RARIANE SILVA DE LIMA

Papel pró-inflamatório da angiotensina II na aorta de camundongos normotensos

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Lacchini

São Paulo

2017

RARIANE SILVA DE LIMA

Papel pró-inflamatório da angiotensina II na aorta de camundongos normotensos

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Lacchini

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018, de 03 de outubro de 2011.

A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

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

Lima, Rariane Silva de
Papel pró-inflamatório da angiotensina II na aorta
de camundongos normotensos / Rariane Silva de
Lima. -- São Paulo, 2017.
Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Fisiopatologia Experimental.
Orientadora: Silvia Lacchini.

Descritores: 1. Angiotensina II 2. Inflamação
3. Aorta 4. Pressão arterial 5. Imuno-histoquímica
6. Baroreflexo 7. Camundongos

USF/FM/DBD-529/17

AGRADECIMENTOS

À Profª Dra. Silvia Lacchini por todos os ensinamentos e parceria, sem a qual eu certamente não teria desenvolvido este trabalho. Obrigada por me orientar, por acreditar em mim e neste trabalho, pelas muitas palavras de incentivo e confiança. Admiração pela pessoa, professora e profissional que você é. Sempre amiga, generosa e sábia. Obrigada por me permitir fazer parte do seu grupo de pesquisa.

À Profª Dra. Maria Cláudia Irigoyen por sua generosidade e acolhimento e, também, ter colaborado com o desenvolvimento deste trabalho abrindo as portas de seu laboratório e sempre se dispondo ajudar, fazendo muitas vezes o impossível para que o projeto pudesse se desenvolver. Obrigada por me fazer ter esperanças diante dos momentos difíceis. Eterna gratidão e admiração .

À minha família, meu maior tesouro, por sempre me permitir ter liberdade para fazer minhas escolhas e trilhar meu caminho. Em especial, a minha mãe Eliane e aos meus irmãos Simone e João que são meus maiores incentivadores. Obrigada por sempre me fortalecer, pela paciência, compreensão e amor.

Aos amigos do laboratório, em especial a Juliane, Cintia e Marina por toda apoio durante a realização dos protocolos, pelos ensinamentos, mas principalmente pela amizade que desenvolvemos ao longo desses anos. Obrigada pelo aconchego amigo.

Aos técnicos Leandro e Maikon do Laboratório de Hipertensão Experimental do Incor pelo auxílio durante os procedimentos cirúrgicos e análise de dados. Obrigada pela paciência e disposição em ajudar.

Ao Programa de Fisiopatologia Experimental, por todo auxílio necessário.

À CAPES pelo auxílio financeiro ao longo do Mestrado.

A Deus, por me dar força e coragem para seguir em frente e superar as dificuldades. Muito Obrigada!

RESUMO

Lima RS. Papel pró-inflamatório da angiotensina II na aorta de camundongos normotensos [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

A Angiotensina II exerce funções fisiológicas importantes para a homeostase do sistema cardiovascular e pode ainda mediar ações que levam a respostas inflamatórias. Estas ações levam à ativação de células musculares lisas vasculares (CMLVs) como também o endotélio, de modo a produzir espécies reativas de oxigênio, citocinas inflamatórias, quimiocinas e moléculas de adesão indutoras de diapedese de células de origem mielóide. Neste contexto, flutuações nas concentrações de Angiotensina II poderiam ocorrer no organismo, levando a aumentos discretos que não interferem diretamente e imediatamente na pressão arterial, mas que poderiam estimular o recrutamento e a ativação de células de origem mielóide capazes de iniciar respostas inflamatórias locais. Tal situação forneceria informações importantes para desencadeamento de um processo crônico sobre os mecanismos de manutenção da pressão arterial e potencialmente levando a doenças cardiovasculares. O objetivo deste estudo, foi verificar a capacidade da angiotensina II em induzir uma resposta inflamatória na aorta e se existe uma relação com variações de pressão arterial, mesmo que discretas. Para isso, foram utilizados camundongos C57Bl/6 tratados com solução salina (0,9%, grupo controle) ou Angiotensina II (30ng, grupo Ang II). Os animais foram canulados na artéria carótida e veia jugular, e 48 horas depois os níveis de PA e FC foram registrados em condições basais e após a administração de salina ou Ang II, nos tempos de 30 min, 1, 2, 6, 12 e 24 h. A avaliação da sensibilidade barorreflexa foi feita após administração de fenilefrina e nitroprussiato de sódio (100 e 150 ng). A avaliação da reação inflamatória na aorta foi realizada por imunohistoquímica, sendo usados TGF- β , iNOS como marcadores inflamatórios e CD45 como marcador de macrófagos. A avaliação da α -actina foi realizada a fim de mostrar uma possível mudança de fenótipo das CMLVs. Ao final dos tratamentos, verificamos que não ocorreu alteração de pressão arterial ou frequência cardíaca, assim como também, não houve alteração na sensibilidade barorreflexa. Observou-se uma resposta bifásica tanto para a expressão de TGF- β como para a presença de células positivas para CD45, ocorrendo um aumento agudo (entre 30 e 60 minutos) e outro aumento mais crônico, entre 24 e 48 horas. Já a imunomarcção positiva para iNOS apresentou aumento em períodos mais longos, de 24 a 72 horas. A imunomarcção para α -actina não mostrou alterações, sugerindo que a dose aplicada de angiotensina II não altera o fenótipo das CMLVs de aorta. Os resultados obtidos sugerem que a angiotensina II, mesmo em doses que não alteram a pressão arterial, é capaz de induzir a expressão de marcadores inflamatórios e a migração de células inflamatórias na aorta de camundongos normotensos. Desta

forma, pode-se considerar que a angiotensina II é capaz de aumentar a propensão ao desenvolvimento de lesão cardiovascular, mesmo em indivíduos normotensos.

Descritores: angiotensina II; inflamação; aorta; pressão arterial; imuno-histoquímica; barorreflexo; camundongos

ABSTRACT

Lima RS. Proinflammatory role of angiotensin II in the aorta of normotensive mice [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

Angiotensin II exerts important physiological functions on cardiovascular system homeostasis and may mediate actions leading to inflammatory responses. These actions lead to the activation of vascular smooth muscle cells (CMLVs) as well as the endothelium, in order to produce reactive oxygen species, inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules inducing diapedesis of cells of myeloid origin. In this context, variations in Angiotensin II concentrations could occur in the body, leading to discrete increases that do not directly and immediately interfere with blood pressure but could stimulate the recruitment and activation of myeloid cells capable of initiating local inflammatory responses. Such a situation would provide important information for triggering a chronic process on the mechanisms of maintaining blood pressure and potentially leading to cardiovascular disease. This study aimed to verify the ability of angiotensin II to induce an inflammatory response in the aorta and if there is a relation with variations of arterial pressure, even if discrete. For this, C57Bl/6 mice treated with saline solution (0.9%, control group) or Angiotensin II (30ng, Ang II group) were used. The animals were cannulated in the carotid artery and jugular vein, and 48 hours later PA and HR levels were recorded at baseline and after administration of saline or Ang II at 30 min, 1, 2, 6, 12 and 24 h. The evaluation of the baroreflex sensitivity was performed after administration of phenylephrine and sodium nitroprusside (100 and 150 ng). The evaluation of the inflammatory reaction in the aorta was performed by immunohistochemistry, using TGF- β , iNOS as inflammatory markers and CD45 as a marker of macrophages. The evaluation of α -actin was performed in order to demonstrate a possible change in CMLV phenotype. At the end of the treatments, we verified that there was no change in blood pressure or heart rate, as well as there was no change in the baroreflex sensibility. A biphasic response was observed both for TGF- β expression and for the presence of CD45 positive cells, with an acute increase (between 30 and 60 minutes) and another more chronic increase, between 24 and 48 hours. Positive staining for iNOS increased in longer periods, from 24 to 72 hours. Immunoblotting to α -actin showed no alterations, suggesting that the applied dose of angiotensin II does not alter the aortic CMLV phenotype. The results suggest that angiotensin II, even at doses that do not alter blood pressure, is capable of inducing the expression of inflammatory markers and the migration of inflammatory cells into the aorta of normotensive mice. Thus, angiotensin II may be considered to be capable of increasing the propensity to develop a cardiovascular injury, even in normotensive individuals.

Descriptors: angiotensin II; inflammation; aorta; arterial pressure;
immunohistochemistry; baroreflex; mice

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 DOENÇAS CARDIOVASCULARES	11
1.2 ESTRUTURA DAS ARTÉRIAS	12
1.3 SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA.....	13
1.4 SINALIZAÇÃO INTRACELULAR VIA RECEPTORES AT1 E AT2	15
1.5 AÇÃO INFLAMATÓRIA DA ANGIOTENSINA II	16
1.6 MEDIADORES DE INFLAMAÇÃO EM CMLV ESTIMULADAS COM ANG II	17
1.7 REMODELAMENTO VASCULAR E RESPOSTA IMUNE	19
1.8 ESTRESSE OXIDATIVO EM RESPOSTA A INFLAMAÇÃO INDUZIDA PELA ANGIOTENSINA II	20
1.9 JUSTIFICATIVA	22
1.10 HIPÓTESE	22
2 OBJETIVOS	23
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
3 MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	24
3.2 AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA SISTÊMICA	26
3.2.1 MEDIDA HEMODINÂMICA INDIRETA ATRAVÉS DE PLETISMOGRAFIA DE CAUDA	26
3.2.2 MEDIDAS HEMODINÂMICAS DIRETA ATRAVÉS DE CÂNULA ARTERIAL	28
3.2.2.1 Canulação	28
3.2.2.2 Registro da PA e FC.....	29
3.3 EUTANÁSIA E COLETA DE TECIDOS	32
3.4 AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO INFLAMATÓRIA POR IMUNOHISTOQUÍMICA	32
3.5 ANÁLISE DA IMUNOMARCAÇÃO	34
3.5.1 Contagem positiva macrófagos	34
3.5.2 Análise pelo software imagej-fiji, com decomposição de cor.....	35
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
4 RESULTADOS	36

4.1 AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA POR PLETISMOGRAFIA DE CAUDA: (MEDIDA INDIRETA).....	36
4.2 AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA POR CANULAÇÃO: MEDIDA DIRETA	37
4.2.1 AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE BARORREFLEXA.....	38
.....	38
4.3 AVALIAÇÃO DA IMUNOMARCAÇÃO PARA A-ACTINA NA TÚNICA MÉDIA.....	39
4.4 AVALIAÇÃO DA CONTAGEM DE MACRÓFAGOS (PELA IMUNOMARCAÇÃO PARA CD45)	40
4.5 AVALIAÇÃO DA IMUNOMARCAÇÃO PARA TGF-B.....	43
4.6 AVALIAÇÃO DA IMUNOMARCAÇÃO PARA IL1-B	45
4.7 AVALIAÇÃO DA IMUNOMARCAÇÃO PARA iNOS	47
5 DISCUSSÃO	49
6 CONCLUSÃO.....	54
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇAS CARDIOVASCULARES

Nas últimas décadas houve um aumento crescente na prevalência de doenças cardiovasculares, representando, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 37% do total de mortes. Ainda segundo a OMS, no ano de 2012, 17,5 milhões de pessoas morreram em consequência de doença arterial coronariana e 6,7 milhões decorrentes de derrame (WHO, 2016). Entre os principais fatores responsáveis pelo desenvolvimento de doenças cardiovasculares estão diabetes mellitus, obesidade, inatividade física, tabagismo, hiperlipidemia e hipertensão arterial sistêmica (HAS). Dentre estes, a hipertensão arterial sistêmica representa um grande fator risco para doenças secundárias que acometem o coração, rins, vasculatura cerebral e periférica (Passos, 2006; OPAS, 2007). Neste contexto, a hipertensão arterial sistêmica é referida como uma das principais causas da redução da qualidade e expectativa de vida, pois cerca de 40% dos óbitos registrados no Brasil ocorrem em decorrência de doenças cardiovasculares (Mackay e Mensah, 2004; WHO, 2002; Passos, 2006; WHO, 2009).

A HAS é considerada uma condição basicamente de ordem multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial (PA) considerando valores de $PA \geq 140/90$ mmHg, e podendo envolver diversos fatores de risco. Entre eles, estão excesso de peso e obesidade, ingestão de sal, ingestão de álcool, sedentarismo, predisposição genética, assim como a combinação de mais de um destes fatores (SBH, 2010). A HAS ainda está relacionada às alterações no metabolismo, alterações no balanço hormonal e também distúrbios indutores de hipertrofia vascular, ocasionando o aumento de resistência vascular periférica e disfunções endoteliais capazes de afetar não só a macrocirculação como também a microcirculação (Taddei et al., 2002).

Danos à microcirculação podem ser ocasionados por desequilíbrios entre o balanço de fatores que induzem o relaxamento e contração no vaso, aumento da relação parede/luz arteriolar, diminuição da rede de capilares e arteríolas, além da

perda de sensibilidade na ação vasodilatadora mediada por acetilcolina, bradicinina e substância P (Carvalho et al., 1987). Em condições de hipertensão, a parede dos vasos sanguíneos reduz sua capacidade de relaxamento, devido à maior liberação de fatores constritores derivados do endotélio (EDCF), prostanóides tromboxano A₂ (TXA₂) e prostaglandina H₂ (PGH₂), além de endotelinas ET-1, ET-2 e ET-3. Assim, com a liberação de EDCFs, os fatores de relaxamento derivados do endotélio (EDRFs) como o óxido nítrico (NO) e a prostaciclina (PGI₂), acabam sendo liberados em menor quantidade e podem ter efeito diminuído devido à baixa sensibilidade de seus receptores ou à redução de sua biodisponibilidade na hipertensão (Stan, 2002). Além disso, em situações onde ocorrem estados de hipóxia, substâncias vasoconstritoras como espécies reativas de oxigênio (EROs), especialmente o ânion superóxido (O₂⁻), são produzidas através da ação da Ang II (Batlouni, 2001; Stan, 2002).

1.2 ESTRUTURA DAS ARTÉRIAS

Considerando a forma como as artérias estão estruturadas, é importante levar em consideração tanto as regiões que compõem as artérias e suas células, quanto a produção local de determinadas substâncias influenciando a funcionalidades destas artérias. De forma breve, as artérias são formadas por três túnicas, sendo elas: a túnica íntima (formada principalmente por células endoteliais e uma membrana elástica interna), a túnica média (formada principalmente por células musculares lisas vasculares e membrana elástica externa) e a túnica adventícia (formada por fibroblastos, microvascularização, terminações nervosas, fibras colágenas, células do tecido adiposo, células inflamatórias e outras), Figura 1 (Viegas e Lacchini, 2008; Zhao et al., 2015).

Figura 1 – Esquema da estrutura da parede arterial composta pelas três camadas: túnica íntima, túnica média e túnica adventícia. Adaptado de Zhao et al., 2015.

A interação entre os componentes presentes no sangue (células e substâncias transportadas), as células que compõem a parede vascular e os diversos componentes da matriz extracelular (MEC) que se encontram entremeados às células vasculares é fundamental tanto para manter ou alterar a estrutura vascular como para determinar o seu funcionamento, dilatando ou contraindo a artéria (Viegas e Lacchini, 2008; Zhao et al., 2015).

Entre os muitos elementos responsáveis seja por mudanças estruturais (remodelamento arterial), seja por mudanças funcionais, destacam-se o estado Redox, o estado inflamatório e o Sistema Renina-Angiotensina. Uma grande quantidade de estudos demonstrou que a angiotensina II é um dos principais mediadores de processos vasculares, induzindo proliferação e crescimento de CMLVs, deposição de colágeno, inflamação, estresse oxidativo, entre outros (Schiffrin e Touyz, 2004).

1.3 SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA

Na hipertensão, a Ang II desempenha uma importante função através de vasoconstrição, aumento da resistência vascular periférica, disfunção endotelial, remodelamento vascular e baixo grau de inflamação (Paradis e Schiffrin, 2009). A Ang

II faz parte de uma cascata de reações bioquímicas do Sistema Renina Angiotensina (SRA) (Figura 2) cuja atuação é essencial para a homeostasia cardiovascular.

Classicamente, o SRA tem início a partir da clivagem do Angiotensinogênio produzido principalmente no fígado, pela enzima Renina produzida por células justaglomerulares renais diante de situações de redução da pressão arterial, do aumento da atividade nervosa simpática renal ou da redução acentuada de sódio. A partir da clivagem do Angiotensinogênio obtém-se a Angiotensina I (Ang I) a qual é convertida em Ang II pela ação da Enzima Conversora de Angiotensina I (ECA) produzida principalmente pelo endotélio (Skrbic e Igic, 2009). Porém, outras formas de produção de Ang II ocorrem no endotélio, na musculatura lisa e nos tecidos cerebrais, adrenais, renais e ovarianos assim como no plasma, sendo estes processos independentes da ação da ECA, mas catalizados por outras enzimas, tais como catepsina e quimase (Petri et al., 2001; Li et al., 2004; Kumar et al., 2008; Lavrentyev et al., 2007).

também pode induzir vias sinalização por Src, Fyn, Yes, Pyk2, FAK, e Janus kinase 2 (JAK2) ou pelos receptores de EGF e PDGF (Carvalho-Filho et al., 2007). A Ang II pode ainda atuar em outro receptor, o AT2 associado à proteína G, entretanto este promove sinalizações intracelulares distintas (Mukoyama et al., 1993). A transdução de sinais promovida pelo AT2 ativa a PP2A, uma fosfatase de serina/treonina direcionando o sinal para o controle da atividade de canais de K^+ e Ca^{++} (Huang et al., 1996).

1.5 AÇÃO INFLAMATÓRIA DA ANGIOTENSINA II

Neste cenário, o SRA está envolvido em muitos processos homeostáticos e moduladores. Além de seu perfil observado em processos fisiopatológicos como hipertrofia, hiperplasia, fibrose, disfunção endotelial, aneurismas e angiogênese. Pré-respostas inflamatórias que sustentam doenças não-infecciosas, como diabetes e aterosclerose, diferenciação celular, programação de células-tronco e hematopoiese, e de proliferação celular e câncer podem ser iniciadas por ação de Ang II. Assim, os modificadores do SRA tais como os inibidores da ECA e bloqueadores dos receptores da angiotensina (BRA), bem como inibidores de renina, ECA2 recombinante e vacinas da angiotensina são ainda susceptíveis a ter utilidade clínica (George et al., 2010).

A Ang II promove um quadro inflamatório através de estresse oxidativo e produção de moléculas de adesão e citocinas (Marchesi et al., 2008; Schiffrin, 2008). Estudos anteriores demonstraram que Ang II é capaz de ativar NF- κ B, o fator de transcrição nuclear-chave nas doenças inflamatórias e fibróticas e esta ativação leva à transcrição de numerosos genes relacionados à inflamação, inclusive interleucina-6 (IL-6), TNF- α e TGF- β (George et al., 2010). Além disso, Ang II ativa a enzima NADPH oxidase com um aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) e indução de estresse oxidativo, que está intimamente ligado com a inflamação (George et al., 2010). Um fato importante a ser considerado é que estes estudos envolveram doses altas de angiotensina II, que determinavam o desenvolvimento de hipertensão arterial, e esta é reconhecida como mecanismo diretamente envolvido com a ativação de mecanismos inflamatórios (Harwani, 2017; Jafri e Ormiston, 2017). Contudo, não se compreende completamente qual seria o efeito pró-inflamatório da angiotensina II em concentrações

mais próximas de valores fisiológicos. Em nosso laboratório, verificamos que doses subpressoras de angiotensina II, embora não levassem a mudanças na pressão arterial, eram capazes de elevar os níveis de IL-6 séricos após 60 minutos de uma única injeção (Oliveira TCS, 2010).

Em respostas inflamatórias, o TNF- α pode efetuar diversas ações como a ativação do endotélio vascular, induzindo o aumento dos níveis de ICAM-1, aumentando também a permeabilidade dos vasos, o que leva à entrada de IgG, proteínas do complemento e células da imunidade inata e adquirida, além de incrementar a drenagem de líquidos para os linfonodos. O TNF- α é capaz de ligar-se a dois receptores: TNF-R1 o qual é expresso em diversos tecidos, e o TNF-R2 o qual é encontrado em células do sistema imune. Em contato com seus ligantes, o TNF- α pode promover a ativação de vias como: 1) NF- κ B, responsável por mediar a transcrição de uma vasta gama de proteínas envolvidas na sobrevivência e proliferação celular, resposta inflamatória, e os fatores anti-apoptóticos; 2) MAPK, via envolvida na proliferação celular, diferenciação, e geralmente pró-apoptose; 3) Apoptose via caspases, via capaz de induzir uma grande concentração de caspase-8, sua ativação autoproteolítica e posterior clivagem de caspases efetoras, levando à apoptose celular (Locksley et al., 2001).

1.6 MEDIADORES DE INFLAMAÇÃO EM CMLV ESTIMULADAS COM ANG II

O NF- κ B é um complexo heterodimérico, fator de transcrição induzível composto por componentes citoplasmático em estado latente e componentes nucleares ativados. O complexo Rel A NF- κ B1 é retido no citoplasma em associação com seu inibidor I κ B α (Beg e Baldwin, 1993). Estímulos que induzem a via canônica do NF- κ B ativa o complexo kinase IKK, resultando na fosforilação do I κ B α (Ghosh e Baltimore, 1990). Como resultado o complexo Rel A-NF- κ B-1 é então liberado para entrar no núcleo. No núcleo, o complexo Rel A-NF- κ B-1 se liga a uma sequência regulatória específica promovendo uma reação e ativando a transcrição de diversas citocinas.

A forma pela qual a Ang II induz a ativação de NF- κ B depende do tipo celular, nas CMLVs quando inativo o NF- κ B é nuclear. No entanto, a Ang II induz a transcrição

do NF- κ B através de uma via independente da proteólise de I κ B, mas mediada por pequenas GTPases Rac/Rho A, exigida pelo complexo NIK-Rel A e induzindo a fosforilação phospho-ser-536 Rel A (Han et al, 1999). Desse modo, a ativação NF- κ B/Rel A ocorre através do aumento nos níveis de phospho-ser-536 Rel A no núcleo, essa resposta já foi observada aorta de ratos tratados com Ang II (Choudhary, et al., 2007; Cui, et al., 2006). Quando ativado pela Ang II, o NF- κ B estimula a expressão de IL-6 por fibroblastos da adventícia, monócitos recrutados e CMLVs (Han et al, 1999).

A IL-6 é uma citocina glicosilada de 26kDa a qual pode ser secretada por CMLVs via Ang II. Foi primeiramente descrita como um fator de crescimento presente no plasma, capaz de promover a proliferação de células musculares lisas envolvendo a produção local de PDGF (Tedgui e Mallat, 2006). Ela age de forma parácrina induzindo uma resposta sistêmica na presença de inflamação vascular aguda (Brasier et al, 2002).

No vaso, a IL-6 promove a produção de ROS mediada pela Ang II (Schrader et al, 2007), além de promover a diferenciação monócito-macrófago contribuindo para a inflamação vascular, aumento da fagocitose, expressão de receptores de superfície Fc, de receptores do fator estimulador da colônia de macrófagos (M-CSF), do marcador de macrófago maduro F4/80, e de promover a expressão de genes como, c-Jun, jun B, jun D, fator regulador de interferon 1 (IRF1), JAK3, importantes para a diferenciação de macrófagos (Hou et al, 2008). Também regula a expressão de MCP-1 (Biswas et al, 1998; Tieu et al, 2009).

Assim, estímulos inflamatórios podem ser mediados pela ação da Ang II induzindo a expressão de moléculas de adesão bem como o aumento do recrutamento de monócitos. Nas células endoteliais, a Ang II estimula a produção de molécula de adesão vascular 1 (VCAM-1), moléculas de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e E-selectina, através de uma via dependente de EROs (Tedgui e Mallat, 2006; Alexander et al., 2009). Em células musculares lisas vasculares (CMLVs), a Ang II estimula a produção de VCAM-1, MCP-1 e IL-6. A MCP-1 pode mediar o recrutamento de monócitos, como também de linfócitos T de memória via receptor de CCR2 (Tedgui e Mallat, 2006; Brasier et al., 2011).

1.7 REMODELAMENTO VASCULAR E RESPOSTA IMUNE

O remodelamento vascular pode ocorrer devido a estímulos inflamatórios, como na hipertensão arterial pulmonar, onde quimiocinas como MCP-1, CCL2, CCL5, CXCL1 e além das citocinas IL-6 e IL-1 β são produzidas recrutando células inflamatórias como macrófagos, mastócitos, células B, células dendríticas, células T e células T reguladoras (Figura 3). Este processo inflamatório ocasiona remodelamento da matriz extracelular, deposição de colágeno, proliferação vascular, migração e trombose (Schermuly et al., 2011).

Figura 3 – Remodelamento vascular na hipertensão pulmonar (adaptação - SCHERMULY, et. al. 2011).

Em células endoteliais, a expressão de moléculas de adesão leucocitária, VCAM-1, ICAM-1 e seletinas são reguladas pela Ang II, o que facilita a adesão de monócitos na parede vascular (Pueyo et al, 2000). Nas CMLVs, a Ang II induz a expressão de quimiocinas e citocinas, incluindo MCP-1 e IL-6. Essas moléculas promovem o aumento da infiltração de células imunes amplificando o perfil inflamatório. Desse modo, a Ang II atua como um fator de crescimento que regula a proliferação celular, hipertrofia e apoptose, além de regular o remodelamento vascular (Pacurari et al., 2014).

A habilidade da Ang II de potencialmente induzir a inflamação vascular envolve a ativação de duas vias de sinalização importantes na resposta de estresse vascular a primeira sendo NFkB-IL6 já descrita anteriormente e a segunda a via TGF-β-Smad (Brasier et al., 2011). Sendo esta intimamente relacionada ao remodelamento vascular.

A Ang II ativa a via TGF-β-Smad, que promove a sinalização dos receptores de TGF-β, importantes na transição de miofibroblasto e remodelamento da MEC vascular. O TGF-β, conhecido por estimular a produção de IL-6 e MCP-1 (Seong et al., 2009; Zhang, et al, 2009) estimula a proliferação de fibroblastos que se diferenciam em miofibroblasto expressando alfa-actina da célula muscular lisa, os quais respondem pelo remodelamento vascular e aumentam sua mobilidade e atividade secretória. A Ang II induz a decomposição da MEC e remodelamento que leva a quimiotaxia de monócitos e a liberação de TGF-β latente. TGF-β também induz a produção de MMP e recrutamento de macrófago através da sinalização de Smad aórtica. A conjugação de IL-6 e TGF-β também modula a expressão de linfócitos T via ativação da Smad e STAT (Desmouliere et al, 1993; Dagouassat, et al., 2010; Brasier et al., 2011).

1.8 ESTRESSE OXIDATIVO EM RESPOSTA A INFLAMAÇÃO INDUZIDA PELA ANGIOTENSINA II

Como visto anteriormente, a Ang II apresenta um papel importante no estabelecimento da hipertensão e lesão vascular mediada em parte pela produção de estresse oxidativo por macrófagos e linfócitos T. Ambos os tipos celulares expressam receptores AT1R e NADPH oxidase (Nataraj et al., 1999; Jurewicz et al., 2007; Jackson et al., 2004; Yanagitani et al., 1999).

Como componente da imunidade inata, os macrófagos ativados possuem importante papel em processos inflamatórios deflagrados, produzindo EROs, como o óxido nítrico (NO), um radical livre produzido a partir da L-arginina mediada pela óxido nítrico sintase (NOS) com formação de L-citrulina. Existem três isoformas dessa enzima, a bNOS e eNOS expressas no cérebro e células endoteliais, respectivamente e que são dependentes do Ca^{2+} /calmodulina, a terceira forma independente de

Ca^{2+} /calmodulina é a i-NOS que é uma enzima citosólica induzida por citocinas e expressa-se em macrófagos, CMLV, células mesangiais, produzindo grande quantidade de NO (Busse e Mulsch, 1990; Loscalzo e Welch, 1995). O NO modula o crescimento de células musculares lisas por mecanismos dependentes e independentes de GMPc. Além disso, inibe proliferação e síntese de colágenos de matriz estimulados pelas endotelinas-1 e Ang II (Batlouni, 2001).

O NO atua como mensageiro intra e extracelular e está envolvido no relaxamento vascular e tem um grande papel na proteção dos vasos sanguíneos, antagonizando a ação vasoconstritora exercida sobre a musculatura lisa vascular e inibição da ativação de plaquetas (Ramesh e Reeves, 2003). A manutenção do fluxo contínuo de sangue e controle do extravasamento tecidual é exercida pela ação de NO liberado continuamente pelo endotélio vascular. Constitui também um importante mediador citotóxico de macrófagos ativados, sendo componente de uma primeira linha de defesa do organismo, capaz de destruir patógenos e células tumorais. Entretanto, o óxido nítrico é potencialmente tóxico em situações de estresse oxidativo, geração de intermediários de oxigênio e deficiência do sistema antioxidante (Dusse e Carvalho, 2003).

O endotélio atua como um sensor recebendo alterações hemodinâmicas e sinais humorais e transmitindo às células musculares lisas vasculares (Dzau, 1989; Gryglewski et al., 1988). O desbalanço entre substâncias vasoconstritoras e vasodilatadores pode promover a disfunção endotelial mediada pelo estresse oxidativo, importante fator de risco para as doenças cardiovasculares (Batlouni, 2001).

Durante a inflamação a atividade da ciclooxygenase 2 (COX-2) aumenta em resposta a várias citocinas pró-inflamatórias como TNF-alfa, IL-1 β . Nesse caso, o endotélio produz grandes quantidade de superóxido (O_2^-) e também hidroxila, radicais livres gerados a partir da peroxidase. Em condições fisiológicas normais, a superóxido dismutase (SOD) inibe a ação oxidante da O_2^- reduzindo-a a peróxido de hidrogênio (H_2O_2). No entanto, durante o estresse oxidativo quantidades significativas de O_2^- reagem com o NO para formar peroxinitrito (ONOO) que atua como radical livre. Em

consequência diminui a disponibilidade de NO endotelial e seu efeito vasodilatador (Batlouni, 2001).

1.9 JUSTIFICATIVA

Com base nos efeitos vasoconstritores e pró-inflamatórios mediados pela ação da Ang II, nosso laboratório vem investigando os efeitos que aumentos discretos de Ang II poderiam surtir na mediação de respostas inflamatórias, de modo a favorecer o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Assim sendo, a investigação do papel que um pequeno aumento de Ang II poderia ter sobre mecanismos inflamatórios é de extrema importância, visto que a ativação de mediadores inflamatórios, mesmo na ausência de doença estabelecida, poderia ser um coadjuvante para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Neste contexto, pode-se imaginar que uma variação endógena de Ang II poderia se relacionar com aumento de susceptibilidade ao desenvolvimento de uma lesão cardiovascular em maior ou menor escala ou impacto sobre o sistema como um todo, tanto na normo como na hipertensão.

1.10 HIPÓTESE

Este estudo tem como hipótese que a Ang II, mesmo em doses que não promovem alteração de pressão arterial, é capaz de induzir a migração de células inflamatórias para a aorta, bem como a expressão de marcadores inflamatórios teciduais.

2 OBJETIVOS

Para confirmar a hipótese apresentada, o objetivo deste estudo foi verificar a capacidade da angiotensina II em induzir uma resposta inflamatória na aorta e se existe uma relação com variações de pressão arterial, mesmo que discretas.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1- Estudar a migração de macrófagos para a aorta e tecido perivascular, além da expressão de marcadores inflamatórios teciduais de forma aguda ou não.

2- Verificar se as alterações de marcadores inflamatórios observados se relacionam com uma possível elevação da pressão arterial.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo utilizou camundongos C57Bl/6 machos adultos, pesando entre 20g e 25g. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em grupos a receberem solução salina (grupo Controle) ou angiotensina II (grupo angiotensina II) e foram avaliados após tempos determinados no estudo. O estudo foi conduzido de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da FMUSP, protocolo de pesquisa 184/14.

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram separados em grupos experimentais, sendo: 1) controle (recebeu única injeção intraperitoneal de solução salina 0,9%), e 2) Angiotensina II (recebendo única dose intraperitoneal de angiotensina II, 30ng/kg). As injeções foram administradas uma única vez e totalizaram um volume de 250 µL. Após o tratamento, os animais foram avaliados em diferentes tempos, mais agudos (30 a 60 minutos) ou mais crônicos (até 72 horas), Figura 4.

Grupos Experimentais (n=8/por grupo):

- Controle (Cont - NaCl 0.9% ip)
- Angiotensina II (Ang II 30 ng/kg ip)

Figura 4 – Esquema do delineamento experimental mostrando a distribuição e análise realizada nos animais dos grupos controle e angiotensina II.

Os animais usados para as avaliações de migração celular e marcadores inflamatórios foram eutanasiados e avaliados em tempos determinados, como mostrado acima. Os tempos de estudo corresponderam aos tempos mais precoces (como feito na avaliação da pressão arterial) e também a tempos mais tardios (até 72 horas).

Metade dos animais usados para as avaliações dos marcadores inflamatórios também teve a pressão arterial medida por pletismografia de cauda (método não invasivo). Contudo, como será explicado a seguir, esta medida foi substituída por medida direta de pressão arterial.

Já os animais usados para a avaliação da pressão arterial de forma direta foram estudados após até 24 horas, de forma a verificar efeitos agudos da injeção aplicada, como será explicado mais adiante. É importante ressaltar que os animais que tiveram a pressão arterial avaliada de forma direta não foram usados para o estudo dos marcadores inflamatórios (devido ao procedimento cirúrgico prévio) e foram acompanhados durante todos os tempos experimentais.

3.2 AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA SISTÊMICA

Inicialmente, pensamos em fazer medidas de pressão arterial nos mesmos animais que seriam usados para as avaliações dos marcadores inflamatórios. Desta forma, teríamos a possibilidade de correlacionar os valores de pressão arterial com os resultados de inflamação de forma direta. Contudo, após a banca de qualificação, tomou-se a decisão de interromper as medidas de pressão arterial por pletismografia de cauda, substituindo-as por medidas diretas através de cânula arterial. Esta é uma medida mais precisa e pensou-se ser importante para determinar possíveis oscilações pequenas na pressão arterial. Para esta nova medida, foi necessário reservar animais para a cirurgia de implante do cateter e medidas posteriores. Desta forma, apresentamos a seguir os dois métodos utilizados: a medida da pressão arterial por pletismografia de cauda e a medida direta da pressão arterial por meio de cateter.

3.2.1 MEDIDA HEMODINÂMICA INDIRETA ATRAVÉS DE PLETISMOGRAFIA DE CAUDA

A medida hemodinâmica por pletismografia de cauda teve como objetivo verificar que os tratamentos não modificariam a pressão arterial, fator que atua na resposta inflamatória estudada, garantindo que os resultados obtidos fossem independentes de fatores hemodinâmicos. Para isso, os animais foram adaptados ao sistema durante uma semana antes da medida efetiva.

A adaptação consistiu em colocar os animais no tubo de contenção do aparelho e, em seguida, posicionando o manguito em torno da cauda para as devidas medidas.

Esse procedimento foi feito durante toda a semana e nos dois primeiros dias da semana seguinte para que os animais pudessem se habituar à rotina e ao equipamento evitando assim a interferência de variáveis como o estresse e permitindo com isso medidas mais precisas e fidedignas.

As medidas foram obtidas através de um esfignomanômetro de cauda, desse modo o animal foi posicionado em uma caixa restritora colocada sobre uma chapa de aquecimento que promove uma vasodilatação na cauda (Figura 5). O esfignomanômetro foi insuflado até a obstrução total do fluxo sanguíneo para a artéria caudal, em seguida a obstrução do fluxo foi sendo diminuída lentamente, até surgir os primeiros picos de pressão arterial sistólica que foram captados pelo sistema BP-2000 series II.

Figura 5 – Esquema simplificado do sistema de Pletismografia de cauda.

Esse sistema é formado por um transdutor eletromagnético localizado na cauda do animal e conectado a um amplificador, que repassa o sinal para um conversor analógico-digital registrando, assim, os valores em tempo real em um computador. Os valores obtidos são analisados pelo programa BP-2000 Blood Pressure Analyzis. A partir desse, foram consideradas as médias aritméticas de quinze registros bons realizados em um mesmo dia para cada animal para a determinação da PAS e FC. Os animais foram divididos nos grupos conforme mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 – Número de Animais utilizados em cada tempo de tratamento para avaliação da PAS e FC por pletismografia de cauda.

TEMPO	GRUPO	
	CONTROLE (n)	ANG II (n)
0 (medida prévia à injeção)	16	17
Após 30 min de injeção	4	5
Após 1 hora de injeção	4	4
Após 6 horas de injeção	4	4
Após 24 horas de injeção	4	4

3.2.2 MEDIDAS HEMODINÂMICAS DIRETA ATRAVÉS DE CÂNULA ARTERIAL

3.2.2.1 Canulação

Para verificar se a dose de Ang II promove efeitos inflamatórios sem alterar os níveis de pressão arterial (PA), foi realizada a medida direta de PA e frequência cardíaca (FC), além de avaliação dos pressorreceptores. Para isso, os animais foram anestesiados por isoflurano para a implantação de dois cateteres (PE-10, com diâmetro interno de 0,1 mm conectado a um cateter PE-50, com diâmetro interno de 0,05 mm), um arterial e outro venoso. Prévia à inserção, os cateteres foram preenchidos com solução fisiológica de NaCl 0,9%. Para a implantação dos cateteres, foi realizada uma pequena incisão na artéria carótida e na veia jugular do animal, em seguida a extremidade do cateter com menor calibre (PE-10) foi introduzido na artéria e veia. Os cateteres foram fixados com fio de algodão, a parte mais espessa do cateter (PE-50) foi passada subcutaneamente no pescoço do animal, sendo exteriorizada no dorso, próximo à região cervical. Após a cirurgia os animais receberam dose de analgésico (tramadol 40 mg/kg, cada 12 hs/por 2 dias) e antibiótico (Penicilina benzatina, 50 UI/kg, dose única) e foram deixados se recuperando em ambiente aquecido, rico em O₂, onde foram monitorados até a plena recuperação. Após 48 horas, foram iniciadas as medidas de pressão arterial e teste dos pressorreceptores, foram registrados os níveis de em condições basais e

após a administração da Ang II (30ng/kg) ou solução salina (NaCl 0,9%) nos tempos 30 min, 1, 2, 6, 12 e 24 h, além disso foram administradas soluções de fenilefrina e nutripussiato de sódio (100 e 150 ng) para avaliação da sensibilidade barorreflexa.

Para a manutenção da cânula, foi realizada lavagem precedente ao registro de PA, usando-se 0,02 ml de heparina sódica (Liquemine – Roche, 5000U) em 0,5 ml de solução fisiológica de NaCl 0,9%, a fim de se evitar obstruções.

Os camundongos foram mantidos em caixas individuais (Plexiglas, 25x15x10 cm) após a canulação e durante a realização das avaliações hemodinâmicas.

3.2.2.2 Registro da PA e FC

Após 48 horas da canulação, com o animal acordado, a cânula foi conectada a uma extensão de 20 cm (PE-50), permitindo livre movimentação do animal na caixa durante o período de experimento.

Para o registro a extensão foi conectada a um transdutor (Kent Instruments, EUA), este conectado a um pré-amplificador (Hewlet-Packard 8805C, Puerto Rico, EUA). O sinal de PA foi gravado em um computador equipado com um sistema de aquisição de dados (Windak 4KHz, DATAQ Instruments, Akron, OH, EUA), permitindo análises de pulso de pressão, batimento-a-batimento, com uma frequência de amostragem de 8000 Hz por canal para estudos de valores de pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) (Figura 6). A sensibilidade barorreflexa foi avaliada pelo índice calculado através da divisão do delta da FC pelo delta da PA. Para isso, foi selecionado um ponto antes da injeção e outro na faixa fisiológica de até 30mmHg no efeito da droga.

Figura 6 – Esquema simplificado do sistema de medida direta de pressão arterial por cateter arterial. O cateter arterial é ligado a um transdutor de pressão, acoplado a amplificador de sinais, que por sua vez é ligado a uma placa de computador, onde pode-se verificar os valores de pressão de pulso.

No programa Windaq é possível executar cálculos a partir dos valores obtidos e já gravados. Os sinais gravados geram uma planilha analisadas no excel. No primeiro dia do registro, será primeiramente realizada a adaptação do animal no ambiente, para que estímulos externos não altere os valores obtidos, após o animal se acalmar ele foi conectado ao sistema e foi feita uma gravação dos valores de PA e FC durante 20 minutos, antes do estímulo com as drogas. Logo após, foi injetado Ang II ou Solução Salina de NaCl 0,9% via ip e foi feita gravação por 40 minutos, para que se possa observar o efeito das drogas no tempo 30 minutos e logo após este, os animais permaneceram conectados ao sistema para posteriores gravações nos tempos propostos. Após os registros do primeiro dia, os animais ficaram mantidos em salas climatizadas com livre acesso a água e comida, para que fosse feito os registros nos dias consecutivos referentes aos tempo após a injeção de Ang II ou solução fisiológica de NaCl 0,9%.

Para a avaliação da pressão arterial e frequência cardíaca direta, 16 animais foram canulados como já descrito anteriormente, sendo 8 destinados ao grupo controle e 8 ao grupo Ang II. Analisando o primeiro experimento verificamos que a taxa de mortalidade desse grupo era muito alta, principalmente, devido a manipulação do

animal para inserção ou retirada ao sistema de registro, desse modo optamos por registrar até o tempo de 24 horas após a injeção de solução salina 0,9% (grupo controle) e Ang II 30 ng (grupo Ang II).

Após a coleta de dados dos 4 primeiros animais de cada grupo observamos que os mesmos chegavam debilitados no dia seguinte à injeção, quando seria registrado o tempo de 24 horas. Então, optamos por deixar os animais conectados ao sistema de registro por um período de 12 horas, evitando ao máximo a manipulação destes durante este período de registro.

Os dados foram coletados do seguinte modo:

- O animal foi conectado ao sistema de aquisição de dados, foi esperado em média uns 15 min até o mesmo se adaptar ao local, quando o animal já estava visualmente calmo iniciamos o registro (o tempo de gravação do registro foi de 20 min em cada tempo);
- Registramos 20 min (tempo basal (tempo 0), prévio à injeção);
- Realizamos a injeção de solução salina 0,9% ou Ang II intraperitoneamente;
- Deixamos gravando o tempo logo após a injeção;
- Registramos após 30 min da injeção;
- Injetamos fenilefrina e, em seguida, nitroprussiato de sódio (concentração de 100ng e 150 ng) na veia para a avaliação da sensibilidade barorreflexa;
- Registramos após 1, 2, 6 e 12 horas da injeção;
- Repetimos a injeção de fenilefrina e nitroprussiato de sódio (concentração de 100ng e 150 ng) para a avaliação da sensibilidade barorreflexa;
- O animal foi desconectado do sistema;
- No dia seguinte, registramos após 24 horas da injeção;
- Repetimos a injeção de fenilefrina e nitroprussiato de sódio (concentração de 100ng e 150 ng);
- Após isso o animal foi sacrificado com dose de anestésico como já descrito anteriormente, mas não houve coleta de tecidos desses animais.

3.3 EUTANÁSIA E COLETA DE TECIDOS

Logo após as medidas hemodinâmicas, cada animal foi anestesiado com sobredose de anestésico Quetamina (180 mg/Kg) suplementado com Xilazina (20mg/Kg). Após a parada respiratória, foi feita toracotomia, corte no átrio direito e coleta de sangue para a dosagem de Angiotensinas. Logo após, foi feita a coleta da aorta usada no estudo.

A aorta, logo após a coleta, foi armazenada em formol 4% tamponado, sendo deixada para a fixação por um tempo de 24 a 48 horas. Logo após, o tecido foi submetido a processamento histológico, passando pelas etapas de desidratação, diafanização e inclusão em parafina.

3.4 AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO INFLAMATÓRIA POR IMUNOHISTOQUÍMICA

Esta avaliação foi realizada na aorta de modo a melhor entender as modificações vasculares induzidas pela Ang II. Após o tratamento e coleta dos tecidos foi realizada a padronização da diluição dos anticorpos primários, alvo de interesse para determinar qual a solução tampão e pH ótimo para o procedimento de recuperação antigênica, bem como qual a melhor diluição a ser utilizada.

Logo após o resultado dos testes de padronização, procedeu-se as análises oficiais. Para isso, os tecidos da aorta foram cortados com espessura de 5µm com auxílio de um micrótomo, sendo depois dispostos em lâminas histológicas silanizadas. Os cortes foram desparafinizados e reidratados para o ensaio de Imunohistoquímica tipo A-B-C (Estreptoavidina – Biotina – Peroxidase). Após a reidratação, as lâminas foram submetidas a recuperação antigênica em tampão citrato de sódio pH = 6.0 a 98° C por 40 minutos. Ao final da recuperação antigênica as lâminas foram deixadas no tampão até chegar a temperatura ambiente, para então dar início ao procedimento de imunohistoquímica. O bloqueio de peroxidase endógena foi feito com H₂O₂ 3%. Logo após, os cortes foram incubados em anticorpo primário anti-CD45 (Vector Laboratories, Burlingame, CA), anti-iNOS (BD Transduction Laboratories Biosciences, Franklin Lakes, NJ), anti-TGF-β (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), anti-IL1-β (Santa Cruz Biotechnology,

Inc.) e anti- α -actina (Abcam, Cambridge, MA), como mostrado na Tabela 2. Os anticorpos primários foram diluídos em TBS-TC e mantidos à temperatura de 4°C *overnight*.

Tabela 2 – Anticorpos, recuperação antigênica e diluições utilizadas para marcação por imunohistoquímica.

Anticorpo primário	Espécie em que foi feito o anticorpo	Diluição anticorpo primário	Fabricante
CD45	Camundongo	1:100	Vector
i-NOS	Coelho	1:200	BD Transduction
TGF-β	Coelho	1:100	Santa Cruz
IL1-β	Coelho	1:100	Santa Cruz
α-actina	Coelho	1:400	Abcam

Após esta etapa, foi realizada a incubação com o anticorpo secundário biotilado anti-coelho (1:500) para anti-iNOS, anti-TGF- β , anti-IL1- β e anti- α -actina, assim como anti-camundongo (1:1000) para anti-CD45, sendo depois realizada a incubação com Estreptoavidina conjugada com HRP. A revelação foi feita usando DAB como cromógeno. A contra-coloração foi feita com hematoxilina (10 segundos apenas), sendo em seguida realizada a montagem das lâminas. O controle negativo nos tecidos utilizados neste ensaio foi obtido pela omissão de anticorpos primários durante a reação. Foi mantido pelo menos 1 corte como controle negativo em cada lâmina avaliada.

3.5 ANÁLISE DA IMUNOMARCAÇÃO

Cada lâmina analisada continha 6 cortes histológicos da aorta, sendo os dois primeiros controles negativos, que foi obtido pela omissão o anticorpo primário, como descrito anteriormente, e mais 4 cortes que foram incubados com o anticorpo primário. As fotomicrografias utilizadas na análise foram adquiridas pelo sistema computadorizado acoplado ao microscópio (AxioCam MRc, ZEISS), com um programa específico para a captura de imagens (Axion Vision 4.8). As análises das fotomicrografias obtidas após a técnica de imunohistoquímica foram realizadas a partir de dois métodos diferentes:

3.5.1 Contagem positiva macrofágos

CD45 – Cada corte foi visualizado na objetiva de 40x, e a partir da visualização ao microscópio foram feitas 5 fotomicrografias de regiões diferentes de um mesmo corte, buscando mostrar um campo onde houvesse tanto o tecido adiposo perivascular como também as diferentes camadas do vaso. A análise foi realizada de forma cega para tratamento e tempo, a partir da contagem das células positivas para CD45 nas túnicas média, adventícia e no tecido adiposo perivascular (PVAT) de cada uma das fotomicrografias (Figura 7). Após as contagens das células positivas, foram calculadas a média $\pm$ desvio padrão da média.

Figura 7 – Fotomicrografia representativas de corte histológico da aorta dos grupos Controle e Ang II 48 h mostrando quando não há marcação (A) e com marcação positiva (B) para o anticorpo anti-CD45 (setas). Objetiva: 40x.

3.5.2 Análise pelo software imagej-fiji, com decomposição de cor

Para a análise de TGF- β , IL1- β , iNOS e α -actina. Cada corte foi visualizado na objetiva de 40x. A partir da visualização ao microscópio, um único corte por animais foi selecionado para a captura das imagens. As análises das túnicas média, adventícia e do tecido adiposo perivascular (PVAT) foram realizadas a partir de 5 fotomicrografias de cada corte utilizado, sendo salvas em formato TIFF. Foi usado o Software ImageJ-Fiji 1.51n (Wayne Rasband. National Institute of Health, USA), que possui a ferramenta para estudo de imunohistoquímica e permita realizar a decomposição de cor. Assim, pode-se medir a intensidade de tom marrom obtido pela revelação do DAB.

Os valores de intensidade de cor são usados para o cálculo médio de intensidade de cor obtida em cada animal. A partir dos valores médios do grupo controle em cada tempo estudado (100%), foram calculados os valores percentuais de intensidade de cor nos animais tratados com angiotensina II. Estes valores foram então usados para a comparação estatística.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores foram expressos como média e desvio padrão da média. Estes valores médios de cada animais foram comparados por Análise de Variância (ANOVA) de dois caminhos, complementada pelo teste de Bonferroni. Para todas as avaliações feitas, foram considerados significantes: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$.

4 RESULTADOS

A seguir, são apresentados os resultados obtidos, mostrando-se inicialmente as medidas de pressão arterial obtidas de forma indireta (por pletismografia de cauda) e direta (por cateter arterial). Na sequência, serão apresentados os resultados verificados quanto ao fenótipo das células musculares lisas vasculares, ao infiltrado inflamatório e aos marcadores inflamatórios.

4.1 AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA POR PLETISMOGRAFIA DE CAUDA: (MEDIDA INDIRETA)

A avaliação da pressão arterial e da frequência cardíaca por pletismografia de cauda demonstrou que não houveram diferenças entre os grupos controle e Angiotensina II em nenhum dos tempos observados (Figura 8).

Figura 8 - Avaliação da pressão arterial (A) e frequência cardíaca (B) por pletismografia de cauda nos grupos Controle (n=4) e Angiotensina II (n=4) nos tempos 30 min, 1 hora, 6 horas e 24 horas.

4.2 AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA POR CANULAÇÃO: MEDIDA DIRETA

A medida hemodinâmica direta da pressão arterial e frequência cardíaca foi realizada a fim de verificarmos se a dose de Ang II seria capaz de alterar a pressão arterial, mesmo que de forma muito pequena. Novamente, verificamos que a dose utilizada não promoveu qualquer alteração de pressão arterial, nem diastólica, sistólica ou média, e nem da frequência cardíaca (Figura 9). Desta forma, podemos considerar que as alterações nos marcadores inflamatórios na aorta não são devidas à pressão arterial.

Figura 9 - Avaliação da pressão arterial diastólica (A), pressão arterial sistólica (B), pressão arterial média (C) e frequência cardíaca (D) por canulação da artéria carótida nos grupos Controle (n=7) e Angiotensina II (n=8) antes da injeção de angiotensina II e após os tempos de 30 min, 1 hora, 2 horas, 6 horas 12 horas e 24 horas.

4.2.1 AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE BARORREFLEXA

A avaliação da sensibilidade barorreflexa permitiu verificar que a aplicação de uma única dose de angiotensina II intraperitoneal (30 ng/kg) não foi capaz de alterar a resposta bradicárdica à fenilefrina (Figura 9) e tampouco a resposta taquicárdica ao nitroprussiato de sódio (Figura 10).

Figura 9 - Avaliação do reflexo bradicárdico após injeção de Angiotensina II. Os valores apresentados correspondem à média do índice obtido após aplicação das doses de 100 e 150ng de fenilefrina.

Figura 10 - Avaliação do reflexo taquicárdico após injeção de Angiotensina II. Os valores apresentados correspondem à média do índice obtido após aplicação das doses de 100 e 150ng de nitroprussiato de sódio.

4.3 AVALIAÇÃO DA IMUNOMARCAÇÃO PARA A-ACTINA NA TÚNICA MÉDIA

Como descrito anteriormente, a análise da expressão de α -actina informou o estado das células musculares lisas quanto ao seu fenótipo contrátil. Quanto mais intensa a marcação, mais provável que o citoesqueleto contrátil se encontrasse bem estruturado, indicando um fenótipo contrátil mais claro. Por outro lado, a marcação mais fraca indica provável desassociação do citoesqueleto, reduzindo sua capacidade contrátil, e associando-se mais provavelmente a um fenótipo sintético (que aparece em células musculares lisas ativadas e participantes de um processo patológico). Como pode ser visto na Figura 11, o tratamento com Angiotensina II em dose subpressora não provocou alteração na expressão de α -actina quando comparado aos grupos controles. Embora possa ser percebida uma redução na sua expressão após 48 horas, não verificamos diferenças estatisticamente significantes (Figura 12).

Figura 11 - Avaliação pelo escore de marcação para o anticorpo anti- α -actina na túnica média nos grupos Controle e Angiotensina II nos tempos 30 min, 24 h, 48 h e 72 h; n=8.

Figura 12 – Fotomicrografia representativas de corte histológico da aorta dos grupos Controle e Ang II 48 h mostrando a marcação para o anticorpo anti- α -actina. Objetiva: 40x.

Como será mostrado a seguir, este tempo de 48 horas corresponde a um momento de maior expressão de marcadores inflamatórios, o que sugere que investigações mais aprofundadas sejam importantes.

4.4 AVALIAÇÃO DA CONTAGEM DE MACRÓFAGOS (PELA IMUNOMARCAÇÃO PARA CD45)

A avaliação por imunohistoquímica do marcador comum de macrófago (CD45) demonstrou que com apenas uma única dose de Angiotensina II é possível observar o recrutamento de células positivas na aorta. Este recrutamento difere quanto ao tempo após a exposição à Angiotensina II, bem como à região do vaso em estudo.

Como podemos observar na Figura 13, não houve diferença na população de células positivas para CD45 entre os grupos na túnica média. Por outro lado, houve aumento na população de células positivas para CD45 no grupo Angiotensina II na túnica adventícia (Figura 14) logo após 1 hora da injeção; esse aumento novamente ocorre após 24 horas. Já no tecido adiposo perivascular (PVAT), a resposta foi ainda mais aguda (Figura 15), havendo aumento de células positivas já após 30 minutos da injeção de angiotensina II. Além disso, da mesma forma como mostrado na túnica adventícia, há uma leve redução após 6 horas, seguida de novo aumento de células positivas residentes no tecido após 24 horas.

Figura 13 - Avaliação por contagem de células positivas para o anticorpo anti-CD45 na túnica média nos grupos Controle e Angiotensina II nos tempos 30 min, 24 h, 48 h e 72 h; n=8.

Figura 14 - Avaliação por contagem de células positivas para o anticorpo anti-CD45 na túnica adventícia nos grupos Controle e Angiotensina II nos tempos 30 min, 24 h, 48 h e 72 h; n=8. * p≤0,05

Figura 15 - Avaliação por contagem de células positivas para o anticorpo anti-CD45 no PVAT nos grupos Controle e Angiotensina II nos tempos 30 min, 24 h, 48 h e 72 h; n=4. * p≤0,05

4.5 AVALIAÇÃO DA IMUNOMARCAÇÃO PARA TGF- β

A marcação imunohistoquímica para o TGF- β foi positiva na túnica média, havendo aumento da expressão protéica no grupo angiotensina II após 30 e 60 minutos da injeção. Esse aumento se manteve até as 48 horas após a injeção (Figura 16).

Figura 16 - Avaliação da expressão do TGF β nos grupos Controle e Angiotensina II na túnica média nos tempos 30 min, 24 h, 48 h e 72 h; n=4. * $p \leq 0,05$

Podemos observar que na túnica adventícia a resposta foi um pouco mais tardia, com aumento do conteúdo proteico de TGF- β no angiotensina II apenas após 48 horas da injeção (Figura 17). Por outro lado, não houve aumento da expressão proteica do TGF- β no PVAT como mostrado na Figura 18.

Figura 17 - Avaliação da expressão do TGF- β nos grupos Controle e Angiotensina II na túnica adventícia nos tempos 30 min, 24 h, 48 h e 72 h; n=4. * $p \leq 0,05$

Figura 18 - Avaliação da expressão do TGF- β nos grupos Controle e Angiotensina II no PVAT nos tempos 30 min, 24 h, 48 h e 72 h; n=4.

4.6 AVALIAÇÃO DA IMUNOMARCAÇÃO PARA IL1-B

Diferente do que foi observado no resultado anterior, a expressão proteica para o IL1- β na túnica média só aumenta nos animais tratados com angiotensina II após 48 horas da injeção (Figura.19). No entanto, tanto na túnica adventícia (Figura 20) como no PVAT (Figura 21) observamos aumento da expressão do IL1- β em dois momentos diferentes, após 30 minutos e 48 horas da injeção de Ang II.

Figura 19 - Avaliação da expressão de IL1- β nos grupos Controle e Angiotensina II na túnica média nos tempos 30 min, 24 h, 48 h e 72 h; n=4. * $p \leq 0,05$

Figura 20 - Avaliação da expressão de IL1- β nos grupos Controle e Angiotensina II na túnica média nos tempos 30 min, 24 h, 48 h e 72 h; n=4. * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$.

Figura 21 - Avaliação da expressão de IL1- β nos grupos Controle e Angiotensina II no PVAT nos tempos 30 min, 24 h, 48 h e 72 h; n=4. . ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

4.7 AVALIAÇÃO DA IMUNOMARCAÇÃO PARA iNOS

A avaliação da imunomarcação para o i-NOS demonstrou que não houve diferença na expressão de i-NOS na túnica média da aorta (Figura 22). No entanto, foi possível observar aumento na expressão proteica de i-NOS na túnica adventícia após 48 horas da injeção de angiotensina II (Figura 23), assim como aumento, também no PVAT após 30 minutos da injeção (Figura 24).

Figura 22 - Avaliação da expressão de iNOS nos grupos Controle e Angiotensina II na túnica média nos tempos 30 min, 24 h, 48 h e 72 h; n=4.

Figura 23 - Avaliação da expressão de iNOS nos grupos Controle e Angiotensina II na túnica adventícia nos tempos 30 min, 24 h, 48 h e 72 h; n=4. * $p \leq 0,05$

Figura 24 - Avaliação da expressão de i-NOS nos grupos Controle e Angiotensina II no PVAT nos tempos 30 min, 24 h, 48 h e 72 h; n=4. * $p \leq 0,05$

5 DISCUSSÃO

Baseado no objetivo geral deste estudo que é o de demonstrar que a angiotensina II, mesmo em pequena quantidade, é capaz de ativar a resposta inflamatória vascular induzida pela Ang II, propusemos iniciar o mesmo avaliando se uma única dose de angiotensina II (30ng/kg) injetada intraperitonealmente nos camundongos era efetivamente subpressora e incapaz de alterar a pressão arterial. De forma geral, este estudo mostrou que esta dose de angiotensina II é subpressora e, mesmo assim, é capaz de ativar a resposta inflamatória na aorta, aumentando o infiltrado inflamatório e os marcadores inflamatórios locais.

Existem diversas linhas de estudo que associam doenças cardiovasculares a um estado crônico de inflamação de baixo grau. As evidências existentes são baseadas em modelos experimentais de hipertensão, embora estudos clínicos que confirmam a participação da resposta imune nas doenças cardiovasculares têm se tornado cada vez mais crescentes. Os processos imunológicos celular e molecular que resultam em alterações vasculares associadas com a hipertensão arterial representam um novo paradigma na pesquisa de estratégias terapêuticas para as doenças cardiovasculares (Kasal e Neves, 2011). Como já esperávamos no nosso estudo, uma única dose de angiotensina II (30ng/kg) não foi capaz de alterar a pressão arterial, frequência cardíaca ou sensibilidade dos pressorreceptores em nenhum dos tempos de estudo como podemos notar tanto nas medidas diretas como, também, nas medidas indiretas. Desse modo, os resultados obtidos neste estudo são independentes de valores de PA e FC.

Após a confirmação de que o estímulo dado aos animais não era suficiente para alterar as medidas hemodinâmicas, buscamos verificar se haveria alteração do fenótipo das CMLVs na parede aórtica, visto que estas, quando em fenótipo sintético, participam da liberação de diversas substâncias, possivelmente inclusive marcadores inflamatórios. Para isso, avaliamos o conteúdo protéico de α -actina na aorta. A α -actina é uma proteína do citoesqueleto muito utilizada para verificar o fenótipo de CMLVs. A Ang II pode ativar a α -actina durante diferenciação do fenótipo celular. Estudos

anteriores demonstraram que a Ang II foi capaz de reduzir os níveis de α -actina através da via JNK e p38MAPK durante a hipertensão (Zhou et al., 2015). No entanto, foi evidenciado aumento dos níveis de α -actina na transição mesenquimal-endotelial no trombo intra-luminal de aneurisma de aorta abdominal, resposta relacionada a um processo fibrogênico e a doenças cardiovasculares (Rao et al., 2015).

No nosso estudo, esperávamos que houvesse diminuição da expressão protéica da α -actina na túnica média do vaso nos animais tratados com angiotensina II. No entanto, não houve diferença significativa entre os grupos, embora tenha havido uma aparente diminuição após 48 horas da injeção. Acreditamos que talvez o estímulo dado com a dose de angiotensina (30ng/kg) não tenha sido suficiente para que as CMLVs iniciassem uma mudança no fenótipo.

Embora os resultados demonstrem que não houve mudança de fenótipo nas CMLVs, a avaliação de infiltrado inflamatório e marcadores inflamatórios era importante para avaliar o recrutamento de células do sistema imune para a aorta. Avaliamos inicialmente a presença de células de origem mielóide, positivas para CD45, nas túnicas média, adventícia, bem como no tecido adiposo perivascular. Como observado, não houve diferença na marcação de CD45 na túnica média. Por outro lado, foi possível observar aumento na marcação de células positivas após 30 minutos da injeção na região do PVAT e, também após 1 e 24 horas na túnica adventícia. Desta forma, uma única dose de Ang II na concentração de 30 ng/Kg foi capaz de alterar os níveis de CD45, marcador comum de leucócitos evidenciando a participação da imunidade inata em resposta a esse estímulo.

Estudos anteriores demonstraram que a Ang II, principal peptídeo vasoativo do sistema renina angiotensina, apresenta funções que vão além de suas atividades vasoconstritoras, mas também apresenta características pró-inflamatórias na parede vascular induzindo a produção de citocinas inflamatórias, moléculas de adesão e produção de ROS, resultando no acúmulo de macrófagos, diferenciação de miofibroblastos (Ejiri et al, 2003; Guzik et al., 2007). Macrófagos ativados podem desempenhar um papel protetor e patogênico em várias doenças, inclusive as doenças vasculares. Estudos revelaram que macrófagos podem exibir fenótipo de célula

mesênquimal em certas condições inflamatórias (Rao et al., 2015). Guzik et al. (2007), demonstrou o aumento dos níveis de CD45 na aorta de camundongos tratados com Ang II, além disso a Ang II estimula células T a produzir TNF- α e IFN- γ . Desse modo, tanto a imunidade inata quanto adaptativa, parecem estar envolvidas na hipertensão induzida pela angiotensina II e lesões em órgãos alvo. (Guzik et al., 2007; Shao et al., 2003, Bahroumi et al., 2011).

Após a confirmação da presença de células positivas para CD45, analisamos a expressão protéica de TGF- β , IL1- β e iNOS, importantes marcadores inflamatórios. O que chama a atenção é que os três marcadores apresentam aumentos agudos na aorta (tempos de 30 a 60 minutos) e, posteriormente, um segundo aumento por volta de 48 horas. Estes resultados vão ao encontro de resultados obtidos anteriormente em nosso laboratório, onde uma dose subpressora de angiotensina II (30 ng/kg) também foi capaz de elevar não apenas a expressão de TGF- β e IL-6 em artérias cardíacas de camundongos, como também a concentração de IL-6 sistêmica (Oliveira, 2010).

No esquema a seguir (Figura 25), a Ang II induz uma rápida migração de macrófagos para o PVAT possivelmente levando ao aumento da expressão de iNOS e IL1- β . Um resposta secundária da migração de macrófagos para a túnica média pode estar relacionada com um aumento tardio na expressão de iNOS e IL1- β . Por outro lado, o TGF- β aumenta rapidamente na túnica média. A razão pela qual ocorre um aumento tardio na expressão de TGF- β na túnica adventícia e PVAT podendo este ser influenciado pela prévia expressão de TGF- β ou pela infiltração de macrófagos necessita ser investigado.

Figura 25 – Esquema ilustrando a estrutura vascular da aorta contendo a túnica íntima mais interna (em vermelho escuro), túnica média (em vermelho), a túnica adventícia (em laranja) e o PVAT (em amarelo) e as possíveis respostas após a infusão de angiotensina II.

Diversos estudos sugerem que a Ang II é um potente indutor de inflamação vascular, isso já foi observado em modelos de infusão aguda de Ang II em camundongos, os quais demonstraram uma grande resposta inflamatória vascular, incluindo aumento na produção de citocinas, quimiocinas e ROS em células endoteliais e CMLVs da aorta prévia a casos de aneurisma (Ejiri et al, 2003; Longo et al, 2002; Zhao et al., 2015).

Certamente, estudos mais aprofundados são necessários para entendermos de que forma a Ang II ativa este mecanismo inflamatório. Possivelmente, estudos em cultura de células serão fundamentais para avaliarmos de que forma as CMLVs respondem à Ang II e como as vias de produção de citocinas inflamatórias são ativadas. Embora não tenhamos observado a redução da marcação para α -actina, como era esperado, é necessário pensar que o aumento observado pode representar algum tipo de estímulo para as CMLVs de modo a atuarem de forma pró-inflamatória.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que a angiotensina II atua sobre a aorta, de forma a estimular uma migração de células positivas para CD45, situação essa que pode facilitar um processo de lesão tecidual. Desta forma, podemos concluir que:

- a dose de angiotensina II de 30 ng/kg não é capaz de alterar a pressão arterial
- a angiotensina II em dose de 30 ng/kg é capaz de induzir resposta inflamatória na aorta de camundongos normotensos, levando ao aumento do infiltrado inflamatório bem como dos marcadores inflamatórios locais

Desse modo, os resultados sugerem que a Angiotensina II pode ser considerada capaz de aumentar a propensão ao desenvolvimento de lesão vascular, ainda que em indivíduos normotensos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alexander H. Sprague and Raouf A. Khalil. Inflammatory Cytokines in Vascular Dysfunction and Vascular Disease. *Biochem Pharmacol.* 2009; 78 (6): 539–552.

Bahroumi T, Kasal DA, Li MW, Shbat L, Laurant P, Neves MF, Paradis p, Schiffrin EL. T Regulatory Lymphocytes Prevent Angiotensin II-Induced Hypertension and Vascular Injury. *Hypertension.* 2011; 57: 469-476.

Batlouni Michel. Endotélio e hipertensão arterial. *Rev Bras Hipertens.* 2001; 8 (3): 328-38.

Beg, A. A. & Baldwin, A. S., Jr. The I kappa B proteins: multifunctional regulators of Rel/NF-kappa B transcription factors. *Genes Dev.* 1993; 7 (11): 2064-2070.

Biswas, P., Delfanti, F., Bernasconi, S., Mengozzi, M., Cota, M., Polentarutti, N., Mantovani, A., Lazzarin, A., Sozzani, S. & Poli, G. Interleukin-6 induces monocyte chemotactic protein-1 in peripheral blood mononuclear cells and in the U937 cell line. *Blood.* 1998; 91 (1): 258-265.

Brasier, A. R., Recinos, A., 3rd & Eledrisi, M. S. Vascular inflammation and the reninangiotensin system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22 (8): 1257-1266.

Brasier A, Brooke J, Tilton RG. Multifaceted role of angiotensin II in vascular inflammation and aortic aneurysmal disease. In: Grundmann R, ed. *Etiology, Pathogenesis and Pathophysiology of Aortic Aneurysms and Aneurysm Rupture.* InTech, Rijeka, Croatia. 2011: 129–146.

Busse R, Mulsch A. Induction of nitric oxide synthase by cytokine in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* 1990; 275: 87-90.

Carvalho-Filho, MA; Carvalheira, JBC; Velloso, LA e Saad, MJA Cross-Talk das Vias de Sinalização de Insulina e Angiotensina II: Implicações Com a Associação Entre

Diabetes Mellitus e Hipertensão Arterial e Doença Cardiovascular. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2007; 51 (2): 195-203.

Carvalho MHC, Scivoletto R, Fortes ZB. Reactivity of aorta and mesenteric microvessels to drugs in spontaneously hypertensive rats: role of the endothelium. *J. Hypertens.* 1987; 5: 377-382.

Choudhary, S., Lu, M., Cui, R. & Brasier, A. R. Involvement of a novel Rac/RhoA guanosine triphosphatase-nuclear factor-kappaB inducing kinase signaling pathway mediating angiotensin II-induced RelA transactivation. *Mol Endocrinol.* 2007; 21 (9): 2203-2217.

Cui, R., Tieu, B., Recinos, A., Tilton, R. G. & Brasier, A. R. RhoA mediates angiotensin II-induced phospho-Ser536 nuclear factor kappaB/RelA subunit exchange on the interleukin-6 promoter in VSMCs. *Circ Res.* 2006; 99 (7): 723-730.

Dagouassat M, Suffee N, Hlawaty H, Haddad O, Charni F, Laguillier C, Vassy R, Martin L, Schischmanoff PO, Gattegno L, Oudar O, Sutton A, Charnaux N. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)/CCL2 secreted by hepatic myofibroblasts promotes migration and invasion of human hepatoma cells. *Int J Cancer.* 2010; 126 (5): 1095-1108.

Desmoulière A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol.* 1993; 122 (1): 103-111.

Dusse LMS, Carvalho, LMVM. Nitric oxide revision. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.* 2003; 39: 343-350.

Dzau VJ. Significance of endothelial derived vasoactive substances. *J Vasc Med Biol.* 1989; 43-55.

Ejiri J, Inoue N, Tsukube T, Munezane T, Hino Y, Kobayashi S, Hirata K, Kawashima S, Imajoh-Ohmi S, Hayashi Y, Yokozaki H, Okita Y, Yokoyama M. Oxidative stress in

the pathogenesis of thoracic aortic aneurysm: Protective role of statin and angiotensin II type 1 receptor blocker. *Cardiovascular Research*. 2003; 59: 988–996.

ETELVINO GM, PELUSO AAB, SANTOS RAS. New Components of the Renin-Angiotensin System: Alamandine and the Mas-Related G Protein-Coupled Receptor D. *Current Hypertension Reports*. 2014; 16: 433.

George AJ, Thomas, WC and Hannan, RD. The renin–angiotensin system and cancer: old dog, new tricks. *Nature Reviews Cancer*. 2010; 10: 745-759.

Ghosh, S. & Baltimore, D. Activation in vitro of NF-kappa B by phosphorylation of its inhibitor I kappa B. *Nature*. 1990; 344 (6267): 678-682.

Guzik TJ, Hoch NE, Brown KA, McCann LA, Rahman A, Dikalov S, Goronzy J, Weyand C, Harrison DG. Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction. *J Exp Med*. 2007; 204: 2449 –2460.

Gryglewski R, Botting R, Vane JR. Mediators produced by the endothelial cell. *Hypertension*. 1988; 12: 530-48.

Han Y, Runge MS, Brasier AR. Angiotensin II induces interleukin-6 transcription in vascular smooth muscle cells through pleiotropic activation of nuclear factor-kappa B transcription factors. *Circ Res*. 1999; 84 (6): 695-703.

Harwani SC. Macrophages under pressure: the role of macrophage polarization in hypertension. *Translational Research*. 2017; 191: 45 – 63.

Hou T, Tieu BC, Ray S, Recinos A, Cui R, Tilton RG, Brasier AR. Roles of IL-6-gp130 Signaling in Vascular Inflammation. *Curr Cardiol Rev*. 2008; 4 (3): 179–192.

Huang XC, Richards EM, Sumners C. Mitogen-activated pro-tein kinases in rat brain neuronal cultures are activated by angiotensin II type 1 receptors and inhibited by angiotensin II type 2 receptors. *J Biol Chem*. 1996; 271: 15635-15641.

Jackson SH, Devadas S, Kwon J, Pinto LA, Williams MS. T cells express a phagocyte-type NADPH oxidase that is activated after T cell receptor stimulation. *Nat Immunol.* 2004; 5: 818–827.

Jafri S, Ormiston ML. Immune regulation of systemic hypertension, pulmonary arterial hypertension, and preeclampsia: shared disease mechanisms and translational opportunities. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2017; 313 (6): 693-705.

Jurewicz M, McDermott DH, Sechler JM, Tinckam K, Takakura A, Carpenter CB, Milford E, Abdi R. Human T and natural killer cells possess a functional renin-angiotensin system: further mechanisms of angiotensin II-induced inflammation. *J Am Soc Nephrol.* 2007; 18: 1093–1102.

Kasal DAB, Neves MF. inflamação como mecanismo patogênico na hipertensão Arterial. *Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto, UERJ.* 2011; 11-19.

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

Lavrentyev EN, AM Estes, Malik KU. Mechanism of high glucose induced angiotensin II production in rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 2007; 101(5): 455-64.

Li M, Liu K, Michalicek J, Angus JA, Hunt JE, Dell'Italia LJ, Feneley MP, Graham RM, Husain A. Involvement of chymase-mediated angiotensin II generation in blood pressure regulation. *J Clin Invest.* 2004; 114 (1): 112-20.

Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell.* 2001; 104 (4): 487–501.

Longo, G. M., Xiong, W., Greiner, T. C., Zhao, Y., Fiotti, N. & Baxter, B. T. Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. *J Clin Invest.* 2002; 110 (5): 625-632.

Loscalzo J, Welch G. Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Prog Cardiovascular Dis.* 1995; 38: 87-104.

Marchesi C, Paradis P, Schiffrin EL. Role of the renin-angiotensin system in vascular inflammation. *Trends Pharmacol Sci*. 2008; 29: 367–374.

Mackay J, Mensah GA. The atlas of heart disease and stroke. Geneva: WHO. 2004. Disponível em: http://www.who.int/cardiovascular_diseases/resources/atlas/en/.

Mukoyama M, Nakajima M, Horiuchi M, Sasamura H, Pratt RE, Dzau VJ. Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven transmembrane receptors. *J Biol Chem*. 1993; 268: 24539-42.

Murphy TJ, Alexander RW, Griendling KK, Runge MS, Bernstein KE. Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature*. 1991; 351 (6323): 233-236.

Nataraj C, Oliverio MI, Mannon RB, Mannon PJ, Audoly LP, Amuchastegui CS, Ruiz P, Smithies O, Coffman TM. Angiotensin II regulates cellular immune responses through a calcineurin-dependent pathway. *J Clin Invest*. 1999; 104:1693-1701.

Oliveira TCS. Ação da angiotensina II associada ao bloqueio dos receptores AT1 e AT2 no processo inflamatório das lesões vasculares [dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2010.

OPAS. Estratégia e plano de ação regional para um enfoque integrado à prevenção e controle das doenças crônicas, inclusive regime alimentar, atividade física e saúde. Washington: *Organização Pan-Americana da Saúde*, 2007.

Pacurari M, Kafoury R, Tchounwou PB, Ndebele K. The Renin-Angiotensin-Aldosterone System in Vascular Inflammation and Remodeling. *International Journal of Inflammation*. 2014; 1-13.

Passos VMA. Hipertensão arterial no Brasil: estimativa de prevalência a partir de estudos de base populacional. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*. 2006; 15: 35-45.

Paradis P, Schiffrin EL. Renin-angiotensin-aldosterone system and pathobiology of hypertension. In: DeMello WC, Frohlich ED, eds. *Renin Angiotensin System and Cardiovascular Disease*. 2009: 35–57.

Petrie MC, Padmanabhan N, McDonald JE, Hillier C, Connell JMC, McMurray JJV. Angiotensin converting enzyme (ACE) and non-ACE dependent angiotensin II generation in resistance arteries from patients with heart failure and coronary heart disease. *J Am Coll Cardiol*. 2001; 37 (4): 1056-61.

Pueyo ME, Gonzalez W, Nicoletti A, Savoie F, Arnal JF, Michel JB. Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor-kappaB activation induced by intracellular oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20 (3): 645-51.

Ramesh G, Reeves WB. TNFR2-mediated apoptosis and necrosis in cisplatin-induced acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003; 285: 610–618.

Rao J, Brown BN, Weinbaum JS, Ofstun EL, Makaroun MS, Humphey JD, Vorp DA. Distinct macrophage phenotype and collagen organization within the intraluminal thrombus of abdominal aortic aneurysm. *Journal of Vascular Surgery*. 2015; 62 (3): 585-593.

Sociedade Brasileira de Hipertensão – SBH. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. São Paulo: 2010. [documento da Internet]. Disponível em: http://www.saude.al.gov.br/files/VI_Diretrizes_Bras_Hipertens_RDHA.pdf

Schrader LI, Kinzenbaw DA, Johnson AW, Faraci FM, Didion SP. IL-6 deficiency protects against angiotensin II induced endothelial dysfunction and hypertrophy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007; 27 (12): 2576-2581.

Shao J, Nangaku M, Miyata T, Inagi R, Yamada K, Kurokawa K, Fujita T. Imbalance of T-cell subsets in angiotensin II-infused hypertensive rats with kidney injury. *Hypertension*. 2003; 42: 31–38.

Schermuly RT, Ghofrani HA, Wilkins MR, Grimminger F. Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension. *Nature Reviews Cardiology*. 2011; 8: 443-455.

Schiffrin EL. The flame that lights the fire: oxidative stress, inflammation, and renal damage in angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension*. 2008; 52: 205-206.

Schiffrin EL, Touyz RM. From bedside to bench to bedside: role of reninangiotensin-aldosterone system in remodeling of resistance arteries in hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004; 287: 435-446.

Seong GJ, Hong S, Jung SA, Lee JJ, Lim E, Kim SJ, Lee JH. TGF-beta-induced interleukin-6 participates in transdifferentiation of human Tenon's fibroblasts to myofibroblasts. *Mol Vis*. 2009; 15: 2123-2128.

Skrbic R, Igic R. Seven decades of angiotensin (1939–2009). *Peptides*. 2009. 30: 1945-1950.

Stan RV. Structure and function of endothelial caveolae. *Microsc. Res. Tech*. 2002; 57: 350-364.

Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Sudano I, Salvetti A. Effects of antihypertensive drugs on endothelial dysfunction. *Drugs*. 2002; 62: 265- 284.

Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in Atherosclerosis: Pathogenic and Regulatory Pathways. *Physiol Rev*. 2006; 86: 515–581.

Tieu BC, Lee C, Sun H, Lejeune W, Recinos A, 3rd Ju X, Spratt H, Guo DC, Milewicz D, Tilton RG, Brasier AR. An adventitial IL-6/MCP1 amplification loop accelerates macrophage-mediated vascular inflammation leading to aortic dissection in mice. *J Clin Invest*. 2009; 119 (12): 3637-3651.

Viegas KAS, Lacchini S. Injúria Vascular e Reestenose. In: Bases Moleculares das Doenças Cardiovasculares – A integração entre a pesquisa e a prática Clínica. JE Krieger (Ed) Athene, 2008; 415-432.

World Health Organization (WHO). Integrated Management of Cardiovascular Risk. Report of a WHO Meeting, Geneva, 9–12 July 2002. Non-communicable Diseases and Mental Health Publication. Geneva. WHO 2002.

World Health Organization (WHO). World Health Statistics 2009. Geneva: World Health Organization, 2009.

World Health Organization (WHO). World health statistics 2016: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. Geneva: World Health Organization, 2016.

Yanagitani Y, Rakugi H, Okamura A, Moriguchi K, Takiuchi S, Ohishi M, Suzuki K, Higaki J, Ogihara T. Angiotensin II type 1 receptormediated peroxide production in human macrophages. *Hypertension*. 1999; 33: 335–339.

Zhang X, Yin P, DI D, Luo G, Zheng L, Wei J, Zhang J, Shi Y, Zhang J, Xu N. IL-6 regulates MMP-10 expression via JAK2/STAT3 signaling pathway in a human lung adenocarcinoma cell line. *Anticancer Res*. 2009; 29 (11): 4497-501.

Zhao Y, Vanhoutte PM, Leung SWS. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *Journal of Pharmacological Sciences* xxx. 2015; 1-12.

ZHOU N, ZHANG Y, WANG T, HE J, HE H, HE L. The imperatorin derivative OW1, a new vasoactive compound, inhibits VSMC proliferation and extracellular matrix hyperplasia. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2015; 284: 125-133.