



ALISSON FERNANDES DOS SANTOS

INVESTIGAÇÃO DAS ALTERAÇÕES DO SISTEMA
RENINA-ANGIOTENSINA EM INDIVÍDUOS PORTADORES DE
ANEMIA FALCIFORME E EFEITOS DA TERAPIA
COM HIDROXIUREIA

CAMPINAS
2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

ALISSON FERNANDES DOS SANTOS

INVESTIGAÇÃO DAS ALTERAÇÕES DO SISTEMA
RENINA-ANGIOTENSINA EM INDIVÍDUOS PORTADORES DE
ANEMIA FALCIFORME E EFEITOS DA TERAPIA
COM HIDROXIUREIA

ORIENTAÇÃO: Profa. Dra. Nicola Amanda Conran Zorzetto

CO-ORIENTAÇÃO: Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP para obtenção de título de Doutor em Clínica Médica na área de concentração Clínica Médica.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA POR ALISSON
FERNANDES DOS SANTOS E ORIENTADO
PELA PROFA. DRA. NICOLA AMANDA
CONRAN ZORZETTO.

Assinatura da Orientadora

CAMPINAS
2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Santos, Alisson Fernandes dos, 1977-
Sa59i Investigação das alterações do sistema renina-angiotensina em indivíduos portadores de anemia falciforme e efeitos da terapia com hidroxiureia / Alisson Fernandes dos Santos. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Nicola Amanda Conran Zorzetto.
Coorientador: Fernando Ferreira Costa.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Sistema renina-angiotensina. 2. Angiotensina II. 3. Anemia falciforme. 4. Inflamação. 5. Receptores de angiotensina. I. Zorzetto, Nicola Amanda Conran. II. Costa, Fernando Ferreira, 1950-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Investigation of alterations of the renin-angiotensin system in sickle cell disease individuals and the effects of hydroxyurea

Palavras-chave em inglês:

Renin-angiotensin system

Angiotensin II

Sickle cell disease

Inflammation

Receptors, Angiotensin

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutor em Clínica Médica

Banca examinadora:

Nicola Amanda Conran Zorzetto [Orientador]

Kleber Yotsumoto Fertrin

Carmen Silvia Passos Lima

Rodolfo Delfini Cançado

Alessandra Gambero

Data de defesa: 08-08-2014

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

ALISSON FERNANDES DOS SANTOS

ORIENTADORA: PROF. DR. NICOLA AMANDA CONRAN ZORZETTO

COORIENTADOR: PROF. DR. FERNANDO FERREIRA COSTA

MEMBROS:

1. PROF. DR. NICOLA AMANDA CONRAN ZORZETTO



2. PROF. DR. KLEBER YOTSUMOTO FERTRIN



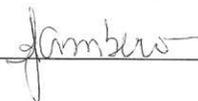
3. PROF. DR. CARMEN SILVIA PASSOS LIMA



4. PROF. DR. RODOLFO DELFINI CANÇADO



5. PROF. DR. ALESSANDRA GAMBERO



Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 08 de agosto de 2014

*“A alegria não chega apenas no encontro do achado,
mas faz parte do processo da busca.”*

Paulo Freire

Dedico a presente tese
à minha querida e adorável esposa Aline,
aos meus filhos, Sofia e Guilherme,
meus pais Antonio e Maria Aparecida,
meus irmãos, Alessandra e Victor!!!
Obrigado por tudo!!!
Amo vocês!!!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela companhia durante a caminhada, me auxiliando com Sua Mão Poderosa e me fazendo lembrar que TUDO É POSSÍVEL.

À minha amada esposa Aline pela compreensão e fé quando estive viajando sempre com coração apertado e vontade de voltar logo para casa e para seus braços! Muito obrigado pela paciência na caminhada!

Aos meus pimpolhos, Sofia e Guilherme, pela obediência e colaboração com a mãe quando estive ausente. Vocês são muito importantes para nós e me encorajam a prosseguir na luta.

Aos meus pais, Maria Aparecida e Antonio, pela oração e fé invocando a proteção e esperança na realização dos experimentos. Também agradeço pelas palavras importantes no decorrer da vida mostrando que tudo é possível quando há vontade. Muito obrigado!!!

Agradeço à Dra. Nicola Conran e ao Dr. Fernando Ferreira Costa por me acolherem no laboratório possibilitando a conquista deste título privilegiado. Apesar da distância, foi possível estreitar a amizade e concluir o trabalho.

Agradeço a toda equipe do laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Campinas pelo auxílio durante os experimentos. São muitos e trarei sempre na lembrança.

Agradeço aos meus colegas de trabalho do Hospital de Clínicas/UFPR e HEMEPAR pela paciência quando precisei me ausentar no laboratório para a realização dos experimentos.

Agradeço aos amigos especiais, Shirley e Moacir, pelo companheirismo, conforto, pela amizade e segurança durante a minha estadia em Campinas.

Agradeço à equipe médica e aos indivíduos portadores de anemia falciforme do HEMEPAR, HU-UDEL e Hemocentro de Campinas por permitirem a coleta do material, contribuindo para novas descobertas.

RESUMO

A anemia falciforme (AF) é uma doença genética causada pela substituição de um ácido glutâmico por uma valina na posição 6 da cadeia globina β . A mutação de ponto origina a hemoglobina S (HbS), que sob condições de deoxigenação se polimeriza tornando os eritrócitos mais propensos à falcização. A fisiopatologia da AF resulta em processos recorrentes de vaso-oclusão e hemólise, causando numerosas complicações clínicas, incluindo a danificação dos rins e problemas cardiovasculares. A angiotensina II (Ang II), um peptídeo vasoconstritor derivado do sistema renina-angiotensina (SRA), controla a pressão arterial e o equilíbrio dos fluidos. A Ang II também participa na geração de espécies reativas de oxigênio, diminuindo a biodisponibilidade do óxido nítrico (NO), um gás vasodilatador, podendo contribuir para alterações no endotélio. A hidroxiureia (HU), agente quimioterápico importante no tratamento dos indivíduos portadores de AF, exerce seu efeito benéfico por meio do aumento de hemoglobina fetal (HbF), reduzindo a falcização dos eritrócitos, diminuindo o número de leucócitos, além de possuir a capacidade de gerar NO. O objetivo deste estudo foi verificar se a produção e expressão das proteínas do SRA estão alteradas na AF e os efeitos da terapia com HU nestes parâmetros. Para analisar a atividade do SRA na AF e um possível papel para a Ang II no processo inflamatório, foram quantificadas as concentrações plasmáticas de Ang II, enzima conversora de angiotensina (ACE), molécula de adesão vascular-1, molécula de adesão intercelular-1, endotelina-1 (ET-1), metabólitos de NO, guanosina monofosfato cíclico (GMPc), interleucina-6, interleucina-8, fator de necrose tumoral- α e inibidor do ativador do plasminogênio-1 nas amostras de sangue dos indivíduos portadores de AF e indivíduos sadios controles. A produção de Ang II e expressão de algumas proteínas do SRA também foram estudadas em um modelo animal de AF. Adicionalmente, camundongos com AF foram tratados com a HU (50 e 75 mg/kg/dia) por 4 semanas. Não foram encontradas diferenças significativas nos níveis plasmáticos de Ang II nos indivíduos portadores de AF e indivíduos controles, porém a Ang II

mostrou correlação positiva com níveis plasmáticos de HbF e ET-1. Uma correlação negativa entre níveis da Ang II e GMPc também foi encontrada no plasma. As concentrações plasmáticas de ACE foram encontradas significativamente menores em indivíduos portadores de AF em comparação aos indivíduos controle. Em camundongos com AF, as concentrações plasmáticas de Ang II estão significativamente diminuídas quando comparadas aos camundongos controles. O tratamento de camundongos AF com HU (75 mg/kg/dia) aumentou significativamente os níveis de Ang II. Diferenças significativas nas expressões dos genes *AT1R* e *ACE1* (que codificam o receptor de angiotensina II tipo 1 e a enzima ACE, respectivamente) foram detectadas em camundongos com AF sem tratamento de HU quando comparados aos camundongos controles, sendo que as expressões dos genes foram menores nos rins e maiores no fígado. Os dados obtidos no estudo sugerem que pode haver alterações no SRA em indivíduos portadores de AF, apesar de não encontrar associações entre alterações em Ang II com parâmetros inflamatórios. Futuros estudos poderiam indicar se alterações na expressão das proteínas do SRA contribuem para algumas manifestações da AF ou refletem danos teciduais nestes indivíduos.

ABSTRACT

Sickle cell disease (SCD) is caused by a point mutation that results in the substitution of glutamic acid for valine at the sixth position of the β -globin chain, leading to the production of hemoglobin S (HbS). HbS polymerizes under conditions of low oxygen concentration, causing the erythrocyte to adopt a sickled shape. The pathophysiology of SCD results in recurrent vaso-occlusion and hemolysis, causing clinical complications, including kidney damage and cardiovascular problems. Angiotensin II (Ang II), a peptide and vasoconstrictor derived from the action of the renin-angiotensin system (RAS), controls blood pressure and fluid balance. Ang II also participates in the generation of reactive oxygen species, decreasing the bioavailability of the vasodilatory gas nitric oxide (NO), and potentially causing endothelial alterations. Hydroxyurea (HU), an important chemotherapeutic drug employed in the treatment of SCD, has numerous benefits that include augmentation of fetal hemoglobin, reduction of erythrocyte sickling and decreased leukocyte numbers; furthermore, HU also generates NO in vivo. The aim of this study was to investigate whether the production and expression of proteins of the RAS are altered in SCD and the effects of HU therapy on these parameters. To analyse alterations in Ang II and possible associations with inflammatory processes in sickle cell anemia (SCA), the following were quantified in the plasma of SCA patients on and off HU and in healthy control individuals; Ang II, angiotensin converting enzyme (ACE), vascular adhesion molecule-1, intercellular adhesion molecule-1 and endothelin-1 (ET-1), NO metabolites, cyclic guanylate monophosphate (cGMP), interleucins-6, interleucins-8, tumor necrosis factor- α and plasminogen activator inhibitor-1. The production of Ang II and the expressions of some RAS proteins were also studied in an animal model of SCD. In addition, SCD mice were treated, or not, with hydroxyurea (50 and 75 mg/kg/day) for 4 weeks. Plasma levels of Ang II of SCA patients did not differ from those of controls; however, Ang II demonstrated positive correlations with fetal hemoglobin and ET-1; and a negative correlation with

plasma cGMP. Plasma levels of ACE were significantly lower in SCA individuals compared with control individuals. In SCD mice, plasma levels of Ang II were significantly decreased when compared to control mice. Treatment with HU (75 mg/kg/day) in the SCD mice increased levels of Ang II significantly. Significant differences in the gene expressions of *AT1R* and *ACE1* (encoding the angiotensin II receptor type 1 and ACE) were detected in SCD mice not treated with HU, when compared to control mice, where these gene expressions were lower in the kidneys and higher in the liver. These results suggest that some alterations in the RAS may occur in SCD individuals. Although we found no association between plasma Ang II levels with inflammatory parameters in patients, further studies should indicate whether alterations in the RAS may contribute to some of the manifestations of SCD or reflect tissue damage in these individuals.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACE	Enzima conversora de angiotensina
<i>ACE1</i>	Gene da proteína da enzima conversora de angiotensina 1
ACE1	Enzima conversora de angiotensina 1
<i>ACE2</i>	Gene da proteína da enzima conversora de angiotensina 2
ACE2	Enzima conversora de angiotensina 2
AF	Anemia falciforme
<i>ACTB</i>	Gene que codifica a proteína β -actina
AGT	Angiotensinogênio
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
Ang IV	Angiotensina IV
Ang (1-7)	Angiotensina (1-7)
Ang (1-9)	Angiotensina (1-9)
<i>AT1R</i>	Gene da proteína do receptor de angiotensina II tipo 1
AT1R	Receptor de angiotensina II tipo 1
<i>AT2R</i>	Gene da proteína do receptor de angiotensina II tipo 2
AT2R	Receptor de angiotensina II tipo 2
AT4R	Receptor de angiotensina tipo 4
AVC	Acidente vascular cerebral
BAC	β -actina
BERK	Camundongos Berkeley homozigotos
CAF	Camundongos quimeras de anemia falciforme
CAF50	Camundongos quimeras de anemia falciforme com tratamento de HU em 50 mg/kg/dia
CAF75	Camundongos quimeras de anemia falciforme com tratamento de HU em 75 mg/kg/dia
CCON	Controles - camundongos C57BL/6
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média

CON	Controles – indivíduos saudáveis
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> (imunoensaio enzimático)
EPO	Eritropoietina
ET-1	Endotelina-1
FDA	<i>US Food and Drug Administration</i>
Glu	Ácido glutâmico
GM-CSF	Fator estimulante de colônias de macrófagos-granulócitos
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
HbA	Hemoglobina A
HbA ₂	Hemoglobina A2
HbF	Hemoglobina Fetal
HbS	Hemoglobina S
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
HU	Hidroxiureia
HUVEC	Células endoteliais de veia umbilical humana
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
MCP-1	Proteína quimiotática de monócito-1
M-CSF	Fator estimulante de colônias de macrófagos
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
NF-κB	Fator de transcrição nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintetase
PAI-1	Inibidor do ativador do plasminogênio-1
RNA	Ácido ribonucleico

ROS	Espécies reativas de oxigênio
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativo
sICAM-1	Molécula de adesão Intercelular-1 solúvel
SRA	Sistema renina-angiotensina
SS	Indivíduos portadores de anemia falciforme
SSHU	Indivíduos portadores de anemia falciforme com uso de HU
sVCAM-1	Molécula de adesão vascular-1 solúvel
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
TEMED	Tetrametiletilenodiamino
USP	Universidade de São Paulo
Val	Valina
VCAM-1	Molécula de adesão vascular-1
VCM	Volume corpuscular médio

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Sequência dos primers e tamanho do fragmento amplificado dos genes dos receptores de angiotensina II (<i>AT1R</i> e <i>AT2R</i>) e das enzimas conversoras de angiotensina (<i>ACE1</i> e <i>ACE2</i>)	69
TABELA 2. Resultado da eficiência dos receptores de angiotensina II (<i>AT1R</i> e <i>AT2R</i>) e enzimas conversoras de angiotensina (<i>ACE1</i> e <i>ACE2</i>)	70
TABELA 3. Perfil clínico e dados hematológicos das amostras coletadas para a realização da pesquisa	76
TABELA 4. Correlações de níveis plasmáticos de Ang II com os parâmetros hematológicos em indivíduos controles e indivíduos portadores de AF	88
TABELA 5. Correlações de níveis plasmáticos de Ang II com ACE, sVCAM-1 e sICAM-1	90
TABELA 6. Correlações de níveis plasmáticos de Ang II COM IL-6, IL-8 e TNF- α	91
TABELA 7. Correlações de níveis plasmáticos de Ang II com PAI-1, ET-1, NO e GMPc	92
TABELA 8. Correlações de níveis plasmáticos de ACE com os parâmetros hematológicos	94
TABELA 9. Correlações de níveis plasmáticos de ACE com sVCAM-1, sICAM e TNF- α	95
TABELA 10. Correlações de níveis plasmáticos de ACE com IL-6, IL-8 e ET-1	95
TABELA 11. Correlações de níveis plasmáticos de ACE com PAI-1, NO e GMPc.....	96
TABELA 12. Valores médios de expressão gênica dos receptores de angiotensina II, <i>AT1R</i> e <i>AT2R</i> , e enzimas conversoras de angiotensina, <i>ACE1</i> e <i>ACE2</i> nos tecidos: rim, coração, cérebro e fígado em camundongos controles e camundongos Berkeley homozigotos.....	104
TABELA 13. Dados hematológicos dos camundongos controles C57BL/6 e camundongos quimeras com ou sem tratamento de HU	109
TABELA 14. Valores médios de expressão gênica de <i>AT1R</i> , <i>AT2R</i> , <i>ACE1</i> e <i>ACE2</i> nos tecidos: rim, coração, cérebro, pulmão e fígado em camundongos controles e camundongos quimeras de AF	119

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Fisiopatologia básica da anemia falciforme	34
FIGURA 2. Etapas de vaso-oclusão na doença falciforme	36
FIGURA 3. Mecanismo de ação e os efeitos benéficos do uso de hidroxiureia para AF	39
FIGURA 4. Produção dos derivados metabólitos do SRA e as enzimas conversoras de angiotensina	41
FIGURA 5. Esquema da interação de Ang II em receptores AT1R/AT2R e Ang IV em receptor AT4R	44
FIGURA 6. Papel de Ang II no desenvolvimento e progressão de aterosclerose	47
FIGURA 7. Concentração de Ang II no plasma de indivíduos controles (CON, n=41), indivíduos portadores de AF sem (SS, n=28) e com (SSHU, n=32) tratamento de HU	77
FIGURA 8. Concentração de ACE no plasma de indivíduos controles (CON, n=32) e indivíduos portadores de AF sem (SS, n=18) e com (SSHU, n=17) tratamento de HU	78
FIGURA 9. Concentração de sVCAM-1 no plasma de indivíduos controles (CON, n=32), indivíduos portadores de AF sem (SS, n=18) e com (SSHU, n=17) tratamento de HU	79
FIGURA 10. Concentração de sICAM-1 no plasma de indivíduos controles (CON, n=32), indivíduos portadores de AF sem (SS, n=16) e com (SSHU, n=17) tratamento de HU	80
FIGURA 11. Concentração de ET-1 no plasma de indivíduos controles (CON, n=32), indivíduos portadores de AF sem (SS, n=17) e com (SSHU, n=21) tratamento de HU	81
FIGURA 12. Determinação de níveis de metabólitos de NO no plasma em indivíduos controles (CON, n=26), indivíduos portadores de AF sem (SS, n=21) e com (SSHU, n=22) tratamento de HU	82
FIGURA 13. Concentração de GMPc no plasma de indivíduos controles (CON, n=26), indivíduos portadores de AF sem (SS, n=22) e com (SSHU, n=22) tratamento de HU	83
FIGURA 14. Concentração de IL-6 no plasma de indivíduos controles (CON, n=32), indivíduos portadores de AF sem (SS, n=22) e com (SSHU, n=21) tratamento de HU	84
FIGURA 15. Concentração de IL-8 no plasma de indivíduos controles (CON, n=31), indivíduos portadores de AF sem (SS, n=18) e com (SSHU, n=18) tratamento de HU	85
FIGURA 16. Concentração de PAI-1 no plasma de indivíduos controles (CON, n=32), indivíduos portadores de AF sem (SS, n=18) e com (SSHU, n=19) tratamento de HU	86

FIGURA 17. Concentração de TNF- α no plasma de indivíduos controles (CON, n=30), indivíduos portadores de AF sem (SS, n=18) e com (SSHU, n=19) tratamento de HU.....	87
FIGURA 18. Correlação de níveis plasmáticos de Ang II com HbF nos indivíduos portadores de AF com uso de HU (n=19)	89
FIGURA 19. Correlação positiva de Ang II com ET-1 (A) nos indivíduos portadores de AF com uso de HU (n=20). Correlação negativa de Ang II com GMPc (B) nos indivíduos portadores de AF sem uso de HU (n=19) ..	93
FIGURA 20. Concentração de Ang II no plasma dos camundongos controles C57BL/6 (CCON, n=10) e Berkeley homozigotos (BERK, n=9) .	97
Figura 21. Expressão gênica do <i>AT1R</i> nos tecidos: (A) rim, camundongos controles C57BL/6 (CCON, n=8) e camundongos Berkeley homozigotos (BERK, n=9); (B) coração, camundongos controles C57BL/6 (CCON, n=9) e camundongos Berkeley homozigotos (BERK, n=8); (C) cérebro, camundongos controles C57BL/6 (CCON, n=5) e camundongos Berkeley homozigotos (BERK, n=5); (D) fígado, camundongos controles C57BL/6 (CCON, n=5) e camundongos Berkeley homozigotos (BERK, n=6)	99
Figura 22. Expressão gênica do <i>AT2R</i> nos tecidos: (A) rim, camundongos controles C57BL/6 (CCON, n=8) e camundongos Berkeley homozigotos (BERK, n=9); (B) coração, camundongos controles C57BL/6 (CCON, n=9) e camundongos Berkeley homozigotos (BERK, n=4); (C) cérebro, camundongos controles C57BL/6 (CCON, n=5) e camundongos Berkeley homozigotos (BERK, n=5); (D) fígado, camundongos controles C57BL/6 (CCON, n=3) e camundongos Berkeley homozigotos (BERK, n=5)	100
Figura 23. Expressão gênica da <i>ACE1</i> nos tecidos: (A) rim, camundongos controles C57BL/6 (CCON, n=8) e camundongos Berkeley homozigotos (BERK, n=9); (B) coração, camundongos controles C57BL/6 (CCON, n=9) e camundongos Berkeley homozigotos (BERK, n=8); (C) cérebro, camundongos controles C57BL/6 (CCON, n=5) e camundongos Berkeley homozigotos (BERK, n=5); (D) fígado, camundongos controles C57BL/6 (CCON, n=5) e camundongos Berkeley homozigotos (BERK, n=6)	102
Figura 24. Expressão gênica da <i>ACE2</i> nos tecidos: (A) rim, camundongos controles C57BL/6 (CCON, n=8) e camundongos Berkeley homozigotos (BERK, n=9); (B) coração, camundongo controles C57BL/6 (CCON, n=9) e camundongos Berkeley homozigotos (BERK, n=8); (C) cérebro, camundongos controles C57BL/6 (CCON, n=5) e camundongos Berkeley homozigotos (BERK, n=5); (D) fígado, camundongos controles C57BL/6 (CCON, n=5) e camundongos Berkeley homozigotos (BERK, n=6)	103

FIGURA 25. Contagens de leucócitos (A), eritrócitos (B) e plaquetas (C) nos camundongos controles C57BL/6 (CCON, n=5), camundongos quimeras de AF sem tratamento (CAF, n=5) e camundongos quimeras de AF com tratamento de HU (CAF50, 50 mg/kg/dia, n=5 e CAF75, 75 mg/kg/dia, n=4)	106
FIGURA 26. Quantificação de hemoglobina (A) e dos índices hematimétricos, VCM (B), HCM (C) e CHCM (D) nos camundongos controles C57BL/6 (CCON, n=5), camundongos quimeras de AF sem tratamento (CAF, n=5) e camundongos quimeras de AF com tratamento de HU (CAF50, 50 mg/kg/dia, n=5 e CAF75, 75 mg/kg/dia, n=4)	108
FIGURA 27. Concentração de Ang II no plasma de camundongos controles C57BL/6 (CCON, n=5), camundongos quimeras de AF sem tratamento de HU (CAF, n=5), camundongos quimeras de AF com tratamento de HU nas duas concentrações de 50 mg/kg/dia (CAF50, n=5) e 75 mg/kg/dia (CAF75, n=4)	110
FIGURA 28. Expressão gênica do <i>AT1R</i> nos tecidos: (A) Rim; (B) Coração; (C) Cérebro; (D) Pulmão; (E) Baço; (F) Fígado. Amostras obtidas dos camundongos controles C57BL/6 (CCON, n=5), camundongos quimeras de AF sem tratamento (CAF, n=5) e camundongos quimeras de AF com tratamento de HU (CAF50, 50 mg/kg/dia, n=5 e CAF75, 75 mg/kg/dia, n=4) por 4 semanas	112
FIGURA 29. Expressão gênica do <i>AT2R</i> nos tecidos: (A) Rim; (B) Coração; (C) Cérebro; (D) Pulmão; (E) Baço; (F) Fígado. Amostras obtidas dos camundongos controles C57BL/6 (CCON, n=5), camundongos quimeras de AF sem tratamento (CAF, n=5) e camundongos quimeras de AF com tratamento de HU (CAF50, 50 mg/kg/dia, n=5 e CAF75, 75 mg/kg/dia, n=4) por 4 semanas	114
FIGURA 30. Expressão gênica da <i>ACE1</i> nos tecidos: (A) Rim; (B) Coração; (C) Cérebro; (D) Pulmão; (E) Baço; (F) Fígado. Amostras obtidas dos camundongos controles C57BL/6 (CCON, n=5), camundongos quimeras de AF sem tratamento (CAF, n=5) e camundongos quimeras de AF com tratamento de HU (CAF50, 50 mg/kg/dia, n=5 e CAF75, 75 mg/kg/dia, n=4) por 4 semanas	116
FIGURA 31. Expressão gênica da <i>ACE2</i> nos tecidos: (A) Rim; (B) Coração; (C) Cérebro; (D) Pulmão; (E) Baço; (F) Fígado. Amostras obtidas dos camundongos controles C57BL/6 (CCON, n=5), camundongos quimeras de AF sem tratamento (CAF, n=5) e camundongos quimeras de AF com tratamento de HU (CAF50, 50 mg/kg/dia, n=5 e CAF75, 75 mg/kg/dia, n=4) por 4 semanas	118

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
LISTA DE ABREVIATURAS	xvii
LISTA DE TABELAS	xxi
LISTA DE FIGURAS	xxiii
1. INTRODUÇÃO	31
1.1. Anemia falciforme	33
1.1.1. Manifestações clínicas das doenças falciformes	34
1.1.2. Processo de vaso-oclusão	35
1.1.3. O endotélio e a inflamação na doença falciforme	36
1.1.4. Óxido nítrico	37
1.1.5. Hemoglobina fetal	38
1.1.6. Hidroxiureia	38
1.2. Sistema renina-angiotensina	40
1.2.1. Angiotensinogênio	40
1.2.2. Enzima conversora de angiotensina	41
1.2.3. Angiotensina II	42
1.2.4. Receptores de Angiotensina II	43
1.2.5. Metabolismo de Angiotensina II	45
1.2.6. Outros peptídeos derivados de Angiotensina II	46
1.2.7. Angiotensina II e as células endoteliais	46
2. JUSTIFICATIVA	49
3. OBJETIVOS	53
3.1. Objetivo principal	55
3.2. Objetivos secundários	55
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS	57
4.1. SUJEITOS	59
4.2. MÉTODOS	60
4.2.1. Humanos	60
4.2.1.1. Coleta de sangue	60
4.2.1.2. Determinação de concentração plasmática de Ang II	60
4.2.1.3. Determinação das concentrações plasmáticas de ACE, sICAM-1, sVCAM-1, IL-6, IL-8, TNF- α e PAI-1	61
4.2.1.4. Determinação da concentração plasmática de NO, GMPc e Endotelina-1	62
4.2.2. Modelo animal de anemia falciforme	62
4.2.2.1. Animais transgênicos AF Berkeley	63
4.2.2.2. Animais quimeras de AF	63
4.2.2.3. Coleta de sangue dos camundongos	65
4.2.2.4. Determinação de concentração de Ang II plasmática de camundongos	66

4.2.2.5.	RT-qPCR de tecidos de camundongos	66
4.2.2.5.1.	Extração de RNA	66
4.2.2.5.2.	Síntese de cDNA	67
4.2.2.5.3.	PCR em tempo real (RT-qPCR)	68
4.2.2.5.4.	Primers	69
4.2.2.5.4.1.	Definição da concentração ideal de primer	69
4.2.2.5.4.2.	Eficiência da reação	70
4.3.	Análise estatística dos resultados obtidos	70
5.	RESULTADOS	73
5.1.	Experimentos com amostras de indivíduos portadores de AF ..	75
5.1.1.	Parâmetros hematológicos e demográficos em indivíduos controles e indivíduos portadores de AF	75
5.1.2.	Quantificação de níveis plasmáticos de Ang II em indivíduos controles e indivíduos portadores de AF com e sem tratamento de HU	77
5.1.3.	Quantificação de níveis plasmáticos de ACE em indivíduos controles e indivíduos portadores de AF com e sem tratamento de HU	78
5.1.4.	Quantificação de níveis de marcadores de ativação endotelial em indivíduos controles e portadores de AF com e sem tratamento de HU	79
5.1.4.1.	Molécula de adesão vascular-1 solúvel (sVCAM-1)	79
5.1.4.2.	Molécula de adesão intercelular solúvel (sICAM-1)	80
5.1.4.3.	Endotelina-1 (ET-1)	81
5.1.5.	Quantificação de níveis de metabólitos de óxido nítrico e guanosina monofosfato cíclico no plasma de indivíduos controles e indivíduos portadores de AF com e sem tratamento de HU	82
5.1.5.1.	Óxido nítrico (NO)	82
5.1.5.2.	Guanosina monofosfato cíclico (GMPc)	83
5.1.6.	Quantificação de níveis plasmáticos de interleucinas em indivíduos controles e indivíduos portadores de AF com e sem tratamento de HU	84
5.1.6.1.	Interleucina-6 (IL-6)	84
5.1.6.2.	Interleucina-8 (IL-8)	85
5.1.7.	Quantificação de níveis plasmáticos de PAI-1 em indivíduos controles e indivíduos portadores de AF com e sem tratamento de HU	86
5.1.8.	Quantificação de níveis plasmáticos de TNF- α em indivíduos controles e indivíduos portadores de AF com e sem tratamento de HU	87
5.2.	Correlações entre níveis plasmáticos de Ang II e os parâmetros hematológicos, marcadores de ativação endotelial e inflamação	88

5.3.	Correlações entre níveis plasmáticos de ACE e os parâmetros hematológicos, marcadores de ativação endotelial e inflamação	93
5.4.	Experimentos com amostras de camundongos	97
5.4.1.	Comparação de níveis plasmáticos de Ang II em camundongos controles (C57BL/6) e camundongos Berkeley homozigotos	97
5.4.2.	Expressão de genes relacionados ao sistema renina-angiotensina em camundongos controles (C57BL/6) e camundongos Berkeley homozigotos	98
5.5.	Efeito do tratamento com HU nos níveis plasmáticos de Ang II em camundongos controles (C57BL/6) e camundongos quimeras de AF	104
5.5.1.	Efeito de HU nos parâmetros hematológicos de camundongos controles (C57BL/6) e camundongos quimeras de AF	105
5.5.2.	Efeito de HU nos níveis plasmáticos de Ang II em camundongos controles (C57BL/6) e camundongos quimeras de AF	110
5.5.3.	Efeito da HU na expressão de genes relacionados ao sistema renina-angiotensina em camundongos controles (C57BL/6) e camundongos quimeras de AF	111
6.	DISCUSSÃO	121
7.	CONCLUSÃO	133
8.	REFERÊNCIAS	137
	ANEXOS	149

1. INTRODUÇÃO

1.1. ANEMIA FALCIFORME

A anemia falciforme é uma doença causada por uma mutação, onde há substituição de um ácido glutâmico por uma valina na sexta posição da cadeia globina β (β^6 Glu \rightarrow Val), originando hemoglobina S (HbS), que é sujeita à polimerização sob condições desoxigenadas, podendo levar a falcização das hemácias (FIGURA 1). As alterações nas hemácias resultam na adesão dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas à parede vascular, causando um fenômeno vaso-oclusivo e infarto nos órgãos alvos (STEINBERG, 1999). Estruturalmente, o ácido glutâmico é uma molécula polar e hidrofílica, enquanto a valina é apolar e fortemente hidrofóbica. Por este motivo, no estado desoxigenado, as moléculas de HbS sofrem alteração na configuração estrutural e expõem os resíduos hidrofóbicos que são rapidamente associados com regiões hidrofóbicas dentro do compartimento aquoso da célula. A polimerização leva à destruição dos eritrócitos ocasionando danos às membranas e aos citoesqueletos das células vermelhas (BARABINO et al., 2010).

A doença falciforme é classificada em dois tipos: anemia falciforme, caracterizada em estado homozigoto SS; e a doença heterozigótica dupla, no qual a hemoglobina S combina-se com outro defeito na hemoglobina, por exemplo, hemoglobina C, D e β -talassemia, resultando em hemoglobinopatia SC, hemoglobinopatia SD e hemoglobinopatia S β -talassemia (WEATHERALL et al., 2006). Estima-se que 4% da população brasileira tenha o traço falciforme (heterozigose simples) e que 25.000 a 50.000 pessoas tenham a doença em estado homozigótico ou na condição de heterozigotos compostos (CANÇADO & JESUS, 2007).

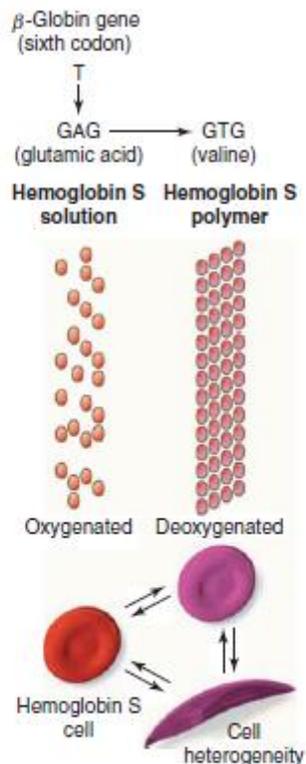


FIGURA 1. Fisiopatologia básica da anemia falciforme. β -globin gene (cadeia globina beta); Sixth codon (sexta posição do códon); Valine (valina); HbS solution (hemoglobina S solúvel); HbS polymer (polímero de hemoglobina S); Oxygenated (oxigenada); Deoxygenated (deoxigenada); HbS cell (célula com hemoglobina S); Cell heterogeneity (heterogeneidade celular). Figura adaptada de STEINBERG, 2006.

1.1.1. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DAS DOENÇAS FALCIFORMES

As doenças falciformes se manifestam quando a síntese de cadeia γ globina, com conseqüente produção de hemoglobina tipo fetal, HbF, visto no nascimento, é substituída pela síntese da cadeia β globina e, como conseqüência, há aumento de produção da hemoglobina anormal, HbS. A presença dessa hemoglobina traz complicações clínicas que permanecem por toda a vida do indivíduo falciforme. As manifestações precoces são dactilite e morte prematura resultante nas síndromes agudas e funcionamento anormal do baço, que leva a hiperesplenismo pelo sequestro dos eritrócitos falcizados (SERJEANT, 2013). É

comum a presença de acidente vascular cerebral (AVC) em crianças menores de 4 anos (WARE et al., 1999).

Adultos com AF podem desenvolver várias manifestações clínicas, tais como infecção, infarto dos órgãos, embolia e complicação pulmonar. Também há manifestações tardias como enurese noturna, dores ósseas, necrose femural, ulceração nas pernas e priapismo devido à vaso-oclusão (SERJEANT, 2013). Ainda podem apresentar síndrome torácica aguda, conhecida como “*acute chest syndrome*”, tais como tromboembolismo, embolia pulmonar gordurosa e pneumonia descompensada, pelo aumento da viscosidade do sangue, dificultando a sua circulação (ROSSE et al., 2000).

1.1.2. PROCESSO DE VASO-OCCLUSÃO

A AF é caracterizada pela recorrência de episódios dolorosos e lesões de órgãos resultantes da oclusão microvascular. A adesão de células vermelhas ao endotélio vascular leva a sua ativação, estimulando o recrutamento e adesão dos leucócitos ao endotélio, tendo como resultado o impedimento do fluxo sanguíneo nos vasos (FRENETTE, 2002).

O processo de vaso-oclusão (FIGURA 2) é complexo e resultante das interações das células vermelhas falcizadas, leucócitos ativados, células endoteliais, plaquetas e proteínas plasmáticas. O fenômeno de vaso-oclusão em indivíduos portadores de AF é resultante da inflamação crônica, diminuição do óxido nítrico (NO) e estresse oxidativo (CONRAN et al., 2009). A interação dos eritrócitos falcizados com as células endoteliais resultam na ativação da produção e expressão dos mediadores de inflamação como a endotelina-1 (ET-1), um vasoconstritor e agonista pró-inflamatório; e do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B), que contribui para o aumento na expressão das moléculas de adesão endoteliais, como a E-selectina, molécula de adesão celular vascular tipo 1 (VCAM-1) e molécula de adesão intercelular tipo 1 (ICAM-1) na superfície das células endoteliais ativadas (CHIANG et al., 2005; CONRAN et al., 2004). A

interação dos complexos celulares estimula a produção de citocinas e quimiocinas, tais como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), fator estimulante de colônias de macrófagos-granulócitos (GM-CSF), interleucinas (IL-1, IL-3, IL-6, IL-8) e fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF) (LANARO et al., 2009; CONRAN et al., 2007). A interação entre as células eritrocitárias falcizadas, os leucócitos e possivelmente as plaquetas nas células endoteliais resultam na obstrução prolongada nas pequenas vênulas sanguíneas ocasionando isquemia e dor local (WUN et al., 1999).

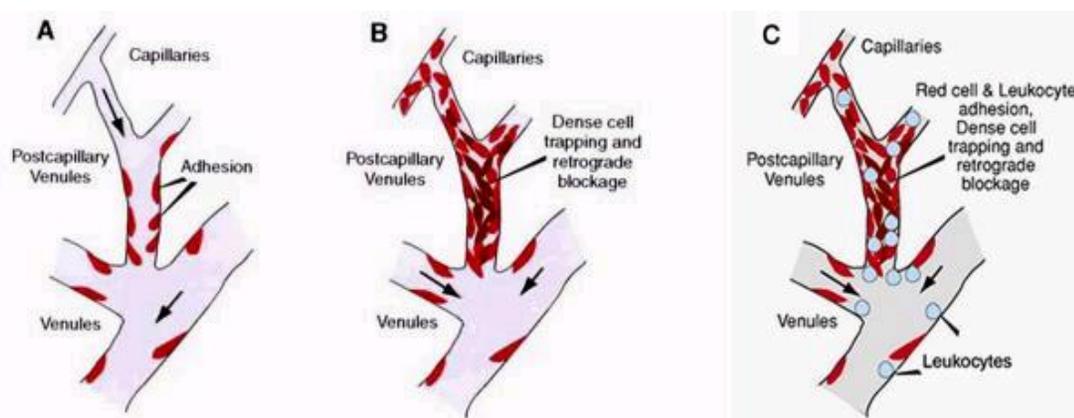


FIGURA 2. Etapas de vaso-oclusão na doença falciforme. (A) Adesão inicial das células vermelhas falcizadas em vênulas de pequeno diâmetro. (B) Adesão das células falciformes é seguida por captura seletiva das células vermelhas densas ou foices entre eritrócitos aderentes. (C) O recrutamento de leucócitos em vênulas inflamadas pode desencadear aprisionamento seletivo das células falcizadas. *Capillaries* (capilares); *Postcapillary Venules* (capilar venoso); *Adhesion* (adesão); *Venules* (vênulas); *Dense cell trapping and retrograde blockage* (células densas fixando e bloqueando); *Red cell & Leukocyte adhesion* (adesão de células vermelhas e leucócitos); *Leukocytes* (leucócitos). Adaptado de KAUL et al. (2009).

1.1.3. O ENDOTÉLIO E A INFLAMAÇÃO NA DOENÇA FALCIFORME

As células endoteliais estruturais e funcionais são importantes para a manutenção do tônus vascular. Sendo uma estrutura semipermeável, o endotélio permite e regula o transporte de moléculas. O equilíbrio da produção endotelial de vasodilatadores, por exemplo, NO; e vasoconstritores, como a ET-1 e prostaglandinas, é importante para a manutenção de homeostase, a qual regula a

trombose, trombólise e aderência das plaquetas; no caso de desequilíbrio, há aterosclerose, hipertensão, hipertensão pulmonar, sepse e síndromes inflamatórias, conhecidas como injúria endotelial (GALLEY & WEBSTER, 2004). Estão presentes nos endotélios os receptores de adesão de células sanguíneas e moléculas de inflamação (HEBBEL et al., 2004).

1.1.4. ÓXIDO NÍTRICO

O óxido nítrico (NO) é um radical livre importante para a manutenção do tônus vascular. É sintetizado principalmente nas células endoteliais pela enzima óxido nítrico sintetase (NOS) a partir de arginina e oxigênio (WOOD et al., 2008). Possui ação vasodilatadora e, quando presente em baixa concentração, pode participar no processo vaso-oclusivo favorecendo a vasoconstrição e a adesão de células para a parede vascular (HSU et al., 2007; GLADWIN & VICHINSKY, 2008). O NO ativa a enzima guanilato ciclase, aumentando a produção do mensageiro secundário, guanosina monofosfato cíclico (GMPc), que por sua vez diminui os níveis de cálcio intracelular das células do músculo liso (FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980).

Na AF, a diminuição da biodisponibilidade do NO se deve à redução de L-arginina plasmática, pelo consumo de NO no vaso sanguíneo por espécies reativas de oxigênio e pela hemoglobina livre que é liberada durante o processo de hemólise. A L-arginina é um aminoácido e substrato para a produção de NO por NOS, sendo degradada pela enzima arginase. A arginase é encontrada em níveis elevados na AF devido ao maior número de eritrócitos jovens e a sua liberação pelas hemácias durante o processo de hemólise (MORRIS, 2006). A presença de hemoglobina livre decorrente da hemólise intravascular também eleva o consumo de NO e resulta na formação de metahemoglobina e nitrato. A biodisponibilidade baixa de NO na AF facilita a vasoconstrição, aumenta ativação plaquetária, a adesão das moléculas leucocitárias e ativa as células endoteliais

contribuindo de forma significativa para o processo de vaso-oclusão (KATO et al., 2007; CONRAN et al., 2009).

1.1.5. HEMOGLOBINA FETAL

As hemoglobinas funcionais (HbA, HbA₂ e HbF) são tetrâmeros de duas cadeias α -globinas e duas cadeias não- α -globinas. A hemoglobina fetal (HbF), constituída por duas cadeias α -globinas e duas cadeias γ -globinas ($\alpha_2\gamma_2$), tem predominância em eritrócitos de fetos e já cai para menos de 1% em eritrócitos de adultos. A concentração de HbF total em AF é variável e de modo significativo, onde altas concentrações desta hemoglobina podem inibir a polimerização das hemácias (ROSSE et al., 2000). A inibição de polimerização de HbS pela presença da maior produção da HbF requer a formação de formas assimétricas híbridas de HbS/HbF ($\alpha_2\delta\beta^S$) (BOOKCHIN et al., 1977). A HbF e cadeias de γ -globinas interferem na polimerização, visto que a baixa concentração de polímeros, já é suficiente para causar injúria nas células vermelhas, sendo um dos pré-requisitos da causa da doença falciforme (STEINBERG, 2002).

1.1.6. HIDROXIUREIA

A hidroxiureia (HU) é um agente quimioterápico que inibe a síntese de DNA pelo bloqueio da ação enzimática da ribonucleotidase redutase. É a única droga aprovada pela FDA (*US Food and Drug Administration*) para o tratamento da AF (STEINBERG, 1999). É um medicamento importante no tratamento, por aumentar a produção de HbF entre outros efeitos (DAVIES & GILMORE, 2003). Os efeitos favoráveis da terapia com HU na AF incluem: diminuição dos eritrócitos falcizados, aumento de NO e diminuição do número de leucócitos (CHARACHE et al., 1995). Além disso, a HU também eleva a concentração de hemoglobina total, reduz o número de complicações vaso-oclusivos (LIMA et al., 1997) e incidência de síndrome torácica aguda (STEINBERG, 2002; GLADWIN & RODGERS, 2000). A

reação de HU com oxihemoglobina, deoxihemoglobina e metahemoglobina favorece o aumento da produção de NO (PACELLI et al., 1996; KIM-SHAPIRO et al., 1999) (FIGURA 3).

O uso crônico de HU tem reduzido a frequência de internação e incidência de dores, síndrome torácica aguda e transfusão sanguínea (FERGUSON et al., 2002; MC GANN & WARE, 2011). Além disso, também reduziu a morbidade e mortalidade dos indivíduos portadores de AF (STEINBERG et al., 2003). No entanto, não são todos os pacientes que toleram ou demonstram resultado no tratamento com a HU (CHARACHE et al., 1995).

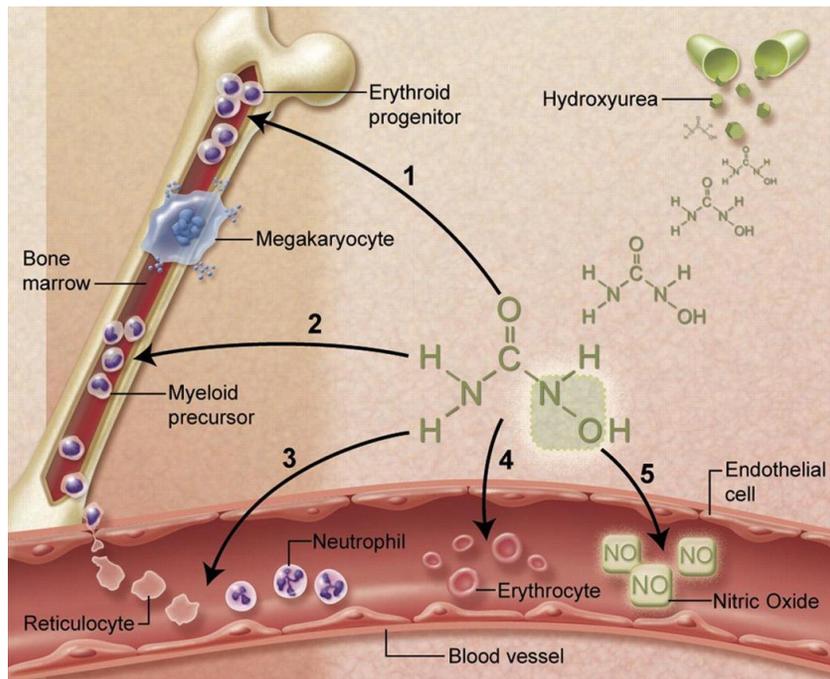


FIGURA 3. Mecanismo de ação e os efeitos benéficos do uso de hidroxiureia para AF. (1) Indução de hemoglobina fetal no compartimento eritrocitário. (2) Citotoxicidade na medula e diminuição do número de neutrófilos e reticulócitos. (3) Alteração da expressão de moléculas de adesão nos neutrófilos e reticulócitos circulantes, diminuindo a adesividade e dano às células endoteliais. (4) Macrocitose e aumento de hidratação diminuindo a hemólise e a formação do formato de foice. (5) Liberação de NO, resultando em vasodilatação. *Erythroid progenitor* (progenitor eritróide); *Hydroxyurea* (hidroxiureia); *Megakaryocyte* (megacariócitos); *Bone marrow* (medula óssea); *Myeloid precursor* (precursor mielóide); *Reticulocyte* (reticulócitos); *Neutrophil* (neutrófilos); *Erythrocyte* (eritrócitos); *Blood vessel* (vasos sanguíneos); *Endothelial cell* (células endoteliais); *Nitric oxide* (óxido nítrico). Figura adaptada de WARE (2010).

1.2. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA

O estudo do funcionamento do sistema de renina-angiotensina (SRA) foi iniciado no ano de 1898 por Tiegerstedt e colaboradores. Eles observaram a presença de um agente vasoconstritor que causava o aumento da pressão arterial no extrato de rim dos coelhos e denominaram-lhe de renina. Anos depois, duas equipes lideradas por Dr. Eduardo Braun-Menendez e Dr. Irvine H. Page, da Argentina e Estados Unidos, respectivamente, descobriram que a renina não era o agente causador de hipertensão, e sim o peptídeo resultante da ação da renina sobre a proteína plasmática. A angiotensina deriva-se da junção de dois nomes dados pelas duas equipes, hipertensina, dado na Argentina e, angiotonina, nos Estados Unidos (SKRBIC & IGIC, 2009).

O SRA é importante para a manutenção do complexo hemodinâmico, com a regulação do volume do fluido extracelular, balanceamento do sódio e efeitos cardíacos e vasculares. Quando o sistema apresenta atividade elevada, há efeitos ateroscleróticos, como hipertensão, hipertrofia nos órgãos; e eventos cardiovasculares, como o infarto, falhas cardiovasculares e esclerose nos rins (FERRARIO & STRAWN, 2006).

1.2.1. ANGIOTENSINOGENÍO

O angiotensinogênio (AGT) é um pró-hormônio e principal substrato para renina (FIGURA 4), no qual é clivado o amino-terminal da cadeia, originando um decapeptídeo inativo, a angiotensina I (Ang I). A maior fonte de AGT é de origem hepática, porém, em experimentos em camundongos transgênicos clonados com o gene de AGT humano, foi detectada a expressão de seu mRNA no rim e fígado, e em baixas concentrações no cérebro, glândula submandibular, coração, glândulas adrenais, tecido adiposo e ovários. Não foi detectado o mRNA nos seguintes órgãos: pulmão, testículos e baço (YANG et al., 1994).

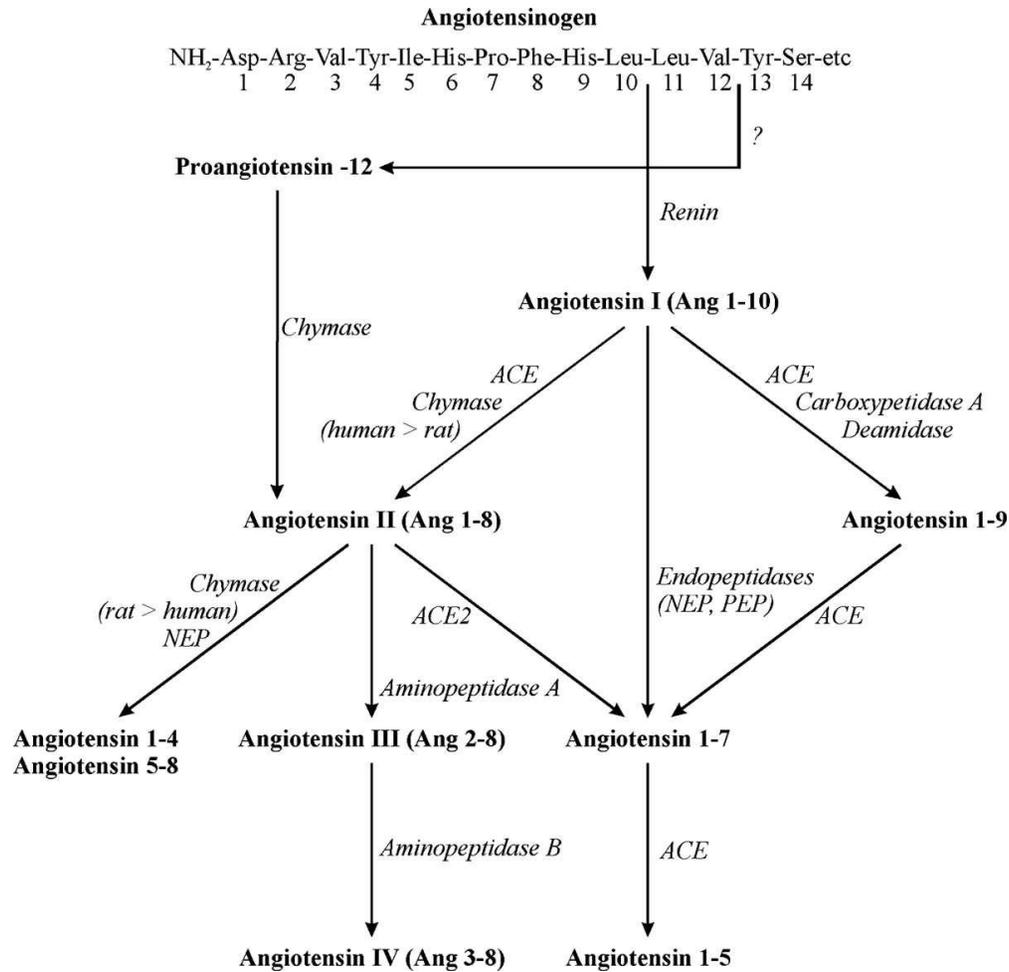


FIGURA 4. Produção dos derivados metabólitos do SRA e as enzimas conversoras de angiotensina. NEP (endopeptidase neutra); PEP (prolil-endopeptidase); Angiotensinogen (angiotensinogênio); Pro-angiotensin-12 (pró-angiotensina-12); Renin (renina); Chymase (quimase); Angiotensin I (angiotensina I); Human (humano); rat (rato); Carboxypeptidase A (carboxipeptidase A); Deamidase (deamidase); Angiotensin II (angiotensina II); Angiotensin 1-9 (angiotensina 1-9); Angiotensin 1-4 (angiotensina 1-4); Angiotensin 5-8 (angiotensina 5-8); Angiotensin III (angiotensina III); Angiotensin 1-7 (angiotensina 1-7); Angiotensin IV (angiotensina IV); Angiotensin 1-5 (angiotensina 1-5). Figura adaptada de SKRBIC & IGIC, 2009.

1.2.2. ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA

A enzima conversora de angiotensina (ACE) ou quininase é uma zinco metalopeptidase que catalisa a principal etapa da cascata do SRA, que é a conversão de Ang I em angiotensina II (Ang II) através da remoção do dipeptídeo do terminal C. Também degrada a bradicinina, um hormônio vasodilatador. A

enzima é encontrada em plasma e inúmeros tecidos, tais como, vasos sanguíneos, coração, rim, cérebro e glândula adrenal (LINZ et al., 1995; NASH, 1992; CORVOL et al., 1995).

Há duas isoformas de ACE: somática (sACE) e germinal (gACE). A diferença entre as duas é o número de sítios ativos: a gACE possui apenas um enquanto na sACE há dois sítios ativos (LANGFORD et al., 1991). A sACE é encontrada nas superfícies endoteliais, membranas renais, intestinais, placenta e plexo coróide. A forma germinal (gACE) é encontrada exclusivamente nos testículos, sendo responsável pela fertilidade (TURNER & HOOPER, 2002).

A ACE2, enzima conversora de angiotensina 2, também conhecida como enzima conversora de angiotensina homóloga (ACEH), difere da ACE pela especificidade e contém um domínio catalítico ativo. É expressa nas células endoteliais, coração, rins, testículos, hipotálamo e na parede da aorta. A sua função é exclusivamente de carboxipeptidase, onde atua na hidrólise dos aminoácidos no terminal C. A ACE2 hidrolisa Ang I e Ang II, mas é indiferente frente à bradicinina. Também cliva Ang I em Ang (1-9), um nonapeptídeo e converte diretamente a Ang II em Ang (1-7) (TURNER & HOOPER, 2002).

Os inibidores de ACE (captopril, enalapril e lisinopril) atuam inibindo a conversão de Ang I em Ang II, reduzindo o estresse oxidativo e inflamação causada por Ang II. A formação de bradicinina é favorecida, resultando num aumento do NO e prostaciclina, atuando como o anti-inflamatório, antitrombótico e ação vasodilatadora (DZAU, 2001). Os inibidores de ACE não inativam a ACE2 (TURNER & HOOPER, 2002).

1.2.3. ANGIOTENSINA II

Produto da ação da ACE sobre a Ang I, a Ang II é o principal hormônio do SRA. É um octapeptídeo ativo do SRA que atua estimulando a liberação de catecolaminas provenientes da medula adrenal e nervos simpáticos. Aumentando-se a sua atividade, estimula a sede e apetite, regula a homeostase de sódio e

água pela liberação de aldosterona no córtex adrenal (FERRARIO & FLACK, 1996). Além disso, também possui atividade nas células endoteliais, ação inflamatória, proliferativa, fibrótica e trombótica nos sistemas vasculares. Possui efeito potente no tônus vascular, constrição das células musculares lisas, regulação do crescimento de células vasculares, apoptose, produção de matriz metaloproteinase e degradação da matriz extracelular (YOO et al., 1998).

Além da ACE, a Ang II pode ser gerada pela quimase a partir de Ang I. A quimase só se torna ativa em casos de dano vascular, quando esta é liberada e permanece inativa no tecido vascular normal (FYHRQUIST & SAIOJONMAA, 2008).

O aumento da concentração de Ang II é uma das causas de hipertensão arterial, por ativar NADPH oxidase dentro dos vasos sanguíneos, rim e cérebro, elevando a geração de espécies reativas de oxigênio (GARRIDO & GRIENGLING, 2009), que por sua vez, ativa a NF-kB, que é conhecida por regular a expressão de genes responsáveis pela regulação de homeostase de sódio e controle de pressão arterial (BRASIER et al., 2000).

1.2.4. RECEPTORES DE ANGIOTENSINA II

Existem três subtipos de receptores de Ang II: tipo 1 (AT1R), tipo 2 (AT2R) e tipo 4 (AT4R). O receptor AT1R é composto de 359 aminoácidos, enquanto o AT2R tem 363 aminoácidos e com 30% de homologia no nível de aminoácidos ao receptor AT1R. Os genes dos receptores AT1R e AT2R são localizados no cromossomo 3 e X, respectivamente. Em animais roedores, há dois subtipos de receptores de AT1R: AT1R_A e AT1R_B, enquanto em humanos, há apenas a expressão do receptor AT1R. O receptor AT4R é composto por 1.025 aminoácidos (THOMAS & MENDELSON, 2003).

Os receptores AT1R são expressos em vasos sanguíneos (vasoconstrição), no córtex adrenal (liberação de aldosterona), fígado (metabolismo do glicogênio),

rim (retenção de água e sal), e cérebro (liberação de vasopressina, sede, apetite, regulação da pressão arterial). Os receptores AT2R são expressos nas células endoteliais, células musculares lisas vasculares e tecido fibroso cardíaco. O AT2R possui capacidade regenerativa e a sua expressão é aumentada em casos de isquemia cerebral e cicatrização de tecidos. Por último, o receptor AT4R, possui ampla distribuição, inclusive nas glândulas adrenais, rim, pulmão e coração (THOMAS & MENDELSON, 2003).

A Ang II atua em dois receptores AT1R e AT2R acoplados à proteína G. O efeito deletério de Ang II é causado pela atividade nos receptores AT1R, por outro lado, nos receptores AT2R, os efeitos são benéficos (TURNER & HOOPER, 2002).

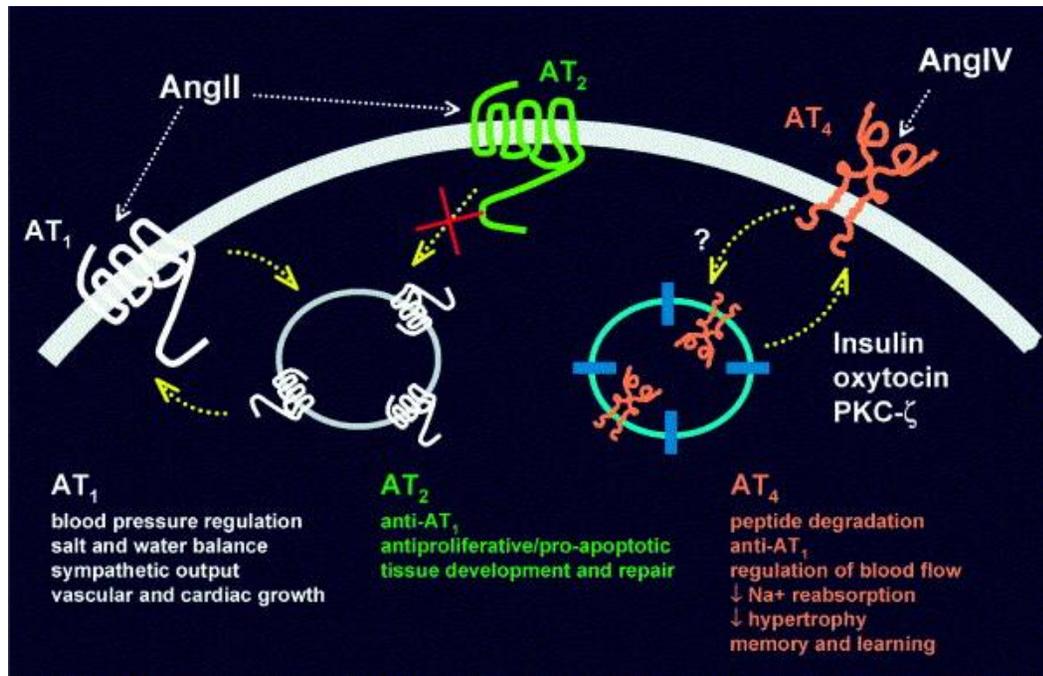


FIGURA 5. Esquema da interação de Ang II em receptores AT1R/AT2R e Ang IV em receptor AT4R. Nos receptores AT1R e AT4R é notada a formação de vesículas intracelulares durante a ativação e desativação. *Blood pressure regulation* (regulação de pressão sanguínea); *Salt and water balance* (balanceamento de sal e água); *Sympathetic output* (transmissão simpática); *Vascular and cardiac growth* (crescimento vascular e cardíaco); *Antiproliferative* (antiproliferativo); *Pro-apoptotic* (pro-apoptótico); *Tissue development and repair* (desenvolvimento e reparo tecidual); *Peptide degradation* (degradação do peptídeo); *Regulation of blood flow* (regulação de pressão sanguínea); *Na⁺ reabsorption* (reabsorção de sódio); *Hypertrophy* (hipertrofia); *Memory and learning* (memória e aprendizagem); *Insulin* (insulina); *Oxytocin* (oxitocina); *PKC* (Proteína-quinase-C). Figura adaptada de THOMAS & MENDELSON, 2003.

1.2.5. METABOLISMO DE ANGIOTENSINA II

O complexo do SRA se inicia na liberação de renina pelas células justaglomerulares renais no sangue que atuará na conversão de AGT em Ang I. Por sua vez, Ang I é convertida em Ang II pela ação da ACE. O peptídeo resultante atuará nos receptores de angiotensina, AT1R e AT2R, que são receptores funcionais antagônicos (SKRBIC & IGIC, 2009).

A Ang I, decapeptídeo, é um metabolito inativo produzido pela ação da renina sobre o angiotensinogênio no fígado. Este decapeptídeo é rapidamente convertida em Ang II pela ACE. A Ang I pode ser convertida em outro composto biologicamente ativo, a Ang (1-7), pela endopeptidase e ainda pode ser convertida para Ang (1-9) pela ACE2 e, subsequentemente, formando Ang (1-7) (DIMITROPOULOU et al., 2006).

A Ang II pode ser convertida para Ang (1-7) pela enzima endopeptidase neutra ou carboxipeptidase prolil, ou ser degradada em metabólitos inativos pela angiotensinase (DIMITROPOULOU et al., 2006).

A complexidade do seu sistema deve-se a atuação de várias enzimas que geram os peptídeos menores, tais como, Ang (2-8), Ang (3-8) e Ang (1-7). Oposto de Ang II, o peptídeo Ang (1-7), atua contrabalanceando os efeitos resultantes de Ang II através da ação nos receptores *Mas* e potencializa o efeito de bradicinina (DRUMER et al., 1988) aumentando também a liberação de NO e ácido araquidônico. Os seus efeitos são benéficos, tais como, vasodilatação, estímulo da excreção de sódio renal e efeitos antiproliferativos (DIMITROPOULOU et al., 2006).

Além da geração de Ang II pela ACE, também pode ser formada pela quimase na conversão de Pro-Angiotensina-12 (ProAng-12) em Ang II sem a participação da renina. A quimase está presente nos mastócitos e aumenta em casos de terapia com inibidor de ACE. Com isso, a Ang II poderá ser formada em duas vias conhecidas, tais como, cascata de renina-angiotensina e de

angiotensinogênio-angiotensina. A liberação de ProAng-12 a partir de AGT ainda está em estudo (SKRBIC & IGIC, 2009).

1.2.6. OUTROS PEPTÍDEOS DERIVADOS DE ANGIOTENSINA II

Como a Ang II, a Ang III, derivada da ação de aminopeptidase A no terminal N de Ang II, também possui afinidade aos receptores AT1R e AT2R. Ang III é um derivado principal no cérebro e participa no controle de pressão sanguínea e liberação de vasopressina (TURNER & HOOPER, 2002).

A aminopeptidase N degrada a Ang II gerando Ang IV ou Ang (3-8). Essa possui afinidade aos receptores AT4R, conhecida como aminopeptidase regulada por insulina (IRAP), tem o princípio de vasodilatação renal, favorece natriurese, liberação de propriedades vasoativas e aumento de expressão de inibidor do ativador do plasminogênio-1 (PAI-1) (ALBISTON et al., 2001).

1.2.7. ANGIOTENSINA II E AS CÉLULAS ENDOTELIAIS

O endotélio é responsável pela manutenção e estrutura vascular através da produção de metabólitos reguladores de tônus vascular, coagulação, células de crescimento e de morte e migração de leucócitos. O equilíbrio entre o NO, um vasodilatador, e a Ang II, um vasoconstritor, é importante para manter o tônus vascular em estabilidade. Além disso, as células musculares lisas também são capazes de liberar citocinas e fatores de crescimento e reguladores que podem influenciar o tônus vascular (DZAU, 2001).

Sendo a Ang II uma mediadora do estresse oxidativo que reduz a atividade de NO, tem um efeito de desequilíbrio funcional nas células endoteliais, onde ocorre a produção de radicais livres, tais como, o ânion superóxido e peróxido de hidrogênio. Também induz atração dos monócitos ao local, ativa o NF- κ B, estimula a expressão de VCAM-1 e liberação de IL-6 e TNF- α (DZAU, 2001).

Além de causar dano nas células endoteliais, a Ang II também pode atuar na remodelação dos vasos sanguíneos, agindo no aumento da expressão de derivados de plaquetas nas células musculares lisas, modulação de migração de células vasculares, redução de apoptose vascular de células musculares lisas e alteração da composição da matriz extracelular. Também pode estimular a síntese e liberação de glicoproteínas e metaloproteinases da matriz. A Ang II tem efeito pleiotrópico, pois pode causar lesão nas células endoteliais e atuar inclusive na remodelação dos mesmos (DZAU, 2001).

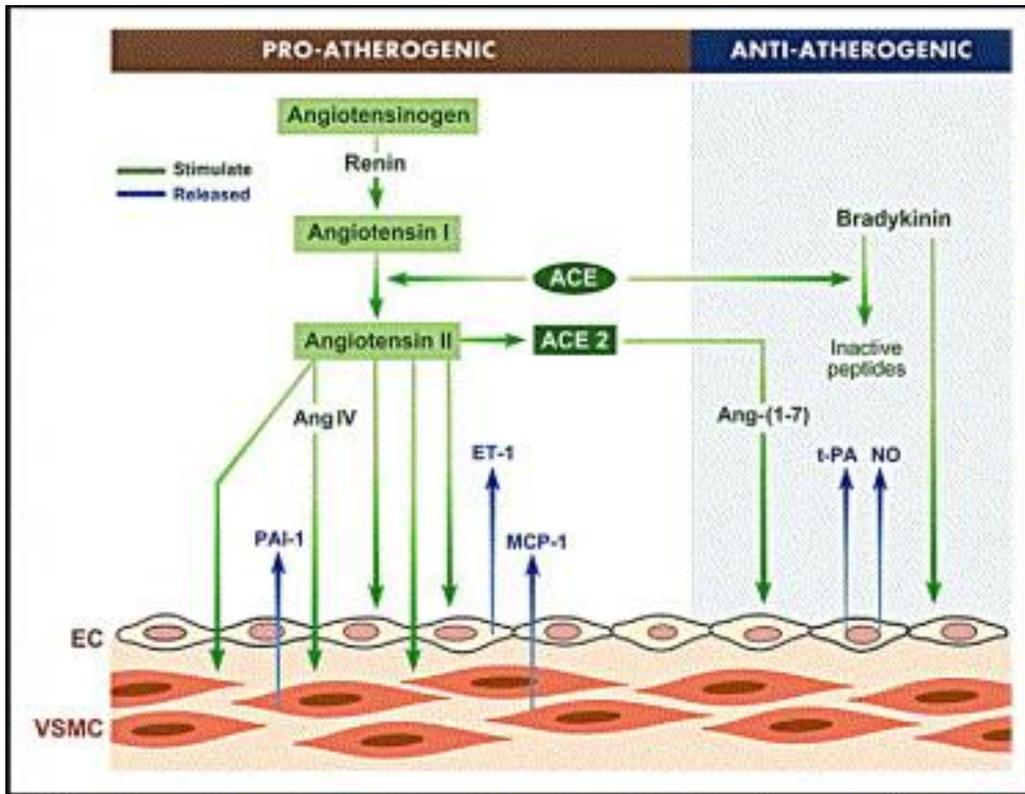


FIGURA 6. Papel de Ang II no desenvolvimento e progressão de aterosclerose. Ang II pode estimular as células endoteliais na liberação dos marcadores pró-aterogênicos ou anti-aterogênicos. *Pro-atherogenic* (pró-aterogênico); *Anti-atherogenic* (anti-aterogênico); *Stimulate* (estimulado); *released* (liberado); *Angiotensinogen* (angiotensinogênio); *Renin* (renina); *Angiotensin I* (angiotensina I); *Angiotensin II* (angiotensina II); *Bradykinin* (bradicinina); *Inactive peptides* (peptídeos inativos); *EC* (células endoteliais); *VSMC* (células de músculo liso vascular); *ET-1* (endotelina-1); *NO* (óxido nítrico); *PAI-1* (inibidor do ativador do plasminogênio-1); *t-PA* (ativador do plasminogênio tecidual); *MCP-1* (*Proteína Quimiotática de Monócito-1*) (FERRARIO & STRAWN, 2006, adaptado TSIKOURIS et al., 2003).

2. JUSTIFICATIVA

A doença falciforme é caracterizada por uma fisiopatologia complexa que desencadeia eventos vaso-oclusivos resultantes da adesão dos eritrócitos falcizados e leucócitos às células endoteliais da parede vascular, causando obstrução e modificações nas suas paredes e ocasionando uma reação inflamatória. A hemólise intravascular também leva à diminuição na biodisponibilidade de NO, facilitando a vasoconstrição e participando no processo vaso-oclusivo. A angiotensina II, peptídeo vasoconstritor, pode atuar como agente inflamatório nas células endoteliais através da interação ao receptor de angiotensina II tipo 1. Além disso, também eleva a pressão arterial. Atualmente, os inibidores de enzima conversora de angiotensina e bloqueadores de receptores de angiotensina II são utilizados para a manutenção da pressão arterial ocasionada pela ação de angiotensina II. Os indivíduos portadores de AF apresentam pressão arterial relativamente baixa em comparação aos indivíduos saudáveis e a determinação de angiotensina II poderia esclarecer a compreensão do funcionamento do sistema destes indivíduos. Como o sistema renina-angiotensina exerce papel importante em processos inflamatórios e vasoconstritivos, propomos investigar se existem alterações nos componentes do sistema renina-angiotensina em indivíduos e animais com anemia falciforme e verificar se há diferença nestes parâmetros entre os pacientes tratados e não tratados com hidroxiureia.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO PRINCIPAL

- Investigar os aspectos do sistema renina-angiotensina em indivíduos portadores de anemia falciforme e num modelo animal de anemia falciforme, avaliando ainda sua modulação por hidroxiureia.

3.2. OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- Quantificar níveis de angiotensina II (Ang II) e enzima conversora de angiotensina (ACE) plasmáticos em indivíduos saudáveis controles e em indivíduos portadores de anemia falciforme em estado estável com ou sem tratamento de hidroxiureia.
- Correlacionar níveis plasmáticos de Ang II e ACE com os parâmetros hematológicos e marcadores de ativação endotelial, molécula de adesão vascular-1 solúvel (sVCAM-1), molécula de adesão intercelular-1 solúvel (sICAM-1) e endotelina-1 (ET-1), em indivíduos saudáveis controles e portadores de anemia falciforme em estado estável com ou sem tratamento de hidroxiureia.
- Correlacionar níveis plasmáticos de Ang II e ACE com os marcadores de inflamação, interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e inibidor do ativador do plasminogênio-1 (PAI-1), e com níveis de metabólitos de NO e da guanosina monofosfato cíclico (GMPc), em indivíduos saudáveis controles e portadores de anemia falciforme.
- Quantificar níveis de Ang II plasmáticos em um modelo animal de anemia falciforme.
- Quantificar a expressão gênica dos receptores de angiotensina II (AT1R e AT2R) e enzima conversora de angiotensina (ACE1 e ACE2) nos seguintes tecidos: baço, cérebro, coração, fígado, pulmão e rim em um modelo animal de anemia falciforme.
- Avaliar efeitos de hidroxiureia nos níveis de Ang II e expressão gênica dos genes AT1R, AT2R, ACE1 e ACE2 em um modelo animal de anemia falciforme.

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1. SUJEITOS

Locais de coleta das amostras: Centro de Hematologia e Hemoterapia Hemocentro de Campinas (UNICAMP), Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (HEMEPAR) e Hospital Universitário de Londrina – UEL (HU-UEL).

Médicos responsáveis pelos pacientes: Dr. Fernando Ferreira Costa (UNICAMP), Dra. Sara T. O. Saad (UNICAMP), Dr. Giorgio Baldanzi (HEMEPAR) e Dra. Denise Akemi Mashima (HU-UEL).

Os sujeitos que participaram da pesquisa foram pacientes portadores de anemia falciforme, diagnosticados através dos métodos de eletroforese de hemoglobina e cromatografia líquida de alta pressão – HPLC, em tratamento ou não com HU, atendidos no Hemocentro de Campinas, HEMEPAR e HU-UEL no momento da consulta rotineira. Estes sujeitos não apresentaram crises vaso-oclusivas e nem receberam transfusão sanguínea durante os 3 meses anteriores à coleta e não fizeram uso de inibidores de ACE. Para o grupo tratado com HU (15-30 mg/kg/dia), o início da terapia foi decidido pelo médico responsável de acordo com os seguintes critérios: mais de 3 crises vaso-oclusivas num mesmo ano e/ou repetidos episódios da síndrome torácica aguda. Estes pacientes fizeram tratamento com HU por pelo menos 2 meses antes de participarem do estudo. Os voluntários controles foram convidados no momento da doação de sangue e não apresentavam outras doenças que pudessem interferir na pesquisa; também não fizeram uso de medicamentos anti-hipertensivos. Todos os indivíduos participaram mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (CAAE: 0898.0.146.000-09, nº 1171/2009, data de aprovação pelo CEP/UNICAMP 11/01/2010) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Londrina – UEL (nº 3113/2011, data de aprovação pelo CEP/UEL 23/11/2011).

4.2. MÉTODOS

4.2.1. HUMANOS

4.2.1.1. COLETA DE SANGUE

Foi coletado sangue periférico, cerca de 17 ml, utilizando o sistema de coleta BD Vacutainer, em 1 tubo contendo heparina e 2 tubos contendo EDTA. Um dos tubos de EDTA foi utilizado para ensaios de Ang II, no qual foi adicionado um coquetel inibidor de proteases e o outro tubo para os seguintes parâmetros: NO, GMPc e ET-1. O tubo de heparina foi utilizado para análise de ACE, sICAM-1, sVCAM-1, IL-6, IL-8, TNF- α e PAI-1.

4.2.1.2. DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE ANG II

Para evitar a degradação/geração de Ang II, foi utilizado um coquetel inibidor, *Angiotensin II Inhibitor Cocktail*, do fabricante SPI-Bio Bertin Pharma (Montigny-le-Bretonneux, França), que é composto de *o*-fenantrolina 0,44 mM, EDTA 25 mM, ácido *p*-hidroxi-mercuribenzóico (PHMB) 1 mM e pepstatina A 0,12 mM. Após a adição do coquetel inibidor (30 μ L de coquetel inibidor:1 mL de sangue), a amostra contendo EDTA e sangue periférico (4 mL) foi centrifugada por 15 minutos x 3000g a 4°C. Em seguida, o plasma foi separado imediatamente e estocado a -80°C até o dia do ensaio.

A extração da Ang II da amostra foi realizada de acordo com o protocolo do kit *Angiotensin II Enzyme Immunoassay*, da SPI-Bio Bertin Pharma. A coluna de extração utilizada foi Cartucho Fenil Hypersep pH 100mg/1ml/100pkg, da Thermo Scientific. O tratamento das amostras consistiu na pré-lavagem dos cartuchos com 1 mL de metanol. Através da aspiração a vácuo, o excesso de metanol foi eliminado da coluna. Após esta etapa, foi adicionado 1 mL de água deionizada em cada cartucho e novamente submetido a aspiração a vácuo. A partir daí, foi adicionado 2 mL de plasma das amostras obtidas em cartuchos individuais. Em seguida, aspirados a vácuo e lavados com 1 mL de água. Os peptídeos

adsorvidos de angiotensina foram eluídos com 500 µL de metanol. Os cartuchos foram submetidos à pressão com pipeta de Pasteur, manualmente, para eluir todo o metanol num microtubo. Posteriormente, os microtubos contendo metanol e angiotensina foram centrifugados a vácuo para evaporar o metanol presente, deixando somente o sedimento contendo os peptídeos de angiotensina. Por último, foram adicionados 500 µL de Tampão EIA, presente no kit, homogeneizados e centrifugados por 3000g por 10 minutos a 4°C.

Amostras extraídas foram armazenadas a -80°C até a determinação de Ang II utilizando o kit de *Angiotensin II Enzyme Immunoassay*, da SPI-Bio Bertin Pharma.

4.2.1.3. DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE ACE, sICAM-1, sVCAM-1, IL-6, IL-8, TNF-α e PAI-1

Para determinação da ACE, sICAM-1, sVCAM-1, IL-6, IL-8, TNF-α e PAI-1, a amostra de sangue contendo heparina foi centrifugada por 15 minutos x 1000g a 4°C não excedendo 30 minutos após a coleta. O plasma foi armazenado a -80°C até o dia do ensaio. A determinação da concentração da ACE foi feita de acordo com o protocolo do kit *Quantikine ELISA Human ACE*, de R&D Systems. Os parâmetros de sICAM-1, sVCAM-1, IL-6, IL-8, TNF-α e PAI-1 foram analisados com os seguintes kits: *Quantikine ELISA Human sICAM-1/CD54*, *Quantikine ELISA Human sVCAM-1*, *Quantikine HS High Sensitivity ELISA Human IL-6*, *Quantikine HS High Sensitivity ELISA Human CXCL8/IL-8*, *Quantikine HS High Sensitivity ELISA Human TNF-α* e *Quantikine Human Serpin E1/PAI-1*, respectivamente, todos de R&D Systems. Para estas análises, não houve necessidade de tratamento especial das amostras. Os protocolos do fabricante foram seguidos.

4.2.1.4. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE NO, GMPc E ENDOTELINA-1

Para análise dos parâmetros de NO, GMPc e ET-1 plasmática foram usadas as amostras de sangue contendo EDTA, os quais foram centrifugadas por 15 minutos x 1000 g a 4°C não excedendo 30 minutos após a coleta. O plasma foi armazenado a -80°C até o dia do ensaio.

Para a quantificação de GMPc plasmática, não houve necessidade de qualquer tratamento especial das amostras. O kit utilizado foi *Amersham cGMP Enzymeimmunoassay Biotrak (EIA) System*, da GE Healthcare. Para determinação da concentração dos metabólitos de NO, o plasma foi centrifugado com filtro Amicon ou Millipore. A ultrafiltração é utilizada para eliminar as possíveis interferências de hemoglobina quando acrescentado o reagente Griess. Os níveis de metabólitos de NO foram quantificados pelo kit *Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit*, da *Cayman Chemical Company*. A ET-1 foi analisada com o kit de *Human Endothelin-1*, da R&D Systems e não houve necessidade de tratamento prévio das amostras. Os protocolos dos fabricantes foram seguidos.

4.2.2. MODELO ANIMAL DE ANEMIA FALCIFORME

Para evitar quaisquer variações que pudessem interferir nas concentrações de Ang II e na necessidade de verificar a ação da HU no SRA em duas concentrações diferentes, foi utilizado um modelo animal de anemia falciforme. O projeto foi submetido à aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp, protocolo número 3024-1, em 2013.

Os animais foram mantidos no Biotério do Hemocentro da UNICAMP, alimentados com ração industrial NUVILAB e não receberam nenhuma restrição hídrica ou dieta específica.

Foram utilizados os dois tipos de camundongos AF nos experimentos, camundongos Berkeley e camundongos quimeras de AF.

4.2.2.1. ANIMAIS TRANSGÊNICOS AF BERKELEY

Os camundongos Berkeley homozigotos (BERK) são denominados de animais transgênicos devido aos genes globinas dos murinos, α e β , terem sido nocauteados e inseridos genes humanos, α e β^S , como um transgene. Estes camundongos, por apresentarem o gene β^S dos humanos, expressam características similares aos indivíduos portadores de AF, tais como, desenvolvimento da anemia hemolítica grave e dano aos órgãos. Os camundongos Berkeley são homozigotos para HbS humano e produzem HbS em sua linhagem (PÁSTZY et al., 1997; RYAN et al., 1997).

4.2.2.2. ANIMAIS QUIMERAS DE AF

Os camundongos denominados quimeras de AF são camundongos C57BL/6 que sofreram irradiação na frequência de 1200 cGy dividida em duas doses, realizada no IPEN/USP, para supressão da medula óssea e receberam transplante, por via intravenosa no plexo orbital, de células nucleadas de medula óssea dos camundongos Berkeley homozigotos (3×10^6 células/mL), apresentando assim as características de camundongos AF. O início da produção das células transplantadas em camundongos foi avaliada 3 meses após o transplante, seguindo o protocolo de TURHAN et al. (2002).

Com o objetivo de verificar a eficácia do transplante, foi feito um pequeno corte na cauda dos camundongos transplantados para coleta de pequenas gotas de sangue, este armazenado em microtubo contendo o anticoagulante EDTA, 50 μ M. O microtubo foi submetido à centrifugação por 145 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e 20 μ L de água foi adicionada ao sedimento para hemolisar os eritrócitos. Em seguida, os hemolisados foram pipetados em eletroforese em gel, preparado de acordo com o protocolo de Weinberg, para a visualização da presença de banda S de hemoglobina, característica de anemia falciforme.

Segundo o protocolo de Weinberg, o gel para eletroforese foi preparado com a adição de 9,4 mL de acrilamida sem BIS; 11,5 mL de água destilada

autoclavada; 7,2 g (4M) de ureia; 30 mg de BIS; 1,5 mL de ácido acético glacial; 150 µL de TEMED; 2,4 mL de persulfato de amônio (45 mg em 3 mL de água) e 600 µL de Triton X-100. O gel foi deixado em descanso por 18 horas numa cuba de eletroforese contendo duas placas de vidro, permitindo o espaço de 0,75 mm para polimerização do gel. No segundo dia, foi feita uma pré-corrída por 2 horas em 200 V com 5% de ácido acético. Em seguida, o ácido acético foi aspirado com o auxílio da bomba a vácuo. Foi adicionada cisteamina (112 mg de cisteamina em 1 mL de água, suficiente para dois géis) nos pocinhos de gel. O ácido acético foi adicionado e deixado na corrida por 1 hora em 150 V. Foi submetido à aspiração a vácuo para remoção do excesso de cisteamina dos pocinhos. O hemolisado de sangue dos camundongos foi inserido nos pocinhos de placa de gel juntamente com o tampão de corrida (1mL de ureia 8M – 4,8 g de ureia para 10 mL de água destilada, 100 µL de ácido acético glacial, 100 µL de 2-mercaptoetanol, resina AG-501 e pironina-Y), obedecendo a proporção de 2 µL de hemolisado para 12 µL de tampão de corrida. Após a corrida por 3 horas na voltagem de 16 mA, o gel foi retirado e feito uma coloração com azul de Comassie sob homogeneização por 20 minutos numa pequena cuba. Em seguida, foi descolorado com 7% de ácido acético e 30% de metanol (35 mL de ácido acético, 150 mL de metanol e completado água até 500 mL). Novamente foi colocado na homogeneização por 20 minutos. Após a troca da solução descorante, o gel foi deixado em *overnight* sob homogeneização. A leitura foi realizada no equipamento de fotodocumentação, Loccus L-Pix Touch, de Loccus Biotecnologia, para visualização de bandas de hemoglobina S.

Após analisar a eficácia do transplante pela eletroforese, os camundongos quimeras de AF foram distribuídos em três grupos, sendo um para controle (n=4) e dois para o tratamento com hidroxíureia por via intraperitoneal. As concentrações de hidroxíureia foram de 50 mg/kg/dia (n=5) e 75 mg/kg/dia (n=6) por 5 dias, durante 4 semanas. A idade dos camundongos ao final do tratamento foi de 5 meses e o peso variou de 24 a 29g. Para evitar possíveis variações na concentração de Ang II com a idade ou peso, foram utilizados os camundongos

controles C57BL/6 com as mesmas características dos camundongos quimeras de AF.

As amostras de sangue dos camundongos Berkeley homozigotos foram coletadas aleatoriamente entre 2 a 6 meses. Para comparação dos resultados destes camundongos, foi utilizado também um outro grupo de camundongos controle, não sendo levada em consideração a idade.

Os camundongos controles C57BL/6, Berkeley homozigotos e quimeras de AF foram submetidos à eutanásia através do deslocamento cervical e exsanguinação sob anestesia com isoflurano. Também foram desinfetados com álcool 70^o na região intraperitoneal e cortados na área das costelas dando acesso ao coração para punção sanguínea para quantificação de Ang II. Os tecidos (rim, cérebro, pulmão, coração, fígado e baço) foram transferidos para um microtubo, congelados em nitrogênio líquido e mantidos a -80^oC, para quantificação de expressão gênica dos receptores de Ang II (*AT1R* e *AT2R*) e enzima conversora de angiotensina (*ACE1* e *ACE2*).

Houve morte prematura de dois camundongos durante o tratamento na dose de 75 mg/kg/dia de HU e não foi possível a coleta de sangue e retirada dos órgãos.

4.2.2.3. COLETA DE SANGUE DOS CAMUNDONGOS

Após o período de tratamento, os camundongos quimeras de AF foram submetidos à eutanásia, dando início aos procedimentos de coleta de sangue e retirada dos órgãos. Para medição de Ang II, o volume de sangue coletado variou de 700 µL a 1000 µL e o coquetel inibidor foi calculado na proporção exata a ser adicionado, sempre respeitando a proporção de 1 mL de sangue para 30 µL de coquetel inibidor. Além da coleta para Ang II, também foi coletado um pequeno volume num microtubo contendo EDTA para quantificação do número de leucócitos, eritrócitos, hemoglobina, índices hematimétricos e plaquetas com o analisador hematológico *Beckman Coulter* (Fullerton, CA, EUA).

4.2.2.4. DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE ANG II PLASMÁTICA DE CAMUNDONGOS

Como em humanos, a extração das amostras dos camundongos também foi realizada de acordo com o protocolo do kit *Angiotensin II Enzyme Immunoassay*, da SPI-Bio Bertin Pharma. Devido ao pequeno volume de sangue obtido dos camundongos, foi adicionado todo plasma presente ao cartucho. A concentração de Ang II obtida foi corrigida de acordo com o volume inserido no cartucho.

4.2.2.5. RT-qPCR DE TECIDOS DE CAMUNDONGOS

Para a quantificação da expressão dos genes dos receptores de Ang II (*AT1R* e *AT2R*) e das enzimas conversoras de angiotensina (*ACE1* e *ACE2*) em tecidos, foram selecionados os camundongos controles C57BL/6, Berkeley homocigotos e quimeras de AF para análises teciduais (baço, cérebro, coração, fígado, pulmão e rim) através da RT-qPCR.

4.2.2.5.1. EXTRAÇÃO DE RNA

A extração de RNA dos tecidos (baço, cérebro, coração, fígado, pulmão e rim) foi realizada com a adição de nitrogênio líquido, procedida de maceração até a formação de pó e adição de Trizol (Invitrogen). O macerado foi congelado até o momento da extração de RNA total. A técnica consistiu na incubação por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foi feita adição de 200 μ L de clorofórmio por 1 mL de Trizol, homogeneização e repouso por 2 minutos à temperatura ambiente. A seguir, o macerado foi centrifugado a 13200 g a 4°C por 15 minutos para separação das fases. A fase superior contendo o RNA total foi transferida para um novo microtubo. Então, foi acrescentado 500 μ L de

isopropanol/mL de Trizol para precipitação de RNA. A solução foi submetida novamente à incubação por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foi centrifugada a 13200 g a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e conservado o sedimento contendo o RNA. Foi procedida a lavagem do pellet com 1 mL de álcool 75° gelado. O sedimento foi ressuspenso através do vórtex e, novamente, foi submetido à centrifugação da amostra a 11800 g a 4°C por 5 minutos. Após a centrifugação, foi descartado o sobrenadante e o microtubo contendo sedimento foi seco com gaze por 10 minutos para eliminação dos possíveis resíduos de álcool 75°.

Por último, o RNA foi eluído com adição de 50 µL de água livre de RNase e incubado em banho-maria a seco a 55°C por 10 minutos. A concentração de RNA obtida foi determinada pelo *Nanodrop ND-1000* (NanoDrop Technologies).

4.2.2.5.2. SÍNTESE DE cDNA

Para o tratamento com DNase, 1 µg do RNA foi tratado com o kit *RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis* (Fermentas, Thermo Scientific): 1 µL de 10x *Reaction Buffer* com MgCl₂, 1 µL DNase I (RNase-free), completando o volume com água livre de nuclease para 10 µL. Foi realizada incubação por 30 minutos a 37°C num termociclador. Em seguida, foi adicionado 1 µL de EDTA 50 mM e novamente incubado por 10 minutos a 65°C.

A reação de transcrição reversa, síntese de cDNA, foi iniciada com a adição de oligo (dT)₁₈ no RNA tratado anteriormente e incubado por 5 minutos a 65°C. Após a incubação, foram acrescentados: 4 µL de 5x *Reaction Buffer*, 1 µL de *RiboLock RNase Inhibitor* (20u/µL), 2 µL de 10 mM dNTP Mix e 1 µL de *RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase* (200 u/µL), totalizando 20 µL de volume final. Nesta etapa, as soluções foram incubadas no termociclador a 42°C por 60 minutos e finalizadas em 75°C por 5 minutos. Por último, a concentração de cDNA sintetizada foi quantificada usando o espectrofotômetro *NanoDrop* (comprimento de onda: 260 nm).

4.2.2.5.3. PCR EM TEMPO REAL (RT-qPCR)

A realização de PCR Real Time (RT-qPCR) foi realizada numa placa com 96 poços, à qual foram adicionados, inicialmente, 6 µl de fluoróforo *SyBr Green PCR Master Mix* (Invitrogen), 3 µl de *primer* dos genes de interesse e, em seguida, 3 µl de amostra, totalizando 12 µl de volume. Todas as amostras foram analisadas em duplicata, inclusive o controle endógeno, *ACTB* (gene que codifica a proteína β-actina).

Foi utilizado o controle negativo para eliminar possíveis contaminações dos primers, para isso, foi adicionada água estéril e livre de nuclease ao invés da amostra. Após a reação de RT-qPCR, foi possível observar a ausência de amplificação nos controles negativos.

Após do término dos 40 ciclos repetitivos no equipamento *7500 PCR Real Time*, foi analisada a formação da curva *melt* de cada amostra, através da análise da temperatura ideal de cada gene.

Por ser feita em duplicata, cada amostra teve a média de expressão relativa (Ct) determinada. Os valores de expressão são normalizados em relação a genes chamados de controles endógenos. Os valores de Ct obtidos foram transferidos para o *Excel* e agrupados de acordo com o gene.

Neste trabalho foi utilizado o gene que codifica a β-actina, *ACTB*, cuja expressão é dita constitutiva por apresentar pouca variação entre diversas condições. Os valores de Ct de cada gene foram obtidos em duplicata, dessa forma, foram calculadas as médias aritméticas destas, para cada amostra que teve um determinado gene estudado. Em seguida foi obtido o valor de delta Ct (ΔCt), que consistiu na subtração do Ct do gene em análise com o respectivo Ct do controle endógeno da amostra. Após, foi calculado o valor de $\Delta\Delta Ct$, que corresponde a subtração do ΔCt da amostra calibradora menos o ΔCt da amostra analisada. Em seguida o valor do $\Delta\Delta Ct$ é aplicado na fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, tendo assim o número de vezes da expressão de um gene em relação ao calibrador.

4.2.2.5.4. PRIMERS

Os primers utilizados nas reações de RT-qPCR foram desenhados através do site www.repeatmasker.org/ e o software *Primer Express*, da Applied Biosystems. Os primers desenhados foram inseridos ao programa *Blat* (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start>) para confirmar a homologia com o gene de interesse. A formação de estruturas secundárias, como o *hairpins* e *dimers*, foi avaliada através do programa *Gene Runner*.

TABELA 1. Sequência dos primers e tamanho do fragmento amplificado dos genes dos receptores de angiotensina (*AT1R* e *AT2R*) e das enzimas conversoras de angiotensina (*ACE1* e *ACE2*).

Gene	Primers	Tamanho do fragmento amplificado
AT1R-F AT1R-R	5' – GTCAGTTTCAACCTCTACGCCAG – 3' 5' – ACAATGGCCAGGTAGCGATC – 3'	71 pb
AT2R-F AT2R-R	5' – GAATCCCTGGCAAGCATCTTAT – 3' 5' – ATGTTGGCAATGAGGATAGACAAG – 3'	71 pb
ACE1-F ACE1-R	5' – GGGCATTGACCTAGAGACTGATG – 3' 5' – CTTGGGCTGTCCGGTCATAC – 3'	71 pb
ACE2-F ACE2-R	5' – ACCAAAGCATTAAAGTGAGGATAAG – 3' 5' – GTTGTGGTCCATTTCATATGCATT – 3'	71 pb
BAC-F BAC-R	5' - ACTGCCGCATCCTCTTCCT-3' 5' - GAACCGCTCGTTGCCAATA -3'	83 pb

4.2.2.5.4.1. DEFINIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO IDEAL DE PRIMER

A concentração ideal de primer a ser utilizada, deve ser a mínima suficiente para permitir a duplicação de todas as cópias do material a cada ciclo da reação. Para isso, foi utilizada a mesma amostra com reações de cada um dos primers (sense e anti-sense) nas concentrações finais de 70 nM, 150 nM e 300 nM. A concentração ideal foi determinada no gene, no qual foi apresentado o menor valor de Ct (ciclo *threshold*), ou seja, amplificação precoce.

4.2.2.5.4.2. EFICIÊNCIA DA REAÇÃO

A reação de RT-qPCR precisa ser confiável e reprodutiva. Utilizando a concentração ótima de primer, foi determinada a eficiência da reação, onde as amplificações apresentem 100% de eficiência a cada ciclo de PCR. A eficiência de amplificação é obtida através da curva da fórmula $E = 10^{(-1/slope)}$, onde *slope* é derivado da inclinação da curva, e esse valor quando aplicado à fórmula de eficiência, tem que ser próximo de 2, que significa que a cada ciclo de amplificação o material genômico está sendo duplicado e é equivalente a 100% de eficiência (MEIJERINK et al., 2001).

TABELA 2. Resultado da eficiência dos receptores de angiotensina (AT1R e AT2R) e enzimas conversoras de angiotensina (ACE1 e ACE2)

Gene	Concentração utilizada	Eficiência
AT1R	150 nM	99,78%
AT2R	150 nM	99,73%
ACE1	70 nM	99,74%
ACE2	150 nM	100%
BAC	70 nM	100%

4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS OBTIDOS

A análise das amostras de humanos e camundongos foram realizadas em duplicata e a média calculada para fins de análise estatística.

Os resultados expressos nas tabelas e nos gráficos mostram os valores em mediana (mínimo e máximo) e o número de amostras realizadas (n).

Na comparação entre os dois grupos, foi utilizado o teste não-paramétrico e não pareado Mann-Whitney. Na comparação entre os três grupos ou mais, foi aplicado o ANOVA, através do teste não-paramétrico e não pareado Kruskal-

Wallis seguido de teste de Dunn's Multiple Comparison Test ou de Bonferroni para comparação. Os gráficos e análises estatísticas foram realizados no programa *GraphPad Prism 5*, e o valor de p menor ou igual a 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

5. RESULTADOS

5.1. EXPERIMENTOS COM AMOSTRAS DE INDIVÍDUOS PORTADORES DE AF

O grupo controle da pesquisa foi composto por indivíduos saudáveis que não fazem tratamento com inibidores de ACE ou bloqueadores de receptores de Ang II. Os indivíduos portadores de AF foram divididos em 2 grupos de acordo com o uso de HU, assim como no grupo controle, não devendo estar utilizando os medicamentos citados acima.

5.1.1. PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E DEMOGRÁFICOS EM INDIVÍDUOS CONTROLES E INDIVÍDUOS PORTADORES DE AF

Os parâmetros hematológicos e demográficos dos indivíduos controles e indivíduos portadores de AF que participaram desta pesquisa estão mostrados na Tabela 3.

TABELA 3. Perfil clínico e dados hematológicos das amostras coletadas para a realização da pesquisa.

	CONTROLES	SS		p (*)	p (**)
		SEM USO DE HU	COM USO DE HU		
Homens/Mulheres	22/20	16/14	13/20	ns	ns
HEMEPAR/UEL/UNICAMP	15/17/10	4/17/9	20/0/13	ns	ns
Idade (anos)	27 (25/13/54)	29 (29/13/50)	27 (26/11/51)	ns	ns
Eritrócitos (x10 ⁶ /μL)	5,11 (5,13/4,21/6,31)	2,67 (2,52/1,98/3,78)	2,54 (2,60/1,25/4,13)	p<0,001	ns
Hemoglobina (g/dL)	14,4 (14,5/11,7/17,5)	7,9 (7,7/4,9/10,7)	8,6 (8,9/3,9/11,0)	p<0,001	ns
Hematócrito (%)	42,8 (43,3/35,2/51,9)	24,7 (24,0/16,5/33,4)	26,2 (27/11,5/33,2)	p<0,001	ns
VCM (fL)	84,1 (84,0/71,9/92,0)	93,1 (90,4/75,4/117)	104,7 (102,0/72,8/143,7)	p<0,001	p<0,01
HCM (pg)	28,4 (28,6/24,9/32,6)	29,9 (30,2/22,3/37,1)	34,6 (34,1/21,4/44,8)	p<0,001	p<0,01
CHCM (g/dL)	33,6 (33,4/32,1/36,8)	32,17 (32,0/29,6/35,1)	33,0 (33,2/29,4/35,8)	ns	ns
Leucócitos (x10 ³ /μL)	6,5 (6,4/4,1/11,3)	10,61 (10,6/4,8/15,2)	8,4 (8,1/3,4/13,9)	p<0,001	p<0,01
Plaquetas (x10 ³ /μL)	265 (258/174/410)	447 (463/142/648)	382 (387/101/638)	p<0,001	ns
HbF (%)	0,4 (0,3/0,2/1,5)	5,9 (5,2/0,7/16,0)	12,0 (10,9/2,1/30,7)	p<0,001	p<0,01

Legenda: SS: indivíduos portadores de AF; VCM (Volume Corpuscular Médio); HCM (Hemoglobina Corpuscular Média); CHCM (Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média); HbF (Hemoglobina Fetal); Valores expressos em MÉDIA (MEDIANA/MÍN/MÁX), exceto para Homens/Mulheres e HEMEPAR/UEL/UNICAMP. (*) Valor do p, comparando SS sem uso de HU com controles; (**) Valor do p, comparando SS com uso de HU com SS sem uso de HU; ns: não significativo.

5.1.2. QUANTIFICAÇÃO DE NÍVEIS PLASMÁTICOS DE ANG II EM INDIVÍDUOS CONTROLES E INDIVÍDUOS PORTADORES DE AF COM E SEM TRATAMENTO DE HU

Para verificar os níveis plasmáticos de Ang II, foram coletadas as amostras de sangue dos indivíduos controles e indivíduos portadores de AF com e sem tratamento de HU para quantificação de Ang II por ELISA. As concentrações de Ang II obtidas nos três grupos estão mostradas na Figura 7. Pôde-se notar que os indivíduos portadores de AF sem HU ($4,720 \pm 1,562$ pg/mL, mediana \pm SEM) apresentaram níveis um pouco elevados de Ang II em relação aos indivíduos controles ($4,763 \pm 0,781$ pg/mL, mediana \pm SEM) e indivíduos portadores de AF com HU ($4,679 \pm 1,294$ pg/mL, mediana \pm SEM), porém, nenhum desses grupos apresentou diferença significativa quando os valores de Ang II foram comparados. No grupo SS/SSHU, independentemente do uso de HU, o valor mediano de Ang II foi de $4,720 \pm 1,002$ pg/mL ($p > 0,05$).

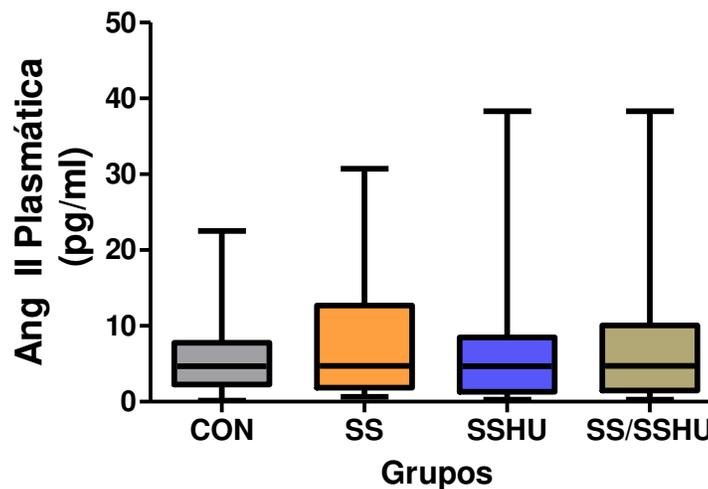


FIGURA 7. Concentração de Ang II no plasma de indivíduos controles (CON, n=41), indivíduos portadores de AF sem (SS, n=28) e com (SSHU, n=32) tratamento de HU. Grupo dos indivíduos portadores de AF independente do uso de HU (SS/SSHU, n = 60). Para comparação entre os quatro grupos, usou-se o teste de Kruskal-Wallis ($p > 0,05$) seguido pelo teste Dunn's Multiple Comparison.

5.1.3. QUANTIFICAÇÃO DE NÍVEIS PLASMÁTICOS DE ACE EM INDIVÍDUOS CONTROLES E INDIVÍDUOS PORTADORES DE AF COM E SEM TRATAMENTO DE HU

A ACE, enzima importante do SRA, participa ativamente na remoção do dipeptídeo do terminal C de Ang I, produzindo um octapeptídeo, Ang II. Devido à importância desta enzima, foram quantificadas as concentrações de ACE no plasma dos indivíduos controles e indivíduos AF com e sem tratamento com HU. A Figura 8 mostra que foram detectadas diferenças significativas ($p < 0,05$) nos níveis de ACE, sendo que o grupo SS apresentou níveis menores quando comparado ao grupo controle. Quando os valores de ACE dos grupos SS (SS/SSHU) são comparados num único grupo com o grupo controle, foi observada uma diferença de $p < 0,05$, sendo que a concentração de ACE no plasma foi mais baixa no grupo SS/SSHU.

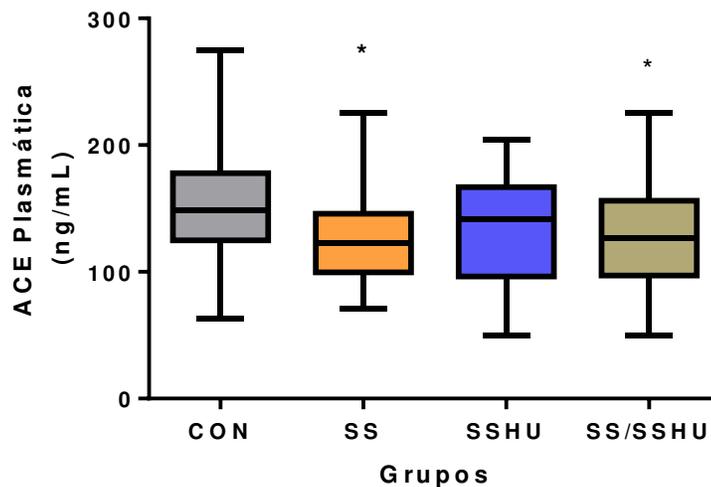


FIGURA 8. Concentração de ACE no plasma de indivíduos controles (CON, $n=32$) e indivíduos portadores de AF sem (SS, $n=18$) e com (SSHU, $n=17$) tratamento de HU. Grupo SS/SSHU é independente do uso de HU ($n = 35$). Para comparação entre os quatro grupos, usou-se o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste Dunn's Multiple Comparison Test. * $p < 0,05$, comparado ao grupo controle.

5.1.4. QUANTIFICAÇÃO DE NÍVEIS DE MARCADORES DE ATIVAÇÃO ENDOTELIAL EM INDIVÍDUOS CONTROLES E INDIVÍDUOS PORTADORES DE AF COM E SEM TRATAMENTO DE HU

5.1.4.1. Molécula de adesão celular vascular-1 solúvel (sVCAM-1): A sVCAM-1 é um marcador de ativação endotelial. Níveis plasmáticos de sVCAM-1 foram quantificados pelo método ELISA com as amostras de plasma dos indivíduos controles, AF com e sem tratamento de HU. A concentração de sVCAM-1 foi maior em indivíduos portadores de AF sem tratamento de HU. Os valores obtidos de sVCAM-1 em indivíduos portadores de AF em tratamento com HU foram elevados quando comparados aos indivíduos controles, mas estavam significativamente menores do que o grupo SS sem tratamento com HU. O grupo SS/SSHU também apresentou maior concentração de sVCAM-1 em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$).

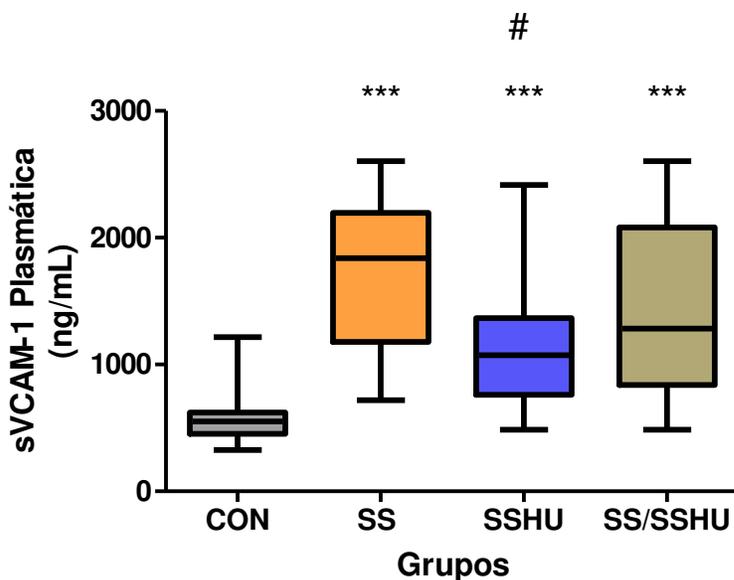


FIGURA 9. Concentração de sVCAM-1 no plasma de indivíduos controle (CON, n=32), indivíduos portadores de AF sem (SS, n=18) e com (SSHU, n=17) tratamento de HU. Grupo SS/SSHU é independente do uso de HU (n = 35). Para comparação entre os quatro grupos, usou-se o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste Dunn's Multiple Comparison. *** $p < 0,001$, comparado ao grupo controle. # $p < 0,05$, comparado ao grupo SS.

5.1.4.2. Molécula de adesão intercelular solúvel (sICAM-1): A sICAM-1 é uma glicoproteína transmembrana que permite a migração e ativação dos leucócitos nas células endoteliais quando ativadas. A sICAM-1 também foi quantificada pelo método ELISA com as amostras dos indivíduos controles e indivíduos portadores de AF com e sem tratamento de HU (Figura 10). Não foi detectada diferença significativa nos três grupos estudados para níveis plasmáticos de sICAM-1 ($p > 0,05$). Quando analisando os indivíduos portadores de AF como um grupo todo (SS/SSHU), foi observado um aumento significativo nos níveis plasmáticos de sICAM-1 nos indivíduos portadores de AF se comparado ao grupo controle.

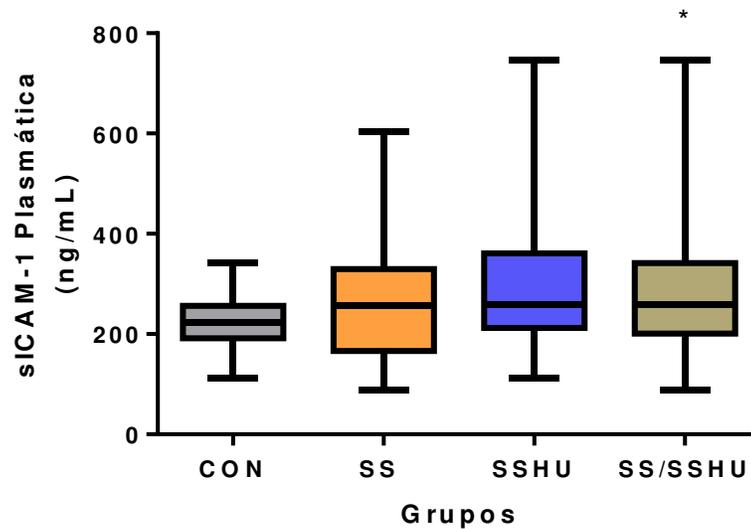


FIGURA 10. Concentração de sICAM-1 no plasma de indivíduos controles (CON, n=32), indivíduos portadores de AF sem (SS, n=16) e com (SSHU, n=17) tratamento de HU. Grupo SS/SSHU consiste dos dois grupos de pacientes com ou sem tratamento com HU (n = 33). Para comparação entre os quatro grupos, usou-se o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste Dunn's Multiple Comparison. * $p < 0,05$, comparado ao grupo controle.

5.1.4.3. Endotelina-1 (ET-1): A ET-1, como a Ang II, também é um potente vasoconstritor. Foram determinadas as concentrações plasmáticas de ET-1 nas amostras de sangue dos indivíduos controles, e indivíduos portadores de AF sem e com tratamento de HU, pelo método ELISA (Figura 11). Não foi notada nenhuma diferença quando comparada aos grupos analisados.

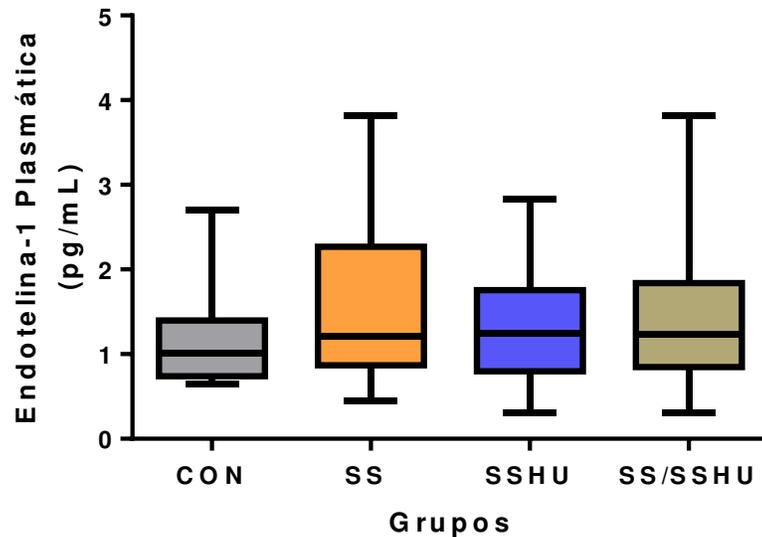


FIGURA 11. Concentração de ET-1 no plasma de indivíduos controles (CON, n=32), indivíduos portadores de AF sem (SS, n=17) e com (SSHU, n=21) tratamento de HU. Grupo SS/SSHU é independente do uso de HU (n = 38). Para comparação entre os quatro grupos, usou-se o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste Dunn's Multiple Comparison ($p > 0,05$).

5.1.5. QUANTIFICAÇÃO DE NÍVEIS DE METABÓLITOS DE ÓXIDO NÍTRICO E GUANOSINA MONOFOSFATO CÍCLICO NO PLASMA DE INDIVÍDUOS CONTROLES E INDIVÍDUOS PORTADORES DE AF COM E SEM TRATAMENTO DE HU

5.1.5.1. Óxido nítrico (NO): O NO, um vasodilatador, promove o equilíbrio da ação vasoconstritora de Ang II nas células endoteliais. Foram coletadas as amostras de sangue dos indivíduos controles, e indivíduos portadores de AF sem e com tratamento de HU e, posteriormente, quantificadas as concentrações de metabólitos de NO no plasma através do método ELISA. Os metabólitos de NO são indicativos de níveis de NO no plasma. Os resultados obtidos estão na Figura 12. Não foram detectadas diferenças nas concentrações de metabólitos de NO nos três grupos analisados e nem diferença quando os grupos SS/SSHU foram combinados em um grupo.

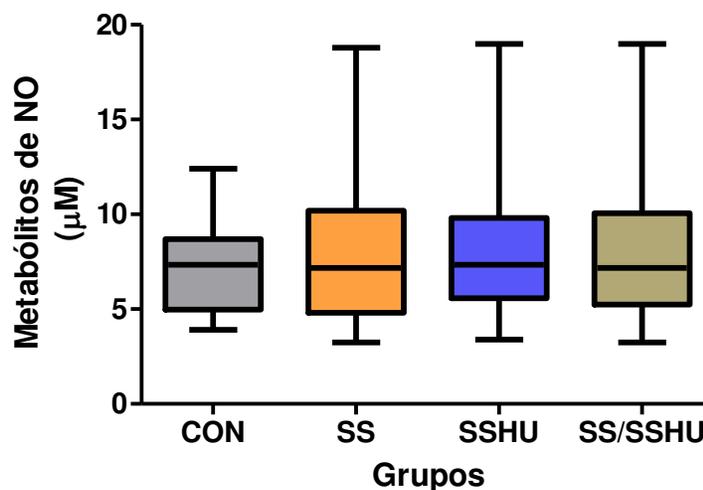


FIGURA 12. Determinação de níveis de metabólitos de NO no plasma em indivíduos controles (CON, n=26), indivíduos portadores de AF sem (SS, n=21) e com (SSHU, n=22) tratamento de HU. Grupo SS/SSHU é independente do uso de HU (n = 43). Para comparação entre os quatro grupos, usou-se o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste Dunn's Multiple Comparison Test ($p > 0,05$).

5.1.5.2. Guanosina monofosfato cíclico (GMPc): Os níveis de GMPc, mensageiro secundário do NO e nucleotídeo importante na sinalização de relaxamento da musculatura lisa, foram determinados pelo método de ELISA com as amostras de plasma coletadas dos indivíduos controles, e indivíduos portadores de AF sem e com tratamento de HU. As concentrações de GMPc no plasma destes indivíduos estão destacadas na Figura 13. A média dos níveis plasmáticos de GMPc foi superior no grupo SS em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), enquanto no grupo SSHU não foi observada nenhuma diferença significativa quando comparado ao grupo controle.

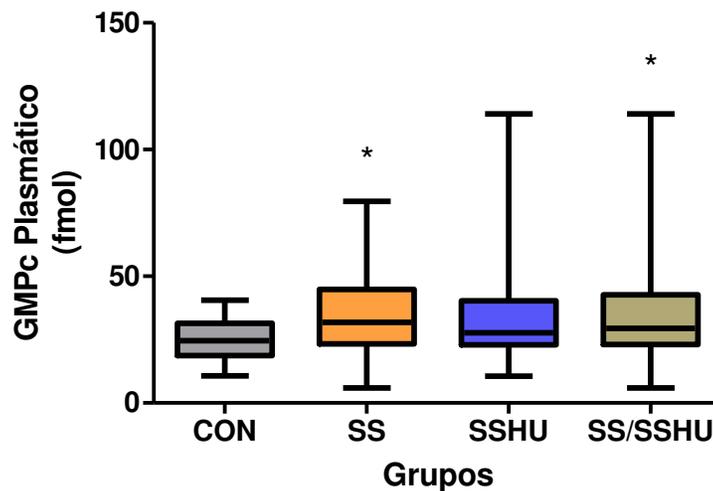


FIGURA 13. Concentração de GMPc no plasma de indivíduos controles (CON, n=26), indivíduos portadores de AF sem (SS, n=22) e com (SSHU, n=22) tratamento de HU. Grupo SS/SSHU é independente do uso de HU (n = 44). Para comparação entre os quatro grupos, usou-se o teste de Kruskal-Wallis e em seguida, usou-se o teste de Dunn's Multiple Comparison para comparação dos grupos AF com o controle. * $p < 0,05$, comparado ao grupo controle.

5.1.6. QUANTIFICAÇÃO DE NÍVEIS PLASMÁTICOS DE INTERLEUCINAS EM INDIVÍDUOS CONTROLES E INDIVÍDUOS PORTADORES DE AF COM E SEM TRATAMENTO DE HU

5.1.6.1. Interleucina-6 (IL-6): A IL-6, citocina produzida em resposta à inflamação nas células endoteliais, foi quantificada pelo método ELISA no plasma de indivíduos controles, e nos indivíduos portadores de AF sem e com tratamento de HU (Figura 14). Níveis de IL-6 estavam significativamente maiores nos indivíduos portadores de AF sem e com em uso de HU, comparado com os indivíduos controles. Apesar de observar uma diminuição nos níveis de IL-6 em indivíduos portadores de AF com HU comparado com os indivíduos portadores de AF sem HU, a diferença não foi significativa.

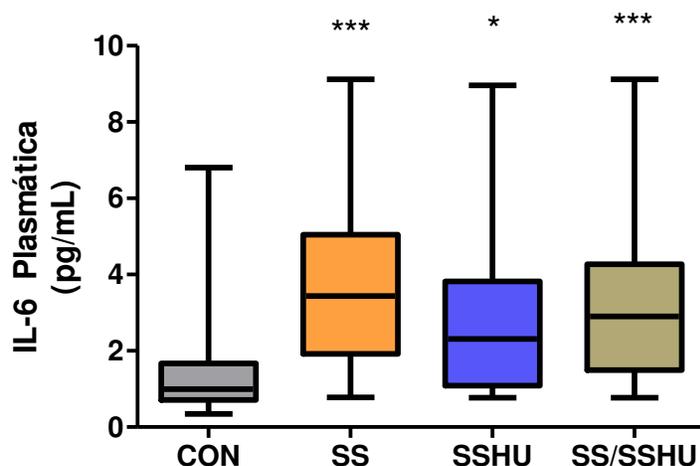


FIGURA 14. Concentração de IL-6 no plasma de indivíduos controles (CON, n=32), indivíduos portadores de AF sem (SS, n=22) e com (SSHU, n=21) tratamento de HU. Grupo SS/SSHU é independente do uso de HU (n = 43). Para comparação entre os quatro grupos, usou-se o teste de Kruskal-Wallis. Para comparação do grupo SS ou SSHU com controle, usou-se o teste de Dunn's Multiple Comparison. *p<0,05; *** p<0,001, comparado com o grupo controle.

5.6.1.2. Interleucina-8 (IL-8): A IL-8, que é produzida pelas células endoteliais em casos de processos inflamatórios, também foi quantificada pelo método ELISA no plasma de indivíduos controles, e de indivíduos portadores de AF sem e com tratamento de HU (Figura 15). A média de IL-8 foi superior nos indivíduos portadores de AF, independente do uso de HU, em comparação aos indivíduos controles, apresentando diferença significativa.

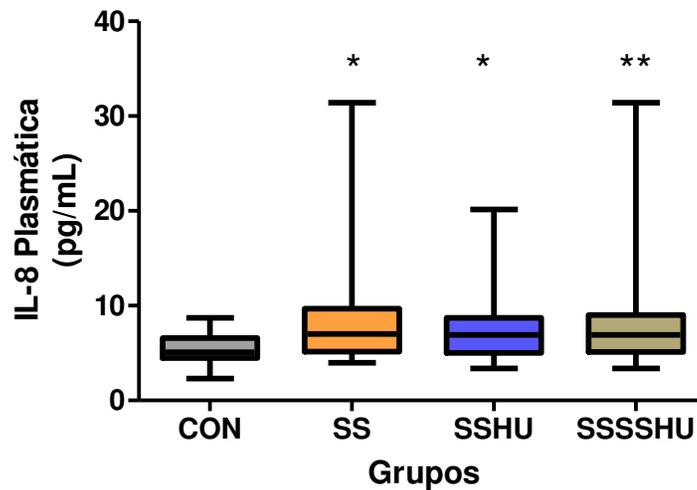


FIGURA 15. Concentração de IL-8 no plasma de indivíduos controles (CON, n=31), indivíduos portadores de AF sem (SS, n=18) e com (SSHU, n=18) tratamento de HU. Grupo SS/SSHU, independente do uso de HU (n = 36). Para comparação entre os quatros grupos, usou-se o teste de Kruskal-Wallis. Para comparação do grupo SS ou SSHU com controle, usou-se o teste de Dunn's Multiple Comparison. *p<0,05; ** p<0,01, comparado com o grupo controle.

5.1.7. QUANTIFICAÇÃO DE NÍVEIS PLASMÁTICOS DE PAI-1 EM INDIVÍDUOS CONTROLES E INDIVÍDUOS PORTADORES DE AF COM E SEM TRATAMENTO DE HU

O inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1, PAI-1, forma um complexo com o ativador do plasminogênio tissular (t-PA), regulando a hemostasia pela atividade inibidora fibrinolítica. A concentração do PAI-1 foi quantificada pelo método ELISA no plasma de indivíduos controles, e indivíduos portadores de AF sem e com tratamento de HU. As concentrações obtidas de PAI-1 estão demonstradas na Figura 16. As concentrações obtidas nos três grupos apresentaram diferenças significativas, sendo que o grupo SSHU apresentou uma concentração significativamente maior de PAI-1 em comparação ao grupo controle e o grupo de indivíduos portadores de AF sem uso de HU. Não houve diferença estatística quando comparadas as concentrações de PAI-1 entre os grupos controles e SS, porém quando os dois grupos SS foram colocados no mesmo grupo, a diferença foi pequena em relação ao grupo controle.

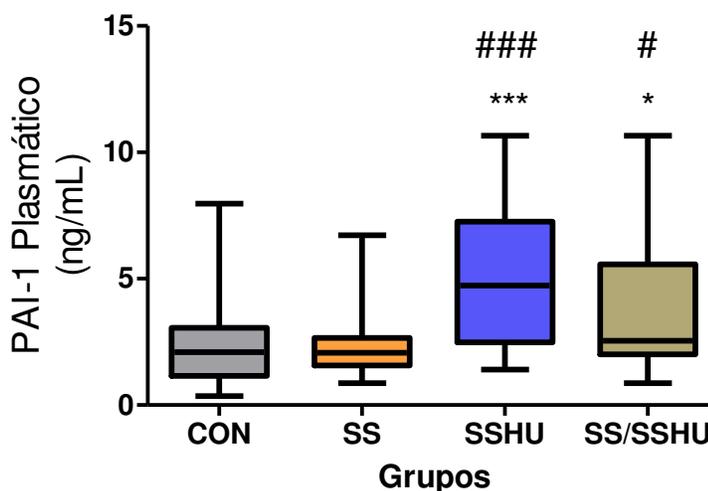


FIGURA 16. Concentração de PAI-1 no plasma de indivíduos controles (CON, n = 32), indivíduos portadores de AF sem (SS, n = 18) e com (SSHU, n = 19) tratamento de HU. Grupo SS/SSHU é independente do uso de HU (n = 37). Para comparação entre os quatro grupos usou-se o teste de Kruskal-Wallis, com o pós-teste de Dunn. * $p < 0,05$, *** $p < 0,0001$ comparado com o grupo controle; ### $p < 0,001$; # $p < 0,05$, comparado ao grupo SS.

5.1.8. QUANTIFICAÇÃO DE NÍVEIS PLASMÁTICOS DE TNF- α EM INDIVÍDUOS CONTROLES E INDIVÍDUOS PORTADORES DE AF COM E SEM TRATAMENTO DE HU

O fator de necrose tumoral- α , TNF- α , é uma molécula importante nos processos inflamatórios, desenvolvimento do sistema imunológico, apoptose e metabolismo lipídico. A quantificação de TNF- α foi determinada pelo método de ELISA no plasma dos indivíduos controles, e nos indivíduos portadores de AF sem e com HU. Foi observada uma diferença significativa entre os grupos SS e SSHU em comparação ao grupo controle. A média dos níveis plasmáticos de TNF- α foi significativamente menor no grupo SSHU comparado ao grupo SS, no entanto houve uma variação maior na concentração da citocina neste grupo (Figura 17).

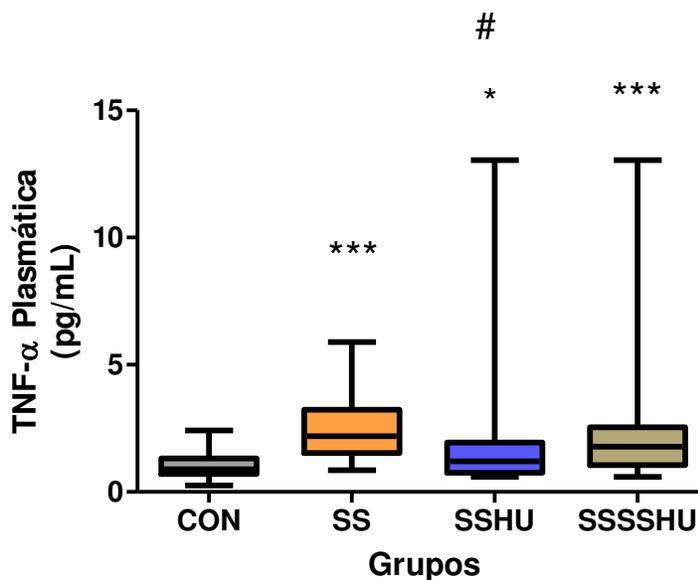


FIGURA 17. Concentração de TNF- α no plasma de indivíduos controles (CON, n=30), indivíduos portadores de AF sem (SS, n=18) e com (SSHU, n=19) tratamento de HU. Grupo SS/SSHU, independente do uso de HU (n = 37). Para comparação entre os quatro grupos, usou-se o teste de Kruskal-Wallis. Para comparação do grupo SS ou SSHU com controle, usou-se o teste de Dunn's Multiple Comparison. *p<0,05; *** p<0,001, comparado com o grupo controle; #p<0,05, comparado ao grupo SS.

5.2. CORRELAÇÕES ENTRE NÍVEIS PLASMÁTICOS DE ANG II E OS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS, MARCADORES DE ATIVAÇÃO ENDOTELIAL E INFLAMAÇÃO

A Tabela 4 mostra as correlações entre os níveis plasmáticos de Ang II e os parâmetros hematológicos nos três grupos de indivíduos estudados. Os valores foram calculados pelo método de Spearman.

TABELA 4. Correlações de níveis plasmáticos de Ang II com parâmetros hematológicos em indivíduos controles e indivíduos portadores de AF.

Grupos		Erit	Ret	Hct	Hb	HbF	Leuc	Plaq
Controles n= 36	r ^S	-0,1392	0,4661	-0,0151	-0,0334	-0,2690	-0,0442	0,1637
	p	0,3854	0,0688	0,9250	0,8534	0,3137	0,7834	0,3065
SS n= 26	r ^S	-0,0390	0,3805	0,0720	0,1546	0,1547	-0,1438	0,0615
	p	0,8465	0,0606	0,7210	0,4413	0,4506	0,4743	0,7651
SSHU n= 31	r ^S	-0,0113	-0,0665	0,1616	0,0468	<u>0,5280</u>	-0,2784	0,1940
	p	0,9525	0,7574	0,3852	0,8025	<u>0,0167</u>	0,1363	0,3117
SS/SSHU n = 57	r ^S	-0,0330	0,1852	0,0512	0,0530	0,2678	-0,1052	0,1765
	p	0,8057	0,1978	0,6998	0,6899	0,0688	0,4317	0,1890

Legenda: SS: indivíduos portadores de AF sem uso de HU; SSHU: indivíduos portadores de AF com uso de HU; SS/SSHU: indivíduos portadores de AF independente do uso de HU. Erit: eritrócitos; Ret: reticulócitos; Hct: hematócrito; Hb: hemoglobina; HbF: hemoglobina fetal; Leuc: leucócitos; Plaq: plaquetas; r^S: Coeficiente de Spearman.

A Ang II mostrou uma correlação positiva com a concentração de HbF no grupo SS com uso de HU, sendo que os valores obtidos foram r^S: 0,5280 e p=0,0167 (FIGURA 18). No entanto, para saber se esta correlação é fisiologicamente relevante, mais dados seriam necessários para apoiar este achado. A correlação de Ang II com a contagem de reticulócitos foi quase

significante nos indivíduos controles e indivíduos portadores de AF sem uso de HU. No entanto esta correlação não foi observada nos indivíduos portadores de AF com uso de HU.

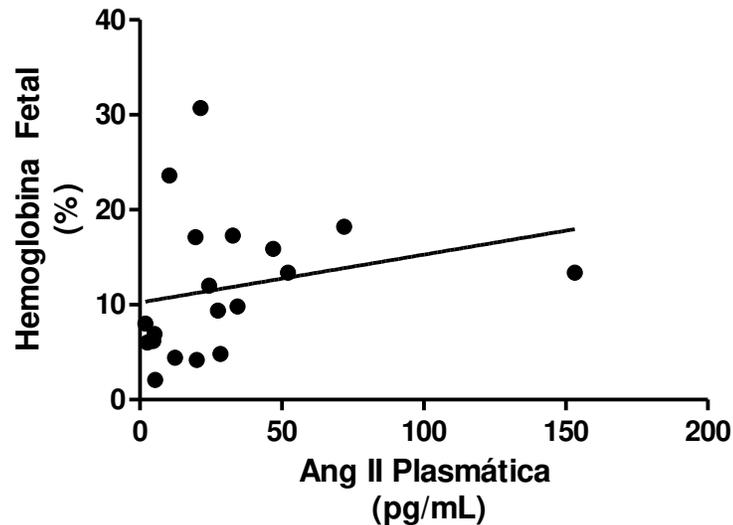


FIGURA 18. Correlação de níveis plasmáticos de Ang II com HbF nos indivíduos portadores de AF com uso de HU (n=19), $r^S = 0,4581$ / $p = 0,0486$.

As Tabelas 5, 6 e 7 demonstram as correlações entre os níveis plasmáticos de Ang II com ACE, sVCAM-1 e sICAM-1; Ang II com IL-6, IL-8 e TNF- α ; e Ang II com PAI-1, ET-1, NO e GMPc, respectivamente, no plasma de indivíduos controles, e indivíduos portadores de AF sem e com uso de HU. A Ang II apresentou uma correlação positiva com ET-1 no grupo SSHU. Enquanto no grupo SS, os níveis de Ang II e GMPc apresentaram correlação negativa.

TABELA 5. CORRELAÇÕES DE NÍVEIS PLASMÁTICOS DE ANG II COM ACE, sVCAM-1 E sICAM-1

Grupos	ACE		sVCAM-1		sICAM-1	
	Média ± SEM	Correlação com Ang II	Média ± SEM	Correlação com Ang II	Média ± SEM	Correlação com Ang II
Controles n= 36	151,5 ± 7,57 n=32	$r^S = -0,2266$ p = 0,2202	555,8 ± 28,2 n=32	$r^S = -0,2073$ p = 0,2632	224,4 ± 7,575 n=32	$r^S = -0,2109$ p = 0,2548
SS n= 26	127,7 ± 9,13 n=18	$r^S = -0,2425$ p = 0,3322	1697 ± 141,4 n=18	$r^S = -0,2054$ p = 0,4136	276,1 ± 36,11 n=16	$r^S = 0,0294$ p = 0,9139
SSHU n= 31	153,2 ± 11,14 n=17	$r^S = 0,1176$ p = 0,6643	1141 ± 128,9 n=17	$r^S = -0,3647$ p = 0,1649	293,9 ± 39,11 n=17	$r^S = -0,1000$ p = 0,7125
SS/SSHU n = 57	130,3 ± 7,038 n = 34	$r^S = -0,0514$ p = 0,7724	1436 ± 108,7 n = 34	$r^S = -0,0799$ p = 0,6533	285,0 ± 26,23 n = 32	$r^S = -0,0359$ p = 0,8452

Legenda: r^S : Coeficiente de Spearman.

TABELA 6. CORRELAÇÕES DE NÍVEIS PLASMÁTICOS DE ANG II COM IL-6, IL-8 E TNF- α

Grupos	IL-6		IL-8		TNF- α	
	Média \pm SEM	Correlação com Ang II	Média \pm SEM	Correlação com Ang II	Média \pm SEM	Correlação com Ang II
Controles n= 36	1,523 \pm 0,25 n=32	$r^S = -0,0193$ p = 0,9177	5,467 \pm 0,28 n=31	$r^S = -0,3740$ $p = 0,0418$	1,011 \pm 0,09 n=30	$r^S = -0,0215$ p = 0,9099
SS n= 26	3,712 \pm 0,44 n=22	$r^S = -0,1940$ p = 0,4125	9,440 \pm 1,72 n=18	$r^S = 0,2211$ p = 0,3631	2,557 \pm 0,33 n=18	$r^S = -0,1662$ p = 0,510
SSHU n= 31	2,662 \pm 0,46 n=21	$r^S = -0,2602$ p = 0,2680	7,582 \pm 0,88 n=18	$r^S = 0,02374$ p = 0,9255	2,034 \pm 0,63 n=19	$r^S = -0,1641$ p = 0,5153
SS/SSHU n = 57	3,199 \pm 0,32 n = 43	$r^S = -0,0957$ p = 0,5492	8,486 \pm 0,95 n=36	$r^S = 0,1778$ p = 0,4873	2,289 \pm 0,36 n=37	$r^S = 0,0321$ p = 0,8522

Legenda: r^S : Coeficiente de Spearman.

TABELA 7. CORRELAÇÕES DE NÍVEIS PLASMÁTICOS DE ANG II COM PAI-1, ET-1, NO E GMPc

Grupos	PAI-1		ET-1		NO		GMPc	
	Média + SEM	Correlação com Ang II	Média + SEM	Correlação com Ang II	Média + SEM	Correlação com Ang II	Média + SEM	Correlação com Ang II
Controles n = 36	2,455 ± 0,31 n = 32	r ^S = 0,1823 p = 0,3264	1,160 ± 0,09 n = 32	r ^S = -0,3383 p = 0,0627	7,27 ± 0,45 n=26	r ^S = 0,1315 p = 0,5308	24,43 ± 1,53 n = 26	r ^S = -0,1038 p = 0,6213
SS n = 26	2,464 ± 0,34 n = 18	r ^S = -0,0619 p = 0,8071	1,591 ± 0,23 n = 17	r ^S = 0,1078 p = 0,6804	8,24 ± 0,92 n=21	r ^S = -0,0140 p = 0,9545	35,85 ± 3,98 n = 22	<u>r^S = -0,4662</u> <u>p = 0,0383</u>
SSHU n = 31	5,088 ± 0,59 n = 19	r ^S = 0,1352 p = 0,5927	1,270 ± 0,12 n = 21	<u>r^S = 0,5398</u> <u>p = 0,0140</u>	8,29 ± 0,80 n=22	r ^S = -0,0766 p = 0,7479	33,05 ± 4,47 n = 22	r ^S = -0,4301 p = 0,0584
SS/SSHU n = 57	3,709 ± 0,4071 n = 36	r ^S = -0,1449 p = 0,3990	1,418 ± 0,4071 n = 37	<u>r^S = 0,3419</u> <u>p = 0,0384</u>	8,386 ± 0,6099 n = 42	r ^S = -0,0993 p = 0,5472	34,79 ± 3,030 n = 43	<u>r^S = -0,3794</u> <u>p = 0,0158</u>

Legenda: r^S: Coeficiente de Spearman.

A Ang II também mostrou correlação positiva com ET-1 (Figura 19A) nos indivíduos portadores de AF com HU ($r^S = 0,539 / p = 0,0140$) e correlação negativa com GMPc (Figura 19B) nos indivíduos portadores de AF sem HU ($r^S = -0,466 / p = 0,0383$).

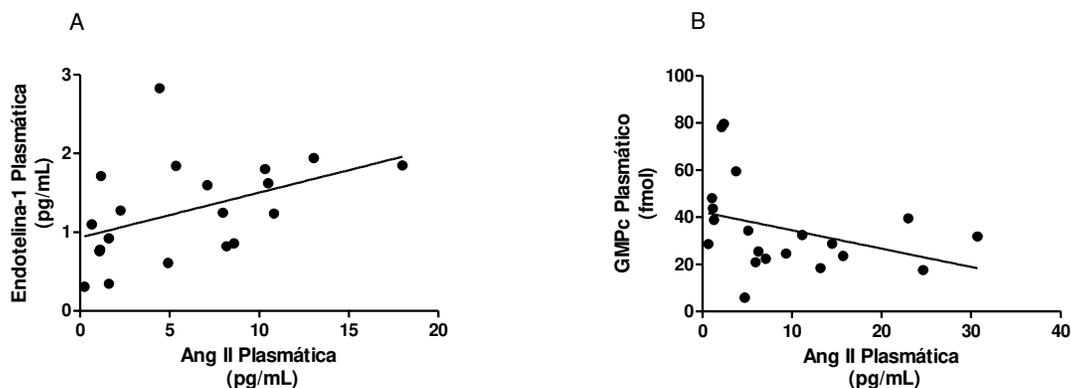


FIGURA 19. Correlação positiva de Ang II com ET-1 (A) nos indivíduos portadores de AF com HU ($n=20$), $r^S = 0,539 / p = 0,0140$. Correlação negativa de Ang II com GMPc (B) nos indivíduos portadores de AF sem HU ($n=19$), $r^S = -0,466 / p = 0,0383$.

5.3. CORRELAÇÕES ENTRE NÍVEIS PLASMÁTICOS DE ACE E OS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS, MARCADORES DE ATIVAÇÃO ENDOTELIAL E INFLAMAÇÃO

A Tabela 8 mostra as correlações de ACE com os parâmetros hematológicos em todos os grupos estudados. Não houve nenhuma correlação significativa (positiva ou negativa) entre a ACE e os parâmetros hematológicos.

TABELA 8. Correlações de ACE com parâmetros hematológicos

Grupos		Erit	Ret	Hct	Hb	HbF	Leuc	Plaq
Controles n = 36	r^S	0,2170	-0,0310	0,1313	0,1557	0,1247	0,1859	-0,1400
	p	0,2328	0,9058	0,4739	0,3947	0,6334	0,3083	0,4446
SS n= 26	r^S	-0,0784	-0,3558	-0,2984	-0,2934	-0,1167	-0,2797	0,0563
	p	0,7569	0,1610	0,2291	0,2374	0,6448	0,2610	0,8298
SSHU n = 31	r^S	0,2000	0,2520	0,1133	0,1444	-0,2000	0,0911	0,0911
	p	0,4748	0,4291	0,6761	0,5936	0,3847	0,7466	0,7466
SS/SSHU n = 57	r^S	0,0386	-0,1109	0,0276	0,0503	-0,0370	-0,0421	0,0863
	p	0,8311	0,5669	0,8766	0,7775	0,8667	0,8160	0,6385

Legenda: Erit: eritrócitos; Ret: reticulócitos; Hct: hematócrito; Hb: hemoglobina; HbF: hemoglobina fetal; Leuc: leucócitos; Plaq: plaquetas; r^S : Coeficiente de Spearman.

As tabelas 9, 10 e 11 mostram as correlações de ACE com os parâmetros de inflamação e citocinas. A ACE correlacionou de forma positiva somente com sICAM-1, e foi fortemente correlacionada positiva ($r^S = 0,515$, $p = 0,0025$) nos indivíduos controles.

TABELA 9. CORRELAÇÕES DE NÍVEIS PLASMÁTICOS DE ACE COM sVCAM-1, ICAM-1 E TNF- α

Grupos	sVCAM-1		sICAM-1		TNF- α	
	Média \pm SEM	Correlação com ACE	Média \pm SEM	Correlação com ACE	Média \pm SEM	Correlação com ACE
Controles n = 36	555,8 \pm 28,2 n = 32	$r^S = 0,3083$ p = 0,0860	224,4 \pm 7,57 n = 32	$r^S = 0,515$ $p = 0,0025$	1,011 \pm 0,09 n=30	$r^S = 0,0870$ p = 0,6476
SS n = 26	1697 \pm 141,4 n = 18	$r^S = 0,2466$ p = 0,3238	276,1 \pm 36,11 n = 16	$r^S = 0,0794$ p = 0,7700	2,557 \pm 0,33 n=18	$r^S = 0,1373$ p = 0,5871
SSHU n = 31	1141 \pm 137,0 n = 17	$r^S = 0,0088$ p = 0,9741	293,9 \pm 39,11 n = 17	$r^S = 0,2735$ p = 0,3053	2,034 \pm 0,63 n=19	$r^S = 0,3088$ p = 0,2278
SS/SSHU n = 57	1436 \pm 108,7 n = 34	$r^S = 0,0392$ p = 0,8255	285 \pm 26,23 n = 32	$r^S = 0,2192$ p = 0,2280	2,289 \pm 0,36 n=37	$r^S = 0,1398$ p = 0,4232

Legenda: r^S : Coeficiente de Spearman.

TABELA 10. CORRELAÇÕES DE NÍVEIS PLASMÁTICOS DE ACE COM IL-6, IL-8 E ET-1

Grupos	IL-6		IL-8		ET-1	
	Média \pm SEM	Correlação com ACE	Média \pm SEM	Correlação com ACE	Média \pm SEM	Correlação com ACE
Controles n = 36	1,523 \pm 0,25 n = 32	$r^S = 0,0604$ p = 0,7423	5,467 \pm 0,28 n=31	$r^S = 0,3319$ p = 0,0682	1,16 \pm 0,09 n=32	$r^S = 0,3244$ p = 0,0701
SS n = 26	3,712 \pm 0,44 n = 22	$r^S = 0,1373$ p = 0,5871	9,440 \pm 1,72 n=18	$r^S = -0,0650$ p = 0,7977	1,59 \pm 0,23 n=17	$r^S = -0,2819$ p = 0,2731
SSHU n = 31	2,662 \pm 0,46 n = 21	$r^S = -0,0235$ p = 0,9311	7,582 \pm 0,88 n=18	$r^S = 0,1691$ p = 0,5164	1,27 \pm 0,14 n=20	$r^S = -0,1941$ p = 0,4713
SS/SSHU n = 57	3,199 \pm 0,32 n = 43	$r^S = 0,0255$ p = 0,8861	8,486 \pm 0,95 n=36	$r^S = 0,0944$ p = 0,5896	1,41 \pm 0,13 n = 37	$r^S = -0,0221$ p = 0,2145

Legenda: r^S : Coeficiente de Spearman.

TABELA 11. CORRELAÇÕES DE NÍVEIS PLASMÁTICOS DE ACE COM PAI-1, NO E GMPc

Grupos	PAI-1		NO		GMPc	
	Média ± SEM	Correlação com ACE	Média ± SEM	Correlação com ACE	Média ± SEM	Correlação com ACE
Controles n= 36	2,455 ± 0,31 n=32	r ^S =0,2265 p = 0,2125	7,276 ± 0,4 n = 26	r ^S = 0,0372 p = 0,8566	24,43 ± 1,53 n = 26	r ^S = 0,1234 p = 0,5481
SS n = 26	2,464 ± 0,34 n=18	r ^S =0,0578 p = 0,8197	8,249 ± 0,9 n = 21	r ^S = 0,1544 p = 0,5540	35,85 ± 3,98 n = 22	r ^S = 0,2714 p = 0,2760
SSHU n = 31	4,954 ± 0,61 n=18	r ^S =0,1471 p = 0,5868	8,523 ± 0,8 n = 21	r ^S = 0,1088 p = 0,6883	33,48 ± 4,67 n = 21	r ^S = 0,1647 p = 0,5421
SS/SSHU n = 57	3,709 ± 0,40 n = 36	r ^S = 0,0924 p = 0,6031	8,386 ± 0,6 n = 42	r ^S = 0,1588 p = 0,3775	34,70 ± 3,03 n = 43	r ^S = 0,1685 p = 0,3407

Legenda: r^S: Coeficiente de Spearman.

5.4. EXPERIMENTOS COM AMOSTRAS DE CAMUNDONGOS

5.4.1. COMPARAÇÃO DE NÍVEIS PLASMÁTICOS DE ANG II EM CAMUNDONGOS CONTROLES (C57BL/6) E CAMUNDONGOS BERKELEY HOMOZIGOTOS

Para fins de comparação dos níveis plasmáticos de Ang II entre os camundongos controles (C57BL/6) e camundongos transgênicos Berkeley homozigotos, foram coletadas amostras de sangue para medir concentrações plasmáticas de Ang II. Os resultados obtidos de Ang II estão demonstrados na Figura 20. As concentrações plasmáticas de Ang II foram significativamente menores nos camundongos Berkeley homozigotos quando comparadas aos camundongos controles. A concentração média de Ang II do grupo controle foi de $57,27 \pm 4,9$ pg/mL, enquanto nos camundongos Berkeley homozigotos, a média foi de $6,61 \pm 1,32$ pg/mL (** $p < 0,0001$).

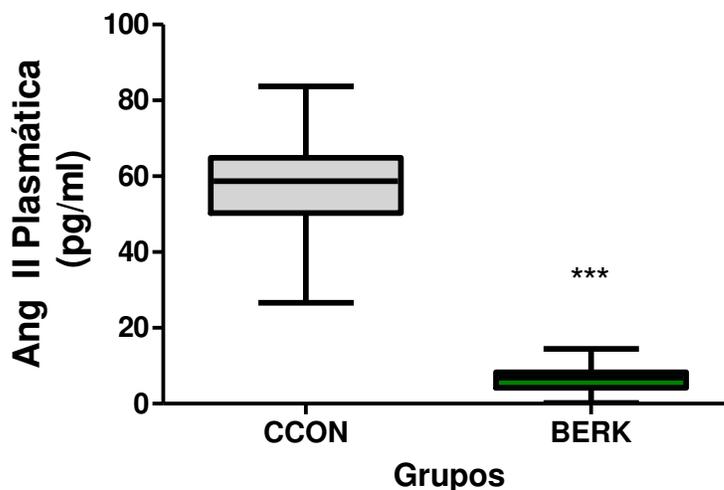


FIGURA 20. Concentração de Ang II no plasma dos camundongos controles C57BL/6 (CCON, n=10) e Berkeley homozigotos (BERK, n=9). Para comparação de concentrações de Ang II usou-se o test t Mann-Whitney (** $p < 0,001$).

5.4.2. EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS AO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA EM CAMUNDONGOS CONTROLES (C57BL/6) E CAMUNDONGOS BERKELEY HOMOZIGOTOS

Com o objetivo de verificar a expressão gênica dos genes que codificam para os receptores, *AT1R* e *AT2R*, e as enzimas conversoras de angiotensina, *ACE1* e *ACE2*, foram utilizados os seguintes tecidos: rim, coração, cérebro e fígado, isolados, dos camundongos controles C57BL/6 e camundongos Berkeley homozigotos para AF.

O receptor AT1R possui atividade pró-inflamatório quando é ativado pela Ang II, iniciando o processo de vasoconstrição, hipertrofia vascular, retenção de sódio e remodelamento cardíaco. A Figura 21 mostra os resultados obtidos da expressão gênica do receptor AT1R nos diferentes tecidos: rim (A), coração (B), cérebro (C) e fígado (D). A expressão do receptor AT1R nos rins dos camundongos Berkeley homozigotos foi menor em relação aos camundongos controles C57BL/6 (Figura 21A), apresentando uma diferença estatística de $p < 0,01$. Nos outros tecidos: coração (Figura 21B), cérebro (Figura 21C) e fígado (Figura 21D), não foram detectadas diferenças significativas na expressão gênica do receptor AT1R entre os camundongos controles e camundongos Berkeley.

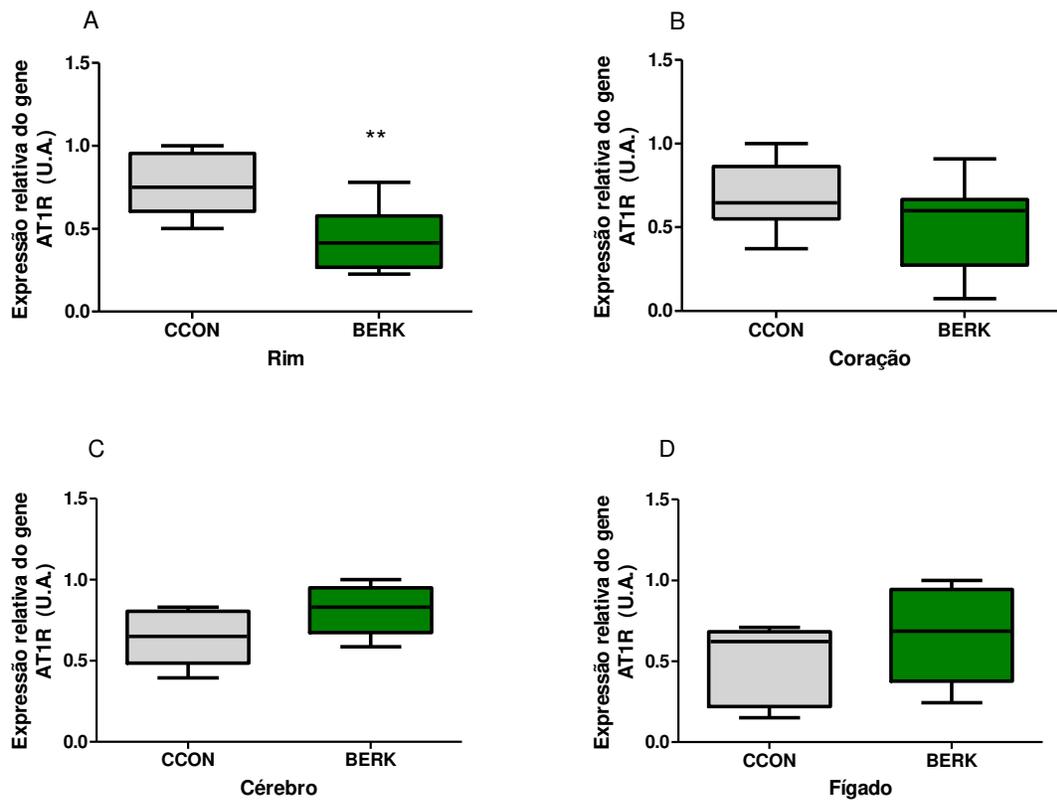


Figura 21. Expressão gênica do *AT1R* nos tecidos: (A) rim, camundongos controles C57BL/6 (CCON, n = 8) e camundongos Berkeley homozigotos (BERK, n = 9); (B) coração, camundongos controles C57BL/6 (CCON, n=9) e camundongos Berkeley homozigotos (BERK, n=8); (C) cérebro, camundongos controles C57BL/6 (CCON, n=5) e camundongos Berkeley homozigotos (BERK, n=5); (D) fígado, camundongos controles C57BL/6 (CCON, n=5) e camundongos Berkeley homozigotos (BERK, n=6). Para comparação entre os camundongos controles C57BL/6 e Berkeley homozigotos, usou-se o test t Mann-Whitney. Diferença na expressão do receptor *AT1R* dos camundongos Berkeley homozigotos em comparação aos controles C57BL/6, ** $p < 0,01$.

Ao contrário do AT1R, o receptor AT2R, possui propriedades vasodilatadoras quando ativado pela Ang II. A expressão gênica do receptor *AT2R*, também foi quantificado nos mesmos tecidos (Figura 22). Apesar das variações de expressão gênica do *AT2R*, entre os grupos de camundongos em todos os tecidos, não houveram diferenças significativas na expressão deste receptor.

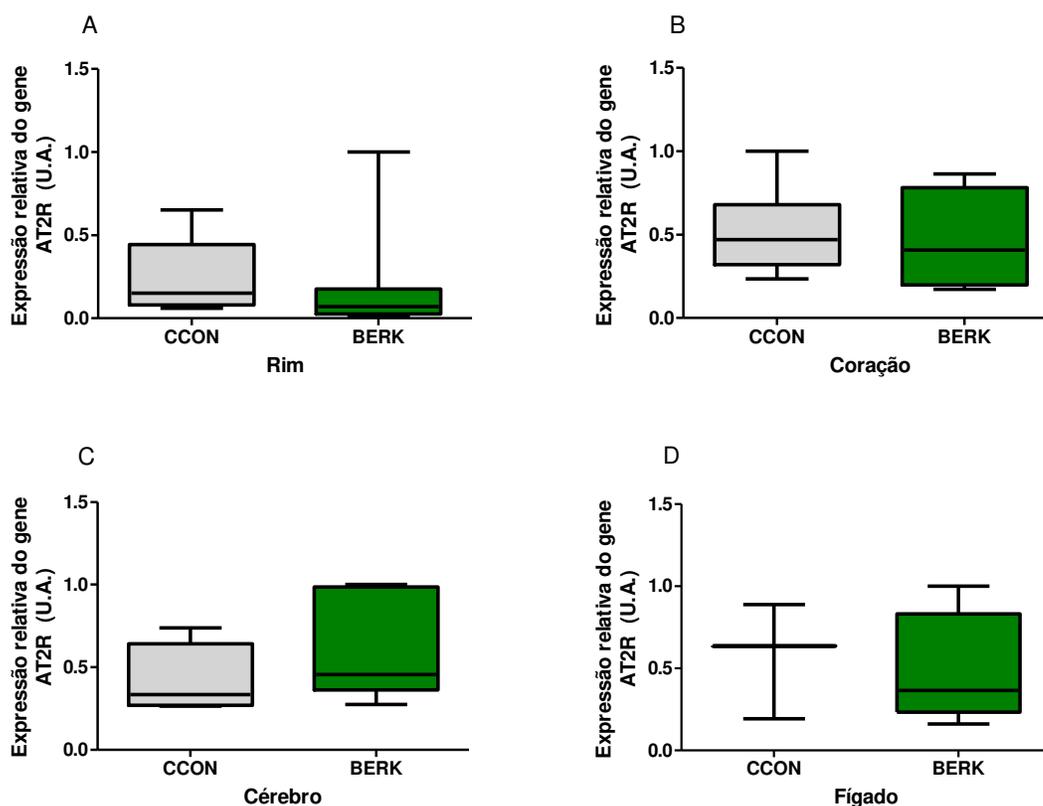


Figura 22. Expressão gênica do *AT2R* nos tecidos: (A) rim, camundongos controles C57BL/6 (CCON, n=8) e camundongos Berkeley homozigotos (BERK, n=9); (B) coração, camundongos controles C57BL/6 (CCON, n=9) e camundongos Berkeley homozigotos (BERK, n=4); (C) cérebro, camundongos controles C57BL/6 (CCON, n=5) e camundongos Berkeley homozigotos (BERK, n=5); (D) fígado, camundongos controles C57BL/6 (CCON, n=3) e camundongos Berkeley homozigotos (BERK, n=5). Para comparação dos camundongos controles C57BL/6 e Berkeley homozigotos, usou-se o test t Mann-Whitney ($p > 0.05$).

Foi quantificada a expressão gênica da enzima conversora de angiotensina tipo 1, *ACE1*, nos tecidos dos camundongos controles C57BL/6 e camundongos Berkeley homozigotos. Foram detectadas diferenças entre os camundongos controles e camundongos Berkeley homozigotos na expressão gênica desta enzima no rim (Figura 23A) e fígado (Figura 23D). No rim (Figura 23A), os camundongos Berkeley homozigotos apresentaram uma expressão menor da *ACE1* ($p=0,001$) enquanto no fígado (Figura 23D) a expressão foi superior em relação aos camundongos controles C57BL/6 ($p<0,05$). No coração (Figura 23B) e cérebro (Figura 23C), não foram detectadas diferenças significativas na expressão deste gene.

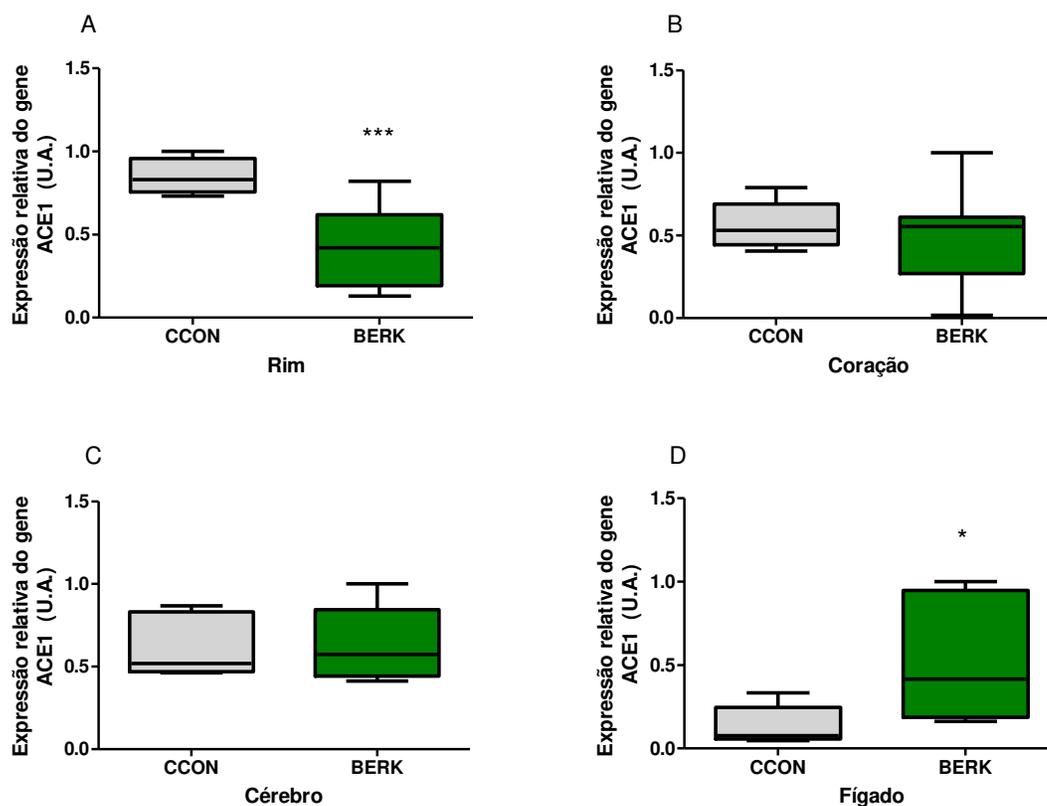


Figura 23. Expressão gênica da *ACE1* nos tecidos: (A) rim, camundongos controles C57BL/6 (CCON, n=8) e camundongos Berkeley homocigotos (BERK, n=9); (B) coração, camundongos controles C57BL/6 (CCON, n=9) e camundongos Berkeley homocigotos (BERK, n=8); (C) cérebro, camundongos controles C57BL/6 (CCON, n=5) e camundongos Berkeley homocigotos (BERK, n=5); (D) fígado, camundongos controles C57BL/6 (CCON, n=5) e camundongos Berkeley homocigotos (BERK, n=6). Para comparação dos camundongos controles C57BL/6 e Berkeley homocigotos, usou-se o teste t Mann-Whitney. Diferença na expressão gênica *ACE1* dos camundongos Berkeley homocigotos em comparação aos camundongos controles C57BL/6, * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

A expressão gênica da enzima conversora de angiotensina tipo 2, *ACE2*, conhecida também como enzima conversora de angiotensina homóloga (ACEH) foi quantificada nos tecidos. Não foram detectadas diferenças significativas na expressão gênica da *ACE2* no rim (Figura 24A), coração (Figura 24B), cérebro (Figura 24C) e fígado (Figura 24D), entre os grupos de camundongos controles C57BL/6 (CCON) e camundongos Berkeley homozigotos (BERK).

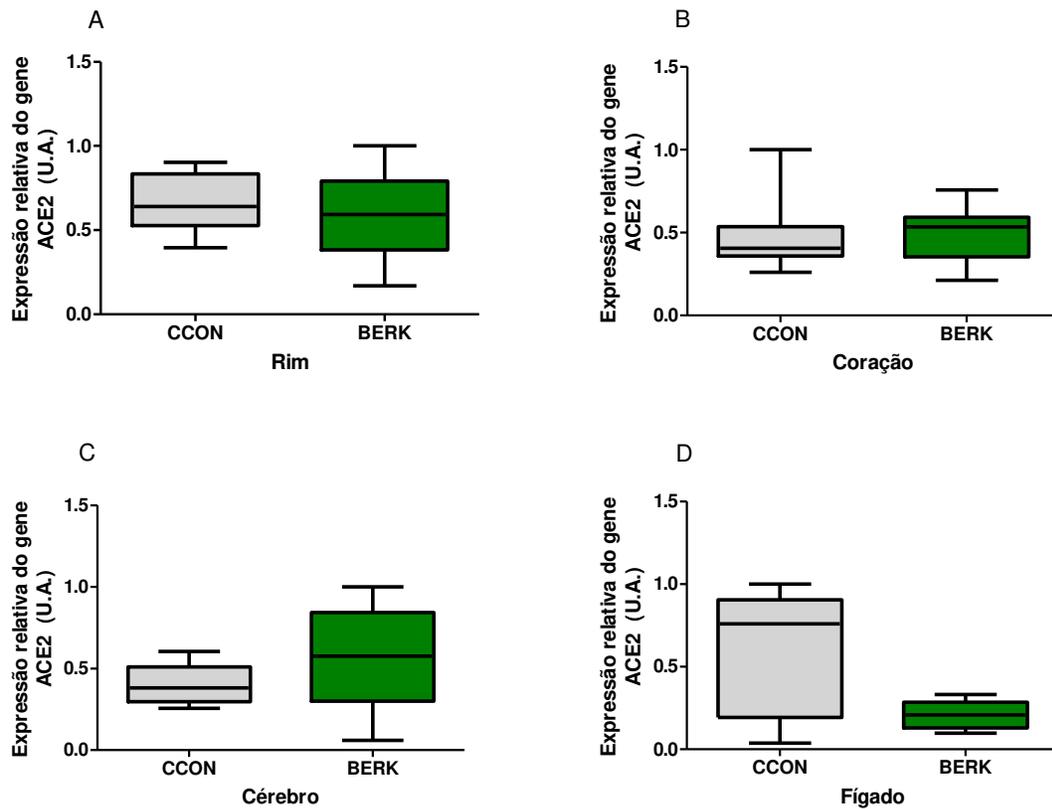


Figura 24. Expressão gênica da *ACE2* nos tecidos: (A) rim, camundongos controles C57BL/6 (CCON, n = 8) e camundongos Berkeley homozigotos (BERK, n=9); (B) coração, camundongos controles C57BL/6 (CCON, n=9) e camundongos Berkeley homozigotos (BERK, n=8); (C) cérebro, camundongos controles C57BL/6 (CCON, n=5) e camundongos Berkeley homozigotos (BERK, n=5); (D) fígado, camundongos controles C57BL/6 (CCON, n=5) e camundongos Berkeley homozigotos (BERK, n=6). Para comparação dos camundongos controles C57BL/6 e Berkeley homozigotos, usou-se o test t Mann-Whitney ($p>0,05$).

Na Tabela 12 estão resumidas as médias obtidas de expressão gênica dos tecidos analisados em camundongos controles C57BL/6 e Berkeley homozigotos.

TABELA 12. Valores médios de expressão gênica dos receptores de angiotensina, *AT1R* e *AT2R*, e enzimas conversoras de angiotensina, *ACE1* e *ACE2* nos tecidos: rim, coração, cérebro e fígado em camundongos controles e camundongos Berkeley homozigotos.

Gene	RIM		CORÇÃO		CÉREBRO		FÍGADO	
	CCON	BERK	CCON	BERK	CCON	BERK	CCON	BERK
<i>AT1R</i>	0,75±0,06	0,44±0,06**	0,67±0,06	0,52±0,09	0,64±0,07	0,81±0,06	0,48±0,11	0,66±0,11
<i>AT2R</i>	0,24±0,07	0,17±0,10	0,51±0,08	0,46±0,15	0,43±0,09	0,63±0,14	0,57±0,20	0,49±0,14
<i>ACE1</i>	0,85±0,03	0,42±0,07***	0,57±0,04	0,48±0,10	0,62±0,08	0,62±0,10	0,13±0,05	0,52±0,15*
<i>ACE2</i>	0,65±0,06	0,59±0,08	0,47±0,07	0,49±0,06	0,39±0,05	0,57±0,15	0,59±0,17	0,20±0,03

Legenda: CCON (Camundongos controles C57BL/6); BERK (Camundongos Berkeley homozigotos); *AT1R* (codifica o receptor de angiotensina tipo 1); *AT2R* (codifica o receptor de angiotensina tipo 2); *ACE1* (codifica a enzima conversora de angiotensina tipo 1); *ACE2* (codifica a enzima conversora de angiotensina tipo 2). **p<0,01; ***p<0,001 comparado ao grupo controle.

5.5. EFEITO DE TRATAMENTO COM HU NOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE ANG II EM CAMUNDONGOS CONTROLES (C57BL/6) E CAMUNDONGOS QUIMERAS DE AF

Para verificar uma possível atuação da HU no SRA, foram utilizados os camundongos quimeras de AF, nos quais foram tratados com HU em duas concentrações diferentes (50 e 75 mg/kg/dia). Também foram utilizados camundongos C57BL/6 como controles.

5.5.1. EFEITO DE HU NOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS DE CAMUNDONGOS CONTROLES (C57BL/6) E CAMUNDONGOS QUIMERAS DE AF

A Figura 25 mostra as contagens de leucócitos (Figura 25A), eritrócitos (Figura 25B) e plaquetas (Figura 25C) nos camundongos controles C57BL/6, nos camundongos quimeras de AF sem tratamento de HU (CAF) e nos camundongos quimeras de AF após tratamento com HU (por via intraperitoneal), em duas concentrações diferentes de 50 mg/kg/dia e 75 mg/kg/dia (CAF50 e CAF75, respectivamente). A duração do tratamento dos camundongos com a HU foi de 4 semanas (cinco vezes por semana).

A contagem de leucócitos (Figura 25A) dos CAF foi elevada em comparação aos CAF com tratamento de HU em 50 mg/kg/dia e 75 mg/kg/dia e CCON. A maior diferença na contagem de leucócitos foi com relação aos CAF sem tratamento de HU com o grupo controle ($p=0,0119$). A HU reduziu a concentração de leucócitos durante o tratamento nos CAF, sendo detectada uma diferença significativa entre os grupos de CAF sem tratamento de HU e o grupo de CAF com o tratamento de 50 mg/kg/dia de HU ($p<0,05$). Pôde-se observar que houve diferença na contagem de eritrócitos (Figura 25B) entre o grupo de CCON e CAF ($p=0,0079$), sendo menor no grupo CAF. Nos camundongos AF tratados com HU (75mg/kg/dia) houve ainda uma redução na contagem de eritrócitos (Figura 25B; $p<0,05$ comparado aos CAF). Não houve diferença significativa no número de plaquetas nos camundongos AF comparado aos camundongos controles, no entanto a contagem de plaquetas foi reduzido após tratamento dos camundongos AF com HU de 75 mg/kg/dia (CAF75, $p<0,05$, comparado ao grupo CCON).

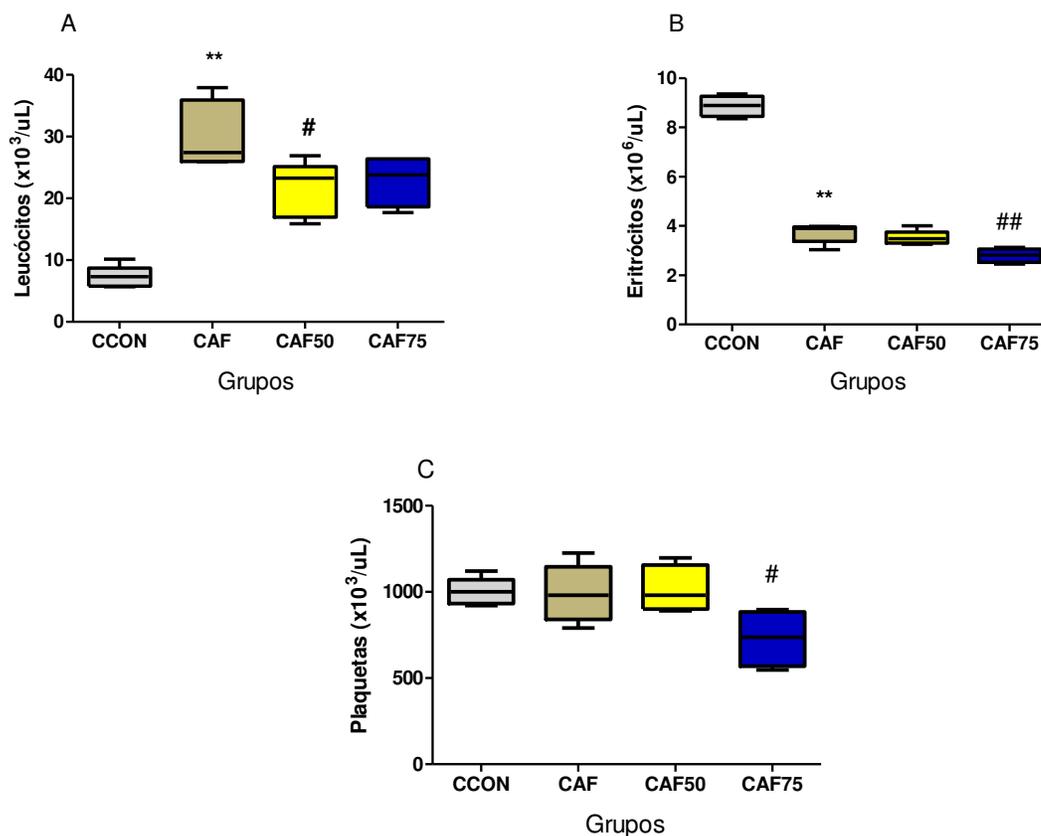


FIGURA 25. Contagens de leucócitos (A), eritrócitos (B) e plaquetas (C) nos camundongos controles C57BL/6 (CCON, n=5), camundongos quimeras de AF sem tratamento (CAF, n=5) e camundongos quimeras de AF com tratamento de HU (CAF50, 50 mg/kg/dia, n=5 e CAF75, 75 mg/kg/dia, n=4). Para comparação dos camundongos CCON e CAF, usou-se o test t Mann-Whitney. Na comparação entre os camundongos CAF, usou-se o One-way ANOVA. Dos camundongos em tratamento em comparação com CAF, usou-se o ANOVA com o pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ comparação entre CAF e CCON; # $p < 0,05$, comparação entre CAF e CAF50; ** $p < 0,01$, comparação entre o CAF e CCON; ## $p < 0,01$ comparação entre CAF e CAF75.

A Figura 26A mostra os valores de hemoglobina nos CCON e CAF sem tratamento e após tratamento de HU nas duas concentrações, 50 mg/kg/dia e 75 mg/kg/dia. Observou-se que no grupo dos CAF, independente do tratamento com HU, os camundongos quimeras de AF apresentaram baixas concentrações de hemoglobina em comparação ao grupo CCON ($p=0,0079$). Em relação aos CAF, o tratamento com HU na concentração de 75 mg/kg diminuiu a concentração de hemoglobina ($p=0,02$, comparado ao grupo AF sem HU). Os índices

hematimétricos, Volume Corpuscular Médio (Figura 26B), Hemoglobina Corpuscular Média (Figura 26C) e de Hemoglobina Corpuscular Média (Figura 26C) dos CCON, CAF sem tratamento de HU e CAF com tratamento de HU nas concentrações de 50 mg/kg e 75 mg/kg, CAF50 e CAF75, respectivamente, estão exibidos na Figura 26. Para os valores de VCM e HCM obtidos, houve diferença entre os grupos CCON e CAF sem tratamento de HU, sendo o VCM maior no CAF sem tratamento ($p=0,01$). Por outro lado, os CAF sem tratamento apresentaram baixos níveis de HCM em relação ao grupo de CCON ($p=0,01$). Entre os grupos CAF, o VCM não apresentou nenhuma diferença. No HCM, houve diferença significativa nos dois grupos com tratamento de 50 mg/kg e 75 mg/kg de HU em comparação ao grupo CAF sem tratamento, $p<0,01$ e $p<0,0001$, respectivamente, sendo maiores nos grupos que fizeram o tratamento com a HU. Na quantificação de CHCM, o grupo CAF sem tratamento de HU apresentou diferença quando comparado ao grupo CCON ($p=0,008$). Não houve nenhuma diferença significativa para CHCM entre os grupos CAF sem e com tratamento de HU.

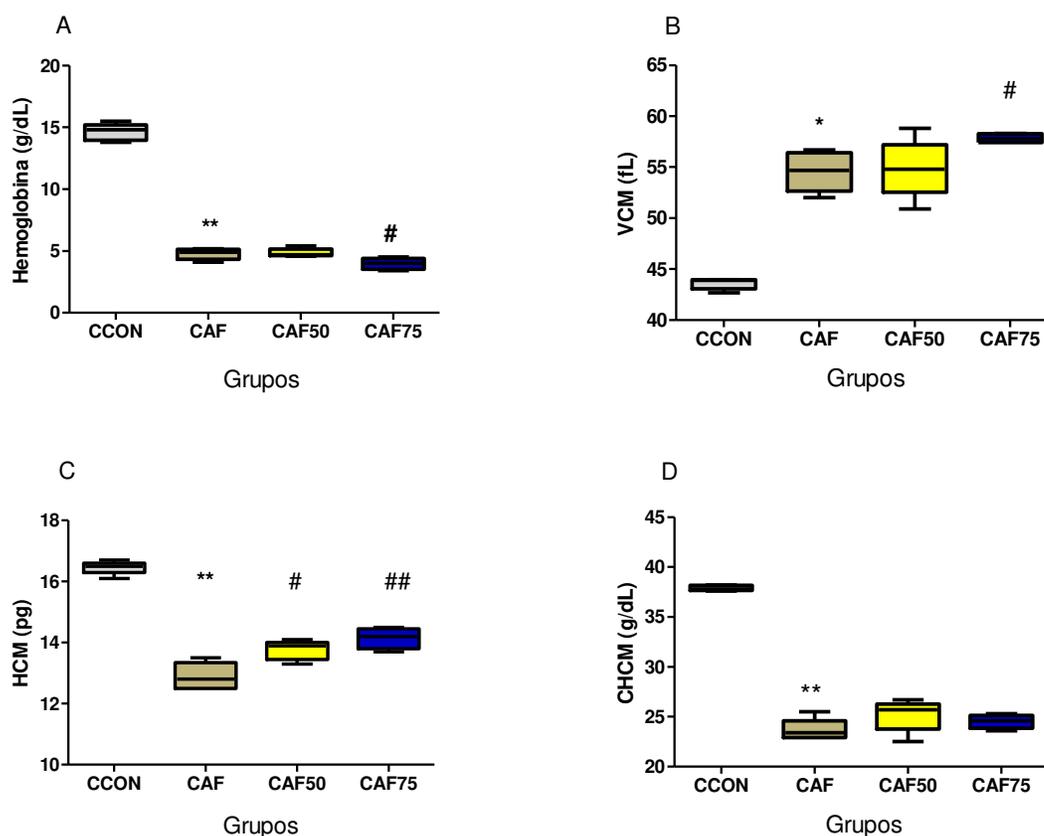


FIGURA 26. Quantificação de hemoglobina (A) e dos índices hematimétricos, VCM (B), HCM (C) e CHCM (D) nos camundongos controles C57BL/6 (CCON, n=5), camundongos quimeras de AF sem tratamento (CAF, n=5) e camundongos quimeras de AF com tratamento de HU (CAF50, 50 mg/kg/dia, n=5 e CAF75, 75 mg/kg/dia, n=4). Para comparação dos camundongos controles CCON e CAF, usou-se o test t Mann-Whitney. Na comparação entre os CAF, usou-se o One-way ANOVA e o pós-teste de Bonferroni. VCM = Volume Corpuscular Médio. HCM = Hemoglobina Corpuscular Média. CHCM = Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média. * p<0,05 comparação entre CAF e CCON; # p<0,05, comparação entre CAF e CAF50; ** p<0,01, comparação entre CAF e CCON; ### p<0,001 comparação entre CAF e CAF75.

A tabela 13 mostra os índices hematológicos dos camundongos controles C57BL/6, CAF sem tratamento de HU e após tratamento de HU nas concentrações de 50 mg/kg/dia e 75 mg/kg/dia.

TABELA 13. Dados hematológicos dos camundongos controles C57BL/6 e camundongos quimeras AF com ou sem tratamento de HU.

Parâmetros	CCON (n=5)	CAF		
		Sem tratamento de HU (n=5)	CAF50 (n=5)	CAF75 (n=4)
Leucócitos (x10 ³ /uL)	7,24 (7,3/5,7/10,1)	30,20 ** (27,38/25,87/37,89)	21,47 # (23,26/15,86/26,88)	22,91 (23,79/17,69/26,39)
Eritrócitos (x10 ⁶ /uL)	8,86 (8,89/8,35/9,35)	3,71 ** (3,9/3,04/3,99)	3,52 (3,48/3,26/4,00)	2,80 ## (2,82/2,45/3,13)
Plaquetas (x10 ³ /uL)	1001 (1000/921/1121)	991 (982/790/1225)	1012 (981/891/1198)	730 # (738/548/898)
Hemoglobina (g/dL)	14,62 (14,8/13,8/15,5)	4,78 ** (4,9/4,1/5,2)	4,86 (4,7/4,6/5,4)	3,97 # (4,00/3,4/4,5)
VCM (fL)	43,59 (43,91/42,68/43,97)	54,56 * (54,7/52/56,7)	54,86 (54,8/50,9/58,8)	57,83 # (57,8/57,4/58,3)
HCM (pg)	16,46 (16,5/16,1/16,7)	12,90 ** (12,8/12,5/13,5)	13,76 # (13,9/13,3/14,1)	14,15 ## (14,2/13,7/14,5)
CHCM (g/dL)	37,88 (37,8/37,6/38,2)	23,68 ** (23,4/22,9/25,5)	25,14 (25,7/22,5/26,7)	24,52 (24,6/23,6/25,3)

Legenda: Valores expressos em Média (Mediana/Mínima/Máxima). CCON = Camundongos controles C57BL/6. CAF = Camundongos quimeras AF. CAF50 = Camundongos quimeras de AF com tratamento de HU por 4 semanas (50 mg/kg/dia). CAF75 = Camundongos quimeras de AF com tratamento de HU por 4 semanas (75 mg/kg/dia). VCM = Volume Corpuscular Médio. HCM = Hemoglobina Corpuscular Média. CHCM = Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média. Valores comparados com grupo controle com teste t Mann-Whitney. *p<0,05; ** p<0,01), comparado com camundongos controles. #p<0,01; ##p<0,05, comparado com camundongos quimeras AF sem tratamento de HU.

5.5.2. EFEITO DE HU NOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE ANG II EM CAMUNDONGOS CONTROLES (C57BL/6) E CAMUNDONGOS QUIMERAS DE AF

A Figura 27 mostra níveis plasmáticos de Ang II nos camundongos CCON, nos CAF sem tratamento de HU e nos CAF com tratamento de HU, nas duas concentrações de 50 mg/kg/dia e 75 mg/kg/dia (CAF50 e CAF75, respectivamente). Nos grupos CAF, o tratamento com a HU na concentração de 75 mg/kg/dia aumentou os níveis plasmáticos de Ang II em comparação ao grupo de CAF sem tratamento e ao grupo CAF com tratamento de HU na concentração de 50 mg/kg/dia ($p=0,02$, comparado ao grupo CAF sem tratamento). Não foi detectada diferença significativa nos níveis plasmáticos de Ang II entre os camundongos CCON e CAF sem tratamento de HU, devido à variação de níveis de Ang II nestes animais controles.

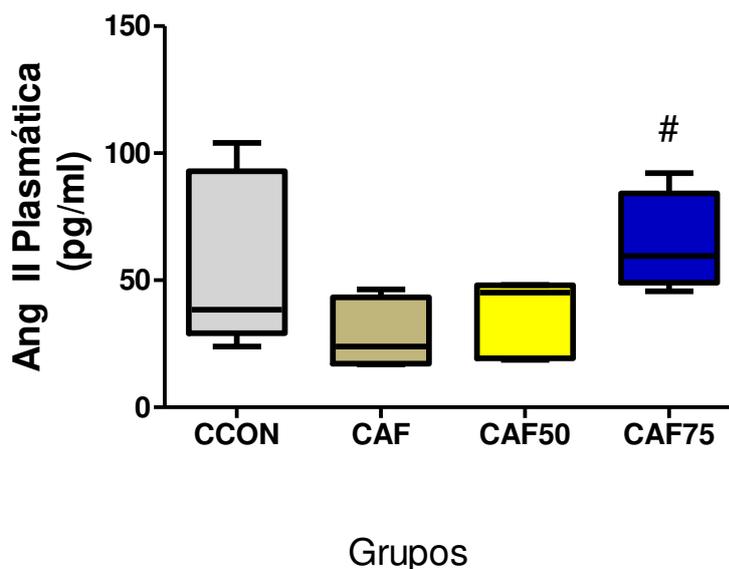


FIGURA 27. Concentração de Ang II no plasma de camundongos controles C57BL/6 (CCON, $n=5$), camundongos quimeras de AF sem tratamento de HU (CAF, $n=5$), camundongos quimeras de AF com tratamento de HU nas duas concentrações de 50 mg/kg/dia (CAF50, $n=5$) e 75 mg/kg/dia (CAF75, $n=4$). A duração do tratamento dos camundongos com a HU foi de 4 semanas (cinco dias por semana). Para comparação dos camundongos CCON e CAF, usou-se o test t Mann-Whitney. Na comparação entre os CAF, usou-se o One-way ANOVA com o pós-teste de Bonferroni. # $p<0,05$, comparando CAF75 com CAF.

5.5.3. EFEITO DA HU NA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS AO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA EM CAMUNDONGOS CONTROLES (C57BL/6) E CAMUNDONGOS QUIMERAS DE AF

Com o objetivo de verificar a influência de HU na expressão gênica dos receptores, *AT1R* e *AT2R*, e enzimas conversoras de angiotensina, *ACE1* e *ACE2*, foram utilizados os seguintes tecidos: rim, coração, cérebro, pulmão, baço e fígado dos camundongos controles C57BL/6 (CCON) e camundongos quimeras de AF (CAF).

A Figura 28 mostra a determinação da expressão gênica do receptor de angiotensina II tipo 1, *AT1R*, responsável pelas atividades pró-inflamatórias de Ang II, nos tecidos: Rim (A), Coração (B), Cérebro (C), Pulmão (D), Baço (E) e Fígado (F). Foi observada diferença na expressão dos genes que codificam o receptor *AT1R* apenas em dois tecidos, coração e fígado. No coração, a expressão gênica de *AT1R* foi superior no grupo CAF75 quando comparada ao grupo CAF ($p=0,01$). Além disso, o fígado dos camundongos CCON apresentou baixa expressão do gene que codifica o receptor *AT1R* ($p=0,02$) quando comparada com os CAF, independente do tratamento.

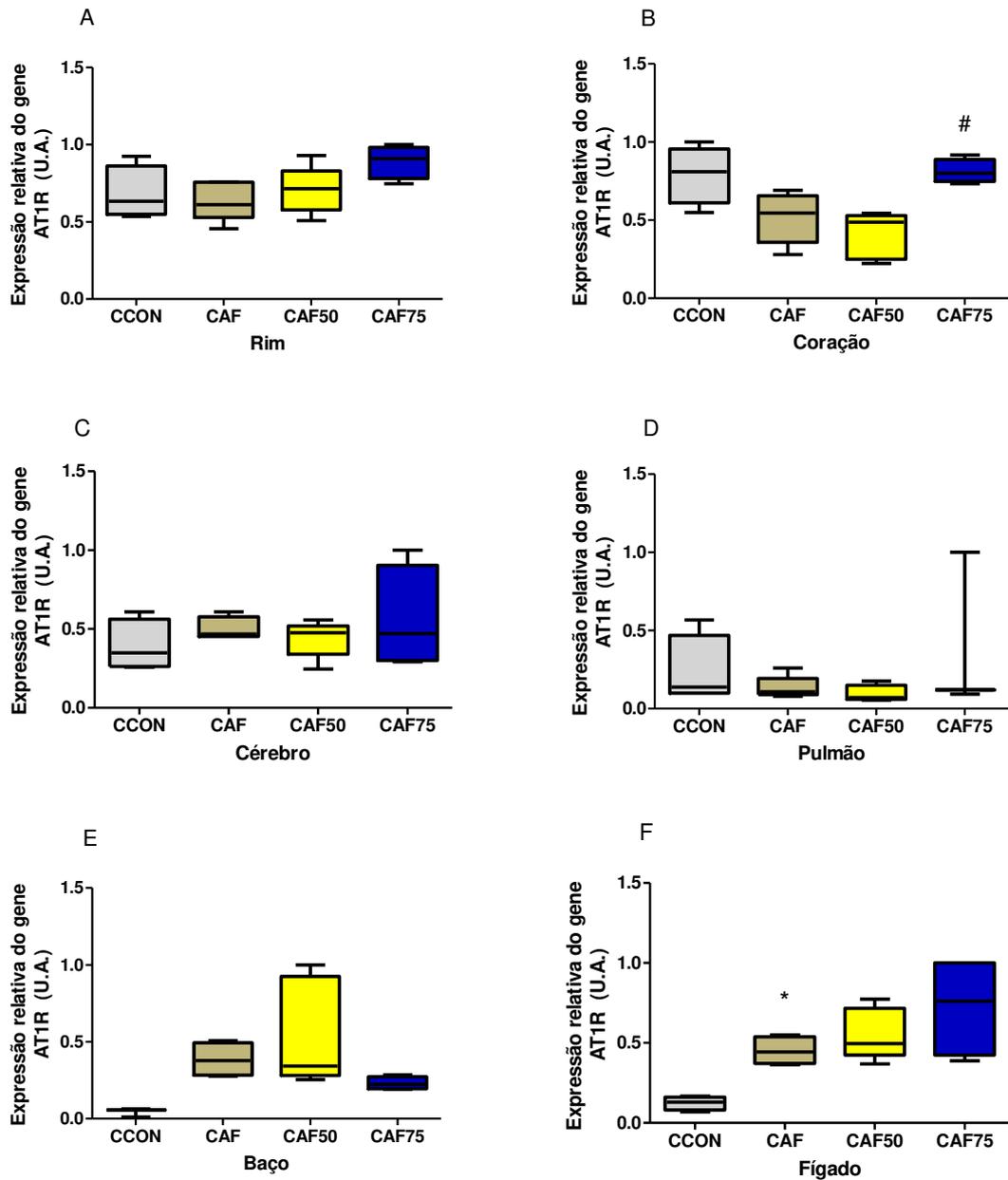


FIGURA 28. Expressão gênica do *AT1R* nos tecidos: (A) Rim; (B) Coração; (C) Cérebro; (D) Pulmão; (E) Baço; (F) Fígado. Amostras obtidas dos camundongos controles C57BL/6 (CCON, n=5), camundongos quimeras AF sem tratamento (CAF, n=5) e camundongos quimeras de AF com tratamento de HU (CAF50, 50 mg/kg/dia, n=5 e CAF75, 75 mg/kg/dia, n=4) por 4 semanas. Para comparação dos CCON e CAF, usou-se o test t Mann-Whitney. Na comparação entre os CAF, usou-se o One-way ANOVA com o pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$; comparado com os camundongos controles. # $p < 0,05$, comparado com os camundongos quimeras AF sem tratamento.

A Figura 29 mostra a quantificação da expressão do gene que codifica o receptor de angiotensina tipo 2, AT2R, que possui função oposta de AT1R e exibe propriedades vasodilatadoras quando é ativado pela Ang II. A expressão gênica do *AT2R* foi determinada nos seguintes tecidos: Rim (A), Coração (B), Cérebro (C), Pulmão (D), Baço (E) e Fígado (F) dos camundongos CCON, CAF sem tratamento de HU (CAF, n=5), CAF com tratamento de HU nas duas concentrações diferentes: 50 mg/kg/dia (CAF50, n=5) e 75 mg/kg/dia de HU (CAF75, n=4). Nenhum tecido analisado apresentou diferenças significativas entre os grupos. A quantificação da expressão do gene que codifica o receptor AT2R não apresentou boa reprodutibilidade em alguns tecidos e os resultados não foram reportados para todos os animais.

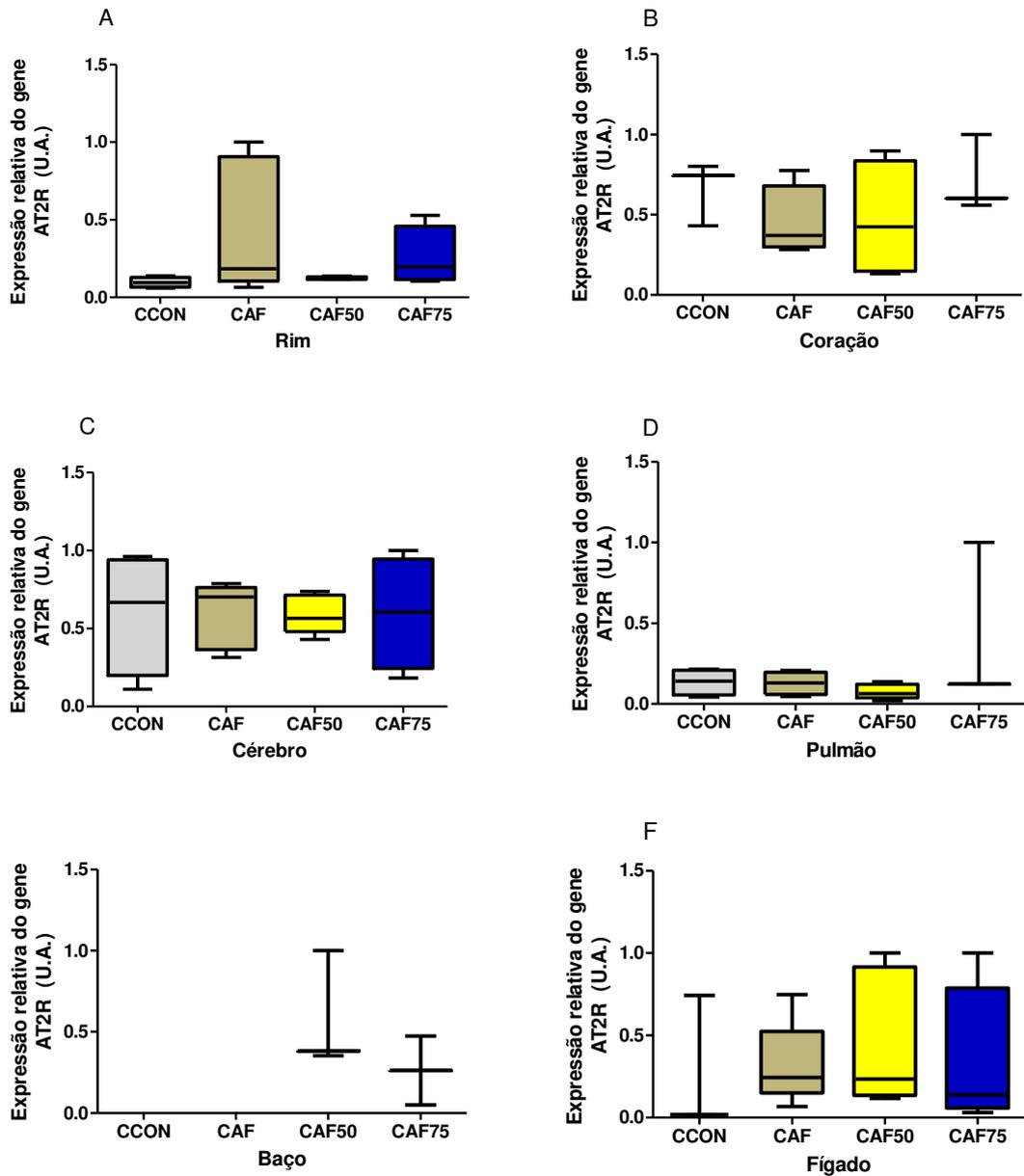


FIGURA 29. Expressão gênica do *AT2R* nos tecidos: (A) Rim; (B) Coração; (C) Cérebro; (D) Pulmão; (E) Baço e (F) Fígado. Amostras obtidas dos camundongos controles C57BL/6 (CCON, n=5), camundongos quimeras de AF sem tratamento (CAF, n=5) e camundongos quimeras de AF com tratamento de HU (CAF50, 50 mg/kg/dia, n=5 e CAF75, 75 mg/kg/dia, n=4) por 4 semanas. Para comparação dos CCON e CAF sem tratamento com HU, usou-se o test t Mann-Whitney. Na comparação entre os CAF, usou-se o One-way ANOVA com o pós-teste de Bonferroni ($p > 0,05$).

A determinação da expressão gênica que codifica a ACE1, responsável pela conversão de Ang I em Ang II, foi feita nos seguintes tecidos: Rim (A), Coração (B), Cérebro (C), Pulmão (D), Baço (E) e Fígado (D) (Figura 30). Entre os tecidos analisados, o rim (Figura 30A) apresentou diferença significativa entre os grupos CAF sem tratamento de HU com o de CCON ($p < 0,05$), onde uma menor expressão gênica da *ACE1* foi observada nos CAF, comparado ao grupo CCON. Além do rim, o coração (Figura 30B) também apresentou diferença na expressão do gene da *ACE1* entre os CAF, sendo mais baixa para aqueles que não fizeram tratamento com HU em comparação aos CCON ($p < 0,05$). Como já observado anteriormente nos resultados de expressão gênica da *ACE1* de fígado de CCON e camundongos Berkeley homozigotos, a expressão gênica da *ACE1* também apresentou uma expressão menor nos camundongos controles C57BL/6 quando comparada aos CAF sem tratamento (Figura 30F). O tratamento com a HU não influenciou a expressão gênica da *ACE1*.

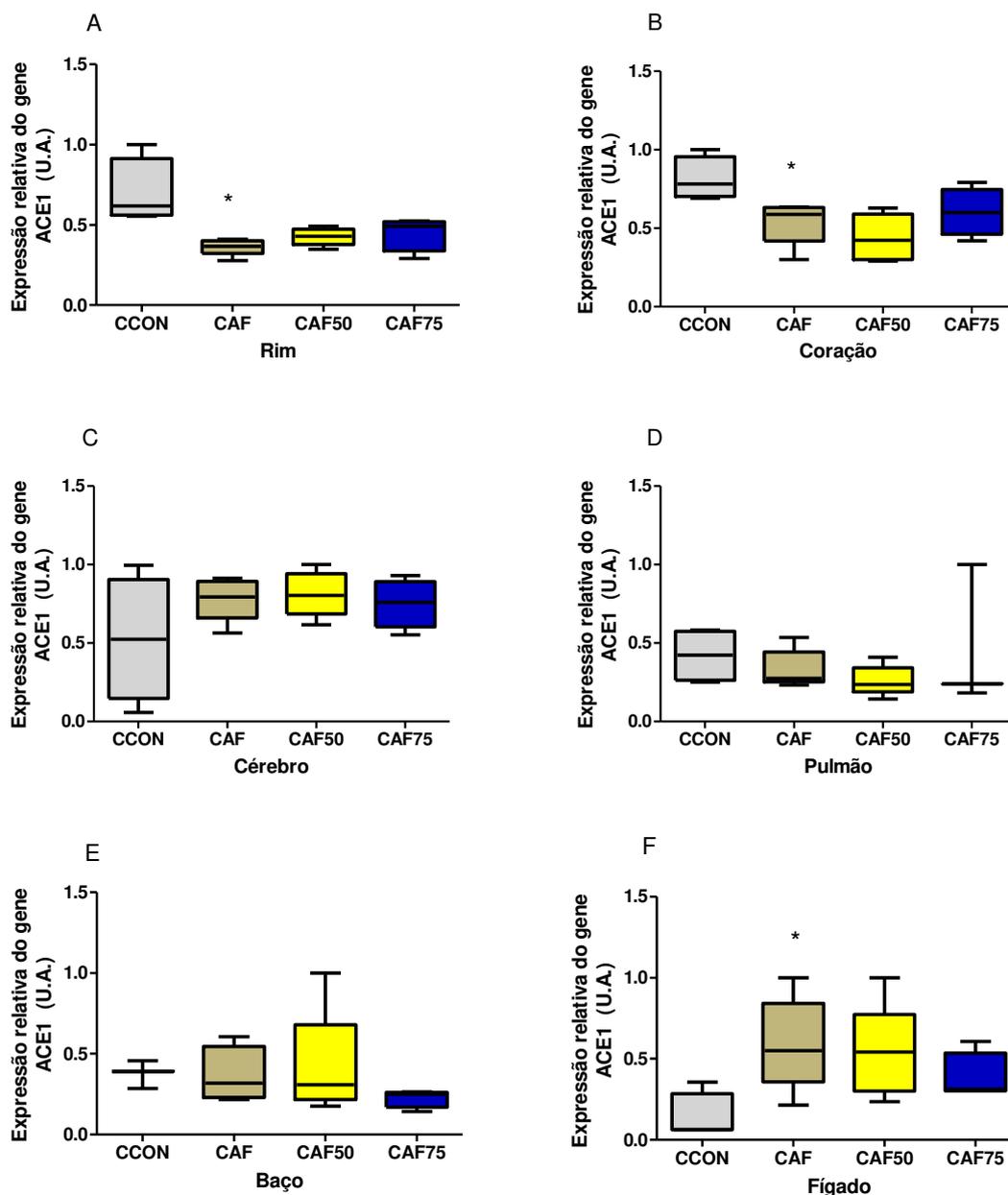


FIGURA 30. Expressão gênica da *ACE1* nos tecidos: (A) Rim; (B) Coração; (C) Cérebro; (D) Pulmão; (E) Baço; (F) Fígado. Amostras obtidas dos camundongos controles C57BL/6 (CCON, n=5), camundongos quimeras de AF sem tratamento (CAF, n=5) e camundongos quimeras de AF com tratamento de HU (CAF50, 50 mg/kg/dia, n=5 e CAF75, 75 mg/kg/dia, n=4) por 4 semanas. Para comparação dos CCON e CAF, usou-se o test t Mann-Whitney. Na comparação entre os CAF, usou-se o One-way ANOVA com o pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$, comparado com os camundongos controles C57BL/6.

A enzima conversora de Ang II tipo 2, ACE2, também conhecida como enzima conversora de angiotensina homóloga (ACEH), é responsável pela conversão de Ang II em Ang (1-7). A Figura 31 exibe a quantificação da expressão gênica da *ACE2* nos tecidos: Rim (A), Coração (B), Cérebro (C), Pulmão (D), Baço (E) e Fígado (F), em camundongos tratados ou não com HU (50 e 75 mg/kg/dia). No rim, os camundongos CAF apresentaram níveis de expressão menores da *ACE2* em relação aos camundongos CCON ($p < 0,05$). No coração, também foi observado níveis de expressão menores de *ACE2* nos CAF sem tratamento de HU, comparado aos camundongos CCON ($p < 0,05$), no entanto não foi observado um efeito significativo da terapia com HU na expressão deste gene neste tecido. Contrariando ao que foi observado nos rim e coração, no fígado, a expressão gênica da *ACE2* nos CAF foi superior quando comparado aos CCON ($p < 0,05$); no entanto não foi observado um efeito significativo da terapia com HU na expressão deste gene neste tecido.

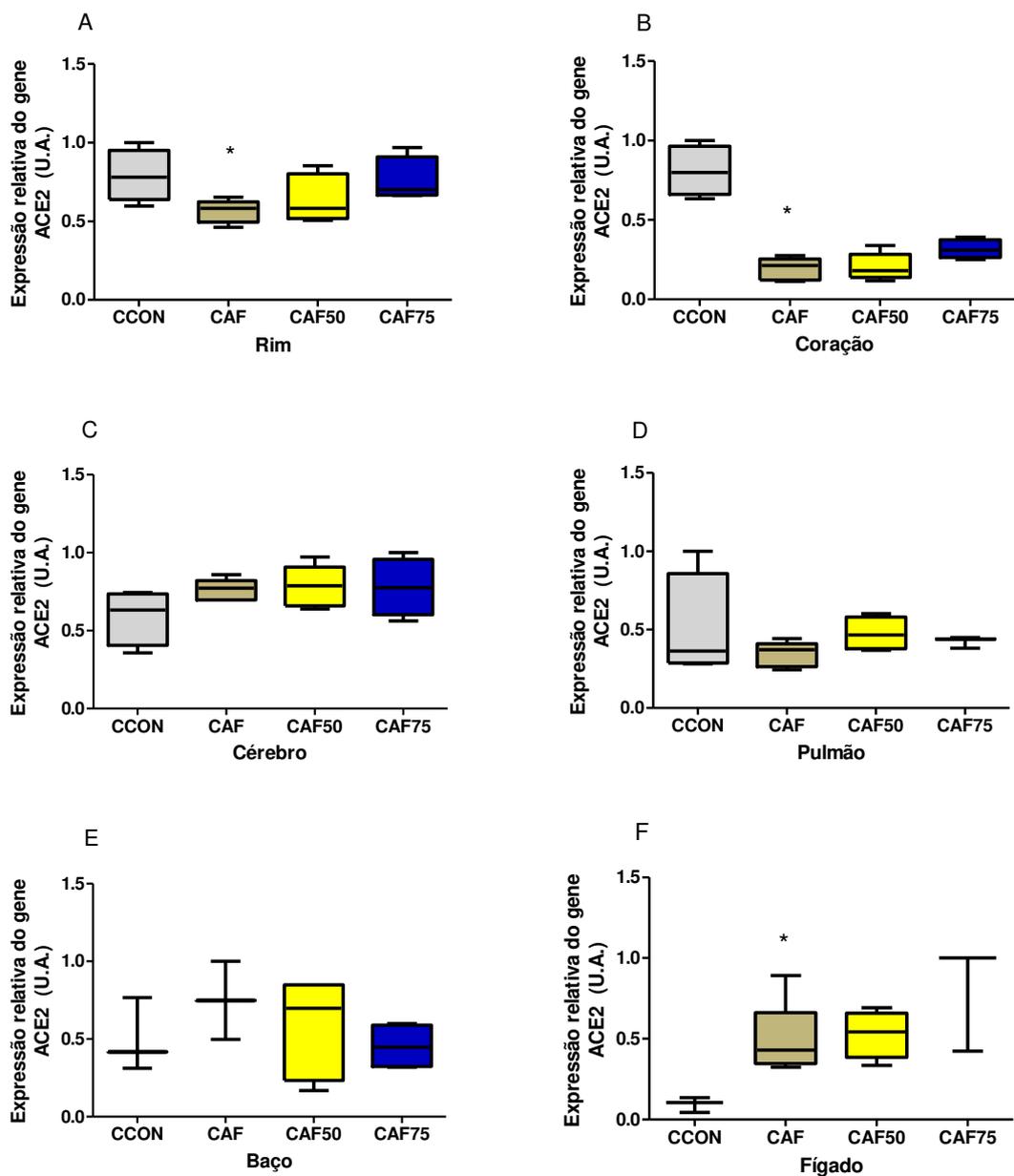


FIGURA 31. Expressão gênica da *ACE2* nos tecidos: (A) Rim; (B) Coração; (C) Cérebro; (D) Pulmão; (E) Baço; (F) Fígado. Amostras obtidas dos camundongos controles C57BL/6 (CCON, n=5), camundongos quimeras de AF sem tratamento (CAF, n=5) e camundongos quimeras de AF com tratamento de HU (CAF50, 50 mg/kg/dia, n=5 e CAF75, 75 mg/kg/dia, n=4) por 4 semanas. Para comparação dos camundongos CCON e CAF, usou-se o test t Mann-Whitney. Dos camundongos em tratamento em comparação com CAF, usou-se o ANOVA com o pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$, comparando com o grupo controle C57BL/6.

A Tabela 14 apresenta os valores médios obtidos para a expressão dos genes *AT1R*, *AT2R*, *ACE1* e *ACE2* nos tecidos, rim, cérebro, coração, pulmão e fígado dos camundongos CCON e CAF sem e com tratamento com HU.

TABELA 14. Valores médios de expressão gênica de *AT1R*, *AT2R*, *ACE1* e *ACE2* nos tecidos: rim, coração, cérebro, pulmão e fígado em camundongos controles e camundongos quimeras de AF.

		<i>AT1R</i>	<i>AT2R</i>	<i>ACE1</i>	<i>ACE2</i>
RIM	CCON	0,682±0,08	0,09±0,01	0,698±0,10	0,789±0,08
	CAF	0,636±0,05	0,441±0,19	0,362±0,02*	0,564±0,03*
	CAF50	0,705±0,06	0,123±0,01	0,427±0,02	0,644±0,06
	CAF75	0,891±0,05	0,256±0,09	0,449±0,05	0,758±0,07
CORÇÃO	CCON	0,792±0,09	0,659±0,11	0,813±0,06	0,807±0,07
	CAF	0,515±0,07	0,450±0,11	0,537±0,06*	0,192±0,03*
	CAF50	0,408±0,06	0,470±0,18	0,441±0,06	0,203±0,03
	CAF75	0,811±0,03#	0,721±0,13	0,603±0,07	0,315±0,02
CERÉBRO	CCON	0,391±0,08	0,602±0,19	0,525±0,19	0,590±0,08
	CAF	0,452±0,03	0,318±0,11	0,589±0,12	0,488±0,10
	CAF50	0,554±0,07	0,466±0,18	0,537±0,12	0,528±0,07
	CAF75	0,727±0,15	0,327±0,22	0,383±0,07	0,807±0,19
PULMÃO	CCON	0,234±0,11	0,135±0,04	0,420±0,08	0,502±0,16
	CAF	0,134±0,03	0,127±0,03	0,334±0,05	0,344±0,03
	CAF50	0,09±0,02	0,07±0,02	0,259±0,04	0,477±0,04
	CAF75	0,40±0,29	0,415±0,29	0,475±0,26	0,423±0,02
FÍGADO	CCON	0,123±0,02	0,260±0,24	0,136±0,07	0,09±0,02
	CAF	0,505±0,03*	0,591±0,09	0,790±0,06*	0,761±0,03*
	CAF50	0,439±0,05	0,590±0,05	0,811±0,06	0,783±0,05
	CAF75	0,558±0,16	0,598±0,18	0,751±0,07	0,778±0,09

Legenda: * $p < 0,05$, comparado com os camundongos controles C57BL/6 (test T Mann-Whitney); # $p < 0,05$, comparado com os camundongos quimeras AF sem tratamento de HU (ANOVA/Bonferroni).

6. DISCUSSÃO

O sistema renina-angiotensina (SRA) é um complexo multienzimático composto pelas enzimas que degradam peptídeos a partir do substrato principal, o angiotensinogênio. A produção de peptídeos resultantes tem resposta diferenciada quando ativam os receptores do sistema. Os peptídeos do SRA possuem função endócrina, parácrina e intrácrina (FYHRQUIST & SAIJONMAA, 2008).

A Ang II é um octapeptídeo produzido pelo substrato angiotensinogênio, resultante da clivagem iniciada pela renina, gerando angiotensina I e seguida pela enzima conversora de angiotensina (ACE). A Ang II circulante contribui para o aumento da pressão arterial e retenção de sódio e água (BREWSTER & PERAZELLA, 2004). Possui ainda efeito pró-inflamatório proliferativo e atividade pró-fibrótica, participando na produção de espécies reativas de oxigênio, crescimento celular, apoptose, remodelamento da matriz extracelular, migração e diferenciação celular (RUSTER & WOLF, 2006).

Os indivíduos portadores de anemia falciforme são mais propensos a apresentarem disfunção endotelial, produção de citocinas inflamatórias e moléculas de adesão, contribuindo com inflamação no local (HEBBEL et al., 1980; CHIANG & FRENETTE, 2005; STEINBERG, 2006). O presente trabalho objetivou a investigação das alterações do SRA em indivíduos portadores de anemia falciforme e efeitos de terapia com hidroxureia (HU). A HU é um medicamento amplamente utilizado por estes indivíduos e tem por função aumentar a produção de hemoglobina fetal (CHARACHE et al., 1995), podendo também aumentar a biodisponibilidade do óxido nítrico, composto vasodilatador (KING, 2003).

Na análise da Ang II determinada nos indivíduos portadores de AF com e sem tratamento de HU, não foi detectada diferença significativa entre estes grupos quando comparados aos indivíduos controles. A média de Ang II nos indivíduos portadores de AF sem uso de HU foi um pouco elevada quando comparada ao indivíduos usuários de HU e indivíduos controles, porém sem diferença estatística. Contrariando os resultados em humanos, os camundongos AF apresentaram baixos níveis de Ang II, sendo que, os tratados com HU, demonstraram aumento na produção de Ang II.

Sabe-se que indivíduos portadores de AF apresentam, de forma geral, medidas de pressão arterial diminuídas em comparação aos indivíduos saudáveis. Dado o fato que drogas inibidoras da produção e ação de Ang II são utilizadas com intuito de diminuir a pressão arterial entre outros efeitos, estudos futuros poderiam esclarecer se alterações nos componentes do SRA teriam participação neste fenômeno (pressão arterial) na AF.

A inabilidade de verificar diferenças nas concentrações plasmáticas de Ang II em indivíduos portadores de AF comparado aos indivíduos controles, sugere uma variabilidade de fatores pré-existentes que podem influenciar na concentração de Ang II, como prática de atividades físicas, estresse, predisposição genética, etc.; enquanto nos camundongos, a variação foi mínima permitindo o equilíbrio na concentração de Ang II.

Por ser um hormônio vasoconstritor, a Ang II está relacionada à inflamação em resposta à disfunção endotelial e liberação de mediadores de inflamação, incluindo moléculas de adesão, quimocinas e citocinas (RUIZ-ORTEGA et al., 2001). Esperávamos que, devido à disfunção endotelial associada à AF, os níveis de Ang II nos indivíduos portadores de AF sem tratamento de HU fossem elevados em comparação aos indivíduos controles e indivíduos portadores de AF com uso de HU. No entanto, em seu estudo, DANSER (2003) observou que a concentração de Ang II plasmática não necessariamente reflete a mesma do sistema vascular, pela presença de SRA em tecidos que possuem a própria regulação.

A quantificação da ACE plasmática nos indivíduos portadores de AF sem uso de HU foi significativamente inferior a dos indivíduos controle, indicando possivelmente danos aos sistemas renal e pulmonar, sítios principais de produção da ACE (BERNSTEIN et al., 2013), podendo contribuir para diminuição dos níveis desta enzima, inclusive a produção de Ang II. Os inibidores de ACE são utilizados como anti-hipertensivos (CASAS et al., 2005; SONG et al., 2006; KRUM & GILBERT, 2007) e também reduzem a expressão de células inflamatórias, moléculas de adesão e produção de citocinas e quimocinas (RUIZ-ORTEGA et al., 2001). Indivíduos portadores de AF geralmente apresentam pressão arterial relativamente baixa em comparação com indivíduos saudáveis (JOHNSON & GIORGIO, 1981; PEGELOW et al., 1997)

e estudos maiores poderiam nos dizer se alterações nos níveis de ACE, e portanto Ang II, poderiam participar deste fenômeno.

Em processos inflamatórios, a Ang II influencia a permeabilidade vascular pela via das prostaglandinas e fator de crescimento endotelial vascular (WILLIAMS et al., 1995). Também causa adesão dos monócitos e neutrófilos ao endotélio e às células mesengiais (KREJCY et al., 1996). Estimula a produção de moléculas de adesão, tais como, P-selectina, sICAM-1 e sVCAM-1 nas células endoteliais vasculares e células musculares lisas (PUEYO et al., 2000). Nos experimentos realizados, apesar da atividade de Ang II na ativação endotelial, não houve nenhuma correlação de Ang II com a sICAM-1 e sVCAM-1 nos indivíduos controles nem nos indivíduos portadores de AF, independentemente do tratamento com HU. PASTORE et al. (1999) relataram que a Ang II regula a expressão gênica de ICAM-1, favorecendo a liberação de sICAM-1 das HUVECs. A ação é anulada quando é utilizado um bloqueador de AT1R e não o antagonista do AT2R, PD12319.

A Ang II induz a disfunção endotelial através do aumento da produção de ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), inativando NO (NAKANE et al., 2000). O NO antagoniza os efeitos de Ang II no tônus vascular, inibindo a síntese de ACE e AT1R (ICHIKI et al., 1998). A inibição da síntese de NO pela L-NAME (N-nitro-L-arginina-metil-ester) favorece a produção de radical $O_2^{\bullet-}$, o aumento de atividade enzimática ACE nos endotélios e acentua a expressão de AT1R, contribuindo para a hipertrofia vascular (USUI et al., 1999). Apesar de NO possuir função oposta de Ang II, não foi detectada nenhuma associação entre as duas vias no plasma de indivíduos portadores de AF, porém a Ang II teve correlação negativa com GMPc, mensageiro secundário importante de NO, apresentando correlação significativa no grupo SS. Este fato pode ser explicado pelo aumento de GMPc que possui efeito inibidor da via enzima proteína quinase-G (PKG), envolvendo a via de MAPK e atuando como modulador negativo em relação a concentração de Ang II (FIEDLER & WOLLERT, 2004). Assim podemos sugerir que, nos indivíduos portadores de AF sem uso de HU, a sinalização dependente em GMPc pode ter um efeito repressor na produção de Ang II, ou vice-versa, apesar que, a quantificação de GMPc no plasma não necessariamente reflete a formação desta molécula nos

tecidos. No entanto, há necessidade de mais estudos para verificar esta hipótese.

Do mesmo modo ao que foi visto com a Ang II, não foi detectada diferença significativa de ET-1, um potente vasoconstritor, em indivíduos portadores de AF quando comparado ao grupo controle. A Ang II mostrou uma correlação positiva com a ET-1 em indivíduos portadores de AF com uso de HU. A Ang II e a ET-1 estão envolvidas na inflamação quando a via de NF- κ B é ativada. Assim como a Ang II, a ET-1 é um potente mediador de inflamação, e induz o estresse oxidativo, remodelamento vascular e disfunção endotelial (AMIRI et al., 2004). Segundo BRUN et al. (2003), a HU exerce influência na redução da expressão gênica de ET-1 em culturas de células endoteliais humanas; e também tem sido relatado a elevação de ET-1 em indivíduos portadores de AF durante as crises vaso-oclusivas.

As interleucinas, IL-6 e IL-8, apresentaram níveis maiores nos indivíduos portadores de AF quando comparados aos indivíduos controles indicando um estado inflamatório crônico e ativação endotelial nestes pacientes, pois a ativação da via de NF- κ B pela Ang II leva à produção das citocinas inflamatórias, a IL-6 e IL-8 (SHURK et al., 2004). No presente trabalho, não foi detectada nenhuma correlação entre os níveis plasmáticos de Ang II com a IL-6 e IL-8 em indivíduos portadores de AF, sendo verificada uma correlação negativa somente nos indivíduos controles entre Ang II e IL-8.

O inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1, PAI-1, foi encontrado em níveis elevados em indivíduos portadores de AF com uso de HU, apresentando diferença quando relacionado aos controles e portadores de AF sem uso de HU. A sua correlação com Ang II foi insignificante, porém, o estudo de MASUDA et al. (2008) relataram participação da Ang II na expressão de PAI-1 plasmático e tecidual. Também observaram a atuação de Ang II como um potente estimulador de PAI-1 em culturas de células endoteliais e musculares lisas, *in vitro*.

O fator de necrose tumoral- α , TNF- α , foi elevado em indivíduos portadores de AF com e sem tratamento de HU quando comparado com os indivíduos controle, apresentando diferença significativa. Assim como as outras citocinas pesquisadas neste estudo, a Ang II não mostrou nenhuma correlação

com a TNF- α . Nos estudos realizados por HIGASHI et al. (2005) e TOUYZ (2004), os autores verificaram que a interação entre TNF- α com Ang II gera uma superprodução de espécies reativas de oxigênio através da modulação da atividade e expressão de NAD(P)H oxidase; no entanto, nos indivíduos portadores de AF que participaram do presente trabalho, não foi observada nenhuma associação entre a produção destas proteínas.

A Ang II mostrou correlação positiva com a HbF no grupo de indivíduos portadores de AF com uso de HU. Nos experimentos posteriores com um modelo animal de AF, observamos que o tratamento com HU foi capaz de induzir a produção de Ang II nestes camundongos, apoiando as observações em humanos. Resta saber se a indução da produção de Ang II por HU poderia representar um dos efeitos benéficos desta terapia.

Estudos destacam a ação de Ang II na eritropoiese através do aumento dos níveis de eritropoietina (EPO) e estímulo ao crescimento de progenitores eritróides (KATO et al., 2005; MRUG et al., 1997). Embora a quantificação da EPO não tenha sido realizada no presente estudo, relatos anteriores indicam atuação da Ang II na regulação de EPO (FREUDENTHALER et al., 1999; GORDEUK et al., 2009). O tratamento conjunto de EPO e HU em indivíduos portadores de AF aumentam a produção de HbF (RODGERS et al., 1993; LITTLE et al., 2006), pressupondo a atividade da HU na geração de Ang II, de forma direta ou indireta. MRUG et al. (1997) verificaram nos experimentos que a EPO é necessária para a ação de Ang II na eritropoiese, *in vitro*. O estímulo da Ang II na eritropoiese pode ser mediada na via de JAK-2 cinase, através da ligação da Ang II aos receptores AT1R presentes nos progenitores eritróides, permitindo o estímulo da Ang II diretamente na proliferação eritróide e aumentando também a via de sinalização de transdução de eritropoietina e outros fatores de crescimento (IL-3, IGF-1, GM-CSF, IL-6 e stem cell factor). RODGERS et al. (2000) verificaram a ação de Ang II no estímulo das células progenitoras, podendo ser utilizada como agente para acelerar a recuperação do sistema hematopoiético após a injúria da medula óssea.

A HbF possui maior afinidade pelo oxigênio, quando comparada a HbS, minimizando os efeitos de hipóxia tecidual, dessa forma, a EPO também é modulada (SHERWOOD et al., 1986; CAMASCHELLA et al., 1990). Quando os

níveis de HbF são elevados, os valores de EPO tendem a se normalizar (CAMASCHELLA et al., 1990). A indução da produção de HbF pela HU permite equilibrar os níveis de EPO (CHARACHE et al., 1992; PAPASSOTIRIOU et al., 2000), indicando que a HU também tem potencial para regular os níveis de Ang II. Como os camundongos AF não produzem a HbF, podemos inferir que o efeito de HU nos níveis de Ang II no modelo animal AF parece ser independente da produção de HbF. No entanto, um papel potencial para EPO neste mecanismo precisa ser melhor elucidado.

Há trabalhos destacando a presença do SRA na medula óssea, no qual são detectados os receptores de angiotensina, AT1R e AT2R (HAZNEDAROGLU & BEYAZIT, 2010; HAZNEDAROGLU & ÖZTÜRK, 2003; RODGERS & diZEREGA, 2013). Os receptores AT1R estão presentes nas células progenitoras eritróides em adultos e possuem correlação com a Ang II na formação do número de colônias formadoras de eritrócitos. Com o uso de losartan, bloqueador do AT1R, o efeito é anulado (GUPTA et al., 2000).

Além da Ang II, a ACE também possui papel importante na proliferação de células hematopoiéticas progenitoras. Altas doses de inibidores de ACE podem induzir anemia e leucopenia em humanos (STUDER & VETTER, 1982; GRIFFING & MELBY, 1982). A ACE também mostra um efeito no recrutamento das células primitivas de hematopoiese em fase S da medula óssea pela degradação de tetrapeptídeo Ac-SDKP (acetil-seril-aspartil-lisil-prolina), um potente inibidor de proliferação das células progenitoras hematopoiéticas (LI et al., 1997; GAUDRON et al., 1999). ASKU et al. (2006) reportaram que a ACE é elevada em casos de leucemia mielóide, e a expressão de ACE é proporcionalmente positiva ao número de células blásticas na medula óssea. No presente trabalho, a ACE não demonstrou qualquer correlação com os parâmetros hematológicos nos indivíduos portadores de AF.

Os camundongos transgênicos e transplantados de AF apresentam características semelhantes às de um indivíduo portador de AF, tais como, danos aos órgãos, anemia, leucocitose, inflamação vascular, aumento de adesão celular e alteração de biodisponibilidade de NO (LEBENSBURGER et al., 2010).

No presente trabalho, os dados hematológicos dos camundongos quimeras de AF apresentaram baixos índices de eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) em relação aos camundongos controles. A contagem de leucócitos e o VCM foram aumentados em camundongos quimeras de AF quando comparados aos controles. As plaquetas não apresentaram diferenças em todos os grupos. Comparando os dados hematológicos entre humanos e camundongos, nota-se que há similaridade em alguns parâmetros, porém não se pode considerar os camundongos transgênicos AF como um modelo para comparação com indivíduos portadores de AF devido a algumas diferenças em resposta ao tratamento, como por exemplo, ausência de produção de hemoglobina fetal em camundongos.

Níveis plasmáticos de Ang II foram significativamente menores nos camundongos Berkeley homozigotos comparados aos camundongos controles. Também foi visto níveis menores de Ang II em camundongos quimeras de AF, porém sem apresentar diferença significativa em comparação ao controle.

Nos camundongos quimeras de AF, o tratamento com 50mg/kg/dia e 75 mg/kg/dia de HU resultou numa redução significativa dos leucócitos. Tal fato corrobora com o trabalho de LEBENSBURGER et al. (2010) onde os camundongos quimeras de AF apresentaram redução do número de leucócitos e neutrófilos em relação aos camundongos sem tratamento de HU. As duas concentrações de HU aplicadas em camundongos não demonstraram diferenças quanto ao número de leucócitos.

Apesar dos camundongos Berkeley homozigotos apresentarem similaridade às características de indivíduos portadores de AF (LEBENSBURGER et al., 2010), a quantificação de Ang II para estes camundongos foi inferior quando comparada ao controle. É possível que esta diferença seja explicada pela menor expressão gênica da *ACE1*, responsável pela conversão de Ang I para Ang II, no rim e coração dos camundongos AF. Porém, este fato contradiz com os valores obtidos no fígado, nos quais os camundongos Berkeley homozigotos apresentaram valores de expressão gênica, para esta enzima, superior em relação ao grupo controle.

O tratamento com HU (75 mg/kg/dia) aumentou os níveis plasmáticos de Ang II nos camundongos AF quando relacionado aos camundongos que não receberam HU, indicando que a HU aparenta ter um efeito no SRA independente das alterações de HbF. No entanto, apesar da menor expressão gênica da *ACE1* em alguns tecidos dos camundongos AF, não foi observado nenhum efeito de tratamento de HU nesta expressão. Em camundongos Berkeley homozigotos, a expressão gênica de *AT1R* no rim foi baixa, apresentando diferença significativa em comparação ao grupo controle. Estes dados justificam a baixa concentração de Ang II em camundongos Berkeley homozigotos e quimeras de AF.

A Ang II, apesar de ser um potente vasoconstritor quando ativa o receptor AT1R, também pode equilibrar a vasoconstrição através da ligação ao receptor AT2R. Segundo VOLPE et al. (2003), a ativação do AT1R aumenta a degradação de mRNA dos receptores AT2R. DE PAOLIS et al. (1999) confirmaram nos seus experimentos que a ativação dos receptores AT1R diminui o acúmulo do mRNA para o AT2R. Em camundongos transfectados com o gene AT2R nas células musculares lisas vasculares, houve diminuição da expressão da mRNA e proteína para do receptor AT1R (TANAKA et al., 1999). O receptor AT2R é expresso em baixa densidade em tecidos adultos, porém em condições patológicas a expressão é estimulada (GASPARO & SIRAGY, 1999). Na análise feita com os camundongos Berkeley homozigotos e quimeras para AF, a expressão dos receptores AT2R não apresentou nenhuma diferença em comparação aos camundongos controles C57BL/6. A HU não influenciou na expressão gênica dos receptores AT2R.

A análise tecidual dos receptores de angiotensina, AT1R e AT2R, em camundongos controles C57BL/6 e camundongos Berkeley homozigotos na pesquisa, demonstrou que não houve predomínio do mesmo receptor em todos os tecidos analisados, o que comprova o equilíbrio da distribuição dos receptores do SRA nos órgãos pesquisados. Somente no rim, houve uma menor expressão gênica de *AT1R* e *ACE1* em camundongos Berkeley homozigotos, apresentando diferença quando comparada aos camundongos controles C57BL/6. A expressão gênica de *AT1R* no rim em CAF sem tratamento de HU foi indiferente em relação ao controle. Por outro lado, a

expressão gênica de *ACE1* no rim dos CAF apresentou uma menor expressão, coincidindo com o que foi visto nos camundongos Berkeley homozigotos.

O tratamento com HU teve pouca influência na expressão gênica do *AT1R* em CAF, apresentando aumento somente no coração após tratamento de 75 mg/kg/dia de HU. Enquanto que no receptor *AT2R* e nas enzimas conversoras de angiotensina, *ACE1* e *ACE2*, a HU não exerceu nenhuma influência na expressão gênica.

Num estudo desenvolvido por KATO et al. (2005) com camundongos transgênicos que produzem renina e angiotensinogênio humano, houve aumento de reticulocitose causado pelo SRA na eritropoiese, intermediada pela ativação dos receptores *AT1aR* nos rins. No mesmo estudo, foi observado também o aumento de hematócrito em camundongos transgênicos quando comparado aos camundongos controles C57BL/6. Com a deleção do gene *AT1aR* nestes grupos, o hematócrito normalizou-se chegando ao mesmo nível do grupo controle. Estes dados afirmam que a ativação crônica do SRA causa reticulocitose e esplenomegalia, ou seja, a Ang II aumenta a produção de EPO e estimula a proliferação no progenitor eritróide. Neste trabalho, a Ang II e reticulócitos nos indivíduos controles e indivíduos portadores de AF sem uso de HU, apresentaram uma correlação positiva quase significativa. Possivelmente, se o n das amostras aumentasse, uma diferença poderia ser presenciada mostrando que a Ang II possui relação com a eritropoiese.

Os dados encontrados neste trabalho demonstram o desequilíbrio do SRA na AF, tais como, concentração de Ang II baixa e alterações nas expressões gênicas das principais proteínas do sistema, observadas em camundongos AF. O tratamento com HU permitiu restaurar alguns parâmetros do SRA. Nos indivíduos portadores de AF, não foram notadas diferenças nas concentrações de Ang II, mesmo naqueles que fizeram uso de HU. Estudos mais aprofundados da ação de Ang II serão necessários para comprovar se os efeitos de HU no SRA vistos nos camundongos AF poderão ser verificados também nos indivíduos portadores de AF.

7. CONCLUSÃO

O estudo do complexo do sistema renina-angiotensina em indivíduos portadores de anemia falciforme e sua modulação por HU, permitiu concluir que:

- Os níveis plasmáticos de Ang II não são significativamente alterados em indivíduos portadores de AF.
- Não foi observada nenhuma associação significativa entre níveis de Ang II e marcadores de inflamação e ativação endotelial em pacientes AF.
- Em um modelo animal de AF, níveis plasmáticos de Ang II foram significativamente diminuídos em comparação aos animais controles.
- A terapia com HU foi capaz de aumentar os níveis plasmáticos de Ang II, independentemente de um efeito dependente em HbF, em camundongos quimeras de AF.
- A HU não exerceu influência significativa nas expressões gênicas das enzimas conversoras de angiotensina, *ACE1* e *ACE2*, e do receptor de angiotensina II tipo 2, *AT2R*; e influenciou pouco no receptor de angiotensina II tipo 1, *AT1R*.

Serão necessários mais estudos sobre o complexo do sistema renina-angiotensina em anemia falciforme para verificar melhor a ação da hidroxiureia sobre a Ang II e componentes do SRA.

8. REFERÊNCIAS

Aksu S, Beyazit Y, Haznedaroglu IC, Canpinar H, Kekilli M, Uner A, Sayinalp N, Büyükaşık Y, Goker H, Ozcebe OI. Over-expression of angiotensin-converting enzyme (CD 143) on leukemic blasts as a clue for the activated local bone marrow RAS in AML. *Leuk Lymphoma*. 2006; 47: 891-6.

Albiston AL, McDowall SG, Matsacos D, Sim P, Clune E, Mustafa T, Lee J, Mendelsohn FA, Simpson RJ, Connolly LM, Chai SY. Evidence that the angiotensin IV (AT(4)) receptor is the enzyme insulin-regulated aminopeptidase. *J Biol Chem*. 2001; 276: 48623-6.

Amiri F, Viridis A, Neves MF, Iglarz M, Seidah NG, Touyz RM, Reudelhuber TL, Schiffrin EL. Endothelium-restricted overexpression of human endothelin-1 causes vascular remodeling and endothelial dysfunction. *Circulation*. 2004; 110: 2233-40.

Barabino GA, Platt MO, Kaul DK. Sickle cell biomechanics. *Annu Rev Biomed Eng*. 2010; 12: 345-67.

Bernstein KE, Shen XZ, Gonzalez-Villalobos RA, Billet S, Okwan-Duodu D, Ong FS, Fuchs S. Different in vivo functions of the two catalytic domains of angiotensin-converting enzyme (ACE). *Curr Opin Pharmacol*. 2011; 11: 105-11.

Bookchin RM, Balazs T, Nagel RL, Tellez I. Polymerisation of haemoglobin SA hybrid tetramers. *Nature*. 1977; 269: 526-7.

Brasier AR, Jamaluddin M, Han Y, Patterson C, Runge MS. Angiotensin II induces gene transcription through cell-type-dependent effects on the nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) transcription factor. *Mol Cell Biochem*. 2000; 212: 155-69.

Brewster UC, Perazella MA. The renin-angiotensin-aldosterone system and the kidney: effects on kidney disease. *Am J Med*. 2004; 116: 263-72.

Brun M, Bourdoulous S, Couraud PO, Elion J, Krishnamoorthy R, Lapoumeroulie C. Hydroxyurea downregulates endothelin-1 gene expression and upregulates ICAM-1 gene expression in cultured human endothelial cells. *Pharmacogenomics J*. 2003; 3: 215-26.

Camaschella C, Serra A, Gottardi E, Alfarano A, Revello D, Mazza U, Saglio G. A new hereditary persistence of fetal hemoglobin deletion has the breakpoint within the 3' beta-globin gene enhancer. *Blood*. 1990; 75: 1000-5.

Cançado RD, Jesus JA. A doença falciforme no Brasil. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2007; 29: 204-206.

Casas JP, Chua W, Loukogeorgakis S, Vallance P, Smeeth L, Hingorani AD, MacAllister RJ. Effect of inhibitors of the renin-angiotensin system and other antihypertensive drugs on renal outcomes: systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2005; 366: 2026-33.

Charache S, Dover GJ, Moore RD, Eckert S, Ballas SK, Koshy M, Milner PF, Orringer EP, Phillips G, Platt OS. Hydroxyurea: effects on hemoglobin F production in patients with sickle cell anemia. *Blood*. 1992; 79: 2555-65.

Charache S, Terrin ML, Moore RD, Dover GJ, Barton FB, Eckert SV, McMahon RP, Bonds DR. Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia. *N Engl J Med*. 1995; 332: 1317-22.

Chiang EY, Frenette PS. Sickle cell vaso-occlusion. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2005; 19: 771-84.

Conran N, Costa FF. Hemoglobin disorders and endothelial cell interactions. *Clin Biochem*, 2009. p. 1824-38.

Conran N, Fattori A, Saad ST, Costa FF. Increased levels of soluble ICAM-1 in the plasma of sickle cell patients are reversed by hydroxyurea. *Am J Hematol*. 2004; 76: 343-7.

Conran N, Franco-Penteado CF, Costa FF. Newer aspects of the pathophysiology of sickle cell disease vaso-occlusion. *Hemoglobin*. 2009; 33: 1-16.

Conran N, Saad ST, Costa FF, Ikuta T. Leukocyte numbers correlate with plasma levels of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in sickle cell disease. *Ann Hematol*. 2007; 86: 255-61.

Corvol P, Michaud A, Soubrier F, Williams TA. Recent advances in knowledge of the structure and function of the angiotensin I converting enzyme. *J Hypertens Suppl*. 1995; 13: S3-10.

Danser AH. Local renin-angiotensin systems: the unanswered questions. *Int J Biochem Cell Biol*. 2003; 35: 759-68.

Davies SC, Gilmore A. The role of hydroxyurea in the management of sickle cell disease. *Blood Rev*. 2003; 17: 99-109.

de Gasparo M, Siragy HM. The AT2 receptor: fact, fancy and fantasy. *Regul Pept*. 1999; 81: 11-24.

De Paolis P, Porcellini A, Gigante B, Giliberti R, Lombardi A, Savoia C, Rubattu S, Volpe M. Modulation of the AT2 subtype receptor gene activation and expression by the AT1 receptor in endothelial cells. *J Hypertens*. 1999; 17: 1873-7.

Dimitropoulou C, Chatterjee A, McCloud L, Yetik-Anacak G, Catravas JD. Angiotensin, bradykinin and the endothelium. *Handb Exp Pharmacol.* 2006; 255-94.

Dzau VJ. Theodore Cooper Lecture: Tissue angiotensin and pathobiology of vascular disease: a unifying hypothesis. *Hypertension.* 2001; 37: 1047-52.

Ferguson RP, Arun A, Carter C, Walker SD, Castro O. Hydroxyurea treatment of sickle cell anemia in hospital-based practices. *Am J Hematol.* 2002; 70: 326-8.

Ferrario CM, Flack JM. Pathologic consequences of increased angiotensin II activity. *Cardiovasc Drugs Ther.* 1996; 10: 511-8.

Ferrario CM, Strawn WB. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system and proinflammatory mediators in cardiovascular disease. *Am J Cardiol.* 2006; 98: 121-8.

Fiedler B, Wollert KC. Interference of antihypertrophic molecules and signaling pathways with the Ca²⁺-calcineurin-NFAT cascade in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res.* 2004; 63: 450-7.

Frenette PS. Sickle cell vaso-occlusion: multistep and multicellular paradigm. *Curr Opin Hematol.* 2002; 9: 101-6.

Freudenthaler SM, Schreeb K, Körner T, Gleiter CH. Angiotensin II increases erythropoietin production in healthy human volunteers. *Eur J Clin Invest.* 1999; 29: 816-23.

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

Fuhrquist F, Saijonmaa O. Renin-angiotensin system revisited. *J Intern Med.* 2008; 264: 224-36.

Galley HF, Webster NR. Physiology of the endothelium. *Br J Anaesth.* 2004; 93: 105-13.

Garrido AM, Griendling KK. NADPH oxidases and angiotensin II receptor signaling. *Mol Cell Endocrinol.* 2009; 302: 148-58.

Gaudron S, Grillon C, Thierry J, Riches A, Wierenga PK, Wdzieczak-Bakala J. In vitro effect of acetyl-N-Ser-Asp-Lys-Pro (AcSDKP) analogs resistant to angiotensin I-converting enzyme on hematopoietic stem cell and progenitor cell proliferation. *Stem Cells.* 1999; 17: 100-6.

Gladwin MT, Rodgers GP. Pathogenesis and treatment of acute chest syndrome of sickle-cell anaemia. *Lancet*. 2000; 355: 1476-8.

Gladwin MT, Vichinsky E. Pulmonary complications of sickle cell disease. *N Engl J Med*. 2008; 359: 2254-65.

Gordeuk VR, Campbell A, Rana S, Nouraie M, Niu X, Minniti CP, Sable C, Darbari D, Dham N, Onyekwere O, Ammosova T, Nekhai S, Kato GJ, Gladwin MT, Castro OL. Relationship of erythropoietin, fetal hemoglobin, and hydroxyurea treatment to tricuspid regurgitation velocity in children with sickle cell disease. *Blood*. 2009; 114: 4639-44.

Griffing GT, Melby JC. Enalapril (MK-421) and the white cell count and haematocrit. *Lancet*. 1982; 1: 1361.

Gupta M, Miller BA, Ahsan N, Ullsh PJ, Zhang MY, Cheung JY, Yang HC. Expression of angiotensin II type I receptor on erythroid progenitors of patients with post transplant erythrocytosis. *Transplantation*. 2000; 70: 1188-94.

Haznedaroglu IC, Beyazit Y. Pathobiological aspects of the local bone marrow renin-angiotensin system: a review. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2010; 11: 205-13.

Haznedaroglu IC, Oztürk MA. Towards the understanding of the local hematopoietic bone marrow renin-angiotensin system. *Int J Biochem Cell Biol*. 2003; 35: 867-80.

Hebbel RP, Boogaerts MA, Koresawa S, Jacob HS, Eaton JW, Steinberg MH. Erythrocyte adherence to endothelium as a determinant of vasocclusive severity in sickle cell disease. *Trans Assoc Am Physicians*. 1980; 93: 94-9.

Hebbel RP, Osarogiagbon R, Kaul D. The endothelial biology of sickle cell disease: inflammation and a chronic vasculopathy. *Microcirculation*. 2004; 11: 129-51.

Higashi Y, Chayama K, Yoshizumi M. Angiotensin II type I receptor blocker and endothelial function in humans: role of nitric oxide and oxidative stress. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents*. 2005; 3: 133-48.

Hsu LL, Champion HC, Campbell-Lee SA, Bivalacqua TJ, Mancini EA, Diwan BA, Schimmel DM, Cochard AE, Wang X, Schechter AN, Noguchi CT, Gladwin MT. Hemolysis in sickle cell mice causes pulmonary hypertension due to global impairment in nitric oxide bioavailability. *Blood*. 2007; 109: 3088-98.

Ichiki T, Usui M, Kato M, Funakoshi Y, Ito K, Egashira K, Takeshita A. Downregulation of angiotensin II type 1 receptor gene transcription by nitric oxide. *Hypertension*. 1998; 31: 342-8.

Johnson CS, Giorgio AJ. Arterial blood pressure in adults with sickle cell disease. *Arch Intern Med.* 1981; 141: 891-3.

Kato GJ, Onyekwere OC, Gladwin MT. Pulmonary hypertension in sickle cell disease: relevance to children. *Pediatr Hematol Oncol.* 2007; 24: 159-70.

Kato H, Ishida J, Imagawa S, Saito T, Suzuki N, Matsuoka T, Sugaya T, Tanimoto K, Yokoo T, Ohneda O, Sugiyama F, Yagami K, Fujita T, Yamamoto M, Nangaku M, Fukamizu A. Enhanced erythropoiesis mediated by activation of the renin-angiotensin system via angiotensin II type 1a receptor. *FASEB J.* 2005; 19: 2023-5.

Kaul DK, Finnegan E, Barabino GA. Sickle red cell-endothelium interactions. *Microcirculation.* 2009; 16: 97-111.

Kim-Shapiro DB, King SB, Shields H, Kolibash CP, Gravatt WL, Ballas SK. The reaction of deoxy-sickle cell hemoglobin with hydroxyurea. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1428: 381-7.

King SB. A role for nitric oxide in hydroxyurea-mediated fetal hemoglobin induction. *J Clin Invest.* 2003; 111: 171-2.

Krejcy K, Eichler HG, Jilma B, Kapiotis S, Wolzt M, Zanaschka G, Gasic S, Schütz W, Wagner O. Influence of angiotensin II on circulating adhesion molecules and blood leukocyte count in vivo. *Can J Physiol Pharmacol.* 1996; 74: 9-14.

Krum H, Gilbert RE. Novel therapies blocking the renin-angiotensin-aldosterone system in the management of hypertension and related disorders. *J Hypertens.* 2007; 25: 25-35.

Lanaro C, Franco-Penteado CF, Albuquerque DM, Saad ST, Conran N, Costa FF. Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy. *J Leukoc Biol.* 2009; 85: 235-42.

Langford KG, Shai SY, Howard TE, Kovac MJ, Overbeek PA, Bernstein KE. Transgenic mice demonstrate a testis-specific promoter for angiotensin-converting enzyme. *J Biol Chem.* 1991; 266: 15559-62.

Lebensburger JD, Pestina TI, Ware RE, Boyd KL, Persons DA. Hydroxyurea therapy requires HbF induction for clinical benefit in a sickle cell mouse model. *Haematologica.* 2010; 95: 1599-603.

Li J, Volkov L, Comte L, Herve P, Praloran V, Charbord P. Production and consumption of the tetrapeptide AcSDKP, a negative regulator of hematopoietic stem cells, by hematopoietic microenvironmental cells. *Exp Hematol.* 1997; 25: 140-6.

Lima CS, Arruda VR, Costa FF, Saad ST. Minimal doses of hydroxyurea for sickle cell disease. *Braz J Med Biol Res.* 1997; 30: 933-40.

Linz W, Wiemer G, Gohlke P, Unger T, Schölkens BA. Contribution of kinins to the cardiovascular actions of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Pharmacol Rev.* 1995; 47: 25-49.

Little JA, McGowan VR, Kato GJ, Partovi KS, Feld JJ, Maric I, Martyr S, Taylor JG, Machado RF, Heller T, Castro O, Gladwin MT. Combination erythropoietin-hydroxyurea therapy in sickle cell disease: experience from the National Institutes of Health and a literature review. *Haematologica.* 2006; 91: 1076-83.

Masuda Y, Emoto N, Nonaka H, Yagita K, Todo T, Okamura H, Yokoyama M, Hirata KI. Role of Angiotensin and the Clock System in the Circadian Regulation of Plasminogen Activator Inhibitor-1. *Kobe J Med Sci.* 2008; 54: E264-E271.

McGann PT, Ware RE. Hydroxyurea for sickle cell anemia: what have we learned and what questions still remain? *Curr Opin Hematol.* 2011; 18: 158-65.

Meijerink J, Mandigers C, van de Locht L, Tönnissen E, Goodsaid F, Raemaekers J. A novel method to compensate for different amplification efficiencies between patient DNA samples in quantitative real-time PCR. *J Mol Diagn.* 2001; 3: 55-61.

Morris CR. New strategies for the treatment of pulmonary hypertension in sickle cell disease : the rationale for arginine therapy. *Treat Respir Med.* 2006; 5: 31-45.

Mrug M, Stopka T, Julian BA, Prchal JF, Prchal JT. Angiotensin II stimulates proliferation of normal early erythroid progenitors. *J Clin Invest.* 1997; 100: 2310-4.

Nakane H, Miller FJ, Faraci FM, Toyoda K, Heistad DD. Gene transfer of endothelial nitric oxide synthase reduces angiotensin II-induced endothelial dysfunction. *Hypertension.* 2000; 35: 595-601.

Nash DT. Comparative properties of angiotensin-converting enzyme inhibitors: relations with inhibition of tissue angiotensin-converting enzyme and potential clinical implications. *Am J Cardiol.* 1992; 69: 26C-32C.

Pacelli R, Taira J, Cook JA, Wink DA, Krishna MC. Hydroxyurea reacts with heme proteins to generate nitric oxide. *Lancet.* 1996; 347: 900.

Papassotiriou I, Voskaridou E, Stamoulakatou A, Loukopoulos D. Increased erythropoietin level induced by hydroxyurea treatment of sickle cell patients. *Hematol J.* 2000; 1: 295-300.

Pastore L, Tessitore A, Martinotti S, Toniato E, Alesse E, Bravi MC, Ferri C, Desideri G, Gulino A, Santucci A. Angiotensin II stimulates intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression by human vascular endothelial cells and increases soluble ICAM-1 release in vivo. *Circulation*. 1999; 100: 1646-52.

Pászty C, Brion CM, Mancini E, Witkowska HE, Stevens ME, Mohandas N, Rubin EM. Transgenic knockout mice with exclusively human sickle hemoglobin and sickle cell disease. *Science*. 1997; 278: 876-8.

Pegelow CH, Colangelo L, Steinberg M, Wright EC, Smith J, Phillips G, Vichinsky E. Natural history of blood pressure in sickle cell disease: risks for stroke and death associated with relative hypertension in sickle cell anemia. *Am J Med*. 1997; 102: 171-7.

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: 645-51.

Rodgers GP, Dover GJ, Uyesaka N, Noguchi CT, Schechter AN, Nienhuis AW. Augmentation by erythropoietin of the fetal-hemoglobin response to hydroxyurea in sickle cell disease. *N Engl J Med*. 1993; 328: 73-80.

Rodgers KE, Xiong S, Steer R, diZerega GS. Effect of angiotensin II on hematopoietic progenitor cell proliferation. *Stem Cells*. 2000; 18: 287-94.

Rodgers KE, Dizerega GS. Contribution of the Local RAS to Hematopoietic Function: A Novel Therapeutic Target. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013; 4: 157.

Rosse WF, Narla M, Petz LD, Steinberg MH. New Views of Sickle Cell Disease Pathophysiology and Treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2000: 2-17.

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

Rüster C, Wolf G. Renin-angiotensin-aldosterone system and progression of renal disease. *J Am Soc Nephrol*. 2006; 17: 2985-91.

Ryan TM, Ciavatta DJ, Townes TM. Knockout-transgenic mouse model of sickle cell disease. *Science*. 1997; 278: 873-6.

Serjeant GR. The Natural History of Sickle Cell Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013.

Sherwood JB, Goldwasser E, Chilcote R, Carmichael LD, Nagel RL. Sickle cell anemia patients have low erythropoietin levels for their degree of anemia. *Blood*. 1986; 67: 46-9.

Skrbic R, Igic R. Seven decades of angiotensin (1939-2009). *Peptides*. 2009; 30: 1945-50.

Skurk T, van Harmelen V, Hauner H. Angiotensin II stimulates the release of interleukin-6 and interleukin-8 from cultured human adipocytes by activation of NF-kappaB. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004; 24: 1199-203.

Song JH, Cha SH, Hong SB, Kim DH. Dual blockade of the renin-angiotensin system with angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor blockers in chronic kidney disease. *J Hypertens Suppl*. 2006; 24: S101-6.

Steinberg MH. Management of sickle cell disease. *N Engl J Med*. 1999; 340: 1021-30.

Steinberg MH. Hydroxyurea treatment for sickle cell disease. *ScientificWorldJournal*. 2002; 2: 1706-28.

Steinberg MH. Bone marrow transplantation in sickle cell disease: indications and successes. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2003; 1: 406-7.

Steinberg MH. Pathophysiologically based drug treatment of sickle cell disease. *Trends Pharmacol Sci*. 2006; 27: 204-10.

Studer A, Vetter W. Reversible leucopenia associated with angiotensin-converting-enzyme inhibitor MK 421. *Lancet*. 1982; 1: 458.

Tanaka M, Tsuchida S, Imai T, Fujii N, Miyazaki H, Ichiki T, Naruse M, Inagami T. Vascular response to angiotensin II is exaggerated through an upregulation of AT1 receptor in AT2 knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; 258: 194-8.

Thomas WG, Mendelsohn FA. Angiotensin receptors: form and function and distribution. *Int J Biochem Cell Biol*. 2003; 35: 774-9.

Touyz RM. Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells -- implications in cardiovascular disease. *Braz J Med Biol Res*. 2004; 37: 1263-73.

Tsikouris JP, Cox CD. Pharmacologic blockade of the renin-angiotensin system: vascular benefits beyond commonly understood pharmacologic actions. *Pharmacotherapy*. 2003; 23: 1141-52.

Turhan A, Weiss LA, Mohandas N, Collier BS, Frenette PS. Primary role for adherent leukocytes in sickle cell vascular occlusion: a new paradigm. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99: 3047-51.

Turner AJ, Hooper NM. The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. *Trends Pharmacol Sci.* 2002; 23: 177-83.

Usui M, Egashira K, Kitamoto S, Koyanagi M, Katoh M, Kataoka C, Shimokawa H, Takeshita A. Pathogenic role of oxidative stress in vascular angiotensin-converting enzyme activation in long-term blockade of nitric oxide synthesis in rats. *Hypertension.* 1999; 34: 546-51.

Volpe M, Musumeci B, De Paolis P, Savoia C, Morganti A. Angiotensin II AT2 receptor subtype: an uprising frontier in cardiovascular disease? *J Hypertens.* 2003; 21: 1429-43.

Ware RE. How I use hydroxyurea to treat young patients with sickle cell anemia. *Blood.* 2010; 115: 5300-11.

Ware RE, Zimmerman SA, Schultz WH. Hydroxyurea as an alternative to blood transfusions for the prevention of recurrent stroke in children with sickle cell disease. *Blood.* 1999; 94: 3022-6.

Weatherall D, Akinyanju O, Fucharoen S, Olivieri N, Musgrove P. Inherited Disorders of Hemoglobin. In: Jamison DT, Breman JG, Measham AR, Alleyne G, Claeson M, Evans DB, Jha P, Mills A, Musgrove P, editors. *Disease Control Priorities in Developing Countries.* 2nd edition. 2006. Chapter 34.

Williams B, Baker AQ, Gallacher B, Lodwick D. Angiotensin II increases vascular permeability factor gene expression by human vascular smooth muscle cells. *Hypertension.* 1995; 25: 913-7.

Wood KC, Hsu LL, Gladwin MT. Sickle cell disease vasculopathy: a state of nitric oxide resistance. *Free Radic Biol Med.* 2008; 44: 1506-28.

Wun T, Paglieroni T, Field CL, Welborn J, Cheung A, Walker NJ, Tablin F. Platelet-erythrocyte adhesion in sickle cell disease. *J Investig Med.* 1999; 47: 121-7.

Yang G, Merrill DC, Thompson MW, Robillard JE, Sigmund CD. Functional expression of the human angiotensinogen gene in transgenic mice. *J Biol Chem.* 1994; 269: 32497-502.

Yoo KH, Thornhill BA, Wolstenholme JT, Chevalier RL. Tissue-specific regulation of growth factors and clusterin by angiotensin II. *Am J Hypertens.* 1998; 11: 715-22.

ANEXOS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Título da Pesquisa: Investigação das alterações do sistema renina-angiotensina-aldosterona em indivíduos portadores de anemia falciforme.

Pesquisador Responsável: Alisson Fernandes dos Santos

Você está sendo convidado a participar do projeto sobre “Investigação das alterações do sistema renina-angiotensina-aldosterona em indivíduos portadores de anemia falciforme”, sob a responsabilidade do pesquisador Alisson Fernandes dos Santos. Este projeto tem por objetivo estudar os processos inflamatórios em indivíduos portadores de anemia falciforme e verificar se há redução inflamatória com o uso de hidroxiureia.

Caso você aceite participar do projeto acima citado, será necessária a coleta de sangue (17 ml de sangue) para a realização dos testes que envolvem o estudo. O único desconforto ao paciente em relação à pesquisa será no momento da coleta de sangue.

A participação é voluntária. Caso surja durante o período da pesquisa algum inconveniente ao paciente, o mesmo tem todo direito de pedir a desvinculação do projeto em qualquer momento sem nenhum comprometimento ou punição.

Todas as informações obtidas serão mantidas em sigilo pelo pesquisador. Seus dados serão utilizados para esta pesquisa e quando os resultados forem publicados não será revelado seu nome ou outras informações que possam identificá-lo.

Não há nenhum custo ou benefício financeiro pela sua participação na pesquisa.

Se tiver qualquer dúvida sobre a sua participação no estudo, você poderá procurar pelo pesquisador Alisson Fernandes dos Santos (Fone: 41-961-69691), Dra. Nicola Conran Zorzetto (Fone: 19-3251-8734). Qualquer reclamação sobre a pesquisa pode ser feita ao Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP, fone: (19) 3251-8936.

Consentimento de Participação

Eu li/ouvi o conteúdo deste termo de consentimento e recebi orientações e esclarecimentos das minhas dúvidas. Entendi o objetivo da pesquisa, o que terei que fazer para participar e para que serão utilizadas as minhas informações. Com todas as informações, aceito participar desta pesquisa.

Nome: _____

Idade: _____ anos

Nome do responsável legal (se menor ou incapacitado): _____

Grau de parentesco: _____

Assinatura do paciente (ou responsável)

Data

Nome e assinatura do pesquisador

Data



CEP, 11/01/10.
(Grupo III)

PARECER CEP: Nº 1171/2009 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0898.0.146.000-09

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "INVESTIGAÇÃO DAS ALTERAÇÕES DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA EM INDIVÍDUOS PORTADORES DE ANEMIA FALCIFORME E EFEITOS DE TERAPIA COM HIDROXIURÉIA".

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Alisson Fernandes dos Santos.

INSTITUIÇÃO: Hemocentro/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 03/12/2009

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 11/01/11 (O formulário encontra-se no *site* acima)

II - OBJETIVOS

Estudar aspectos do sistema renina-angiotensina em indivíduos portadores de anemia falciforme e sua modulação por hidroxiuréia.

III - SUMÁRIO

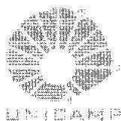
Estudo experimental, *in vitro*, que será realizado nos Centros de Hematologia e Hemoterapia de Campinas - Unicamp e Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná HemePar. Os pacientes portadores de anemia falciforme (n = 70), usuários ou não de hidroxiuréia, serão selecionados nos dois Centros no momento da consulta rotineira, onde serão coletados cerca de 12 a 25 ml de sangue para obtenção do plasma do sangue periférico. O grupo controle consistirá de sujeitos que serão convidados no momento da doação e não devem apresentar outras doenças que possam interferir na pesquisa e não devem estar em uso de medicamentos anti-hipertensivos.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Após respostas às pendências, o projeto encontra-se adequadamente redigido e de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.



O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII- DATA DA REUNIÃO

Homologado na XII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 15 de dezembro de 2009.


Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
VICE-PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM/UNICAMP



CEP, 28/02/12.
(PARECER CEP: N° 1171/2009)

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa

PARECER

I – IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “INVESTIGAÇÃO DAS ALTERAÇÕES DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA EM INDIVÍDUOS PORTADORES DE ANEMIA FALCIFORME E EFEITOS DE TERAPIA COM HIDROXIURÉIA”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Alisson Fernandes dos Santos

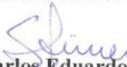
II – PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou o adendo que inclui Hospital Universitário da Universidade de Londrina (HU/UDEL), referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

III – DATA DA REUNIÃO.

Homologado na II Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 28 de fevereiro de 2012.


Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-887 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "INVESTIGAÇÃO DAS ALTERAÇÕES DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA EM CAMUNDONGOS (*Mus musculus*) TRANSGÊNICOS DE ANEMIA FALCIFORME E EFEITOS DE TERAPIA COM HIDROXIURÉIA" (protocolo nº 3024-1), sob a responsabilidade de Dra. NICOLA AMANDA CONRAN ZORZETTO / ALISSON FERNANDES DOS SANTOS, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 1º. de abril de 2013.

Campinas, 1º. de abril de 2013.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

Artigo publicado – Life Sciences

Reduced plasma Angiotensin II levels are reversed by hydroxyurea treatment in mice with sickle cell disease

Alisson F. dos Santos, Camila B. Almeida, Ana F. Brugnerotto, Fernanda M. Roversi, Flávia R. Pallis, Carla F. Franco-Penteado, Carolina Lanaro, Dulcineia M. Albuquerque, Flávia C. Leonardo, Fernando F. Costa, Nicola Conran.

INCT de Sangue, Hematology and Hemotherapy Center, School of Medicine, University of Campinas – UNICAMP, Campinas, Sao Paulo, Brazil

Short Running Title: Angiotensin II in sickle cell mice

Correspondence to:

N. Conran, Hemocentro, Rua Carlos Chagas, 480, Cidade Universitária, Barão Geraldo, Campinas 13083-970-SP, Brazil.

Tel: + 55 19 35218533; Fax: +55 19 3289 1089; e-mail: conran@unicamp.br

Abstract

Aims: Sickle cell disease (SCD) pathogenesis leads to recurrent vaso-occlusive and haemolytic processes, causing numerous clinical complications including renal damage. As vasoconstrictive mechanisms may be enhanced in SCD, due to endothelial dysfunction and vasoactive protein production, we aimed to determine whether the expression of proteins of the rennin-angiotensin system (RAS) may be altered in an animal model of SCD. *Main Methods:* Plasma angiotensin II (Ang II) was measured in C57BL/6 (WT) and mice with SCD by ELISA, while quantitative PCR was used to compare expressions of the genes encoding the angiotensin-II-receptors 1 and 2 (*AT1R* and *AT2R*) and the angiotensin-converting enzymes (*ACE1* and *ACE2*) in the kidneys, hearts, livers and brains of mice. The effects of hydroxyurea (HU; 50-75 mg/kg/day, 4 weeks) treatment on these parameters were also determined. *Key findings:* Plasma Ang II was significantly diminished in SCD mice, compared to WT mice, in association with decreased *AT1R* and *ACE1* expressions in SCD mice kidneys. Treatment of SCD mice with HU reduced leukocyte and platelet counts and increased plasma Ang II to levels similar to those of WT mice. HU also increased *AT1R* and *ACE2* gene expression in the kidney and heart. *Significance:* Results indicate an imbalanced RAS in an SCD mouse model; HU therapy may be able to restore some RAS parameters in these mice. Further investigations regarding Ang II production and the RAS in human SCD may be warranted, as such changes may reflect or contribute to renal damage and alterations in blood pressure.

Key words: Angiotensin II; renin angiotensin system; vasoconstriction; kidneys; sickle cell disease.

Introduction

The pathogenesis of the genetic disorder, sickle cell disease (SCD), derives from the polymerization of deoxygenated hemoglobin S (HbS) in the red cells. Polymerized hemoglobin distorts the red blood cell (RBC), which becomes sickled in shape and less deformable (Stuart and Nagel 2004). Vaso-occlusion is a characteristic manifestation of SCD and results from interactions between red cells, activated leukocytes, and other cells in the blood vessel, in a mechanism that is initiated and perpetuated by endothelial activation, reduced nitric oxide (NO) bioavailability, augmented oxidative stress and vascular inflammation (Conran and Costa 2009). Together with hemolytic anemia, vaso-occlusive (VO) processes cause the clinical complications that are associated with SCD, including painful VO episodes, autoinfarction of the spleen, acute chest syndrome, stroke, pulmonary hypertension, organ damage, renal damage and a shortened lifespan (Steinberg 2009).

Hydroxyurea (HU), or hydroxycarbamide, has been used with some success as a therapy in SCD, reducing crisis incidence and mortality, and is currently the only drug approved by the FDA for treatment of this disease (Charache et al. 1995). This drug is generally administered to patients fulfilling the criteria for HU therapy under a chronic regime of between 15-30 mg/Kg/day (McGann and Ware 2011). HU therapy in SCD patients usually increases fetal hemoglobin (HbF) production (Charache et al. 1992) and there is evidence to suggest that HU can generate NO production *in vivo* (King 2004). HU therapy has also been shown to decrease red blood cell (RBC) rigidity, modulate adhesion protein expression by RBC and endothelial cells (VEC), as well as reduce leukocyte counts (Conran and Costa 2009).

While most adult SCD patients display lower systemic blood pressures (de Jong et al. 1982; Pegelow et al. 1997; Steinberg 2009), vaso-constrictive mechanisms may be enhanced in SCD at sites of inflammation, with a probable contribution to vaso-occlusive processes (Ergul et al. 2004). Reduced levels of NO in the blood vessels,

due to hemolytic processes and endothelial dysfunction (Reiter et al. 2002), may decrease NO-dependent vasodilation, while increased endothelin-1 (ET-1) production may augment vasoconstriction at sites of inflammation and endothelial activation (Ergul 2004).

Angiotensin II (Ang II) is a vasoactive peptide and constitutes one of the vasoactive products of the renin-angiotensin system (RAS). Ang II is produced from the cleavage of angiotensinogen by renin to form angiotensin I (Ang I), followed by conversion of Ang I to Ang II by the angiotensin-converting enzyme (ACE) (Grace et al. 2012). Ang II mediates its biological effects via two receptors, the Ang II type 1 receptor (AT₁R) and the Ang II type 2 receptor (AT₂R). The AT₁R mediates much of the pathological effects of Ang II, such as vasoconstriction, inflammation, and sodium reabsorption. In contrast, the AT₂R may mediate vasodilation, and inhibit growth and its expression can increase in pathological conditions such as hypertension, renal failure and diabetes (Savoia et al. 2011). While ACE is the major Ang-II-generating enzyme, it can also inactivate kinins, leading to a reduction in bradykinin-mediated vasodilation. In addition, the more recently identified ACE2 protein catalyzes Ang I and Ang II conversion into the small Ang peptides Ang-(1-9) and Ang-(1-7), which both have opposing effects to those of Ang II (Sampaio et al. 2007).

Renal disease is frequently experienced by SCD patients, especially in older individuals (Ataga et al. 2014; Sasongko et al. 2013; Sharpe and Thein 2014). Repeated cycles of ischemic injury in the kidney may cause chronic microvascular disease, causing hyperfiltration and proteinuria, in turn potentially contributing to the onset of chronic kidney disease in some individuals (Sharpe and Thein 2014). Given the renal damage that is often associated with SCD and the fact that the kidney is the major site of renin production, this study aimed to determine whether production of the vasoconstrictive peptide, Ang II, and proteins involved in Ang II production and signaling may be altered in SCD. We used transgenic Berkeley mice as an animal

model of SCD for this study and investigated the effects of HU treatment on these parameters.

Methods

Animals

C57BL/6 mice were obtained from the animal housing facility (CEMIB), University of Campinas, Brazil. Berkeley mice (Tg[*Hu-miniLCR* α 1G γ A γ δ β S] Hba^{-/-}Hbb^{-/-}) were originally purchased from the Jackson laboratories (Bar Harbor, ME) and maintained and bred at CEMIB. Berkeley mice used were age-matched (5-6 months) to C57BL/6 (WT) mice and are hereafter referred to as “Berk mice”. For some experiments, chimeric male SCD mice were generated by transplantation of nucleated bone marrow cells harvested from Berkeley SCD mice into lethally-irradiated C57BL/6 mice (2-months old), as previously described.(Turhan et al. 2002) Only chimeric SCD mice expressing > 97% human globin were utilized in experiments at 3 months after transplantation. Transplanted chimeric SCD mice are hereafter denominated “SCD mice”. All animal experimental procedures were carried out in accordance with the ‘Principles of Laboratory animal care’ (<http://grants.nih.gov/grants/guide/notice-files/not96-208.html>), as well as in accordance with current Brazilian laws for the protection of animals; this study was approved by the Commission for Ethics in Animal Experimentation of the University of Campinas (CEUA/Unicamp, protocol 3024-1, 2013). All animals were fed on a 22 % protein diet (NUVILAB – CR1 irradiated) for at least 3 months before experiments.

Treatment of SCD mice with hydroxyurea

For some experiments, chimeric SCD mice (5-months old) were treated with hydroxyurea (50 or 75 mg/kg/day *i.p.*) or saline vehicle (*i.p.*) 5-times-a-week for 4

weeks before sacrificing and storing plasma and organs at -80°C. Hematological indices were obtained for blood samples using a Beckman Coulter hemolytic analyzer (Fullerton, CA).

Measurement of plasma Angiotensin II

Blood samples were collected in EDTA by cardiac puncture from mice and Angiotensin II Inhibitor Cocktail (SPI-Bio Bertin Pharma, Montigny-le-Bretonneux, France) was immediately added to samples (30 µL/ml blood) to inhibit Angiotensin II (Ang II) degradation and production. Samples were centrifuged (15 min, 3 000 *g*, 4°C) and plasma stored at -80°C until the day of assay. On the day of assay, Ang II was extracted from plasma samples using phenyl Hypersep PH columns (Thermo Scientific, Waltham, MA) before determining Ang II concentrations using the Angiotensin II Enzyme Immunoassay (SPI-Bio Bertin Pharma), according to the manufacturer's instructions. Final plasma Ang II concentrations were calculated from a standard curve and adjusted according to the initial plasma volume from which Ang II was extracted.

Quantitative real time PCR (qPCR)

The expressions of the genes encoding angiotensin receptor 1 (*AT1R*), angiotensin receptor 2 (*AT2R*), ACE (*ACE1*) and ACE2 (*ACE2*) were determined in the tissues of the kidney, heart, brain and liver, which were isolated from mice at the time of sacrifice. mRNA was extracted from the organs of mice (entire organs) using Trizol (Invitrogen, Carlsbad, USA) and cDNA was synthesized using a reverse-transcription kit (RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis, Thermo Scientific, Waltham, MA). Synthetic oligonucleotide primers were designed to amplify cDNA for conserved regions of the genes described, by Primer-Express (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). For primer sequences, see Table 1. Primers were synthesized by Invitrogen (São Paulo,

Brazil) and *ACTB* was used as an internal control gene. All samples were assayed in a 12 μ L volume containing 5 ng cDNA, 6 μ L SYBR Green Master Mix PCR (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) and gene primers (7500 Fast Real-Time PCR System – Applied Biosystems). To confirm accuracy and reproducibility of real-time PCR, the intra-assay precision was calculated according to the equation: $E^{-1/\text{slope}}$. The dissociation protocol was performed at the end of each run to check for non-specific amplification. Two replicas were run on the plate for each sample. Results are expressed as arbitrary units (A.U.) of gene expression, when compared with the control gene.

Statistical Analysis

Data are depicted in graphs as medians and interquartile ranges and in tables as means \pm SEM. Values were compared by unpaired nonparametric analysis of variance (ANOVA; Kruskal-Wallis) and Bonferroni post test, or the unpaired nonparametric Mann-Whitney test for comparisons between two groups. $P < 0.05$ was considered to be significant.

Results

Plasma levels of angiotensin II are significantly lower in transgenic sickle cell mice

Levels of Ang II were measured in the plasma of WT C57BL/6 control (WT) mice and aged-matched transgenic sickle Berkeley (Berk) mice by ELISA. Levels of Ang II were found to be approximately 90 % lower in the Berk sickle mice compared to WT mice (Figure 1A).

Expression levels of angiotensin receptors and angiotensin converting enzymes in transgenic Berk sickle cell mice

The relative expressions of the genes encoding AT₁R (*AT1R*), AT₂R (*AT2R*), angiotensin converting enzyme (*ACE1*) and angiotensin converting enzyme 2 (*ACE2*) were quantified in the kidney, heart, brain and liver of WT C57BL/6 control (WT) mice and transgenic sickle Berkeley (Berk) mice by real time quantitative PCR (qRT-PCR). In the kidney, the expressions of the *AT1R* and *ACE1* genes were significantly lower in Berk mice than in WT. In contrast, *ACE1* expression was significantly higher in the liver of Berk mice, compared to WT mice. All other genes studied were expressed similarly in the organs analyzed (Table 2).

Effects of hydroxyurea therapy on angiotensin parameters in sickle cell mice

Sickle cell (transplanted chimeric) mice (5-months old) were treated five times a week with 50 or 75 mg/kg/day hydroxyurea (HU) or saline vehicle (*i.p.*) for four weeks. Under basal conditions, SCD demonstrate significantly augmented leukocyte counts and mean corpuscular volume (MCV), as well as significantly reduced RBC counts, hemoglobin levels, mean corpuscular hemoglobin (MCH) and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), compared to age and sex-matched WT C57BL/6 control mice (Table 3). Consistent with previous studies demonstrating the action of HU on Sickle cell mice (Lebensburger et al. 2012; Lebensburger et al. 2010), chronic treatment of animals with HU for 4 weeks, resulted in a reduction in leukocytosis, and increased MHC (50 mg/kg/day), while 75 mg/kg/day HU reduced RBC counts, hemoglobin levels and platelet counts after 4 weeks in sickle cell mice, possibly indicating a slight toxicity at this higher concentration (Table 3). As these mice do not produce the human gamma globin chain, these effects were independent of fetal hemoglobin production.

Basal plasma Ang II levels were also decreased in transplanted sickle chimeric mice compared to the WT C57BL/6 control mice (Figure 1B). Four weeks of chronic HU

treatment resulted in increased mean plasma Ang II levels (75 mg/kg/day) that reached levels that were similar to those of WT mice (Figure 1B). With regard to the tissue expression of angiotensin related proteins, HU treatment (75 mg/kg/ml) was associated with a reversal in the (non-significantly) decreased expressions of the genes encoding the AT₁R and the ACE2 protein in the kidneys of SCD mice (Table 4). The non-significantly decreased expression of *ATR1* in the heart of sickle cell mice was also augmented by 75 mg/kg/day HU (Table 4), while no significant effects of HU on the expressions of the *AT1R*, *ATR2*, *ACE1* and *ACE2* genes were observed in the brain or liver of SCD mice (Table 5).

Discussion

Given the high levels of vascular inflammation, oxidative stress and production of vasoactive substances reported in SCD, we were surprised to find that Ang II levels were significantly diminished in the plasma of transgenic Berk mice and were also lower in chimeric SCD mice. Low Ang II was associated with decreased expressions of the genes encoding AT₁R and ACE in the kidneys of mice with SCD. It has been suggested that SCD individuals display relatively lower blood pressures, compared to age- and race-matched controls (Pegelow 1997; Steinberg 2009). ACE inhibitors and Ang II receptor blockers, such as enalapril and losartan, are commonly employed as antihypertensives (Burnier et al. 2014); furthermore, the absence of intrarenal ACE production has been shown to protect against hypertension in mice (Gonzalez-Villalobos et al. 2013). At present, there are no data available to indicate whether parameters of the RAS system, including Ang II and RAS proteins, are altered in human SCD. It is difficult to extrapolate results from SCD animal models to the human form of the disease (Manci et al. 2006); however, it may be postulated that should down-regulation of renal RAS also occur in human SCD this may contribute to lower

blood pressure in these individuals, although further data and evidence collected from humans with SCD are required to support such a hypothesis. The implications of increased ACE expression in the liver of SCD mice are not clear; however liver injury is known to increase hepatic expression of ACE (Grace 2012).

Treatment of SCD mice with HU for four weeks led to reduced leukocyte and platelet counts in mice, without any improvement in red cell indices, which was consistent with previous studies examining the effects of chronic HU treatment on mice with SCD and with the fact that these mice do not express fetal hemoglobin (Lebensburger 2012; Lebensburger 2010). Importantly, HU treatment (75 mg/kg/day) was found to increase Ang II to levels that were similar to those of age- and sex-matched WT mice and increased the expression of the genes encoding the AT₁R and ACE2 genes in the kidney and heart. As such, in SCD mice, HU therapy appears to restore alterations in unbalanced parameters of the RAS. Whether such HU-induced RAS alterations may be beneficial in SCD is unclear; to date there is no evidence regarding basal RAS parameters or the effects of HU on RAS in human SCD, and while HU therapy is associated with lower albuminuria and improved glomerular filtration, no significant effects of HU on blood pressure have been reported in these patients (Desai et al. 2012; Laurin et al. 2013). HU-induced increased ACE2 activity could have potential benefits, as a consequent production of Ang-(1-7) could have vasodilatory and anti-inflammatory effects; however, Ang-(1-7) levels were not measured herein and further studies are required to determine whether HU may affect levels of this Ang II-derived peptide in SCD.

ACE inhibitors (ACEi) and Ang II receptor blockers (ARB) are routinely used for the control of nephropathy in diseases such as diabetes and chronic kidney disease (CKD)(Lambers Heerspink and de Zeeuw 2013; Lewis and Maxwell 2014) and a number of reports relate the use of these classes of drugs in SCD patients presenting albuminuria and proteinuria with a view to preventing evolution to CKD (Ataga 2014; Fitzhugh et al. 2005; Foucan et al. 1998; Lima et al. 2008; Sasongko 2013; Sharpe and

Thein 2011). Higher relative systemic blood pressure in SCD has been associated with an increased risk for pulmonary hypertension and renal dysfunction (Gordeuk et al. 2008). As HU augmented the production of Ang II in SCD mice, investigations to look at the effects of HU on the human RAS are necessary with a view to evaluating whether the administration of ACEi or ARB together with HU may be indicated in patients with higher systemic blood pressures.

Conclusions

A mouse model of sickle cell disease appears to present an unbalanced RAS system, as demonstrated by decreased levels of plasma Ang II and the altered expression of major RAS proteins in the kidneys of these mice; HU treatment was able to restore some RAS parameters in these mice. Further studies are required to determine whether such alterations may occur in human SCD and the consequences of these alterations.

Acknowledgments

This study was funded by FAPESP and CNPq (FAPESP grant ID, 2008/57441-0; CNPq grant ID, 565036/2010). The authors would like to thank the CEMIB, UNICAMP for assistance with animal maintenance.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflicts of evidence relevant to this study.

References

Ataga KI, Derebail VK, Archer DR. The glomerulopathy of sickle cell disease. American journal of hematology. 2014.

- Burnier M, Vuignier Y, Wuerzner G. State-of-the-art treatment of hypertension: established and new drugs. *Eur Heart J*. 2014;35:557-62.
- Charache S, Dover GJ, Moore RD, Eckert S, Ballas SK, Koshy M, et al. Hydroxyurea: effects on hemoglobin F production in patients with sickle cell anemia. *Blood*. 1992;79:2555-65.
- Charache S, Terrin ML, Moore RD, Dover GJ, Barton FB, Eckert SV, et al. Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia. *The New England journal of medicine*. 1995;332:1317-22.
- Conran N, Costa FF. Hemoglobin disorders and endothelial cell interactions. *Clinical biochemistry*. 2009;42:1824-38.
- de Jong PE, Landman H, van Eps LW. Blood pressure in sickle cell disease. *Archives of internal medicine*. 1982;142:1239-40.
- Desai PC, Deal AM, Brittain JE, Jones S, Hinderliter A, Ataga KI. Decades after the cooperative study: a re-examination of systemic blood pressure in sickle cell disease. *American journal of hematology*. 2012;87:E65-8.
- Ergul S, Brunson CY, Hutchinson J, Tawfik A, Kutlar A, Webb RC, et al. Vasoactive factors in sickle cell disease: in vitro evidence for endothelin-1-mediated vasoconstriction. *American journal of hematology*. 2004;76:245-51.
- Fitzhugh CD, Wigfall DR, Ware RE. Enalapril and hydroxyurea therapy for children with sickle nephropathy. *Pediatric blood & cancer*. 2005;45:982-5.
- Foucan L, Bourhis V, Bangou J, Merault L, Etienne-Julan M, Salmi RL. A randomized trial of captopril for microalbuminuria in normotensive adults with sickle cell anemia. *The American journal of medicine*. 1998;104:339-42.
- Gonzalez-Villalobos RA, Janjoulia T, Fletcher NK, Giani JF, Nguyen MT, Riquier-Brison AD, et al. The absence of intrarenal ACE protects against hypertension. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123:2011-23.
- Gordeuk VR, Sachdev V, Taylor JG, Gladwin MT, Kato G, Castro OL. Relative systemic hypertension in patients with sickle cell disease is associated with risk of pulmonary hypertension and renal insufficiency. *American journal of hematology*. 2008;83:15-8.
- Grace JA, Herath CB, Mak KY, Burrell LM, Angus PW. Update on new aspects of the renin-angiotensin system in liver disease: clinical implications and new therapeutic options. *Clinical science*. 2012;123:225-39.
- King SB. Nitric oxide production from hydroxyurea. *Free radical biology & medicine*. 2004;37:737-44.
- Lambers Heerspink HJ, de Zeeuw D. Novel drugs and intervention strategies for the treatment of chronic kidney disease. *British journal of clinical pharmacology*. 2013;76:536-50.
- Laurin LP, Nachman PH, Desai PC, Ataga KI, Derebail VK. Hydroxyurea is associated with lower prevalence of albuminuria in adults with sickle cell disease. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2013.
- Lebensburger JD, Howard T, Hu Y, Pestina TI, Gao G, Johnson M, et al. Hydroxyurea therapy of a murine model of sickle cell anemia inhibits the progression of pneumococcal disease by down-modulating E-selectin. *Blood*. 2012;119:1915-21.
- Lebensburger JD, Pestina TI, Ware RE, Boyd KL, Persons DA. Hydroxyurea therapy requires HbF induction for clinical benefit in a sickle cell mouse model. *Haematologica*. 2010;95:1599-603.
- Lewis G, Maxwell AP. Risk factor control is key in diabetic nephropathy. *The Practitioner*. 2014;258:13-7, 2.
- Lima CS, Ueti OM, Ueti AA, Franchini KG, Costa FF, Saad ST. Enalapril therapy and cardiac remodelling in sickle cell disease patients. *Acta cardiologica*. 2008;63:599-602.

- Manci EA, Hillery CA, Bodian CA, Zhang ZG, Luty GA, Collier BS. Pathology of Berkeley sickle cell mice: similarities and differences with human sickle cell disease. *Blood*. 2006;107:1651-8.
- McGann PT, Ware RE. Hydroxyurea for sickle cell anemia: what have we learned and what questions still remain? *Current opinion in hematology*. 2011;18:158-65.
- Pegelow CH, Colangelo L, Steinberg M, Wright EC, Smith J, Phillips G, et al. Natural history of blood pressure in sickle cell disease: risks for stroke and death associated with relative hypertension in sickle cell anemia. *The American journal of medicine*. 1997;102:171-7.
- Reiter CD, Wang X, Tanus-Santos JE, Hogg N, Cannon RO, 3rd, Schechter AN, et al. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. *Nature medicine*. 2002;8:1383-9.
- Sampaio WO, Henrique de Castro C, Santos RA, Schiffrin EL, Touyz RM. Angiotensin-(1-7) counterregulates angiotensin II signaling in human endothelial cells. *Hypertension*. 2007;50:1093-8.
- Sasongko TH, Nagalla S, Ballas SK. Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors for proteinuria and microalbuminuria in people with sickle cell disease. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2013;3:CD009191.
- Savoia C, Burger D, Nishigaki N, Montezano A, Touyz RM. Angiotensin II and the vascular phenotype in hypertension. *Expert reviews in molecular medicine*. 2011;13:e11.
- Sharpe CC, Thein SL. Sickle cell nephropathy - a practical approach. *British journal of haematology*. 2011;155:287-97.
- Sharpe CC, Thein SL. How I treat renal complications in sickle cell disease. *Blood*. 2014.
- Steinberg MHO-F, K. Heeney, M.M. Clinical and Pathophysiological Aspects of Sickle Cell Anemia. In: Steinberg MH, Forget, B.G., Higgs, D.R., Weatherall, D.J., editor. *Disorders of Hemoglobin*. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2009.
- Stuart MJ, Nagel RL. Sickle-cell disease. *Lancet*. 2004;364:1343-60.
- Turhan A, Weiss LA, Mohandas N, Collier BS, Frenette PS. Primary role for adherent leukocytes in sickle cell vascular occlusion: a new paradigm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99:3047-51.

Table 1. Primer sequences employed for qPCR

Gene	Primers	Optimal primer concentration
AT1R-F AT1R-R	5'– GTCAGTTTCAACCTCTACGCCAG – 3' 5'– ACAATGGCCAGGTAGCGATC – 3'	150 nM
AT2R-F AT2R-R	5'– GAATCCCTGGCAAGCATCTTAT – 3' 5'– ATGTTGGCAATGAGGATAGACAAG – 3'	150 nM
ACE1-F ACE1-R	5'– GGGCATTGACCTAGAGACTGATG – 3' 5'– CTTGGGCTGTCCGGTCATAC – 3'	70 nM
ACE2-F ACE2-R	5'– ACCAAAGCATTAAAGTGAGGATAAG – 3' 5'– GTTGTTGGTCCATTCATATGCATT – 3'	150 nM
ACTB-F ACTB-R	5'- ACTGCCGCATCCTCTTCCT-3' 5'- GAACCGCTCGTTGCCAATA -3'	70 nM

F, forward; R, reverse; *AT1R*, Angiotensin receptor 1; *AT2R*, Angiotensin receptor 2; *ACE1*, ACE; *ACE2*, ACE2; *ACTB*, beta actin .

Table 2. Expression of genes encoding the angiotensin receptors and angiotensin converting enzyme in organs of WT and Berkeley sickle mice

	KIDNEY		HEART		BRAIN		LIVER	
	WT	BERK	WT	BERK	WT	BERK	WT	BERK
	N=8	N=9	N=9	N=9	N=5	N=5	N=5	N=6
<i>AT1R</i>	0.76±0.06	0.44±0.06 **	0.68±0.06	0.52±0.09	0.65±0.07	0.82±0.06	0.49±0.11	0.66±0.11
<i>AT2R</i>	0.25±0.07	0.18±0.10	0.52±0.08	0.46±0.15 (N=5)	0.43±0.09	0.63±0.14	0.57±0.20 (N=3)	0.50±0.14 (N=5)
<i>ACE1</i>	0.85±0.03	0.43±0.07 ***	0.57±0.04	0.49±0.10	0.62±0.08	0.63±0.10	0.14±0.05	0.52±0.15 *
<i>ACE2</i>	0.66±0.06	0.59±0.08	0.48±0.07	0.50±0.06	0.40±0.05	0.57±0.15	0.59±0.17	0.21±0.03

Expressions of the genes, *AT1R*, *AT2R*, *ACE1* and *ACE2*, in the kidney, heart, brain and liver of WT (C57BL/6) control mice and transgenic sickle Berkeley (Berk) mice. Gene expressions are depicted as arbitrary units (A.U.) of expression compared to the expression of *ACTB*. Number of mice analyzed is reported in brackets for each tissue, unless specified for specific experiments.

*, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001, compared to equivalent WT expression; Mann Whitney test.

Table 3. Hematological parameters of WT mice and of sickle cell mice following treatment, or not, with hydroxyurea (HU) for four weeks

Hematological Parameter	WT (n=5)	Sickle cell mice		
		0 mg/kg/day HU (n=5)	50 mg/kg/day HU (n=5)	75 mg/kg/day HU (n=4)
Leukocyte count (x10 ³ /μL)	7.24 (7.3/5.7/10.1)	30.20 ** (27.4/25.9/37.9)	21.47 # (23.3/15.9/26.9)	22.91 (23.8/17.7/26.4)
RBC count (x10 ⁶ /μL)	8.86 (8.89/8.35/9.35)	3.71 ** (3.9/3.04/3.99)	3.52 (3.48/3.26/4.00)	2.80 ## (2.82/2.45/3.13)
Platelet count (x10 ³ /μL)	1001 (1000/921/1121)	991 (982/790/1225)	1012 (981/891/1198)	730 # (738/548/898)
Haemoglobin (Hb g/dL)	14.62 (14.8/13.8/15.5)	4.78 ** (4.9/4.1/5.2)	4.86 (4.7/4.6/5.4)	3.97 # (4.00/3.4/4.5)
MCV (fL)	43.59 (43.91/42.68/43.97)	54.56 * (54.7/52/56.7)	54.86 (54.8/50.9/58.8)	57.83 (57.8/57.4/58.3)
MHC (pg)	16.46 (16.5/16.1/16.7)	12.9 ** (12.8/12.5/13.5)	13.76 # (13.9/13.3/14.1)	14.15 ## (14.2/13.7/14.5)
MCHC (g/dL)	37.8 (37.8/37.6/38.2)	23.68 ** (23.4/22.9/25.5)	25.1 (25.7/22.5/26.7)	24.52 (24.6/23.6/25.3)

Data expressed in mean (median/min/max); WT, WT (C57BL/6) control mice; Sickle cell mice, transplanted chimeric sickle mice. Mice were treated, or not, with hydroxyurea (HU) five times a week for four weeks (via i.p.). MCV, Mean corpuscular volume; MCH, Mean corpuscular hemoglobin; MCHC, Mean corpuscular hemoglobin concentration. *, P<0.05; **, P<0.01, compared to WT (Mann-Whitney test); #, P<0.05; ##, P<0.01, compared to 0 mg/kg/day (Kruskal Wallis, Dunn's Test).

Table 4. Effect of hydroxyurea treatment on the expression of genes encoding the angiotensin receptors and angiotensin converting enzymes in the kidney and heart of sickle cell mice

	Kidney				Heart			
	WT	Sickle Cell			WT	Sickle Cell		
		Basal	50 HU	75 HU		Basal	50 HU	75 HU
N=12	N=5	mg/kg/day N=5	mg/kg/day N=4	N=12	N=5	mg/kg/day N=5	mg/kg/day N=4	
<i>AT1R</i>	0.73±0.05	0.64±0.05	0.71±0.06	0.90±0.05 #	0.71±0.05	0.52±0.07	0.41±0.06	0.81±0.03 #
<i>AT2R</i>	0.20±0.05	0.44±0.19 (N=4)	0.12±0.01	0.26±0.09	0.55±0.07 (N=11)	0.45±0.11	0.47±0.18	0.72±0.13 (N=3)
<i>ACE1</i>	0.80±0.05	0.36±0.02 ** (N=4)	0.43±0.02	0.45±0.05 (N=3)	0.65±0.05	0.54±0.06	0.44±0.06	0.60±0.07
<i>ACE2</i>	0.70±0.05	0.56±0.03	0.64±0.06	0.76±0.07 #	0.58±0.07	0.19±0.03 **	0.20±0.03	0.32±0.02

Expressions of the genes, *AT1R*, *AT2R*, *ACE1* and *ACE2*, in the kidney and heart of WT (C57BL/6) control mice and sickle cell mice (transplanted chimeras). Gene expressions are depicted as arbitrary units (A.U.) of expression compared to the expression of *ACTB*. Numbers of mice analyzed are reported each tissue, unless specified.

** , P<0.01, compared to equivalent WT expression; Mann Whitney test. #, P<0.05, compared to basal expression (Kruskal Wallis/Dunn's).

Table 5. Effect of hydroxyurea treatment on the expression of genes encoding the angiotensin receptors and angiotensin converting enzymes in the brain and liver of sickle cell mice

	Brain				Liver			
	WT	Sickle Cell			WT	Sickle Cell		
		Basal	50 HU	75 HU		Basal	50 HU	75 HU
N=9	N=5	mg/kg/day N=5	mg/kg/day N=4	N=9	N=5	mg/kg/day N=5	mg/kg/day N=4	
<i>AT1R</i>	0.53±0.07	0.51±0.03	0.44±0.05	0.56±0.16	0.33±0.09	0.45±0.04	0.55±0.07	0.73±0.16
<i>AT2R</i>	0.51±0.10	0.59±0.10	0.59±0.06	0.60±0.18	0.36±0.10 (N=8)	0.32±0.11	0.47±0.18	0.33±0.23
<i>ACE1</i>	0.58±0.09	0.78±0.02	0.81±0.06	0.75±0.08	0.14±0.04	0.59±0.13 **	0.54±0.13	0.38±0.74
<i>ACE2</i>	0.48±0.06	0.76±0.03*	0.78±0.06	0.78±0.09	0.41±0.14 (N=8)	0.49±0.10	0.53±0.07	0.81±0.19 (N=3)

Expressions of the genes, *AT1R*, *AT2R*, *ACE1* and *ACE2*, in brain and liver of WT (C57BL/6) control mice and sickle mice (transplanted chimeric mice). Gene expressions are depicted as arbitrary units (A.U.) of expression compared to the expression of *ACTB*. Numbers of mice analyzed are reported each tissue, unless specified.

** , P<0.01, compared to equivalent WT expression; Mann Whitney test.

Figure Legend

FIGURE 1. Plasma Angiotensin II in WT control mice and sickle cell mice. (A) Plasma levels of Angiotensin II (Ang II) are significantly lower in transgenic Berkeley sickle mice (Berk, N=7) than in WT (C57BL/6, N=9) control mice. Mice were age-matched (5-6 months old); Ang II was determined by ELISA. ***, $P < 0.001$, Mann Whitney test. **(B)** Effects of hydroxyurea treatment on plasma Ang II levels in sickle cell mice. Sickle cell mice (transplanted male chimeric mice; 5-months old) were treated (i.p.) with 0 (N= 5), 50 (N=5) or 75 (N=4) mg/kg/day hydroxyurea (HU) five times a week for four weeks. Levels of angiotensin II (Ang II) were then measured in the plasma of sickle cell mice and compared with those of age-matched male WT (C57BL/6, N=10) control mice. #, $P < 0.05$, compared to basal (0 mg/kg/day HU) (Kruskall Wallis/Dunn's).

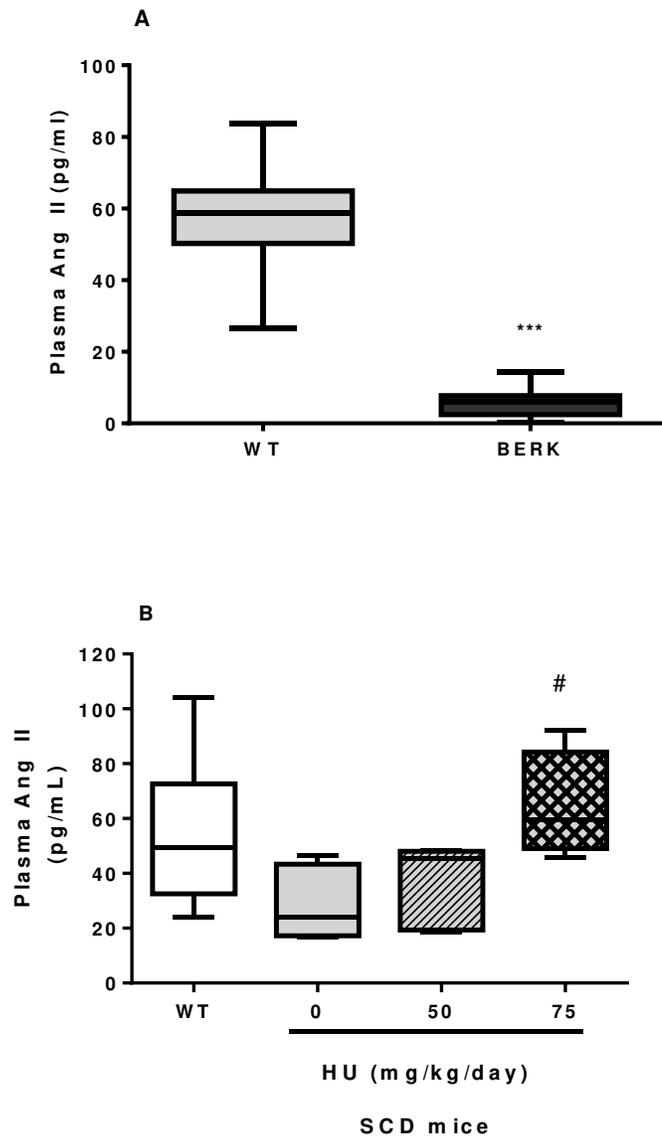


Figure 1