LUCIANA SIMÃO DO CARMO

**Mecanismos fisiopatológicos do
remodelamento vascular associado à
calcificação em camundongos com obesidade
e resistência à insulina**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Nefrologia

Orientador: Prof. Dr. Emmanuel de
Almeida Burdmann

SÃO PAULO

2017

LUCIANA SIMÃO DO CARMO

**Mecanismos fisiopatológicos do
remodelamento vascular associado à
calcificação em camundongos com obesidade
e resistência à insulina**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Nefrologia

Orientador: Prof. Dr. Emmanuel de
Almeida Burdmann

SÃO PAULO

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Carmo, Luciana Simão do
Mecanismos fisiopatológicos do remodelamento
vascular associado à calcificação em camundongos com
obesidade e resistência à insulina / Luciana Simão
do Carmo. -- São Paulo, 2017.
Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Nefrologia.
Orientador: Emmanuel de Almeida Burdmann.

Descritores: 1.Remodelação vascular 2.Calcificação
vascular 3.Diabetes mellitus tipo 2 4.Obesidade
5.Resistência à insulina 6.Estresse oxidativo
7.Metaloproteinases da matriz 8.Colecalciferol
9.Camundongos obesos

USP/FM/DBD-474/17

Dedicatória

Aos meus Pais, Ruth e José do Carmo, pelo amor
incondicional e apoio permanente nos
momentos mais difíceis.

Aos meus irmãos, Luisela, Marco Aurélio e Priscila
e ao meu sobrinho, Luiz Phillip
pela fraterna torcida.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Doutor Emmanuel de Almeida Burdmann, orientador e amigo, pela orientação pessoal e profissional. Sempre sereno, generoso e grande incentivador, a quem tenho profunda admiração e respeito.

Ao Prof. Dr. Marcel Liberman, a quem devo grande parte de minha formação científica.

Ao Prof. Dr. Francisco Rafael Martins Laurindo, pesquisador admirável, pelas sugestões na aula de qualificação e nos experimentos que valorizam ainda mais este trabalho.

Ao grande amigo, Prof. Dr. Alex Yuri Simões Sato, pelo incentivo e disponibilidade ao longo desses anos.

À Profa. Dra. Vanda Jorgetti pelas conversas e conselhos que foram muito importantes durante a reta final deste trabalho.

À Profa. Dra. Rita Tostes, pelas sugestões de experimentos que tornaram este trabalho ainda mais interessante.

Aos Professores Doutores Luiz Vicente Rizzo e Anna Carla Renata Goldberg pela oportunidade de pesquisar no Instituto de Pesquisa do Hospital Israelita Albert Einstein, o meu especial agradecimento.

Ao Prof. Dr. Lionel Gamarra, pelo auxílio fundamental na realização do experimento de calcificação vascular.

À Dra. Claudia Pinto Marques Souza de Oliveira e ao técnico José Edson Pereira da Costa pela doação dos camundongos.

A toda equipe do Núcleo de Apoio à pesquisa do Hospital Israelita Albert Einstein (NAP). Especialmente, Aline e Ana Cláudia, sempre disponíveis e atenciosas, contribuíram na prestação de contas e na submissão dos relatórios da FAPESP.

Aos colegas do grupo de calcificação vascular: Maria Claudina, Youri, Elisângela, Luciana, Gabriel e Melissa pela convivência, discussões científicas e apoio em alguns experimentos.

À grande amiga, Marta Diniz, sempre presente e disponível, que com zelo manteve o laboratório em ótimas condições de trabalho.

Aos Assistentes de pesquisa do Instituto de pesquisa do Hospital Israelita Albert Einstein, Andrea Vieira, Luiz Sardinha e Natália Torres pela disposição e competência na ajuda aos pós-graduandos.

A todos os funcionários do Centro de Experimentação e treinamento em cirurgia do Hospital Israelita Albert Einstein, especialmente a Coordenadora Luciana Cintra que contribuíram para o sucesso desse projeto.

Ao Dr. Thiago Pinheiro Arrais Aloia pelo auxílio na realização das imagens em microscópio confocal.

*À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela
concessão da bolsa de doutorado e pelo financiamento desse estudo.*

Não é sobre ter todas as pessoas do mundo pra si
É sobre saber que em algum lugar alguém zela por ti
É sobre cantar e poder escutar mais do que a própria voz
É sobre dançar na chuva de vida que cai sobre nós
É saber se sentir infinito
Num universo tão vasto e bonito é saber sonhar
Então, fazer valer a pena cada verso
Daquele poema sobre acreditar
Não é sobre chegar no topo do mundo e saber que venceu
É sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu
É sobre ser abrigo e também ter morada em outros corações
E assim ter amigos contigo em todas as situações
A gente não pode ter tudo
Qual seria a graça do mundo se fosse assim?
Por isso, eu prefiro sorrisos
E os presentes que a vida trouxe pra perto de mim
Não é sobre tudo que o seu dinheiro é capaz de comprar
E sim sobre cada momento sorriso a se compartilhar
Também não é sobre correr contra o tempo pra ter sempre mais
Porque quando menos se espera a vida já ficou pra trás
Segura teu filho no colo
Sorria e abraça teus pais enquanto estão aqui
Que a vida é trem-bala, parceiro
E a gente é só passageiro prestes a partir

Ana Carolina Vilela Da Costa

Normalização Adotada

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)*

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª Ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Este estudo teve suporte financeiro da:

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
(Processo n. 13/09652-0)

SUMÁRIO

Dedicatória	iv
Agradecimentos.....	vi
Lista de Figuras.....	xiv
Lista de Abreviaturas e Símbolos	xvii
Lista de Tabelas.....	xix
Resumo	xx
Abstract	xxi
1. INTRODUÇÃO	22
2. HIPÓTESE.....	42
3. OBJETIVOS.....	44
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
5. ESTATÍSTICA.....	63
6. RESULTADOS	65
7. DISCUSSÃO.....	81
8. CONCLUSÕES	92
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94
ANEXO	112

Lista de Figuras

Figura 1. Desdiferenciação de células musculares lisas vasculares em células com fenótipo osteocondrogênico após estímulos calcificadores, segundo Giachelli.	28
Figura 2. Caracterização do remodelamento vascular, segundo Mulvany <i>et al.</i>	30
Figura 3. Mecanismos fisiopatológicos do remodelamento vascular, segundo van Vark <i>et al.</i>	31
Figura 4. Delineamento do protocolo experimental <i>in vivo</i> , após 7 dias de estímulo com vitamina D ₃ em ob/ob e em C57BL/6.	49
Figura 5. Delineamento do protocolo experimental <i>in vivo</i> , após 14 dias de estímulo com vitamina D ₃ em ob/ob e em C57BL/6	50
Figura 6. Gráfico representativo da concentração de cálcio iônico e fósforo sérico, após 14 dias de protocolo experimental <i>in vivo</i>	66
Figura 7. Segmento da aorta torácica de C57BL/6 e de ob/ob, após 14 dias de protocolo experimental <i>in vivo</i>	67
Figura 8. Gráfico representativo da quantificação da circunferência da lâmina elástica externa e da área da parede do vaso, após 14 dias de protocolo experimental <i>in vivo</i>	68
Figura 9. Análise histológica após coloração com hematoxilina eosina.	68
Figura 10. Gráfico representativo da quantificação da circunferência da lâmina elástica interna e da área do lúmen, após 14 dias de protocolo experimental <i>in vivo</i>	69

Figura 11. Gráfico representativo da quantificação da espessura da parede do vaso, após 14 dias de protocolo experimental <i>in vivo</i>	70
Figura 12. Análise histológica após coloração com <i>masson</i>	71
Figura 13. Gráfico representativo da quantificação da área e da percentagem de colágeno, após 14 dias de protocolo experimental <i>in vivo</i>	71
Figura 14. Análise histológica após coloração de <i>Verhoeff-Van Gieson</i>	72
Figura 15. Gráfico representativo da quantificação da fragmentação de fibras elásticas, após 14 dias de protocolo experimental <i>in vivo</i>	73
Figura 16. Análise histológica após coloração por <i>Alizarin Red S</i>	73
Figura 17. Gráfico representativo da quantificação da área e da percentagem de calcificação, após 14 dias de protocolo experimental <i>in vivo</i>	74
Figura 18. Detecção da calcificação por OsteoSense® <i>ex vivo</i>	75
Figura 19. Gráfico representativo da correlação entre o remodelamento vascular e a intensidade de calcificação, após 14 dias de protocolo experimental <i>in vivo</i>	76
Figura 20. Gráfico representativo da expressão de RNA mensageiro para Runx2, Msx2 e Fosfatase Alcalina por RT-PCR em aorta de C57BL/6 e de ob/ob, após 7 dias de protocolo experimental <i>in vivo</i>	77
Figura 21. Expressão proteica de BMP-2, após 14 dias de protocolo experimental <i>in vivo</i>	78
Figura 22. Detecção de radicais livres por adutos de DMPO, após 14 dias de protocolo experimental <i>in vivo</i>	79

Figura 23. Gráfico representativo da quantificação da intensidade de fluorescência de radicais livres, após 14 dias de protocolo experimental <i>in vivo</i>	79
Figura 24. Atividade de metaloproteinases de matriz por confocal em aortas torácicas de C57BL/6 e de ob/ob, após 14 dias de protocolo experimental <i>in vivo</i>	80

Lista de Abreviaturas e Símbolos

AAA	Aneurisma da aorta abdominal
ANOVA	Análise de variância univariada
α-SMA	Alfa-actina de músculo liso
BMP-2	Proteína morfogênica de osso-2
C57	C57BL/6
cDNA	Ácido desoxiribonucleico fita complementar
CMLV	Célula muscular lisa vascular
CO₂	Dióxido de Carbono
CV	Calcificação vascular
CVC	Célula vascular calcificadora
DM2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
DMPO	5,5 dimetil-1-pirrolina-N-óxido
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DP	Desvio padrão
DRC	Doença renal crônica
eNOS	Sintase de óxido nítrico endotelial
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FA	Fosfatase alcalina
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FAV	Fístulas artério-venosas
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HE	Hematoxicilina e eosina

IAM	Infarto agudo do miocárdio
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IL-6	Interleucina-6
IP	Intraperitoneal
LEE	Lâmina elástica externa
LEI	Lâmina elástica interna
MEC	Matriz extracelular
MEE	Membrana elástica externa
MGP	Proteína ácido glutâmico de matriz ou proteína γ -carboxiglutâmico de matriz
miRNA	MicroRNA
MMP	Metaloproteinase da matriz
Msx2	Msh homeobox 2
NIH	National Institute of Health
OB	ob/ob
OCT	Tissue-Tek®: meio para inclusão tecido em congelação
PXE	Pseudoxantoma elástico
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	Reação de polimerase em cadeia por transcriptase Reversa
Runx2	Fator de transcrição 2 relacionado ao runt
SM22α	Proteína 22 alfa de músculo liso
SM-MHC	Cadeia pesada de músculo liso
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa

Lista de Tabelas

Tabela 1. Formas de calcificação vascular, manifestações clínicas mais frequentes e fatores de risco na população em geral e com doença renal crônica (DRC)	25
Tabela 2. Estímulos relacionados à alteração fenotípica das células musculares lisas vasculares	33
Tabela 3. Fatores reguladores da calcificação vascular	37

Resumo

Carmo LS. *Mecanismos fisiopatológicos do remodelamento vascular associado à calcificação em camundongos com obesidade e resistência à insulina* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

O remodelamento vascular é uma resposta adaptativa a estímulos específicos, participando da fisiopatologia de diversas doenças cardiovasculares. Devido à intersecção de fatores de risco cardiovasculares relacionados tanto ao remodelamento vascular como à calcificação vascular (CV), propomos a investigação de mecanismos que inter-relacionam tais condições. Postulamos que camundongos ob/ob com obesidade e resistência à insulina têm resposta exacerbada de remodelamento vascular associado à CV quando comparado aos camundongos controles C57BL/6 (C57) após estímulo com vitamina D₃ (VD) *in vivo*. Camundongos C57 e ob/ob (OB) machos foram injetados com 8x10³ UI/kg de vitamina D₃ intraperitoneal (IP) ou solução fisiológica (CT) durante 14 dias (n=6). Houve aumento da circunferência da lâmina elástica externa da aorta, determinando aumento da área circunferencial do vaso em camundongos OBVD. A hipervitaminose D aumentou o comprimento da lâmina elástica interna da aorta, aumentando o lúmen vascular em camundongos OBVD. Ocorreu também diminuição da espessura da parede do vaso em camundongos OBVD, caracterizando remodelamento vascular positivo hipotrófico. Observamos ainda maior deposição de colágeno na parede do vaso e elastólise em camundongos OBVD. O remodelamento vascular positivo em camundongos OBVD se correlacionou diretamente com o aumento da calcificação na aorta (R²=0,8; p<0,003). Aortas de camundongos OBVD apresentaram aumento na expressão de espécies reativas de oxigênio (ERO), que foi associado ao aumento da atividade de metaloproteinases de matriz (MMP). Estes resultados fornecem evidências que camundongos obesos, insulino-resistentes, e com diabetes tipo 2 desenvolveram remodelamento vascular positivo hipotrófico correlacionado diretamente com calcificação vascular em camundongos OBVD após estímulo com vitamina D₃. O desenvolvimento do remodelamento vascular positivo hipotrófico neste modelo murino é possivelmente mediado pela ativação de MMP na parede da aorta e a geração de ERO pode ter contribuído para a ativação de MMP neste modelo.

Descritores: remodelação vascular; calcificação vascular; diabetes mellitus tipo 2; obesidade; resistência à insulina; estresse oxidativo; metaloproteinases da matriz; colecalciferol; camundongos obesos.

Abstract

Carmo LS. *Mechanisms of vascular remodeling associated with calcification in obesity and insulin resistance* [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

Vascular remodeling is a vessel response to mechanical and hemodynamic stimuli, which is a major determinant of changes in vessel lumen caliber. The mechanisms that influence arterial remodeling include calcification. We hypothesized that ob/ob mice develop positive vascular remodeling associated with calcification. We quantify and assess mechanisms of vascular remodeling and vascular calcification in ob/ob mice (OB) after vitamin D₃ stimulation (VD) or phosphate buffered saline (CT), compared with (C57BL/6) mice. Both ob/ob (OBVD) and C57BL/6 (C57VD) mice received 8x10³ IU/day of (IP) vitamin D₃ for 14 days. Control ob/ob (OBCT) and C57BL/6 (C57CT) mice received IP phosphate buffered saline (PBS) for 14 days (n=6). Hypervitaminosis D increased the external and internal elastic length in aortas from OB mice, resulting in increased total vascular area and lumen vascular area respectively, which characterizes positive vascular remodeling. OBVD mice decreased the aortic wall thickness, resulting in hypotrophic vascular remodeling. We demonstrated increases in collagen deposition, elastolysis and calcification in the aortas of OBVD mice. These results showed a positive correlation between expansive vascular remodeling and vascular calcification in OBVD mice ($R^2=0,8$; $p<0,003$). Furthermore, aorta from OBVD increased oxidative stress, coincidently with augmented metalloproteinase activity. Our data provide evidence that obese type 2 diabetes mellitus and insulin-resistant mice (ob/ob) developed positive hypotrophic vascular remodeling correlated directly with increased vascular calcification in OBVD mice after chronic vitamin D₃ stimulation. The development of positive hypotrophic vascular remodeling in this mouse model is possibly mediated by the activation in the aortic wall of MMP and ROS may have contributed to the activation of MMP in this model.

Descriptors: vascular remodeling; vascular calcification; diabetes mellitus, type 2; obesity; insulin resistance; oxidative stress; matrix metalloproteinases; cholecalciferol; mice, obese.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A calcificação vascular (CV) é um fator de risco importante de morbimortalidade cardiovascular, ¹ incidindo especialmente em pacientes com diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) ^{2, 3} e doença renal crônica (DRC). ⁴⁻⁶ A calcificação está envolvida na fisiopatologia da estenose da valva aórtica, ^{7, 8} no desenvolvimento do aneurisma, na hipertensão arterial sistêmica (por diminuir a complacência vascular), e em doenças cerebrovasculares. ⁴

Durante décadas, a calcificação vascular tem sido descrita como doença degenerativa ou como consequência do envelhecimento. ^{9, 10} No entanto, estudos recentes descreveram que a calcificação vascular é um processo regulado, ^{9, 11-13} similar à osteocondrogênese do esqueleto. ^{2, 6} Este processo pode ser amplificado em pacientes com osteodistrofia renal e osteoporose. ¹⁴ Sabidamente, o diabetes *mellitus* ¹⁵ é um fator de risco multiplicador de complicações cardiovasculares e de morte. ⁹

A hiperglicemia pode potencializar a calcificação vascular, através do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio ^{16, 17} Previamente, nosso grupo demonstrou que o comprometimento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) é importante na fisiopatologia e participa da calcificação valvar aórtica ¹⁸ e calcificação vascular, ¹⁹ atuando especificamente na alteração fenotípica das células musculares lisas vasculares (CMLVs). ⁹ Ainda, a obesidade associada à resistência à insulina e ao diabetes *mellitus* é fator de risco

independente para o desenvolvimento de doenças e calcificação vascular.²⁰

Nosso grupo demonstrou que as células musculares lisas vasculares de camundongos ob/ob têm maior propensão à calcificação após estímulo com proteína morfogênica de osso-2 (BMP-2), com expressão precoce de genes osteocondrogênicos.²¹

1.1 **Calcificação vascular**

Apesar de serem processos que ocorrem simultaneamente, podemos dividir didaticamente a calcificação vascular em comprometimento da íntima e da média do vaso (Tabela 1).²²

Tabela 1. Formas de calcificação vascular, manifestações clínicas mais frequentes e fatores de risco na população em geral e com doença renal crônica (DRC), segundo Wolisi e Moe (2005) ²²

Lesão	Manifestação clínica	Fatores de risco na população geral	Fatores de risco em pacientes com DRC
Aterosclerose: placas ou lesões circunferenciais (Calcificação da íntima)	Doença arterial coronária, arritmia, morte súbita, doença vascular periférica, estenose da artéria renal	Predisposição genética, tabagismo, hipertensão arterial, diabetes, dislipidemia e inflamação	Os mesmos encontrados na população geral, além dos distúrbios do metabolismo mineral, produtos de glicação avançados (AGEs), estresse oxidativo e inflamação
Calcificação da média	Aumento da pressão de pulso, isquemia de múltiplos órgãos ⁵ , estenose valvar aórtica	Diabetes, envelhecimento	Diabetes, envelhecimento, distúrbios do metabolismo mineral, AGEs, estresse oxidativo e inflamação
Arteríolopatia calcificante urêmica (calcifilaxia)	Lesões isquêmicas de pele	Não observados	Distúrbios do metabolismo mineral, especialmente hiperfosfatemia, obesidade, sexo feminino e raça branca

A calcificação da camada íntima acontece principalmente associada à aterosclerose, como consequência à deposição de lipídeos, aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, infiltração de macrófagos e proliferação de células musculares lisas que, posteriormente, sinalizam para osteocondrogênese.^{23, 24} Enquanto isso, a calcificação da camada média pode ocorrer independentemente da aterosclerose e, geralmente, se associa à destruição de fibras elásticas, aparecendo inicialmente como depósitos lineares ao longo do vaso.²⁵ Esse tipo de calcificação (também denominada esclerose média, ou doença de *Mönckeberg*,²⁶ é, particularmente, comum nos pacientes com diabetes *mellitus*,²⁴ com doença renal crônica, na hipertensão essencial, podendo se associar com a osteoporose.^{6, 24} A calcificação da camada média favorece o enrijecimento da parede arterial, com perda da complacência, aumento na pressão sanguínea, alterações de fluxo sanguíneo, o que aumenta o risco cardiovascular.⁶

A calcificação vascular se assemelha à mineralização do esqueleto após desdiferenciação das células musculares lisas vasculares em uma linhagem osteocondrogênica, também descrita como célula vascular calcificadora (CVC).²⁷ As células vasculares calcificadoras têm a capacidade de se diferenciar em outras linhagens mesenquimais, além do osteoblasto, representando 20% a 30% da população total de células musculares lisas.²⁸⁻³⁰ A diferenciação osteogênica caracteriza-se pela diminuição de expressão de proteínas de células musculares lisas e aumento de marcadores osteogênicos, com consequente produção de

vesículas de matriz, que inicia o processo de mineralização e, por fim, secreção de hidroxiapatita. ² *In vitro*, essas células, quando incubadas com estímulos calcificadores, aumentam a expressão de runx2, osterix e fosfatase alcalina, e diminuem a expressão de marcadores de linhagem de célula muscular lisa (cadeia pesada de músculo liso (SM-MHC), proteína 22 alfa de músculo liso (SM22α), alfa-actina de músculo liso (α-SMa) e desmina. ⁵ Estes mecanismos podem ser observados na Figura 1. A desdiferenciação das células musculares lisas pode ocorrer após diversos estímulos, como o aumento do estresse oxidativo, ^{11, 17} aumento da concentração de fosfato inorgânico que pode aumentar o produto cálcio e fósforo. ^{5, 31} Além disso, a BMP-2 presente na placa de aterosclerose é um potente mediador da desdiferenciação das células musculares lisas vasculares em uma linhagem osteocondrogênica ^{3, 32-34} (Figura 1).

Fonte: Adaptado de Giachelli (2005) ⁵

Figura 1. Desdiferenciação de células musculares lisas vasculares em células com fenótipo osteocondrogênico após estímulos calcificadores, segundo Giachelli.

Abreviaturas: SM-MHC: cadeia pesada de músculo liso, SM22-α: proteína 22α de músculo liso, α-SMa: alfa-actina de músculo liso, Runx2: fator de transcrição 2 relacionado ao runt e Msx2: Msh homeobox 2.

1.2 Remodelamento vascular

O remodelamento vascular é uma mudança conformacional e arquitetural do vaso, como resposta a determinados estímulos, participando da fisiopatologia de diversas doenças cardiovasculares como: aneurisma e dissecção vascular, ³⁵ aterosclerose ³⁶ e hipertensão arterial sistêmica do idoso, caracterizada por aumento da pressão de pulso, ³⁷ que contribui para aumentar a morbimortalidade cardiovascular. ¹

O remodelamento vascular reflete a adaptação da parede do vaso a estímulos mecânicos e hemodinâmicos. ³⁵ É definido como qualquer

mudança da área compreendida pela membrana elástica externa (MEE),¹⁶ sendo de fundamental importância para readequação do calibre vascular em diversas situações fisiopatológicas, como a reestenose pós-angioplastia, aterosclerose e fistulas arteriovenosas (FAV), caracterizada por *shear stress* aumentado.³⁸ O remodelamento pode, por exemplo, potencializar a redução do lúmen pela placa neointimal (remodelamento negativo) ou tamponar tal obstrução (remodelamento excêntrico ou positivo).³⁹ O remodelamento vascular excêntrico ou positivo participa na formação do aneurisma, aterosclerose, fistulas arteriovenosas,³⁸ além de modificar o fluxo sanguíneo para órgãos e sistemas, colaborando para a deterioração clínica em diversas doenças cardiovasculares: doença isquêmica do coração, dissecção de aorta, isquemia cerebrovascular, doença arterial periférica, hipertensão arterial sistêmica e insuficiência renal.^{35, 40-43}

Macroscopicamente, o remodelamento arterial pode ser didaticamente classificado através de características do vaso como: a forma e a topografia, podendo ser excêntrico (positivo), normal (equilibrado) ou concêntrico (negativo), além de hipertrófico (maior espessamento da parede vascular), eutrófico (espessura mantida da parede vascular) ou hipotrófico (maior afinamento da parede vascular)⁴⁴ (Figura 2).

Fonte: Adaptado de Mulvany *et al.* (1996) ⁴⁴

Figura 2. Caracterização do remodelamento vascular, segundo Mulvany *et al.* ⁴⁴

Diferentes tipos de remodelamento podem acontecer após lesão: hipotrófico, eutrófico e hipertrófico. Além disso, o remodelamento pode ser concêntrico ou excêntrico. O remodelamento hipotrófico resulta em afilamento da parede e uma menor proporção da relação da parede/luz do vaso. O remodelamento hipertrófico é caracterizado pelo espessamento da parede vascular devido à hiperplasia celular e/ou hipertrofia ou deposição de matriz extracelular que resulta em aumento da proporção da relação da parede/luz por espessamento da parede do vaso. Denomina-se remodelamento eutrófico quando ocorre alteração do diâmetro do vaso, mas a proporção da relação da parede/luz do vaso permanece inalterada.

1.3 Mecanismos do remodelamento vascular

O remodelamento vascular é um processo ativo, muito prevalente, regulado por inúmeros processos que são inter-relacionados. Os principais mecanismos potencialmente envolvidos no remodelamento vascular incluem: 1) proliferação e diferenciação das CMLVs, 2) degradação e ruptura das fibras elásticas, e 3) calcificação e deposição de componentes da matriz extracelular (Figura 3).³⁵

Fonte: Adaptado de van Varik *et al.* (2012)³⁵

Figura 3. Mecanismos fisiopatológicos do remodelamento vascular, segundo van Varik *et al.*³⁵

Corte transversal da parede do vaso. (A) Situação fisiológica (B) Remodelamento arterial. Exemplo de remodelamento arterial caracterizado por aumento da espessura da parede do vaso. Degradação da fibra elástica, calcificação da matriz extracelular e deposição de colágeno resultam em adaptação da parede do vaso. Abreviações: TGF- β , fator de crescimento transformador beta; IL-1, interleucina-1; MMP, metaloproteinases de matriz; VSMC, vascular smooth muscle cell ou célula muscular lisa vascular.

1.3.1 **Proliferação e diferenciação das células musculares lisas vasculares**

As células musculares vasculares são reguladores importantes do tônus vascular e entender a sua função é importante para compreender os mecanismos envolvidos no remodelamento vascular. Em artérias normais, as células musculares lisas vasculares da camada média regulam o tônus e o diâmetro do vaso a fim de garantir o balanço hemodinâmico e a perfusão tecidual.⁴⁵ Embora a maioria das células musculares lisas vasculares da parede vascular apresenta um fenótipo contrátil, vários estudos têm demonstrado que subtipos específicos de CMLVs da camada média têm a capacidade de se diferenciar em um fenótipo sintético que pode ser dividido em fenótipo proliferativo-migratório, secretor ou osteogênico.⁴⁶ A alteração fenotípica das células musculares lisas vasculares é importante em diversas condições fisiopatológicas do tecido vascular. Este processo de desdiferenciação denominado mudança de fenótipo é considerado um dos mecanismos do remodelamento vascular.^{45, 47} Os principais estímulos envolvidos na alteração fenotípica das células musculares lisas vasculares estão sumarizados na Tabela 2.

Tabela 2. Estímulos relacionados à alteração fenotípica das células musculares lisas vasculares, segundo Alexander e Owens (2012)

45

Estímulos relacionados à alteração fenotípica das células musculares lisas vasculares
Inflamação Estresse oxidativo Aumento do produto cálcio e fósforo <i>Shear stress</i> hemodinâmico Estiramento mecânico Produtos de glicação avançada (AGEs)
Estímulo hormonal
Angiotensina 2 Aldosterona
Estímulos parácrinos
Metaloproteinase de matriz (MMP) Fator de crescimento transformador beta (TGF- β) Fator de crescimento endotelial (EGF) Fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF) Fator de crescimento de fibroblasto (FGF)

1.3.2 Fenótipo osteogênico das células musculares lisas vasculares

As células musculares lisas vasculares podem se desdiferenciar *in vitro* em um fenótipo osteogênico e adquirir características semelhantes aos osteoblastos e condrócitos, após estímulo com altas concentrações de cálcio e fosfato.¹⁵ Essas células com fenótipo osteogênico são caracterizadas pela diminuição de proteínas inibitórias de mineralização e aumento de fosfatase alcalina e de vesículas de matriz.³¹ Quando incubadas *in vitro* com estímulos calcificadores (por ex., altas

concentrações de fosfato) aumentam a expressão de runx2, osterix e fosfatase alcalina, diminuindo a expressão de marcadores de célula contrátil, (cadeia pesada de músculo liso (SM-MHC), proteína 22 alfa de músculo liso (SM22α), alfa-actina de músculo liso (α-SMa) e desmina),³¹ (Figura 1)⁵. A diferenciação osteogênica das células musculares vasculares pode ocorrer após diversos estímulos, como o aumento do estresse oxidativo^{17, 48}, aumento da concentração de fosfato inorgânico que leva ao aumento do produto cálcio e fósforo^{5, 27, 31} e de BMP-2^{3, 32-34}, que é agonista potente na desdiferenciação de células musculares lisas vasculares em células osteocondrogênicas (Figura 1).

A desdiferenciação das células musculares lisas vasculares em fenótipo osteocondrogênico após estímulo calcificador com BMP-2 é também regulado pela proteína gla de matriz (MGP) que é inibidor clássico da calcificação. Em camundongos *knockout* para MGP ocorre aumento exuberante da calcificação das fibras elásticas, perda das características do fenótipo contrátil de células musculares lisas vasculares, resultando em um fenótipo osteocondrogênico.⁴⁹ A proteína MGP sequestra o BMP-2, mantendo as células musculares lisas vasculares em um fenótipo contrátil impedindo assim a calcificação vascular.^{13, 50}

Em 1983, Tanimura e colaboradores descreveram associação entre partículas encapsuladas com uma membrana pequena, denominadas vesículas de matriz e calcificação vascular.⁵¹ Essas estruturas vesiculares são secretadas pelas células musculares lisas

vasculares e estão presentes nas camadas íntima e média do vaso.^{52, 53} As vesículas de matriz estão presentes em lesões ateroscleróticas e na hipertensão arterial.^{52, 54} *In vitro*, as vesículas de matriz formam nicho para a calcificação.¹⁵

1.3.3 Degradação e ruptura das fibras elásticas

As fibras elásticas consistem em polímeros de tropoelastina interligados por microfibrilas. A elastina é produzida principalmente pelas células musculares lisas vasculares durante o período fetal e neonatal e é um nicho importante para a calcificação. O pseudoxantoma elástico (PXE) é uma doença genética autossômica recessiva caracterizada por fragmentação e calcificação das fibras elásticas.⁵⁵ Além disso, processo similar ao que ocorre na PXE, isto é alteração na função da elastina foi observado no envelhecimento vascular e na rigidez da aorta.⁵⁶ O mecanismo pelo qual ocorre degradação da fibra elástica associada ao envelhecimento ainda não foi elucidado. Um dos mecanismos é o alongamento cíclico e consecutivo das fibras elásticas após cada batimento cardíaco.^{57, 58} A hipertensão sistólica acelera esse processo, aumentando a pressão de pulso (PP), exercendo tensão e estiramento das fibras na parede vascular. Suportando esta hipótese, demonstrou-se que alterações estruturais na elastina ocorrem de maneira inversamente associada ao número de

ciclo total de batimentos cardíacos *in vitro*.⁵⁹ No entanto, a degradação da elastina *in vivo* não foi estudada até o momento.

1.3.4 **Calcificação e deposição de componentes da matriz extracelular**

A desdiferenciação das células musculares lisas vasculares, bem como a degradação de componentes da matriz extracelular são importantes fatores que aumentam a progressão da calcificação vascular. A CV previamente definida como deposição de minerais é um processo regulado por fatores estimulatórios e inibitórios (Tabela 3). A calcificação é um importante marcador de algumas doenças genéticas, como síndrome de Keutel e PXE.⁶⁰⁻⁶³ A síndrome de Keutel é caracterizada por mutação no gene que codifica a MGP, que é o principal inibidor da calcificação vascular. A MGP é uma proteína de 14 kD dependente da vitamina K que quando carboxilada torna-se biologicamente ativa, inibindo a calcificação vascular.⁶⁴⁻⁶⁶ A PXE é caracterizada pela mutação no gene *abcc6* que codifica uma proteína transportadora. O substrato da MDRP-6 e o mecanismo pelo qual a alteração genética aumenta a calcificação vascular ainda são desconhecidos. Alguns estudos hipotetizaram que ela atue na desdiferenciação da célula muscular lisa vascular, estresse oxidativo e interferência com a carboxilação da MGP.^{63, 67-70}

Tabela 3. Fatores reguladores da calcificação vascular

Fatores estimuladores da calcificação vascular
BMP-2 Produto cálcio e fósforo TNF- α IL-6 IGF-1 Hiperglicemia PTH MMP Degradação da elastina Cristais de hidroxapatita
Fatores inibidores da calcificação
Fetúina-A MGP Osteoprotegerina

1.4 Camundongos deficientes em leptina (ob/ob)

Os camundongos ob/ob são animais hiperfágicos, obesos, hiperinsulinêmicos e hiperglicêmicos que se caracterizam pela deficiência completa de leptina, originalmente produzida por células adiposas, que agem no hipotálamo, inibindo o neuropeptídeo orexigêno Y (NPY); a leptina aumenta, assim, o sinal anorexigênico. Estes roedores apresentam aumento no número (hiperplasia) e volume (hipertrofia) de células- β do pâncreas, que tem capacidade de liberação mais rápida e de maior quantidade de insulina. A hiperglicemia tem pico entre 3 a 5 meses de vida, enquanto que a hiperinsulinemia máxima ocorre um

pouco mais tarde. Os animais são inférteis, devido ao hipogonadismo hipogonadotrófico. A hipertensão pode estar presente, mas não é regra e o colesterol sérico normalmente é elevado, acompanhado de hipertrigliceridemia modesta quando comparados com camundongos controles. Além disso, apresentam menor temperatura corpórea e atividade metabólica mais eficiente e, assim, acumulam mais gordura (células adiposas). O estudo com camundongos deficientes em leptina, do ponto de vista fisiológico, também nos é favorável, pois foi demonstrado que esses camundongos não desenvolvem calcificação vascular (sem estímulo específico), quando comparados aos camundongos controles. Ao contrário, apenas o excesso ou a superexpressão de leptina aumenta a calcificação vascular tanto *in vivo* (em camundongos Apo E *knockout*) ⁷¹ quanto *in vitro*. ⁷² Quanto à deficiência de leptina no osso, os camundongos ob/ob demonstraram aumento da massa óssea. Estudos posteriores, porém, explicitaram que tais alterações não foram uniformes entre o segmento axial e apendicular: aumento do comprimento e da massa óssea de vertebrados lombares e diminuição do comprimento do fêmur, do volume trabecular, quando comparados aos camundongos controles. Assim, em níveis fisiológicos, a leptina pode modular o dimorfismo ósseo dependente do sexo. Camundongos machos deficientes em leptina perdem algumas características ósseas ligadas ao sexo, possivelmente devido à alteração de vias de sinalização de andrógenos no osso. ⁷³

1.5 Modelos experimentais de calcificação vascular

A administração aguda ou crônica de vitamina D₃ em animais é um modelo importante e amplamente descrito na literatura para o estudo da calcificação.^{23, 74, 75}

Um dos principais efeitos da hipervitaminose D é a hipercalcemia e a calcificação vascular.⁷⁶

A incubação de células musculares lisas bovinas com 1,25 dihidroxivitamina D₃ determinou calcificação e aumento da atividade de fosfatase alcalina. A 1,25 dihidroxivitamina D₃ aumentou coincidentemente a expressão gênica de osteopontina, uma glicoproteína fosforilada secretada na matriz extracelular óssea que regula a calcificação vascular em células musculares lisas.⁷⁷

Assim, a 1,25 dihidroxivitamina D₃ é potente estimulador da diferenciação osteoblástica por aumentar a expressão gênica de osteocalcina e osteopontina.⁷⁸ Nesse modelo, a 1,25 dihidroxivitamina D₃ diminuiu a expressão de proteínas e genes relacionados com o hormônio da paratireóide em células musculares lisas bovinas.⁷⁸ Outro estudo demonstrou que a 1,25 dihidroxivitamina D₃ modulou também a transcrição de genes relacionados com o hormônio da paratireóide (PTHrP) em outras linhagens celulares (osteossarcoma de ratos ROS 17/2.8), células escamosas humanas (NCI H520) e queratinócitos humanos.^{16, 79, 80}

Outro modelo de calcificação da aorta envolve a administração de 0,25µg/kg de 1,25 dihidroxivitamina D₃ durante seis semanas em ratos submetidos a nefrectomia. Este modelo demonstrou aumento da expressão dos marcadores osteoblásticos como osteopontina, osteocalcina e sialoproteína óssea em aortas dos ratos estimulados com 1,25 dihidroxivitamina D₃, quando comparados aos ratos controles. Além disso, as células musculares lisas vasculares primárias de ratos foram incubadas com diferentes concentrações de vitamina D₃ (10⁻¹¹ a 10⁻⁷ mol/l) demonstrando aumento da expressão de osterix, que é importante fator de transcrição osteogênico na calcificação vascular.⁷⁴

A administração perivascular (aorta abdominal de ratos *Sprague-Dawley*) de CaCl₂ em altas concentrações (0,2 a 0,5 mol/L) determinou formações aneurismáticas dos segmentos da aorta envolvidos associadamente aumento da calcificação e degradação das fibras elásticas.²³

O desenvolvimento do aneurisma é o resultado de reação inflamatória intensa aos depósitos calcificados.⁸¹⁻⁸⁴ Na análise estrutural da aorta, a maioria dos depósitos de cálcio aparece como massas grandes e compactas que abrange toda a espessura da aorta e, raramente podem ser observadas fibras elásticas. A administração perivascular de baixa concentração de CaCl₂ (0,15 mmol/L) após 7 dias, permite demonstrar o processo inicial de calcificação, ou seja, níveis moderados de calcificação das fibras elásticas e degradação da elastina, bem como ausência de aneurisma e de intensa reação inflamatória. O

processo inicial da calcificação vascular está relacionado à formação de pequenos depósitos de cálcio intimamente associados às fibras elásticas, que segue o aspecto ondulado ou normal das mesmas. No processo final da lesão vascular, os depósitos de cálcio crescem entre as fibras e conectam-se as estruturas adjacentes resultando em degradação das fibras elásticas. Além disso, foi demonstrado desorganização da rede de colágeno, com diminuição da desmosina acompanhada de perda da ondulação das fibras elásticas, paralelamente ao aumento de cálcio em aortas calcificadas. As áreas amplamente calcificadas apresentam características típicas de depósitos minerais maciços, que aparentemente adquirem a forma tubular do vaso sanguíneo.²³

Esses aspectos morfológicos e bioquímicos podem ser observados em pacientes com Síndrome de *Marfan*^{85, 86} e na doença de *Monckeberg* ou Esclerose Medial^{15, 87} e, possivelmente reflete um processo degenerativo. Além disso, as MMPs desempenham importante papel e sabe-se que estão com atividade aumentada em vários processos degenerativos vasculares.⁸⁸

Outro modelo agudo de hipervitaminose D envolve a administração subcutânea de 500.000 UI/Kg de peso corporal de vitamina D₃ em camundongos fêmeas, diariamente, por três dias, a fim de estudar calcificação em tecidos moles.⁷⁵

2. HIPÓTESE

2. HIPÓTESE

A hipótese deste estudo é que camundongos ob/ob tenham uma resposta exacerbada de remodelamento vascular quando comparado ao seu *background* camundongo controle (C57BL/6), após estímulo com vitamina D₃ *in vivo*. Tais mecanismos envolveriam aumento do estresse oxidativo local e da atividade das metaloproteinases de matriz, ocasionando alterações estruturais vasculares, maior destruição de fibras elásticas, alterações do colágeno e calcificação, resultando em remodelamento vascular.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

O objetivo mais amplo deste estudo é entender o efeito da vitamina D₃ no remodelamento vascular associado à calcificação em camundongos ob/ob (obesos e com resistência à insulina) comparado aos controles (C57BL/6). Assim, queremos explorar os mecanismos pelos quais camundongos ob/ob desenvolvem remodelamento vascular e calcificação *in vivo*.

Os objetivos específicos deste projeto são:

Objetivo específico 1: caracterizar o remodelamento vascular em camundongos ob/ob e em C57BL/6, após estímulo calcificador, quanto a: mudanças na expressão gênica e/ou reguladoras da calcificação vascular.

Objetivo específico 2: avaliar a produção de radicais livres.

Objetivo específico 3: investigar o remodelamento da matriz extracelular do vaso, incluindo a destruição de fibras elásticas e a deposição de colágeno, bem como atividade enzimática de metaloproteinases de matriz extracelular.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados 40 camundongos ob/ob (obesos, resistentes à insulina e deficientes em leptina) e 40 camundongos C57BL/6, machos, com 16 a 20 semanas de idade. Estes camundongos foram adquiridos da *Jackson Laboratory* e do centro de pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Os camundongos ob/ob e C57BL/6 foram mantidos em gaiolas de criação, sob condições ambientais controladas com temperatura de 22 ± 2 °C, umidade relativa de $55\pm 10\%$, ciclo de iluminação 12h claro/12h escuro e alimentados *ad libitum* com água e ração, permanecendo por um período de adaptação aos gaioleiros de 20 a 30 dias.

4.2 Comitê de ética em pesquisa

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo possuindo o número de protocolo (129/15).

4.3 Modelo experimental *in vivo*

O modelo experimental *in vivo* que mimetiza a calcificação vascular após injeção intraperitoneal (i.p.) de vitamina D₃ 8.000 UI/kg

de peso corporal foi realizado em camundongos machos C57BL/6 (20-25 gramas) e em ob/ob (50 a 60 gramas). A dose de 8.000 UI/Kg peso corporal de vitamina D₃ administrada nos camundongos durante 14 dias foi previamente padronizada em nosso laboratório a fim de estudar seus efeitos crônicos em um modelo de obesidade e resistência à insulina e, conseqüentemente promover calcificação. Os camundongos foram divididos em 4 grupos: **C57CT** (n=20) e **OBCT** (n=20) que receberam solução fisiológica 0,9% i.p., **C57VD** (n=20) e **OBVD** (n=20) que receberam injeção de vitamina D₃ 8.000 UI/kg de peso corporal i.p. diariamente por um período de 7 ou 14 dias com o objetivo de avaliar a calcificação *in vivo* em diferentes intervalos de tempo. A mortalidade foi de aproximadamente 10% tanto em camundongo ob/ob como em C57 após injeção i.p. de vitamina D₃ durante 14 dias. Os camundongos foram eutanasiados com dose letal de ketamina e de xilazina após 7 e 14 dias. Após a eutanásia, algumas aortas foram incluídas em O.C.T. *Tissue-Tek*® (n=6), armazenadas em freezer a -80° C e, posteriormente, utilizadas para análise de radicais livres, imunofluorescência, calcificação vascular e atividade das metaloproteinases de matriz *in situ*. Enquanto aortas de outros camundongos foram incluídas em parafina (n=6) para caracterização do remodelamento vascular, definido como qualquer mudança da área compreendida pela lâmina elástica externa (LEE) e para avaliação da matriz extracelular do vaso: calcificação, fibrose e fibras elásticas do vaso.

4.4 Delineamento experimental

4.4.1 Avaliação temporal 1

Após sete dias de protocolo experimental *in vivo* os camundongos C57CT, C57VD, OBCT e OBVD foram eutanasiados, as aortas torácicas dissecadas para avaliação da expressão de RNAm de Runx2, Msx2, Fosfatase Alcalina e GAPDH por RT-PCR.

Figura 4. Delineamento do protocolo experimental *in vivo*, após 7 dias de estímulo com vitamina D₃ em ob/ob e em C57BL/6.

4.4.2 Avaliação temporal 2

Após 14 dias de protocolo experimental *in vivo* os camundongos C57CT, C57VD, OBCT e OBVD foram eutanasiados, as aortas torácicas dissecadas para: a) mensuração da concentração sérica de cálcio e fósforo; b) análise macroscópica da aorta; c) quantificação do remodelamento vascular por planimetria; d) análise da matriz

extracelular por microscopia da aorta através da avaliação do conteúdo de colágeno do vaso por coloração específica tricrômio de masson e das fibras elásticas, através de coloração verhoeff-van gieson; e) avaliação da calcificação, através de coloração específica para cálcio *Alizarin Red S* e de *OsteoSense*; f) expressão de genes de calcificação por RT-PCR; g) detecção de radicais livres por adutos de DMPO *in vivo* e h) atividade de metaloproteinase *in situ* através do kit DQ-gelatinase.

Figura 5. Delineamento do protocolo experimental *in vivo*, após 14 dias de estímulo com vitamina D₃ em ob/ob e em C57BL/6

4.5 **Preparo de vitamina D₃**

A vitamina D₃ foi ressuspensa em 5 mL de etanol absoluto e, posteriormente, alíquotada em *eppendorf* de 0,2 mL e acondicionada em freezer -20°C. Diariamente, a vitamina D₃ foi diluída em 500 uL de solução fisiológica para injeção intraperitoneal nos camundongos C57VD e OBVD.

4.6 **Obtenção das amostras de sangue total**

4.6.1 **Sangue total**

As amostras de sangue total foram obtidas por punção do plexo axilar em camundongos previamente anestesiados com xilazina (16 mg/kg de peso corporal) e ketamina (120 mg/kg de peso corporal) sem anticoagulante para dosagem da concentração sérica de cálcio.

4.6.2 **Soro**

As amostras de sangue permaneceram em repouso durante 20 minutos à temperatura ambiente. Após retração do coágulo, as mesmas foram centrifugadas a 2000 rpm, durante 15 minutos a 4°C e utilizadas para dosagem da concentração sérica de fósforo inorgânico. E as outras alíquotas foram armazenadas a -80°C para experimentos futuros.

4.7 Avaliação bioquímica do sangue

A partir da obtenção de sangue total, conforme descrito no item 4.6.1, foi realizada a dosagem da concentração sérica de cálcio através do equipamento i-STAT1 CHEM 8+ da *Abbott*.

4.7.1 Determinação da concentração sérica de fósforo inorgânico

A determinação da concentração sérica de fósforo inorgânico foi realizada com amostras de soro obtidas de acordo com o descrito no item 4.6.2 utilizando o kit Fósforo UV Liquiform. O método direto para determinação de fósforo inorgânico no soro foi desenvolvido por Daly e Ertingshausen e modificado pela Labtest. O sistema para determinação do fósforo inorgânico por fotometria em ultravioleta, com reação de ponto final baseia-se na seguinte reação:

Fósforo inorgânico + H_2SO_4 + Molibdato de Amônio =
Complexo Fosfomolibdato não reduzido.

O fósforo inorgânico reage com o molibdato de amônio na presença do ácido sulfúrico resultando na formação de um complexo fosfomolibdato não reduzido. A absorbância em 340 nm do complexo formado é proporcional à concentração de fósforo inorgânico na amostra.

O soro obtido dos camundongos foi separado após 20 minutos da colheita para minimizar a liberação do fósforo das hemácias. Para dosagem de fósforo inorgânico, as amostras de soro foram

homogeneizadas e, posteriormente foi pipetado 0,01 mL das amostras em duplicata na placa de 96 poços. Na mesma placa, foi pipetado 0,01 mL do padrão e 0,01 mL do branco ambos em duplicata. Em seguida, a placa foi agitada e incubada em banho-maria a 37° C, durante 5 minutos. Após esse período, foi determinada a absorbância do teste e do padrão em 340 nm, acertando o zero com o branco. A quantificação da concentração de fósforo inorgânico foi realizada dividindo a absorbância do teste pela absorbância do padrão e, posteriormente multiplicando por 5.

4.8 Quantificação do remodelamento vascular através de planimetria do vaso

Os camundongos foram eutanasiados com dose letal de ketamina e de xilazina e, posteriormente, perfundidos com solução fisiológica. Imediatamente, a aorta ascendente após a valva aórtica foi cateterizada com gelco plástico e mantida sob pressão de 100mmHg através de sistema de injeção fechada utilizando o manômetro durante 1 hora. O corte transversal da aorta foi fixado, incluído em parafina e, em seguida, cortado em micrótomo. A quantificação do remodelamento vascular foi realizada através de planimetria do vaso utilizando o programa *CellSens Dimension* do microscópio *Olympus*. O remodelamento vascular positivo foi definido como qualquer aumento compreendido pela lâmina elástica externa (LEE) quando comparado ao controle e foi calculado através de quantificação da: a) espessura da

parede vascular: medida linear entre a lâmina elástica externa e interna; b) área do lúmen do vaso e comprimento da lâmina elástica interna; c) área total do vaso, compreendida pela lâmina elástica externa, assim como o comprimento da lâmina elástica externa. As mensurações foram realizadas em quatro campos diferentes da aorta, sendo extraída a média a fim de classificar o remodelamento vascular em excêntrico (positivo), normal (equilibrado) ou concêntrico (negativo), além de hipertrófico (maior espessamento da parede vascular), eutrófico (espessura mantida da parede vascular) ou hipotrófico (maior afinamento da parede vascular).⁴⁴

4.9 **Morfologia: estudo do remodelamento da matriz extracelular**

Para avaliar o remodelamento da matriz extracelular foram realizadas colorações padrão hematoxilina e eosina, tricrômio de masson, *verhoeff-van gieson* e *alizarin red S*. As colorações foram realizadas em tecidos emblocados em parafina e, posteriormente cortados a 4 µm em micrótomo.

4.9.1 **Cálculo de colágeno e das fibras elásticas do vaso**

Foi mensurada a área e a percentagem da expressão de colágeno, através da coloração tricrômio de masson usando o microscópio *Olympus*. As fibras elásticas foram avaliadas pela coloração *verhoeff-van gieson* e a destruição de fibras elásticas através da interrupção das

fibras em contiguidade na aorta. O resultado de cada grupo foi interpretado através da área e da percentagem (multiplicado por 100) demonstrado pela média de cada aorta e pelo desvio padrão.

4.10 **Histoquímica: *Alizarin Red S***

4.10.1 **Desparafinização das lâminas**

As lâminas silanizadas contendo os cortes da aorta de aproximadamente 4 µm foram montadas em suporte e mantidas em estufa a 60°C durante 20 minutos. Em seguida, foram colocadas em 3 banhos de xilol durante 3 minutos em cada banho.

4.10.2 **Hidratação**

As lâminas foram mergulhadas em etanol absoluto por 1 minuto, etanol 95% (1 min.), etanol 70% (1 min.) e, posteriormente, lavadas em água corrente e deionizada.

4.11 **Determinação da calcificação vascular por *Alizarin Red S***

A determinação da calcificação vascular foi realizada através da coloração *Alizarin red S*. As lâminas foram desparafinizadas e hidratadas de acordo com o descrito no item 4.10.1 e 4.10.2, respectivamente. As lâminas contendo as aortas foram incubadas com *Alizarin Red S* 1%, pH=4,1 por aproximadamente 7 minutos. A

coloração foi observada em microscópio após 7 minutos de incubação com o corante *Alizarin Red S*. Em seguida, as lâminas foram lavadas três vezes com água destilada por 3 minutos cada lavagem e, posteriormente, lavadas com lamínulas. As áreas de calcificação avermelhadas foram analisadas e o resultado quantificado através da área e percentagem de calcificação usando o microscópio *Olympus* modelo TH4.

4.12 **Quantificação da calcificação vascular por OsteoSense® *ex vivo***

A calcificação da aorta foi avaliada utilizando o marcador *OsteoSense®* 680EX, adaptado de estudos prévios,^{89, 90} através do espectrofluorímetro tecidual com excitação/emissão de 675/720nm, respectivamente. Após 14 dias de protocolo experimental *in vivo*, foi administrado 0,2 µm de *OsteoSense* diluído em 100 µL de PBS i.p. nos camundongos C57CT, C57VD, OBCT e OBVD. Após 24 horas de administração, os animais foram eutanasiados, perfundidos com solução fisiológica e, em seguida, a aorta foi dissecada. O tecido foi colocado sobre uma superfície preta para evitar a refletância da fluorescência, dentro do equipamento de fluorescência *IVIS® Lumina LT Series III* da *Perkin Elmer*, com um tempo de exposição de 4 milisegundos e um campo de visão de 12,5 cm. Os dados foram analisados após a aquisição das imagens, normalizando o sinal de

fluorescência nas unidades de fótons/s, também utilizando uma região de interesse de 4,0 cm² e ângulo sólido estereoradio.

4.13 **Detecção proteica por imunofluorescência**

As aortas congeladas a fresco em O.C.T. *Tissue Tek Sakura* e cortadas a 4 µm em criostato foram fixadas em paraformaldeído 4% em PBS, pH 7,4 durante 15 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, as lâminas foram lavadas duas vezes em PBS gelado. A permeabilização foi realizada através da incubação com PBS contendo 0,25% de Triton X-100 durante 15 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas três vezes durante 5 minutos. O bloqueio foi realizado através da incubação das lâminas com 1% de BSA em PBS contendo Triton (PBS-T) durante 30 minutos. O anticorpos primários específicos foram incubados por 12 horas a 4° C, diluídos em PBS contendo 1 mg/ml de albumina. Em seguida, foi realizada a incubação com anticorpo secundário durante 1 hora a temperatura ambiente. As aortas foram analisadas e quantificadas em microscópio confocal *Zeiss LSM 710*.

4.14 **RT-PCR**

4.14.1 **Extração de RNA tecidual**

A aorta foi coletada, armazenada em RNA *later*® e mantida a -80° C. As amostras foram manipuladas com luvas, material estéril tratado

previamente com água DEPC, portanto livre de RNase. A aorta foi macerada em gral e pestilo de porcelana contendo nitrogênio líquido. Foi adicionado 1 mL de Trizol ao tecido que foi macerado novamente e homogeneizado. A amostra foi transferida para microtubo de 1,5 mL e, posteriormente, mantida sob agitação, durante 1 hora. Adicionamos 500 uL de clorofórmio em cada microtubo de 1,5 mL que foi agitado por inversão durante 15 segundos; incubado por 15 minutos à temperatura ambiente e submetidos à centrifugação de 13000 rpm por 15 minutos, a 4° C. A fase superior foi, então, transferida para outro microtubo. O RNA foi precipitado da fase aquosa com a adição de 500 uL de álcool isopropílico. Depois, agitada e incubada por 10 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas novamente a 13000 rpm, 4° C por 15 minutos, seguido de remoção do sobrenadante e lavagem do RNA precipitado com 1 mL de etanol 70% em água DEPC. Em seguida, foram centrifugadas por 10 minutos, 9500 rpm à 4° C, seguido de remoção do sobrenadante. Cada amostra foi ressuspensa em 15uL de água livre de RNase e mantidas em gelo. Após 15 minutos, foi adicionado 2 uL de EDTA 25mM e incubados em estufa a 65°C, durante 10 minutos. O RNA foi quantificado medindo-se a absorbância em 260nm (*NanoVue*) e a pureza pela relação da absorbância entre 260/280 nm.

4.14.2 Síntese de cDNA

A reação de transcriptase reversa foi feita usando o *Kit High Capacity (Life Technologies)*. Foi utilizado 0,1µg de RNA que foi convertido em cDNA pela incubação com 1,0 uL de dNTP (100 mM), 0,8 uL de Tampão RT, 2,0 uL de *Random Primers* e 1,0 uL de *MultiScribe Reverse Transcriptase* a 25° C por 10 minutos, 37 ° C por 120 minutos e 85°C por 5 minutos.

4.14.3 Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR)

Adicionou-se 1µL da amostra de cDNA em microtubos juntamente com 8µL de Taqman e 1µL primers específicos marcados com FAM. Como controle negativo da reação foi utilizado 8µL de Taqman, 1µL *primers* e 1µL de água DEPC, sem o cDNA. As amostras foram centrifugadas e normalizadas pelo GAPDH após amplificação por 40 ciclos no equipamento 7500 Real Time PCR *System da Applied Biosystems*. Os resultados foram expressos por delta-delta Ct.

4.15 Detecção de radicais livres por adutos de DMPO *in vivo*

A metodologia empregada na detecção direta de radicais livres foi realizada através da injeção intraperitoneal de 2g/Kg de peso corporal de DMPO em camundongos ob/ob e em C57BL/6, após 14 dias de protocolo experimental *in vivo*. A aplicação intraperitoneal de DMPO foi

divida em duas doses e administradas 6 e 2 horas anteriores a eutanásia, de acordo com o método descrito por Khoo *et al.*⁹¹ Posteriormente, os camundongos foram eutanasiados com dose letal de xilazina e ketamina e as aortas dissecadas. Imediatamente, as mesmas foram congeladas a fresco em O.C.T. *Tissue Tek Sakura* e cortadas a 6 µm em criostato. As aortas foram fixadas em paraformaldeído 4% em PBS, pH 7,4, durante 15 minutos à temperatura ambiente. Após a fixação, foram incubadas com anticorpo primário anti-DMPO conjugado com FITC durante 12 horas para detecção de radicais livres por adutos de DMPO. As lâminas foram montadas com lamínula, analisadas e quantificadas em microscópio *Confocal Zeiss LSM 710*.

4.16 **Atividade enzimática da metaloproteinase de matriz *in situ***

A atividade enzimática da metaloproteinase de matriz *in situ* foi avaliada utilizando-se o Kit DQ-gelatinase. Foi utilizado 1 mg/mL de DQ-gelatinase como substrato que foi diluída em água MiliQ e em seguida, diluída novamente 1:10 em tampão do *kit*. Foram utilizadas aortas congeladas a fresco em O.C.T. *Tissue Tek Sakura*, cortadas a 6 µm em criostato que foram incubadas com 200 µL da DQ-gelatina previamente diluída, durante 6 horas à temperatura ambiente. O controle negativo foi incubado na presença do inibidor de metaloproteinase de matriz denominado 1,10 fenantrolina contido no *kit*. A atividade da metaloproteinase de matriz foi detectada por

microscopia *confocal* Zeiss LSM 710 através de excitação de 490nm e de emissão de 530 nm.

4.17 Reagentes

A vitamina D₃ ou colecalciferol (código: C1357) e o *Alizarin Red S* foram adquiridos da *Sigma Chemical*, St Louis, MO, EUA. O 5,5 dimetil-1-pirrolina-N-óxido (DMPO) foi obtido da *Enzo Life Science*, Farmingdale, NY, EUA e o anticorpo anti-DMPO da Abcam, Milton, Cambridge, Reino Unido. O Trizol, *Hoechst*, DNase, *Taqman Universal PCR Master Mix* e os *primers* (*Msx2*, *Runx2*, fosfatase alcalina e *GAPDH*) eram da *Thermo Fisher Scientific*, Waltham, Massachusetts, EUA. O O.C.T. *Tissue TEK Compound* foi comprado da *Sakura Finetek*, Torrance, CA, EUA e o *kit* DQ-gelatinase da *Molecular Probes*, Eugene, Oregon, EUA. O cartucho CHEM8+ do equipamento i-STAT utilizado para análise bioquímica foi obtido da *Abbott Laboratories*, Lake Bluff, Illinois, EUA. A síntese de cDNA foi adquirida através do *kit High Capacity cDNA Reverse Transcription* com inibidor de RNase da *Applied Biosystems*, Foster, CA, EUA. Para imunofluorescência, foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-BMP-2 e o anticorpo secundário anti-mouse da Abcam. O *kit* fósforo UV *Liquiform* foi adquirido da Labtest Diagnóstica SA, Lagoa Santa, MG, Brasil e o *Osteosense*® 680 da *Perkin Elmer*, Waltham, Massachusetts, MA, EUA. A Ketamina (100 mg/mL) foi comprada da *Richmond División Veterinaria S.A.*, Grand Bourg, Buenos

Aires, Argentina e a Xilazina da Syntec, Cotia, São Paulo, Brazil. As soluções foram preparadas com água purificada em sistema MiliQ.

5. ESTATÍSTICA

5. ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão ⁵⁹. Analisamos os resultados através de ANOVA e, posteriormente, fizemos o pós-teste de *Newman-Keuls*. Consideramos significância estatística quando $p < 0,05$.

O software utilizado foi o *Prism GraphPad 5.0* (*GraphPad Software Inc., La Jolla, CA 92037 USA*).

6. RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1 Modelo experimental *in vivo*

6.1.1 Caracterização do modelo experimental *in vivo*

Observamos aumento semelhante dos níveis plasmáticos de cálcio iônico em OBVD e em C57VD, após 14 dias de protocolo quando comparado aos seus respectivos controles (Figura 6A). Não houve diferença estatística entre os grupos quando mensuramos os níveis plasmáticos de fósforo em sangue total (Figura 6B).

Figura 6. Gráfico representativo da concentração de cálcio iônico e fósforo sérico, após 14 dias de protocolo experimental *in vivo*.

A) Aumento semelhante dos níveis plasmáticos de cálcio iônico em camundongos OBVD e em C57VD. Os valores basais não tiveram diferença estatística (n=5-6). B) A concentração plasmática de fósforo não diferiu entre os grupos (n=5). * $p < 0,05$ vs. seus respectivos controles (ANOVA seguido de *Newman-Keuls*).

6.2 Análise macroscópica da aorta

Durante a manipulação das aortas, as mesmas apresentavam-se quebradiças, com consistência mais gelatinosa e elasticidade reduzida. Além disso, houve aumento do diâmetro transversal do vaso em camundongos OBVD (Figura 7).

Figura 7. Segmento da aorta torácica de C57BL/6 e de ob/ob, após 14 dias de protocolo experimental *in vivo*

A) Não houve diferença entre o segmento da aorta torácica de camundongos C57VD e o de C57CT. B) Notamos aumento do diâmetro transversal do vaso em aortas de camundongos OBVD quando comparado aos controles e à C57VD.

6.3 Análise da matriz extracelular e quantificação do remodelamento vascular por planimetria

A hipervitaminose D contribuiu para aumentar a circunferência da lâmina elástica externa (LEE) após 14 dias de protocolo experimental (Figura 8A), determinando um aumento da área circunferencial do vaso em OBVD quando comparado aos controles e a C57VD (Figura 8B). Esse resultado foi demonstrado através de microscopia da aorta após coloração com hematoxilina e eosina (Figura 9).

Figura 8. Gráfico representativo da quantificação da circunferência da lâmina elástica externa e da área da parede do vaso, após 14 dias de protocolo experimental *in vivo*.

A) Aumento da circunferência da lâmina elástica externa (μm) em aortas de camundongos OBVD ($n=6$). B) Notamos aumento da área total do vaso (μm^2) em OBVD ($n=6$). * $p<0,05$ vs. todos os grupos (ANOVA seguido de *Newman Keuls*).

Figura 9. Análise histológica após coloração com hematoxilina eosina.

Aumento da circunferência da lâmina elástica externa (seta) e da área da parede do vaso em aortas de camundongos OBVD, após 14 dias de protocolo experimental *in vivo* (aumento de 5x), $n=6$.

Nesse contexto, a vitamina D₃ também aumentou o comprimento da lâmina elástica interna ocasionando um aumento do lúmen vascular em aortas de camundongos OBVD, denotando um processo de remodelamento vascular positivo ou excêntrico, respectivamente, o que não ocorreu em C57VD e em seus respectivos controles (Figura 10).

Figura 10. Gráfico representativo da quantificação da circunferência da lâmina elástica interna e da área do lúmen, após 14 dias de protocolo experimental *in vivo*

A) Aumento da circunferência da lâmina elástica interna (µm) em aortas de camundongos OBVD (n=6). B) Aumento da área do lúmen (µm²) em OBVD (n=6). * p<0,05 *vs.* todos os grupos (ANOVA seguido de *Newman Keuls*).

Houve, ainda, diminuição significativa da espessura da parede do vaso em aortas de camundongos OBVD caracterizando remodelamento vascular hipotrófico (Figura 11).

Figura 11. Gráfico representativo da quantificação da espessura da parede do vaso, após 14 dias de protocolo experimental *in vivo*.

Houve diminuição da espessura da parede do vaso (µm) em aortas de camundongos OBVD (n=6). * $p < 0,05$ vs. todos os grupos (ANOVA seguido de *Newman Keuls*).

6.4 Análise da matriz extracelular por microscopia da aorta

6.4.1 Avaliação do conteúdo de colágeno do vaso

Na Figura 12, observamos maior deposição de colágeno na parede do vaso de OBVD em comparação a C57VD (µm²), quantificada na Figura 13. Conforme demonstrado na Figura 12, a microtopografia da fibrose concentrou-se, principalmente ao redor dos núcleos de calcificação nos camundongos OBVD. Não notamos fibrose significativa em C57CT e em C57VD.

Figura 12. Análise histológica após coloração com *masson*

Notadamente, observamos ainda maior deposição de colágeno (seta) em aortas de camundongos OBVD, após 14 dias de protocolo experimental *in vivo*. Houve discreta fibrose em aortas de camundongos OBCT (aumento de 20x), n=6.

Figura 13. Gráfico representativo da quantificação da área e da percentagem de colágeno, após 14 dias de protocolo experimental *in vivo*.

A) Aumento de colágeno em aortas de camundongos OBVD *vs.* OBCT demonstrado pela área em μm^2 (n=6). B) Notamos aumento da percentagem de colágeno na parede do vaso de camundongos OBVD *vs.* OBCT (n=6). * $p < 0,05$ *vs.* OBCT.

6.4.2 Avaliação das fibras elásticas do vaso

Na Figura 14, observamos alteração da arquitetura das fibras elásticas através de coloração específica, *Verhoeff-Van Gieson*, em aortas de camundongos OBVD, após 14 dias. Houve aumento de elastólise ou rotura das fibras elásticas em aortas de camundongos OBVD, quantificada na Figura 15. Em contiguidade a áreas de calcificação vascular houve perda significativa de fibras elásticas. Não notamos fragmentação das fibras elásticas em C57CT, OBCT e em C57VD.

Figura 14. Análise histológica após coloração de *Verhoeff-Van Gieson*

Observamos destruição de fibras elásticas (seta) apenas em aortas de OBVD, principalmente em regiões do vaso próximas a núcleos de calcificação (seta), após 14 dias de protocolo experimental *in vivo* (aumento de 20x), n=6.

Figura 15. Gráfico representativo da quantificação da fragmentação de fibras elásticas, após 14 dias de protocolo experimental *in vivo*.

Aumento da fragmentação de fibras elásticas em aortas de OBVD (n=6).

6.4.3 Avaliação da calcificação vascular por *Alizarin Red S*

Aortas de camundongos ob/ob submetidos ao estímulo calcificador (OBVD) apresentaram aumento significativo da calcificação vascular em comparação com C57VD, o qual demonstrou discreta mineralização da aorta (Figura 9). Os camundongos OBCT e C57CT não demonstraram calcificação detectável por *Alizarin Red S* (Figuras 16 e 17).

Figura 16. Análise histológica após coloração por *Alizarin Red S*.

Demonstramos calcificação aumentada (setas) em OBVD *vs.* C57VD e seus respectivos controles, após 14 dias de protocolo experimental *in vivo* (aumento de 20x), n=6.

Figura 17. Gráfico representativo da quantificação da área e da percentagem de calcificação, após 14 dias de protocolo experimental *in vivo*.

A) Aumento de calcificação em OBVD demonstrado pela área em μm^2 vs. C57VD. B) Aumento da percentagem de calcificação em relação à parede do vaso de OBVD vs. C57VD. * $p < 0,05$ vs. C57VD, (n=6).

6.5 Avaliação da calcificação vascular por OsteoSense® *ex vivo*

Na figura 18, demonstramos aumento da calcificação em aortas de OBVD em comparação com OBCT, o qual demonstrou discreta calcificação da aorta. Os camundongos C57CT e C57VD não demonstraram calcificação detectável por *OsteoSense*.

Figura 18. Detecção da calcificação por OsteoSense® *ex vivo*

Demonstramos calcificação aumentada (amarelo) em OBVD *vs.* todos os grupos após 14 dias de protocolo experimental *in vivo*, (n=3).

6.6 Avaliação do remodelamento vascular associado à calcificação após protocolo experimental *in vivo*

Observamos notadamente que o remodelamento vascular positivo em OBVD se correlacionou diretamente com o aumento da calcificação na aorta $R^2=0,80$ ($p=0,0027$), Figura 19. Em paralelo, houve maior fragmentação das fibras elásticas (Figura 14) e maior fibrose em OBVD, conforme demonstrado anteriormente na Figura 12.

Figura 19. Gráfico representativo da correlação entre o remodelamento vascular e a intensidade de calcificação, após 14 dias de protocolo experimental *in vivo*.

Observamos forte correlação entre o aumento do remodelamento vascular positivo representado pela área total do vaso e pelo aumento da intensidade de calcificação em OBVD. $R^2=0,8006$, $p=0,0027$ ($n=8$).

6.7 Expressão de RNAm de Runx2, Msx2 e de Fosfatase alcalina

O RT-PCR da aorta mostrou diminuição da expressão gênica de Runx2, Msx2 e de Fosfatase Alcalina em ob/ob após sete dias de estímulo com Vitamina D₃ (OBVD) normalizado pelo GAPDH (Figura 20). Por outro lado, observamos aumento da expressão gênica de Msx2, Runx2 e de Fosfatase Alcalina em ob/ob na condição basal (sem estímulo).

Figura 20. Gráfico representativo da expressão de RNA mensageiro para Runx2, Msx2 e Fosfatase Alcalina por RT-PCR em aorta de C57BL/6 e de ob/ob, após 7 dias de protocolo experimental *in vivo*.

A) Observamos diminuição da expressão de RNAm para Msx2 em aortas de OBVD (n=4). B) Notamos diminuição da expressão de RNAm para MSX2 em aortas de OBVD (n=5). C) Demonstramos diminuição da expressão de RNAm para fosfatase alcalina em aortas de OBVD (n=5). Houve aumento da expressão de RNAm de Runx2, Msx2 e de fosfatase alcalina na condição basal. * $p < 0,05$ (ANOVA seguido de *Newman Keuls*).

6.8 Avaliação da expressão protéica de BMP-2

Notamos aumento exuberante da expressão de proteína morfogênica de osso-2 (BMP-2) em aortas de camundongos OBVD (seta), denotando “transativação” do BMP-2 um dos mais importantes fatores estimulatórios da calcificação vascular descritos na literatura (Figura 21). O aumento do BMP-2 resultou em desdiferenciação da CMLV em nosso modelo de diabetes/resistência à insulina.

Figura 21. Expressão proteica de BMP-2, após 14 dias de protocolo experimental *in vivo*.

Demonstramos aumento da expressão proteica de BMP-2 em aortas de camundongos OBVD (setas). Aumento de 400x, n=5.

6.9 Detecção de radicais livres por adutos de DMPO *in vivo*

Por meio de “imunospintrapping”, notamos aumento da formação de radicais livres em aortas de camundongos OBVD que possivelmente potencializa o remodelamento vascular associado à calcificação em nosso modelo de diabetes/resistência à insulina. O aumento de radicais livres foi demonstrado em vermelho (seta) por microscopia confocal (Figuras 22 e 23).

Figura 22. Detecção de radicais livres por adutos de DMPO, após 14 dias de protocolo experimental *in vivo*.

Houve aumento da produção de espécies reativas de oxigênio em aortas de camundongos OBVD (setas). Aumento de 400x, n=6.

Figura 23. Gráfico representativo da quantificação da intensidade de fluorescência de radicais livres, após 14 dias de protocolo experimental *in vivo*.

Aumento da intensidade de fluorescência de radicais livres em OBVD, (n=6).

6.10 Avaliação da atividade das metaloproteinases de matriz

Na Figura 24, observamos aumento da atividade de metaloproteinases de matriz (MMP) *in situ* em aortas de camundongos OBVD, demonstrado através do aumento da fluorescência em verde (seta).

Figura 24. Atividade de metaloproteinases de matriz por confocal em aortas torácicas de C57BL/6 e de ob/ob, após 14 dias de protocolo experimental *in vivo*.

Atividade das metaloproteinases de matriz aumentada em aorta de OBVD (verde). Aumento de 400x, n=4.

7. DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

Usamos um modelo experimental de calcificação vascular consagrado na literatura ^{77, 92-95} através de hipervitaminose D, visando compreender as alterações fisiopatológicas como o enrijecimento vascular, caracterizado por calcificação e elastólise, e assim investigar os mecanismos envolvidos no remodelamento vascular e na calcificação vascular. Tal modelo assemelha-se ao do envelhecimento do vaso ⁹⁶ e é relevante em diversas condições patológicas como aneurismas, aterosclerose, fistula arteriovenosa e no desbalanço de fluxo. ³⁵ Em humanos, tal processo determina: a) rigidez vascular com aumento da pressão de pulso e da velocidade da onda de pulso, presentes na hipertensão arterial sistêmica, por exemplo; b) perda da autorregulação de fluxo, corroborando para isquemia de órgãos e tecidos distais; c) lesão de órgãos alvo (coração, cérebro, rins e retina). Além disso, a rigidez vascular pode complicar procedimentos vasculares e endovasculares e de revascularização. ⁹⁷

Neste trabalho, analisamos a resposta a estímulo calcificador com vitamina D₃ e o remodelamento vascular em camundongos diabéticos/com resistência à insulina (ob/ob) comparados aos controles. Especialmente, neste grupo de diabetes/resistência à insulina, em que a doença/risco cardiovascular é exacerbada, há grande interesse científico em entender tais mecanismos e avaliar possíveis alvos terapêuticos. Ainda não se sabe como o diabetes *mellitus* pode modular o remodelamento vascular, e de forma complementar,

como a calcificação pode influenciar este processo. Postulamos que o aumento da desdiferenciação da célula muscular lisa vascular, a calcificação vascular, a alteração de componentes da matriz extracelular como a destruição de fibras elásticas observada no modelo de diabetes contribuem para a fisiopatologia do remodelamento vascular em aorta de camundongo OBVD.

Em nosso modelo, a hipervitaminose D aumentou de maneira semelhante os níveis séricos de cálcio iônico em camundongos ob/ob e em C57BL/6. Um dos marcadores séricos da hipervitaminose D é a hipercalcemia, devido a maior absorção intestinal de cálcio e a redução de sua excreção pela urina.⁷⁷ Desse modo, as diferenças de remodelamento vascular e alterações da matriz extracelular (calcificação, elastólise e fibrose) encontradas em aortas de OBVD não podem ser explicadas unicamente por diferenças do aumento do cálcio iônico, mas por uma resposta individual do vaso. Desta forma, nosso objetivo foi entender tal processo, através de investigação dos mecanismos que determinaram remodelamento e calcificação vascular neste modelo.

Na prática clínica, conforme consenso de 2011, a Sociedade de Endocrinologia dos Estados Unidos, determinou que a concentração sérica desejável de 25 (OH) vitamina D é >75 nmol/L (>30ng/ml). Segundo o *National Institute of Health*, a ingesta de 700-800 UI/dia de vitamina D₃ e de 500-1.200 mg/dia de cálcio é recomendada para pessoas entre 62 e 85 anos de idade e é importante para tentar

diminuir o risco de fratura e perda óssea, principalmente em mulheres na pós-menopausa que apresentam risco aumentado de osteoporose. No entanto, é importante ressaltar que o uso indiscriminado de suplementos de cálcio (1,000 mg/dia) e de vitamina D₃ (400 UI) por mulheres na pós-menopausa durante 7 anos associou-se com um aumento de 17% no risco de desenvolver cálculo renal.⁹⁸

A suplementação de cálcio aumentou em 31% o risco de infarto agudo do miocárdio (IAM) em cinco estudos clínicos que incluíram 81.151 participantes.⁹⁹ Em outro estudo, envolvendo 11921 pacientes, houve aumento de 27% em IAM, sendo esse estudo a análise de outros 11 publicados.⁹⁹ Porém, o *Women's Health Initiative* CaD mostrou que não houve aumento de eventos cardiovasculares em pacientes suplementados com 1 g de cálcio e de 400 UI de vitamina D/dia (n=36.282) seguidos por 7 anos.^{98, 100} Assim, diante desses dados, a reposição de cálcio e vitamina D₃ deve ser individualizada e realizada com parcimônia, nunca de forma indiscriminada ou prolongada, a fim de não determinar efeitos de calcificação ectópica, como a mineralização vascular e suas consequências clínicas.

Estudos *in vitro* com célula muscular lisa estimulada com altas concentrações de fosfato apresentaram aumento da expressão de marcadores osteogênicos (fosfatase alcalina, Runx2 e osterix) e diminuição da expressão de marcadores de célula contrátil, como α -actina de músculo liso (α -SMA), proteína 22 α de músculo liso (SM22 α), desmina e cadeia pesada de músculo liso (SM-MHC).^{9, 47, 101-103}

Nosso grupo demonstrou que as células musculares lisas de aortas de ob/ob são mais propensas à osteocondrogênese.²¹ Neste trabalho, observamos que a expressão gênica de fosfatase alcalina, Msx2 e de Runx2 aumentou em ob/ob *vs.* C57BL/6 em situação basal ou controle (sem estímulo calcificador). As células musculares lisas vasculares de ob/ob apresentaram aumento da expressão gênica e proteica de marcadores osteogênicos como a fosfatase alcalina, Msx2 e Runx2 também após incubação com BMP-2 quando comparado ao C57BL/6 sob as mesmas condições.²¹

Em nosso modelo *in vivo* demonstramos também aumento da expressão gênica de fosfatase alcalina, Msx2 e de Runx2 em aortas de ob/ob e em C57BL/6. Porém, o RNAm de tais marcadores diminuiu após 7 dias de estímulo com vitamina D₃ *in vivo*. Este resultado, entretanto, não afasta a possibilidade de expressão aumentada do RNAm destes marcadores em avaliações temporais distintas, seja mais precoce ou tardia. Ainda, outras formas de regulação gênica podem estar envolvidas neste processo: pós-translacional, exercida por microRNA⁸⁵ que atuam como reguladores da expressão gênica como “feedback” regulatório à ossificação ectópica. Por exemplo, estudos mostraram que o miR-204 regula a calcificação *in vivo*, em modelo murino de calcificação vascular após injeção de 500.000 UI/kg de vitamina D₃ subcutâneo, durante 3 dias.¹⁰⁴ Nesse modelo, a calcificação vascular foi associada com aumento da expressão gênica de Runx2 na aorta.¹⁰⁴ Estudos de outros grupos mostraram que células musculares lisas vasculares estimuladas com BMP-2 apresentaram

diminuição da concentração de miR-30b e de miR-30c, com consequente aumento da expressão de Runx2 estimulando a mineralização ectópica.¹⁰⁵

Em nosso modelo de calcificação vascular associado à diabetes/resistência à insulina, demonstramos que a hipervitaminose D aumentou a expressão proteica de BMP-2 em aorta de ob/ob, que possivelmente ativa o programa osteocondrogênico de células musculares lisas vasculares, potencializando assim, a calcificação vascular. O BMP-2 é uma proteína morfogenética óssea-2 que está aumentada em lesões ateroscleróticas humanas ocasionando desdiferenciação da CMLV.^{32, 33} De acordo com publicação recente do nosso grupo, CMLVs de ob/ob aumentaram a mineralização *in vitro* após estímulo com BMP-2.²¹ Outro mecanismo que pode explicar o aumento da calcificação vascular é através do aumento do estresse oxidativo. Notamos aumento exuberante de radicais livres em aorta de OBVD detectado por DMPO e respectivo anticorpo. O DMPO é um aduto que detecta radicais livres *in vivo*. A hiperglicemia em ob/ob pode potencializar a calcificação vascular através do aumento do estresse oxidativo.^{9, 18, 19} O estresse oxidativo e nitrosativo, assim como a diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico sabidamente participam da calcificação valvar aórtica,¹⁰⁶ e estão aumentados ao redor de núcleos de calcificação.¹⁸ O H₂O₂ aumenta a expressão de Runx2 resultando na desdiferenciação da CMLV em um fenótipo osteogênico.¹⁰⁷

De acordo com nossos resultados, verificamos que camundongos OBVD desenvolveram remodelamento vascular positivo ou excêntrico da aorta, com aumento de 1,5 vezes o diâmetro do vaso. O remodelamento vascular positivo em OBVD foi caracterizado pelo aumento do lúmen e da área total do vaso, bem como pela diminuição da espessura da parede do vaso denotando remodelamento vascular positivo hipotrófico.

Em nosso modelo de calcificação vascular *in vivo*, demonstramos que o remodelamento vascular positivo em OBVD se correlacionou diretamente com o aumento da calcificação na aorta, $R^2=0,80$ ($p=0,0027$).

Sabidamente, o remodelamento vascular pode ocorrer juntamente com mudanças na arquitetura da matriz extracelular da parede vascular como a calcificação, a fibrose, hiperplasia das camadas íntima e média, mudanças do colágeno e de fibras elásticas do vaso, assim com a disfunção endotelial.³⁵ Nosso modelo demonstra alterações da microarquitetura do vaso, relevantes em uma miríade de doenças cardiovasculares, além da calcificação vascular como: remodelamento vascular e da matriz extracelular com a deposição de colágeno, rotura de fibras elásticas, secreção, determinando a perda de elasticidade e rigidez vascular. Tais achados estão exacerbados em OBVD. A elastocalcinose demonstrada em aorta de OBVD é caracterizada pela deposição de hidroxapatita nas lâminas elásticas das artérias, em geral, um processo inicial de calcificação vascular. A elastocalcinose é uma alteração da parede do vaso, também demonstrada em modelo de

calcificação vascular em camundongos deficientes em proteína ácido glutâmico de matriz (MGP), uma proteína inibidora da calcificação vascular, que necessita de gama-carboxilação para ser funcionalmente ativa. Esta proteína também é funcionalmente deficiente em pacientes anticoagulados cronicamente com Varfarina, um inibidor da vitamina K^{101, 108} Em paralelo, a calcificação vascular pode ser acompanhada por elastólise.³⁵ Em nosso modelo, observamos alteração da arquitetura das fibras elásticas com aumento de elastólise ou rotura das fibras elásticas em contiguidade a áreas de calcificação vascular em aortas de OBVD. Isto também poderia explicar o remodelamento vascular positivo, devido à perda de propriedades elásticas do vaso que determina mudanças na capacidade de acomodação e "recoil" do vaso, além do aumento do *shear stress*. Por sua vez, a elastina degradada tem alta afinidade pelo cálcio, o que facilita a progressão da calcificação vascular.^{109, 110} Em outros modelos de remodelamento vascular e aneurisma, tais como a Síndrome de *Marfan*, as fibras elásticas estão propensas à rotura, devido à mutação do gene da fibrilina-1.^{78, 85, 111} Ainda, a degradação da elastina é causada por ativação de elastase e metaloproteinases que têm um papel importante no remodelamento vascular e na progressão da calcificação.^{109, 110} Isto ocorre através de peptídeos derivados da elastina que se ligam aos receptores laminina e da elastina na superfície das CMLVs e através da transformação da sinalização do fator de crescimento β podem aumentar a expressão de Runx-2 que é importante na desdiferenciação osteocondrogênica e na proliferação celular.^{109, 110}

Em nosso modelo, também demonstramos intenso depósito de colágeno principalmente em torno dos núcleos de calcificação em aortas de OBVD, favorecendo o remodelamento da matriz extracelular o que pode influenciar a conformação geométrica do vaso associadamente à maior calcificação vascular.

Para melhor entender este processo, investigamos mecanismos que poderiam exacerbar o remodelamento positivo do vaso, tais como aumento da atividade das metaloproteinases de matriz e fibrose, que estavam aumentados em aorta de OBVD. Tal aumento da atividade de metaloproteinase de matriz na parede do vaso com consequente degradação de fibras elásticas corrobora para o remodelamento vascular positivo. O diabetes *mellitus* aumenta a atividade das metaloproteinases de matriz em células vasculares.¹¹²

O estresse oxidativo aumentado na aorta de camundongos obesos e com resistência à insulina *in vivo* também pode ter contribuído para ativação das metaloproteinases de matriz.¹¹¹ Podemos fazer um paralelo com a fisiopatologia da progressão de aneurisma da aorta abdominal em que a degradação da matriz extracelular mediada por proteases como MMPs é um mecanismo relevante.^{113, 114} Neste processo, alguns subtipos de metaloproteinases de matriz são expressos na parede vascular como, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9 e MMP-12.¹¹⁵ Para demonstrar a importância das metaloproteinases de matriz no desenvolvimento de aneurisma da aorta abdominal, camundongos “knockout” para as enzimas proteolíticas MMP-9 e MMP-2 não

desenvolvem a doença.⁸⁴ Além disso, existe um desequilíbrio entre MMPs e TIMPs, culminando com a degradação da matriz extracelular em aneurisma da aorta abdominal, hipertensão, aterosclerose e calcificação.¹¹⁶ Fazendo um paralelo com nosso modelo postulamos que possa existir também um desequilíbrio entre MMPs e TIMPs determinando, por fim, a degradação das proteínas da matriz extracelular e, conseqüentemente, remodelamento vascular em OBVD. Ainda, consideramos que o processo de desdiferenciação das células musculares lisas vasculares em fenótipo osteocondrogênico que inicia a calcificação vascular possa também ser um mecanismo de intersecção que favoreça o remodelamento vascular positivo em OBVD, através da regulação de expressão e atividade de MMP e TIMP.^{14, 18} Ainda, células vasculares podem secretar proteínas da família das metaloproteinases de matriz *in vitro*, que desempenham papel importante no remodelamento vascular^{78, 117-120} e que degradam componentes da matriz extracelular em pH fisiológico.⁷⁸

Estudos recentes têm demonstrado que o estresse oxidativo participa do desenvolvimento do aneurisma da aorta abdominal.^{121, 122} O aumento de radicais livres pode, posteriormente, promover a inflamação, a atividade de metaloproteinases de matriz, a apoptose de células musculares lisas ou alterações do colágeno.¹²² Estudos realizados em modelos de murinos de aneurisma da aorta abdominal demonstraram que a NADPH oxidase e a eNOS são importantes à síntese de radicais livres e progressão do aneurisma.¹²³ A inibição destas enzimas impede o desenvolvimento do aneurisma da aorta

abdominal, através da diminuição da expressão de MMP-2 e MMP-9 em tecidos da aorta.¹²³ O aumento do estresse oxidativo neste modelo de diabetes e calcificação vascular com vitamina D₃ poderia aumentar atividade MMPs.

Por fim, nossos achados experimentais mais relevantes são: camundongos ob/ob têm calcificação vascular aumentada após estímulo calcificador com vitamina D₃ *in vivo* e apresentaram associadamente remodelamento vascular positivo hipotrófico. Ainda, a obesidade e a resistência à insulina promovem mudanças estruturais da parede vascular neste modelo como: deposição de colágeno e rotura de fibras elásticas, aumento do estresse oxidativo e da atividade de metaloproteinases, determinando a perda de elasticidade e aumento da rigidez vascular, implicado em diversas doenças cardiovasculares e envelhecimento.

8. CONCLUSÕES

8. CONCLUSÕES

Nossos resultados sugerem que a resposta vascular, nesse modelo de obesidade e resistência à insulina, após estímulo calcificador *in vivo*, está exarcebada e culmina com aumento da mineralização ectópica do vaso por ativação de programa osteocondrogênico específico, além de simultâneo remodelamento vascular positivo e hipotrófico. Essa mudança conformacional e estrutural do vaso provavelmente tem intersecção fisiopatológica comum com a ativação de genes osteogênicos ativados pelo BMP-2, com aumento do estresse oxidativo e da atividade metaloproteinase vascular. Esses resultados são importantes para melhor conhecimento dessas vias de sinalização, e têm potencial de identificar alvos terapêuticos para atenuar a progressão da calcificação vascular associada à elastólise, aumento da rigidez vascular e remodelamento vascular, marcadores de alta morbimortalidade durante o envelhecimento e, especialmente, em pacientes com obesidade, resistência à insulina e diabetes.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Speer MY, Yang HY, Brabb T, Leaf E, Look A, Lin WL, et al. Smooth muscle cells give rise to osteochondrogenic precursors and chondrocytes in calcifying arteries. *Circ Res* 2009;104(6):733-41.
2. Shao JS, Cheng SL, Sadhu J, Towler DA. Inflammation and the osteogenic regulation of vascular calcification: a review and perspective. *Hypertension* 2010;55(3):579-92.
3. Bostrom KI, Jumabay M, Matveyenko A, Nicholas SB, Yao Y. Activation of vascular bone morphogenetic protein signaling in diabetes mellitus. *Circ Res* 2011;108(4):446-57.
4. Giachelli CM. Vascular calcification mechanisms. *J Am Soc Nephrol* 2004;15(12):2959-64.
5. Giachelli CM, Speer MY, Li X, Rajachar RM, Yang H. Regulation of vascular calcification: roles of phosphate and osteopontin. *Circ Res* 2005;96(7):717-22.
6. Wu M, Rementer C, Giachelli CM. Vascular calcification: an update on mechanisms and challenges in treatment. *Calcif Tissue Int* 2013;93(4):365-73.
7. Miller JD, Weiss RM, Heistad DD. Calcific aortic valve stenosis: methods, models, and mechanisms. *Circ Res* 2011;108(11):1392-412.
8. Otto CM, Lind BK, Kitzman DW, Gersh BJ, Siscovick DS. Association of aortic-valve sclerosis with cardiovascular mortality and morbidity in the elderly. *N Engl J Med* 1999;341(3):142-7.

9. Abedin M, Tintut Y, Demer LL. Vascular calcification: mechanisms and clinical ramifications. *Arterioscler Thromb Vac Biol* 2004;24(7):1161-70.
10. Towler DA, Demer LL. Thematic series on the pathobiology of vascular calcification: an introduction. *Circ Res* 2011;108(11):1378-80.
11. Demer LL. Vascular calcification and osteoporosis: inflammatory responses to oxidized lipids. *Int J Epidemiol* 2002;31(4):737-41.
12. Speer MY, Giachelli CM. Regulation of cardiovascular calcification. *Cardiovasc Pathol* 2004;13(2):63-70.
13. Wallin R, Wajih N, Greenwood GT, Sane DC. Arterial calcification: a review of mechanisms, animal models, and the prospects for therapy. *Med Res Rev* 2001;21(4):274-301.
14. Cesini J, Cheriet S, Breuil V, Lafage-Proust MH. Osteoporosis: chronic kidney disease in rheumatology practice. *Joint Bone Spine* 2012;79 Suppl 2:S104-9.
15. Shanahan CM, Cary NR, Salisbury JR, Proudfoot D, Weissberg PL, Edmonds ME. Medial localization of mineralization-regulating proteins in association with Monckeberg's sclerosis: evidence for smooth muscle cell-mediated vascular calcification. *Circulation* 1999;100(21):2168-76.
16. Kremer R, Sebag M, Champigny C, Meerovitch K, Hendy GN, White J, et al. Identification and characterization of 1,25-dihydroxyvitamin D3-responsive repressor sequences in the rat parathyroid hormone-related peptide gene. *J Biol Chem* 1996;271(27):16310-6.

17. Liu XW, Xie CM, Mo YX, Zhang R, Li H, Huang ZL, et al. Magnetic resonance imaging features of nasopharyngeal carcinoma and nasopharyngeal non-Hodgkin's lymphoma: are there differences? *Eur J Radiol* 2012;81(6):1146-54.
18. Liberman M, Bassi E, Martinatti MK, Lario FC, Wosniak J, Jr., Pomerantzeff PM, et al. Oxidant generation predominates around calcifying foci and enhances progression of aortic valve calcification. *Arterioscler Thromb Vac Biol* 2008;28(3):463-70.
19. Liberman M, Johnson RC, Handy DE, Loscalzo J, Leopold JA. Bone morphogenetic protein-2 activates NADPH oxidase to increase endoplasmic reticulum stress and human coronary artery smooth muscle cell calcification. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;413(3):436-41.
20. Snell-Bergeon JK, Budoff MJ, Hokanson JE. Vascular calcification in diabetes: mechanisms and implications. *Curr Diab Rep* 2013;13(3):391-402.
21. Andrade MC, Carmo LS, Farias-Silva E, Liberman M. Msx2 is required for vascular smooth muscle cells osteoblastic differentiation but not calcification in insulin-resistant ob/ob mice. *Atherosclerosis* 2017;265:14-21.
22. Wolisi GO, Moe SM. The role of vitamin D in vascular calcification in chronic kidney disease. *Semin Dial* 2005;18(4):307-14.
23. Basalyga DM, Simionescu DT, Xiong W, Baxter BT, Starcher BC, Vyavahare NR. Elastin degradation and calcification in an abdominal aorta injury model: role of matrix metalloproteinases. *Circulation* 2004;110(22):3480-7.

24. Vattikuti R, Towler DA. Osteogenic regulation of vascular calcification: an early perspective. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004;286(5):E686-96.
25. Janzen J, Vuong PN. Arterial calcifications: morphological aspects and their pathological implications. *Z Kardiol* 2001;90 Suppl 3:6-11.
26. Schinke T, McKee MD, Kiviranta R, Karsenty G. Molecular determinants of arterial calcification. *Ann Med* 1998;30(6):538-41.
27. Shioi A, Nishizawa Y, Jono S, Koyama H, Hosoi M, Morii H. Beta-glycerophosphate accelerates calcification in cultured bovine vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vac Biol* 1995;15(11):2003-9.
28. Johnson RC, Leopold JA, Loscalzo J. Vascular calcification: pathobiological mechanisms and clinical implications. *Circ Res* 2006;99(10):1044-59.
29. Reynolds JL, Joannides AJ, Skepper JN, McNair R, Schurgers LJ, Proudfoot D, et al. Human vascular smooth muscle cells undergo vesicle-mediated calcification in response to changes in extracellular calcium and phosphate concentrations: a potential mechanism for accelerated vascular calcification in ESRD. *J Am Soc Nephrol* 2004;15(11):2857-67.
30. Watson KE, Bostrom K, Ravindranath R, Lam T, Norton B, Demer LL. TGF-beta 1 and 25-hydroxycholesterol stimulate osteoblast-like vascular cells to calcify. *J Clin Invest* 1994;93(5):2106-13.
31. Shanahan CM, Crouthamel MH, Kapustin A, Giachelli CM. Arterial calcification in chronic kidney disease: key roles for calcium and phosphate. *Circ Res* 2011;109(6):697-711.

32. Bostrom K, Watson KE, Horn S, Wortham C, Herman IM, Demer LL. Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 1993;91(4):1800-9.
33. Bostrom K, Watson KE, Stanford WP, Demer LL. Atherosclerotic calcification: relation to developmental osteogenesis. *Am J Cardiol* 1995;75(6):88B-91B.
34. Bostrom KI, Rajamannan NM, Towler DA. The regulation of valvular and vascular sclerosis by osteogenic morphogens. *Circ Res* 2011;109(5):564-77.
35. van Varik BJ, Rennenberg RJ, Reutelingsperger CP, Kroon AA, de Leeuw PW, Schurgers LJ. Mechanisms of arterial remodeling: lessons from genetic diseases. *Front Genet* 2012;3:290.
36. Wei Y, Schober A, Weber C. Pathogenic arterial remodeling: the good and bad of microRNAs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2013;304(8):H1050-9.
37. Aronow WS, Schwartz KS, Koenigsberg M. Correlation of serum lipids, calcium, and phosphorus, diabetes mellitus and history of systemic hypertension with presence or absence of calcified or thickened aortic cusps or root in elderly patients. *Am J Cardiol* 1987;59(9):998-9.
38. Ward MR, Pasterkamp G, Yeung AC, Borst C. Arterial remodeling. Mechanisms and clinical implications. *Circulation* 2000; 102(10):1186-91.
39. Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 1987;316(22):1371-5.

40. Al-Aly Z. Medial vascular calcification in diabetes mellitus and chronic kidney disease: the role of inflammation. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 2007;7(1):1-6.
41. Arribas SM, Hinek A, Gonzalez MC. Elastic fibres and vascular structure in hypertension. *Pharmacol Ther* 2006;111(3):771-91.
42. Castro MM, Rizzi E, Figueiredo-Lopes L, Fernandes K, Bendhack LM, Pitol DL, et al. Metalloproteinase inhibition ameliorates hypertension and prevents vascular dysfunction and remodeling in renovascular hypertensive rats. *Atherosclerosis* 2008;198(2):320-31.
43. Spinale FG. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiol Rev* 2007;87(4):1285-342.
44. Mulvany MJ, Baumbach GL, Aalkjaer C, Heagerty AM, Korsgaard N, Schiffrin EL, et al. Vascular remodeling. *Hypertension* 1996;28(3):505-6.
45. Alexander MR, Owens GK. Epigenetic control of smooth muscle cell differentiation and phenotypic switching in vascular development and disease. *Annu Rev Physiol* 2012;74:13-40.
46. Gerthoffer WT. Mechanisms of vascular smooth muscle cell migration. *Circ Res* 2007;100(5):607-21.
47. Iyemere VP, Proudfoot D, Weissberg PL, Shanahan CM. Vascular smooth muscle cell phenotypic plasticity and the regulation of vascular calcification. *J Intern Med* 2006;260(3):192-210.

48. Demer L, Tintut Y. The roles of lipid oxidation products and receptor activator of nuclear factor-kappaB signaling in atherosclerotic calcification. *Circ Res* 2011;108(12):1482-93.
49. Luo G, Ducy P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, et al. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 1997;386(6620):78-81.
50. Zebboudj AF, Shin V, Bostrom K. Matrix GLA protein and BMP-2 regulate osteoinduction in calcifying vascular cells. *J Cell Biochem* 2003;90(4):756-65.
51. Tanimura A, McGregor DH, Anderson HC. Matrix vesicles in atherosclerotic calcification. *Proc Soc Exp Biol Med* 1983;172(2):173-7.
52. Kim KM. Calcification of matrix vesicles in human aortic valve and aortic media. *Fed Proc* 1976;35(2):156-62.
53. Hsu HH, Camacho NP. Isolation of calcifiable vesicles from human atherosclerotic aortas. *Atherosclerosis* 1999;143(2):353-62.
54. Kockx MM, De Meyer GR, Muhring J, Jacob W, Bult H, Herman AG. Apoptosis and related proteins in different stages of human atherosclerotic plaques. *Circulation* 1998;97(23):2307-15.
55. Uitto J, Li Q, Jiang Q. Pseudoxanthoma elasticum: molecular genetics and putative pathomechanisms. *J Invest Dermatol* 2010;130(3):661-70.
56. Smith ER, Tomlinson LA, Ford ML, McMahon LP, Rajkumar C, Holt SG. Elastin degradation is associated with progressive aortic stiffening and all-cause mortality in predialysis chronic kidney disease. *Hypertension* 2012;59(5):973-8.

57. O'Rourke MF. Pulsatile arterial haemodynamics in hypertension. *Aust N Z J Med* 1976;6 suppl 2:40-8.
58. Nichols W, O'Rourke M. Mc Donald's blood flow in arteries. London: Hodder Arnold; 2005.
59. Avolio A, Jones D, Tafazzoli-Shadpour M. Quantification of alterations in structure and function of elastin in the arterial media. *Hypertension* 1998;32(1):170-5.
60. Ziereisen F, De Munter C, Perlmutter N. The Keutel syndrome. Report of a case and review of the literature. *Pediatr Radiol* 1993;23(4):314-5.
61. Munroe PB, Olgunturk RO, Fryns JP, Van Maldergem L, Ziereisen F, Yuksel B, et al. Mutations in the gene encoding the human matrix Gla protein cause Keutel syndrome. *Nat Genet* 1999;21(1):142-4.
62. Vanakker OM, Martin L, Gheduzzi D, Leroy BP, Loeys BL, Guerci VI, et al. Pseudoxanthoma elasticum-like phenotype with cutis laxa and multiple coagulation factor deficiency represents a separate genetic entity. *J Invest Dermatol* 2007;127(3):581-7.
63. Rutsch F, Nitschke Y, Terkeltaub R. Genetics in arterial calcification: pieces of a puzzle and cogs in a wheel. *Circ Res* 2011;109(5):578-92.
64. Rennenberg RJ, van Varik BJ, Schurgers LJ, Hamulyak K, Ten Cate H, Leiner T, et al. Chronic coumarin treatment is associated with increased extracoronary arterial calcification in humans. *Blood* 2010;115(24):5121-3.

65. Weijs B, Blaauw Y, Rennenberg RJ, Schurgers LJ, Timmermans CC, Pison L, et al. Patients using vitamin K antagonists show increased levels of coronary calcification: an observational study in low-risk atrial fibrillation patients. *Eur Heart J* 2011;32(20):2555-62.
66. Schurgers LJ, Joosen IA, Laufer EM, Chatrou ML, Herfs M, Winkens MH, et al. Vitamin K-antagonists accelerate atherosclerotic calcification and induce a vulnerable plaque phenotype. *PLoS One* 2012;7(8):e43229.
67. Pasquali-Ronchetti I, Garcia-Fernandez MI, Boraldi F, Quaglino D, Gheduzzi D, De Vincenzi Paolinelli C, et al. Oxidative stress in fibroblasts from patients with pseudoxanthoma elasticum: possible role in the pathogenesis of clinical manifestations. *J Pathol* 2006;208(1):54-61.
68. Garcia-Fernandez MI, Gheduzzi D, Boraldi F, Paolinelli CD, Sanchez P, Valdivielso P, et al. Parameters of oxidative stress are present in the circulation of PXE patients. *Biochim Biophys Acta* 2008;1782(7-8):474-81.
69. Boraldi F, Annovi G, Guerra D, Paolinelli Devincenzi C, Garcia-Fernandez MI, Panico F, et al. Fibroblast protein profile analysis highlights the role of oxidative stress and vitamin K recycling in the pathogenesis of pseudoxanthoma elasticum. *Proteomics Clin Appl* 2009;3(9):1084-98.
70. Li Q, Jiang Q, Pfendner E, Varadi A, Uitto J. Pseudoxanthoma elasticum: clinical phenotypes, molecular genetics and putative pathomechanisms. *Exp Dermatol* 2009;18(1):1-11.

71. Zeadin M, Butcher M, Werstuck G, Khan M, Yee CK, Shaughnessy SG. Effect of leptin on vascular calcification in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vac Biol* 2009;29(12):2069-75.
72. Parhami F, Tintut Y, Ballard A, Fogelman AM, Demer LL. Leptin enhances the calcification of vascular cells: artery wall as a target of leptin. *Circ Res* 2001;88(9):954-60.
73. Cirmanova V, Bayer M, Starka L, Zajickova K. The effect of leptin on bone: an evolving concept of action. *Physiol Res* 2008;57 Suppl 1:S143-51.
74. Zebger-Gong H, Muller D, Diercke M, Haffner D, Hoher B, Verberckmoes S, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3-induced aortic calcifications in experimental uremia: up-regulation of osteoblast markers, calcium-transporting proteins and osterix. *J Hypertens* 2011;29(2):339-48.
75. Leopold JA. MicroRNAs Regulate Vascular Medial Calcification. *Cells* 2014;3(4):963-80.
76. Grubler MR, Marz W, Pilz S, Grammer TB, Trummer C, Mullner C, et al. Vitamin-D concentrations, cardiovascular risk and events - a review of epidemiological evidence. *Rev Endocr Metab Disord* 2017;18(2):259-72.
77. Jono S, Nishizawa Y, Shioi A, Morii H. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 increases in vitro vascular calcification by modulating secretion of endogenous parathyroid hormone-related peptide. *Circulation* 1998;98(13):1302-6.
78. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in

- vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1994;94(6):2493-503.
79. Falzon M. DNA sequences in the rat parathyroid hormone-related peptide gene responsible for 1,25-dihydroxyvitamin D₃-mediated transcriptional repression. *Mol Endocrinol* 1996;10(6):672-81.
80. Falzon M. The noncalcemic vitamin D analogues EB1089 and 22-oxacalcitriol interact with the vitamin D receptor and suppress parathyroid hormone-related peptide gene expression. *Mol Cell Endocrinol* 1997;127(1):99-108.
81. Ikonomidis JS, Gibson WC, Gardner J, Sweterlitsch S, Thompson RP, Mukherjee R, et al. A murine model of thoracic aortic aneurysms. *J Surg Res* 2003;115(1):157-63.
82. Tambiah J, Franklin IJ, Trendell-Smith N, Peston D, Powell JT. Provocation of experimental aortic inflammation and dilatation by inflammatory mediators and *Chlamydia pneumoniae*. *Br J Surg* 2001;88(7):935-40.
83. Tambiah J, Powell JT. *Chlamydia pneumoniae* antigens facilitate experimental aortic dilatation: prevention with azithromycin. *J Vasc Surg* 2002;36(5):1011-7.
84. Longo GM, Xiong W, Greiner TC, Zhao Y, Fiotti N, Baxter BT. Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. *J Clin Invest* 2002;110(5):625-32.
85. Bunton TE, Biery NJ, Myers L, Gayraud B, Ramirez F, Dietz HC. Phenotypic alteration of vascular smooth muscle cells precedes elastolysis in a mouse model of Marfan syndrome. *Circ Res* 2001;88(1):37-43.

86. Pereira L, Andrikopoulos K, Tian J, Lee SY, Keene DR, Ono R, et al. Targetting of the gene encoding fibrillin-1 recapitulates the vascular aspect of Marfan syndrome. *Nat Genet* 1997;17(2):218-22.
87. Shioi A, Taniwaki H, Jono S, Okuno Y, Koyama H, Mori K, et al. Monckeberg's medial sclerosis and inorganic phosphate in uremia. *Am J Kidney Dis* 2001;38(4 Suppl 1):S47-9.
88. Kieffer P, Giummelly P, Schjoth B, Carteaux JP, Villemot JP, Hornebeck W, et al. Activation of metalloproteinase-2, loss of matrix scleroprotein content and coronary artery calcification. *Atherosclerosis* 2001;157(1):251-4.
89. Hjortnaes J, New SE, Aikawa E. Visualizing novel concepts of cardiovascular calcification. *Trends Cardiovasc Med* 2013;23(3):71-9.
90. New SE, Goettsch C, Aikawa M, Marchini JF, Shibasaki M, Yabusaki K, et al. Macrophage-derived matrix vesicles: an alternative novel mechanism for microcalcification in atherosclerotic plaques. *Circ Res* 2013;113(1):72-7.
91. Khoo NK, Cantu-Medellin N, Devlin JE, St Croix CM, Watkins SC, Fleming AM, et al. Obesity-induced tissue free radical generation: an in vivo immuno-spin trapping study. *Free Radic Biol Med* 2012;52(11-12):2312-9.
92. Hass GM, Trueheart RE, Hemmens A. Experimental arteriosclerosis due to hypervitaminosis D. *Am J Pathol* 1960;37:521-49.
93. Hong MK, Vossoughi J, Haudenschield CC, Wong SC, Zuckerman BD, Leon MB. Vascular effects of diet-induced hypercalcemia after

- balloon artery injury in giant Flemish rabbits. *Am Heart J* 1995;130(4):758-64.
94. Mortensen JT, Brinck P, Binderup L. Toxicity of vitamin D analogues in rats fed diets with standard or low calcium contents. *Pharmacol Toxicol* 1993;72(2):124-7.
95. Niederhoffer N, Bobryshev YV, Lartaud-Idjouadiene I, Giummelly P, Atkinson J. Aortic calcification produced by vitamin D3 plus nicotine. *J Vasc Res* 1997;34(5):386-98.
96. Roberts WC. The senile cardiac calcification syndrome. *Am J Cardiol* 1986;58(6):572-4.
97. Toggweiler S, Leipsic J, Binder RK, Freeman M, Barbanti M, Heijmen RH, et al. Management of vascular access in transcatheter aortic valve replacement: part 2: Vascular complications. *JACC Cardiovasc Interv* 2013;6(8):767-76.
98. Jackson RD, LaCroix AZ, Gass M, Wallace RB, Robbins J, Lewis CE, et al. Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of fractures. *N Engl J Med* 2006;354(7):669-83.
99. Bolland MJ, Avenell A, Baron JA, Grey A, MacLennan GS, Gamble GD, et al. Effect of calcium supplements on risk of myocardial infarction and cardiovascular events: meta-analysis. *BMJ* 2010;341:c3691.
100. Hsia J, Heiss G, Ren H, Allison M, Dolan NC, Greenland P, et al. Calcium/vitamin D supplementation and cardiovascular events. *Circulation* 2007;115(7):846-54.

101. de Oliveira RB, Okazaki H, Stinghen AE, Drueke TB, Massy ZA, Jorgetti V. Vascular calcification in chronic kidney disease: a review. *J Bras Nefrol* 2013;35(2):147-61.
102. Liberman M, Pesaro AE, Carmo LS, Serrano Jr CV. Vascular calcification: pathophysiology and clinical implications. *Einstein (Sao Paulo)* 2013;11(3):376-82.
103. van Eys GJ, Niessen PM, Rensen SS. Smoothelin in vascular smooth muscle cells. *Trends Cardiovasc Med* 2007;17(1):26-30.
104. Cui RR, Li SJ, Liu LJ, Yi L, Liang QH, Zhu X, et al. MicroRNA-204 regulates vascular smooth muscle cell calcification in vitro and in vivo. *Cardiovasc Res* 2012;96(2):320-9.
105. Balderman JA, Lee HY, Mahoney CE, Handy DE, White K, Annis S, et al. Bone morphogenetic protein-2 decreases microRNA-30b and microRNA-30c to promote vascular smooth muscle cell calcification. *J Am Heart Assoc* 2012;1(6):e003905.
106. Miller FJ, Jr., Gutterman DD, Rios CD, Heistad DD, Davidson BL. Superoxide production in vascular smooth muscle contributes to oxidative stress and impaired relaxation in atherosclerosis. *Circ Res* 1998;82(12):1298-305.
107. Byon CH, Javed A, Dai Q, Kappes JC, Clemens TL, Darley-Usmar VM, et al. Oxidative stress induces vascular calcification through modulation of the osteogenic transcription factor Runx2 by AKT signaling. *J Biol Chem* 2008;283(22):15319-27.
108. Poterucha TJ, Goldhaber SZ. Warfarin and Vascular Calcification. *Am J Med* 2016;129(6):635 e1-4.

109. Hosaka N, Mizobuchi M, Ogata H, Kumata C, Kondo F, Koiwa F, et al. Elastin degradation accelerates phosphate-induced mineralization of vascular smooth muscle cells. *Calcif Tissue Int* 2009;85(6):523-9.
110. Simionescu A, Philips K, Vyavahare N. Elastin-derived peptides and TGF-beta1 induce osteogenic responses in smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;334(2):524-32.
111. Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res* 2002;90(3):251-62.
112. Uemura S, Matsushita H, Li W, Glassford AJ, Asagami T, Lee KH, et al. Diabetes mellitus enhances vascular matrix metalloproteinase activity: role of oxidative stress. *Circ Res* 2001;88(12):1291-8.
113. Morris DR, Biros E, Cronin O, Kuivaniemi H, Golledge J. The association of genetic variants of matrix metalloproteinases with abdominal aortic aneurysm: a systematic review and meta-analysis. *Heart* 2014;100(4):295-302.
114. Nosoudi N, Nahar-Gohad P, Sinha A, Chowdhury A, Gerard P, Carsten CG, et al. Prevention of abdominal aortic aneurysm progression by targeted inhibition of matrix metalloproteinase activity with batimastat-loaded nanoparticles. *Circ Res* 2015;117(11):e80-9.
115. Thompson RW, Baxter BT. MMP inhibition in abdominal aortic aneurysms. Rationale for a prospective randomized clinical trial. *Ann N Y Acad Sci* 1999;878:159-78.

116. Raffetto JD, Khalil RA. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochem Pharmacol* 2008;75(2):346-59.
117. Galis ZS, Muszynski M, Sukhova GK, Simon-Morrissey E, Unemori EN, Lark MW, et al. Cytokine-stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzymes required for extracellular matrix digestion. *Circ Res* 1994;75(1):181-9.
118. Herron GS, Banda MJ, Clark EJ, Gavrilovic J, Werb Z. Secretion of metalloproteinases by stimulated capillary endothelial cells. II. Expression of collagenase and stromelysin activities is regulated by endogenous inhibitors. *J Biol Chem* 1986;261(6):2814-8.
119. Herron GS, Werb Z, Dwyer K, Banda MJ. Secretion of metalloproteinases by stimulated capillary endothelial cells. I. Production of procollagenase and prostromelysin exceeds expression of proteolytic activity. *J Biol Chem* 1986;261(6):2810-3.
120. Yanagi H, Sasaguri Y, Sugama K, Morimatsu M, Nagase H. Production of tissue collagenase (matrix metalloproteinase 1) by human aortic smooth muscle cells in response to platelet-derived growth factor. *Atherosclerosis* 1991;91(3):207-16.
121. Guzik B, Sagan A, Ludew D, Mrowiecki W, Chwala M, Bujak-Gizycka B, et al. Mechanisms of oxidative stress in human aortic aneurysms--association with clinical risk factors for atherosclerosis and disease severity. *Int J Cardiol* 2013;168(3):2389-96.
122. Schramm A, Matusik P, Osmenda G, Guzik TJ. Targeting NADPH oxidases in vascular pharmacology. *Vascul Pharmacol* 2012;56(5-6):216-31.

123. Xiong W, Mactaggart J, Knispel R, Worth J, Zhu Z, Li Y, et al.
Inhibition of reactive oxygen species attenuates aneurysm
formation in a murine model. *Atherosclerosis* 2009;202(1):128-34.

ANEXO

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que o projeto intitulado **“Mecanismos do remodelamento excêntrico associado à calcificação vascular na obesidade e resistência à insulina”** protocolo nº **129/15** sob a responsabilidade de **Emmanuel de Almeida Burdmann e Luciana Simão do Carmo**, apresentado pelo Departamento de Clínica Médica - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em 23.02.16

Vigência do Projeto	Outubro/2017
Espécie/linhagem	Camundongo transgênico e ob/ob / C57BL/6
Nº de animais	40 e 40
Peso/Idade	3 a 6 meses
Sexo	Machos
Origem	Bioterio do Hospital Israelita Albert Einstein

CEUA-FMUSP, 23 de Fevereiro de 2016

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais