das artérias renal e femoral de coelho (*Oryctolagus cuniculus*). **Acta Scientiarum**, v. 26, p. 227-234, 2004b.

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.

ZHANG, G. Y. et al. Angiotensin II activates connective tissue growth factor and induces extracellular matrix changes involving Smad/activation and p38 mitogen-activated protein kinase signalling pathways in human dermal fibroblasts. **Exp. Dermatol.**, v.18, n.11, p. 947-53, 2009.

ZHANG, H. et al. Role of TNF- α in vascular dysfunction. **Clin. Sci.**, v.116, p. 219-230, 2009.

ZHAO, Y. et al. Role of Ras/PKC ζ /MEK/ERK1/2 signaling pathway in angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell proliferation. **Regulatory Peptides**, v.128, p.43-50, 2005.

ZHU, J.; GAO, D. Losartan reduces collagen content and intimal thickening of iliac arteries after balloon injury in rabbits. **J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.**, v.1, p. 278-282, sep., 2000.

ZHU, Y. C. et al. Role of Angiotensin AT1 and AT2 receptors in cardiac hypertrophy and cardiac remodeling. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v.30, p.911–918, 2003.

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

WOOLFOLK, E. A. et al. Angiotensin II-induced activation of p21-activated kinase 1 requires Ca^{2+} and protein kinase C δ in vascular smooth muscle cells. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v.289, p. C1286-C1294, 2005.

YAMAMOTO, K. et al. Tenascin-C is an essential factor for neointimal hyperplasia after aortotomy in mice. **Cardiovasc. Res.**, v. 65, p. 737-742, 2005.

Apêndices

APÊNDICE A

Dados parciais: colágeno perivascular nas artérias femoral e carótida

Em relação aos estudos do colágeno perivascular nos vasos propostos para estudo no projeto (artérias femoral e carótida), o que temos até o momento são dados parciais, não tratados estatisticamente e que necessitam ainda de complementação.

Na figura 1 observa-se a fibrose perivascular (indicada pelas setas) na artéria femoral de animais tratados por 7 dias. O tratamento com Angiotensina II aumenta a quantidade de colágeno perivascular, principalmente tipo I (coloração vermelho alaranjada analisada sob luz polarizada), enquanto que o tratamento com Losartan parece reverter este processo (**Figuras 1 e 2**). Já o tratamento combinado com Losartan+Angiotensina por 14 dias aparentemente não reverte a fibrose (**Figuras 3 e 4**).

Figura 1 – Fotomicrografia da fibrose perivascular (setas) na artéria femoral tratada por 7 dias. Aumento: 400x

A e B: Angiotensina II; **C e D:** Losartan. A e C luz comum; B e D luz polarizada.

Figura 2 – Gráfico mostrando a relação entre área de colágeno perivascular e área da média na artéria femoral tratada por 7 dias.

Figura 3 – Fotomicrografia da fibrose perivascular (setas) na artéria femoral tratada por 14 dias. Aumentos: 400x em A, B e D; 200x em C.

A e B: Controle; **C e D:** Losartan+Angiotensina. A e C luz comum; B e D luz polarizada.

Figura 4 – Gráfico mostrando a relação entre área de colágeno perivascular e área da média na artéria femoral tratada por 7 dias.

Na artéria carótida foi observado que o tratamento com Angiotensina por 14 dias aumenta a área de fibrose perivascular em relação ao Controle (**Figuras 5 e 6**). As análises dos outros grupos e tempos estão em andamento.

Figura 5 – Fotomicrografia da adventícia com área de fibrose perivascular (setas) na artéria carótida tratada por 14 dias. Aumento: 200x.

A e B: Controle; **C e D:** Angiotensina. A e C luz comum; B e D luz polarizada.

Figura 6 – Gráfico mostrando a relação entre área de colágeno perivascular e área da média na artéria carótida nos grupos Controle e Angiotensina tratados por 14 dias.

Na avaliação do colágeno perivascular sob luz polarizada observamos a predominância de colágeno do tipo I (coloração vermelha) tanto na artéria femoral (**Figuras 1 e 3**) quanto na artéria carótida (**Figura 5**). Porém, na a. femoral ocorreu aumento deste tipo colágeno no tratamento combinado da Ang II com Losartan (**Figuras 3D**), inclusive é possível observar a presença de colágeno tipo III (verde) entremeadado ao COL I (**Figura 3D**), indicando que provavelmente está havendo ativação da síntese desta proteína de matriz e remodelamento do vaso.

APÊNDICE B

Avaliação qualitativa do componente elástico vascular

Em relação ao componente elástico das artérias do coração analisado qualitativamente até o momento não observamos nenhuma alteração relevante (**Figura 1**), porém novas lâminas histológicas foram confeccionadas e estamos analisando quantitativamente este componente da MEC vascular em artérias do coração, artérias femoral, carótida e aorta, para termos resultados mais precisos.

Outra abordagem para o estudo do componente elástico vascular que pretendemos realizar é a avaliação simultânea do colágeno e da elastina através de microscopia de fluorescência nas lâminas coradas com Picrossirius, de acordo com metodologia descrita por Borges et al. (2005).

Figura 1 – Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de aorta de animais tratados por 14 dias. Coloração: Vernhoeff Van-Gieson. Aumento: 1000x.

A: Controle **B:** Angiotensina II

ANEXO A

Representação gráfica da via de sinalização das MAPKs.

FONTE: Adaptado de QI & ELION (2005) por Cristina Eusébio Mendes.