

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



Tallita Vassequi da Silva

“Avaliação da Função da MAGP1 na Formação de Neoíntima”

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Tallita Vassequi da Silva
Cláudio Ch. Werneck
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Biologia Funcional e
Molecular, na área de Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Claudio Chrysostomo Werneck

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

V447a

Vassequi-Silva, Tallita

Avaliação da função da MAGP1 na formação de neoíntima / Tallita Vassequi da Silva. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Claudio Chrysostomo Werneck.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Glicoproteína associada a microfibrila-1. 2. Fator transformador de crescimento beta. 3. Losartan. 4. Neoíntima. I. Werneck, Claudio Chrysostomo. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Evaluation of MAGP1 Function in Neoíntima Formation.

Palavras-chave em inglês (Keywords): Microfibril-associated glycoprotein-1; Transforming Growth factor beta; Losartan; Neoíntima.

Área de concentração: Bioquímica.

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Claudio Chrysostomo Werneck, José Camillo Novello, Wilson Nadruz Júnior.

Data da defesa: 25/02/2011.

Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

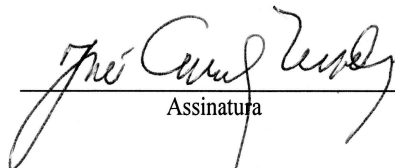
Campinas, 25 de Fevereiro de 2011

BANCA EXAMINADORA

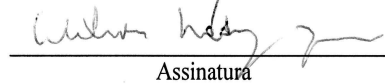
Prof. Dr. Claudio Chrysostomo Werneck (Orientador)


Assinatura

Prof. Dr. José Camillo Novello


Assinatura

Prof. Dr. Wilson Nadruz Júnior


Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Marangoni

Assinatura

Prof. Dr. Leonardo dos Santos

Assinatura

“(...) Como chegar a outro chão, outros lugares,
conhecer novas paisagens, inteirar-se de novos cultivos,
deleitar-se com outras cores e formas de terras,
espelhar-se e moldar-se, se se recusa a ir?
Para longe ou perto, para próximo ou muito distante,
para onde se possa estiar a própria bandeira e dizer:
Neste território eu pisei.”

Fanny Abramovich

DEDICATÓRIA

A meus pais, Carlos e Nilceia,

Que com enorme coragem e força de vontade,
não pouparam sacrifícios para permitir que o meu sonho
se tornasse realidade, dando-me apoio incondicional
na árdua tarefa de completar esse ciclo.

AMO VOCÊS!!!

AGRADECIMENTOS

- A Deus

Que iluminou meu caminho, minha vida, que guiou meus pensamentos fortalecendo minha alma, sustentando meus ideais e me ajudou a vencer as adversidades.

- A minha querida irmã Táilla e meu Noivo Bruno:

Quantas vezes nos despedimos porque a vontade de aprender foi soberana;

Porque ao iniciar a luta por um ideal, não pude parar;

Porque precisava construir meu castelo...

Vocês foram a força, a paciência e o acalento...

- A meus amigos e Familiares

Por todo carinho, apoio, incentivo, e principalmente, por entenderem minha ausência constante nos aniversários, encontros, festas...

Vocês sabem que tenho um objetivo a ser alcançado e infelizmente a distância é um mal necessário.

- A Família Monsueto

Pela calorosa acolhida, pelos maravilhosos dias de convivência, pelo enorme carinho e apoio que me deram todo esse tempo...

Vocês foram essenciais nessa caminhada.

- Ao Professor Claudio C. Werneck

Que ao longo dessa caminhada guiaste meu caminho,

Mostrando a cada momento conhecimento, compreensão, paciência, inteligência e dedicação. E diante disso, carregue na bagagem da vida o ensinamento eterno.

Hoje é minha vez de retribuir te desejando a continuidade de muito Sucesso e que tua estrela continue sempre brilhando.

- A Professora Cristina P. Vicente

Por toda alegria, paciência, dedicação e ensinamento...

E por tantas vezes que esteve ao meu lado, dedicando seu precioso tempo para que este trabalho se realizasse.

- A minha grande amiga Ana Cláudia C. N. Diez

Pela Amizade, companheirismo, paciência...

Pelos fins de semana de gavagem, para que eu pudesse visitar minha família...

Por todas as caronas, em dias de chuva e de sol também...

Enfim, por todo apoio e ajuda que me destes durante todo esse período.

- As minhas amigas Érica e Thanuci

Vocês foram as primeiras pessoas que conheci quando cheguei na Unicamp e desde então nos tornamos grandes amigas.

Obrigada pelo carinho, amizade, apoio, pelas conversas nos corredores, pelos almoços no bandejão, pela companhia no dia-dia.

- Ao Laboratório de fibras Elásticas: Talitinha, Guilherme, Denise, Catherine, Danielle, Neto, Fernanda, Camila

Pela amizade, carinho e apoio na realização dos experimentos.

Por nossos momentos de descontração, nossas festinhas no laboratório.

- Ao professor Eduardo Galembeck

Que me recebeu em seu laboratório com muito carinho...

Por ter aberto as portas da Unicamp para mim.

- Aos professores Sergio Marangoni, José Camillo Novello, Marcelo Brochi, Eduardo

Galembeck, Paulo Joazeiro, que aceitaram com prontidão o convite para participar da banca da minha qualificação e contribuíram enormemente para finalização deste trabalho.

- Aos professores José Camillo Novello, Wilson Nadruz Júnior, Sergio Marangoni e Leonardo dos Santos por aceitarem o convite para participar da banca de defesa da tese e enriquecerem meu trabalho.

- Aos professores José Eduardo Krieger e Leonardo dos Santos
Por nos receberem de braços abertos no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular, contribuindo para o enriquecimento desse trabalho.

A todos que contribuíram de alguma forma para que este ciclo se completasse...

O meu MUITÍSSIMO Obrigada, que Deus abençoe todos vocês!!!

AGRADECIMENTO ESPECIAL



Universidade Estadual de Campinas – SP

Laboratório de Fibras Elásticas – Unicamp

Laboratório de Arteriosclerose e Trombose – Unicamp

Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular – InCor-HC/FMUSP

FINANCIAMENTO



Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo

Processo Número: 2009/03495-5

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
LISTA DE FIGURAS	xv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
1. Introdução.....	1
2. Revisão da Literatura.....	5
3. Objetivo	22
3.1. Objetivo geral	22
3.2. Objetivos específicos	22
4. Materiais e Métodos	24
4.1. Materiais	24
4.2. Animais.....	24
4.3. Tratamento com fármaco.....	24
4.4. Aferição da pressão sanguínea por pletismografia	25
4.5. Angioplastia.....	26
4.6. Análise dos Cortes Histológicos.....	26
4.7. Quantificação de TGF- β no plasma por ELISA	28
5. Resultados.....	31
6. Discussão	37
7. Conclusão	46
8. Referências Bibliográficas.....	48
9. Anexos.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS

ACE – Enzima conversora de Angiotensina
AngII – Angiotensina II
AT1 – Receptor 1 de angiotensina II
BMP – Proteína morfogênica do osso (Bone morphogenetic Protein)
bp – Pares de base
BrdU – Bromodeoxyuridina
C-terminal – Carboxi terminal
°C – Graus Celsius
DAPI – 4',6-diamidino-2-fenylindole
DNA – Ácido desoxirribonucleico
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF – Fator de crescimento epidermal (Epidermal factor growth)
ELISA – Imunoensaio ligado à enzima (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)
EMC – Matriz extracelular
FGF – Fator de crescimento de fibroblasto (Fibroblast growth factor)
GLUT – Transportador de glicose
h – Horas
HCl – Ácido clorídrico
HEPES – 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
kDa – Quilo Dalton
LOS – Losartan
MAGP – Glicoproteína associada à microfibrila (Microfibril-Associated GlycoProtein)
MAGP1^{+/+} - Animal selvagem
MAGP1^{-/-} - Animal deficiente em MAGP1
mg/kg/dia – miligrama por quilograma por dia
µl – microlitro
mM – micro mol por litro
NaOH – Hidróxido de Sódio
nm – Nanômetro

N-terminal – Amino terminal

OCT – Temperatura ótima de corte (Optimal cutting temperature)

PDGF – Fator de crescimento derivado de plaqueta (Platelet-derived growth factor)

PBS – Tampão salina fosfato (Phosphate Buffered Saline)

pH – Potencial Hidrogeniônico

PLA – Placebo

RNA – Ácido Ribonucléico

ROS – Espécie reativa de oxigênio

SMC – Célula muscular lisa (Smooth muscle cell)

TGF- β – Fator de crescimento transformante beta (Transforming Growth Factor- β)

TGFBR – Receptor do fator de crescimento transformante beta (Transforming Growth Factor Beta Receptor)

VSMC – Células musculares lisas vasculares

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Eletromicrografia de tecido rico em fibra elástica.....	6
Figura 2.2. Esquema da deleção da MAGP1	8
Figura 2.3. Participação de TGF- β em doenças	12
Figura 2.4. Transdução da sinalização de TGF- β pelas SMADs.....	14
Figura 2.5. Corte transversal de uma artéria.....	18
Figura 2.6. Esquema da inibição do receptor AT1 por losartan.....	20
Figura 4.1. Imagem do aparelho de pletismografia.....	25
Figura 4.2. Imagem da cirurgia de angioplastia	26
Figura 4.3. Corte transversal da artéria carótida comum.....	28
Figura 5.1. Corte histológico da artéria carótida	32
Figura 5.2. Comparação da porcentagem de neoíntima	32
Figura 5.3. Área da formação de neoíntima	33
Figura 5.4. Análise do espessamento da média	33
Figura 5.5. Parâmetros hemodinâmicos	34
Figura 5.6. Análise de TGF- β total no plasma	35
Figura 6.1. Mecanismo molecular implicado na fibrose vascular causado por AngII e TGF- β	43

Avaliação da Função da MAGP-1 na Formação de Neoíntima

RESUMO

As fibras elásticas são responsáveis por darem sustentação a tecidos, como artéria aorta, pele, pulmão. São compostas por dois componentes distintos, elastina e microfibrila, quando analisadas por microscopia eletrônica. Anteriormente, os pesquisadores acreditavam que a principal função da rede de microfibrila, composta principalmente de fibrilinas e MAGPs, era na formação das fibras elásticas. Mas, sabe-se hoje, que a rede de microfibrila também é essencial na sinalização molecular. As MAGPs são proteínas aparentemente importantes para a função estrutural das microfibrilas e seu desenvolvimento. Embora sua função biológica ainda não seja conhecida, muitos estudos têm demonstrado sua interação com várias moléculas *in vitro*, como as fibrilinas 1 e 2, tropoelastina, biglican, decorina e colágeno VI. Até o momento nenhuma patologia foi relacionada à deficiência ou mutações no gene da MAGP1. Entretanto, dados preliminares demonstram que camundongos deficientes em MAGP1, quando submetidos à angioplastia, desenvolvem mais neoíntima quando comparados com animais selvagens. O procedimento de angioplastia resulta muitas vezes no remodelamento vascular, levando a reestenose ou formação de neoíntima. Muitos estudos têm relacionado o TGF- β com o processo de reestenose após angioplastia, justamente pelo fato desse fator de crescimento ser capaz de modular o desenvolvimento e remodelamento vascular. Levando em consideração dados recentes que demonstram que a MAGP1 tem a capacidade de interagir com o TGF- β ativo, foi de nosso interesse tratar os camundongos deficientes em MAGP1 e selvagens com losartan (antagonista de TGF- β) para verificar a função da MAGP1 e a possível participação de TGF- β na formação de neoíntima. Os animais foram tratados com losartan ou placebo por 4 semanas e então submetidos ao ensaio de angioplastia, aferição da pressão sanguínea e dosagem de TGF- β plasmático. Observou-se que todos os animais são normotensos e, que o tratamento com losartan resultou em uma redução na formação de neoíntima em comparação com os animais não tratados e que não houve diferença na formação de neoíntima entre os animais deficientes em MAGP1 comparados com selvagens. Não houve alteração dos níveis de TGF- β total. Os dados sugerem que a MAGP1 parece não ser importante no processo de formação de neoíntima e que o tratamento com losartan é eficaz na redução da formação da neoíntima, sem alterar a pressão sanguínea e os níveis de TGF- β .

Palavras-chave: Glicoproteína associada a microfibrila-1; TGF- β ; Losartan; Neoíntima.

Evaluation of MAGP1's Function in Neointima Formation

ABSTRACT

Elastic fibers are responsible for providing support to tissues such as aorta, skin and lung. They are composed of two distinct components, elastin and microfibrils, when analyzed by electron microscopy. Previously, researchers believed that the main function of the microfibrils network, mainly composed of fibrillin and MAGPs, was the formation of the elastic fiber. But, today, we know that the microfibril network is essential for molecular signaling also. The MAGPs are proteins apparently important for the structural functions of the microfibrils and development. Although its biological function is not known yet, many studies have demonstrated its interaction with various molecules *in vitro*, such as fibrillin 1 and 2, tropoelastin, biglycan, decorin and type VI collagen. So far no pathology was related to MAGP1 deficiency or mutations. However, preliminary data show that MAGP1 deficient mice when assayed using angioplasty model they developed more neointima than wild-type animals. The angioplasty procedure often results in vascular remodeling, leading to restenosis. Many studies have shown that TGF- β is related to this process mainly because this growth factor is able to modulate the development and vascular remodeling. Take into account recent data showing that MAGP1 has the ability to interact with active TGF- β , it was our interest to treat the MAGP1 deficient and wild-type mice with losartan (antagonist of TGF- β) to verify the MAGP1 function and possible involvement of TGF- β in the neointima formation. Mice were treated with losartan or placebo for 4 weeks and then tested on angioplasty, blood pressure measurement and serum TGF- β . It was observed that all animals are normotensive, and that losartan treatment resulted in a neointima reduction compared with untreated animals. No difference in neointima formation was observed between the MAGP1 deficient and wild-type mice. There was no change in total serum TGF- β levels. Data suggest that MAGP1, apparently is not important in neointima formation and the losartan treatment is effective in reducing neointima formation without affecting blood pressure and levels of TGF- β .

Keywords: Microfibril-associated glycoprotein-1; Transforming growth factor beta; Losartan; Neointima.

Introdução

1. Introdução

As fibras elásticas são responsáveis por dar sustentação aos tecidos, como artéria aorta, intestino, pele, dentre outros (Kielty et al., 2002). Elas são compostas por dois componentes distintos, elastina e microfibrila, quando analisadas por microscopia eletrônica. A rede de microfibrila é a primeira a ser desenvolvida, em seguida, infiltrada por tropoelastina, que origina a elastina, a qual resulta na fibra elástica madura (Fahrenbach et al., 1996). Anteriormente, os pesquisadores acreditavam que a principal função dessa rede de microfibrila – composta principalmente por duas glicoproteínas: fibrilinas e MAGPs (Microfibril-Associated GlycoProtein) – era na formação das fibras elásticas, onde ocorre a deposição de tropoelastina por ação das enzimas lisil oxidases, que promovem as reações cruzadas (de “cross-linking”) entre estes monômeros, para formação do polímero insolúvel e amorfo de elastina. Mas, sabe-se, hoje, que a rede de microfibrila é essencial para sinalização molecular.

As MAGPs são proteínas aparentemente importantes para a função estrutural das microfibrilas e seu desenvolvimento. Muito embora, a função biológica da MAGP1 não seja conhecida, muitos estudos bioquímicos têm demonstrado sua interação com várias moléculas *in vitro*, dentre elas, fibrilinas 1 e 2, tropoelastina, biglican, decorina e colágeno tipo VI (Jensen *et al.*, 2001; Finnis & Gibson, 1997; Werneck *et al.*, 2004; Trask *et al.*, 2000). Até o momento, nenhuma patologia foi relacionada à deficiência ou mutações no gene da MAGP1.

De acordo com dados da literatura, a MAGP1 desempenha um papel importante na formação de microfibrilas durante a embriogênese e sua expressão é crítica para o desenvolvimento vascular quando analisada em peixe zebra. Estas alterações vasculares

aparentemente estão associadas com a diminuição da interação integrina/matriz extracelular (Chen *et al.*, 2006), evidenciando a importância da MAGP1 como proteína capaz de mediar a interação das células com o ambiente externo. Porém, em mamíferos essas alterações não estão presentes, sendo que os camundongos deficientes em MAGP1 apresentam expectativa de vida e prole normais, sugerindo que a MAGP1, pelo menos no que se refere ao desenvolvimento, não desempenha papel fundamental. Mas, pode ser importante na homeostase dos tecidos em que faz parte (Werneck *et al.*, 2008; Weinbaum *et al.*, 2008).

Dados preliminares demonstraram que camundongos deficientes em MAGP1, quando submetidos a um modelo de angioplastia, desenvolvem mais neoíntima quando comparados com animais selvagens (79,9% e 52,7%, respectivamente). O procedimento de angioplastia resulta, muitas vezes, na hiperplasia da íntima e no remodelamento vascular. Os mecanismos que passam a atuar são complexos e multifatoriais, onde ocorre a ativação das células musculares lisas com sua alteração fenotípica, migração para a camada íntima, proliferação e produção de matriz extracelular, que contribui para a redução do lúmen arterial e limitação do fluxo sanguíneo, levando a reestenose (Forrester *et al.* 1991; da Luz & Solimene, 1997).

Muitos estudos têm relacionado o fator de crescimento transformante- β (TGF- β) com a reestenose após angioplastia, justamente pelo fato desse fator de crescimento ser capaz de modular o desenvolvimento e o remodelamento vascular (Ramirez & Dietz, 2007; Yamamoto *et al.*, 200).

Levando em consideração dados recentes que demonstram que a MAGP1 tem a capacidade de interagir com o TGF- β ativo, sugerindo que esta proteína poderia estar envolvida na regulação da ação deste fator de crescimento (Weinbaum *et al.*, 2008), foi de

nosso interesse tratar os camundongos deficientes em MAGP1 e os selvagens com o fármaco losartan (inibidor de receptor AT1 de angiotensina II), que resulta em diminuição nos níveis de TGF- β , a fim de comparar se a inibição do receptor AT1, provocada pelo losartan, pode mediar a inibição da resposta excessiva do TGF- β , a qual desencadeia um aumento na neointima após a cirurgia de angioplastia.

Revisão da Literatura

2. Revisão da Literatura

2.1. Fibras elásticas

As fibras elásticas são importantes componentes da matriz extracelular de estruturas ou órgãos que são submetidos à constante estresse mecânico, tais como pulmão, pele e grandes vasos. Por meio da análise ultra-estrutural, é possível identificar dois componentes bem distintos: uma rede de microfibrilas com diâmetro de aproximadamente 12nm entremeada por uma substância mais elétron-densa e amorfa formada pela elastina (figura 2.1). As microfibrilas são constituídas por vários componentes dos quais se destacam as fibrilinas, que são os componentes majoritários, e outras moléculas como as MAGPs (“Microfibril-Associated GlycoProtein”), fibulinas, entre outras (Kielty *et al.*, 2005; Kielty *et al.*, 2002).

Análise ultra-estrutural revela que as microfibrilas têm aparência semelhante a um “**colar de contas**”. Uma das principais funções das microfibrilas é participar na formação das fibras elásticas. Durante o desenvolvimento, a rede de microfibrila funciona como um molde para a deposição apropriada de tropoelastina, para a posterior ação das enzimas lisil oxidases, promovendo as reações de “cross-linking” entre estes monômeros, formando, então, o polímero insolúvel e amorfo de elastina. As funções específicas de cada um dos componentes na formação das microfibrilas e das fibras elásticas ainda não são totalmente conhecidas. Mutações no gene da fibrilina 1 estão relacionadas com a Síndrome de Marfan e resulta em anormalidades no esqueleto ósseo e na formação das paredes dos vasos sanguíneos, que ficam sujeitos à ocorrência de aneurismas e rupturas (Reinhardt *et al.*, 1996). Mutações no gene da fibrilina 2 leva à aracnodactilia contratural congênita, uma

doença autossômica de caráter dominante, que apresenta algumas características em comum com a Síndrome de Marfan (Lee *et al.*, 1991; Gupta *et al.*, 2002). Fibrilina-3 é o mais novo membro desta família de glicoproteínas e até o momento, nenhuma patologia foi caracterizada como estando associada a esta molécula.

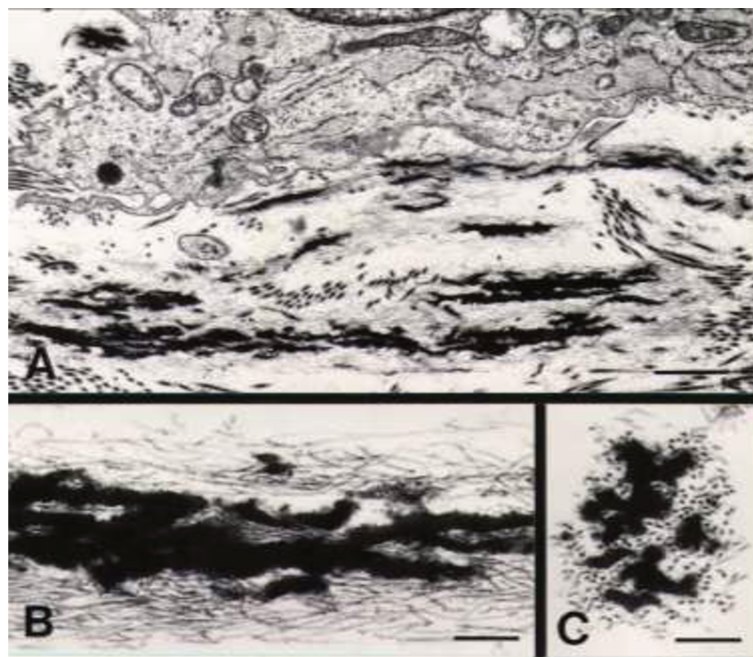


Figura 2.1. Eletromicrografia de tecido rico em fibra elástica (aorta) em desenvolvimento. A – Visão geral do tecido rico em fibra elástica. B e C – Presença de uma região mais eletrodensa, a elastina, e a rede de microfibrila. B – Corte longitudinal e C – Corte transversal (Davis, 1994).

2.2. MAGPs

As MAGPs formam outro grupo de proteínas aparentemente importante para a função estrutural das microfibrilas e seu desenvolvimento, muito embora, atualmente, saiba-se da ocorrência de isoformas intracelulares que podem desempenhar importante função na sinalização celular. Os dois membros da família das MAGPs, MAGP1 e 2, apresentam como principal característica, uma sequência de 60 aminoácidos na região C-terminal que foi identificada como sendo o domínio de ligação com a matriz extracelular

(Segade *et al.*, 2002). Ao contrário das fibrilinas, que são glicoproteínas de alta massa molecular, as MAGPs apresentam baixa massa molecular (aproximadamente 20 kDa).

MAGP1, que é o principal foco deste estudo, possui dois domínios distintos: a região N-terminal, com características ácidas, é rica em prolina e contém um segmento rico em resíduos de glutamina, e a região C-terminal, que apresenta todos os 13 resíduos de cisteína presentes na molécula e carga líquida total positiva, em pH fisiológico. Esta região é muito importante na determinação da estrutura terciária e na interação da proteína com outras moléculas presentes nas fibras elásticas, através da formação de pontes bissulfeto (Prosser *et al.*, 1984).

Embora o significado biológico não seja conhecido, muitos estudos bioquímicos têm demonstrado que a MAGP1 interage com várias moléculas *in vitro*, dentre elas, fibrilinas 1 e 2, tropoelastina, biglican, decorina e colágeno tipo VI (Jensen *et al.*, 2001; Finnis & Gibson, 1997; Werneck *et al.*, 2004; trask *et al.*, 2000). Até o momento, nenhuma patologia foi relacionada à deficiência ou mutações no gene da MAGP1. Estudos comparativos das seqüências de MAGP1 mostram que é uma proteína altamente conservada, não somente entre os mamíferos, mas também entre vertebrados inferiores (65% de homologia se considerada a molécula toda e 96% se considerada a região C-terminal da proteína de mamífero comparada a do peixe zebra). Nenhum gene homólogo a MAGP1 foi encontrado em banco de dados de levedura, mosca ou vermes, sugerindo que MAGP1 é um gene relativamente novo na escala evolutiva. Na verdade, o aparecimento da MAGP1 coincide com o aparecimento do gene da elastina (Segade *et al.*, 2002; Sage & Gray, 1981), sugerindo que estas proteínas estão relacionadas.

Estudos com o peixe zebra mostraram que MAGP1 desempenha um papel importante na formação de microfibrilas durante a embriogênese e que a expressão de

MAGP1 é crítica para o desenvolvimento vascular. Alterações vasculares estão associadas com a diminuição da interação integrina/matriz extracelular (Chen *et al.*, 2006), evidenciando a importância da MAGP1 como proteína capaz de mediar a interação das células com o ambiente externo.

Para o entendimento da função da MAGP1, foram desenvolvidos animais com mutação no gene da MAGP, cuja estratégia foi a substituição dos éxons 3 a 6 pelo cassete que confere resistência a neomicina (neo) (figura 2.2). Esta modificação resultou em animais denominados deficientes em MAGP1 que apresentam um aumento de peso e de tecido adiposo, mas não possuem nenhuma patologia, são animais saudáveis (Weinbaum *et al.*, 2008).

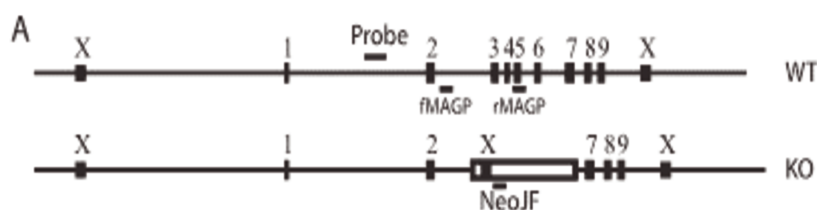


Figura 2.2. Esquema da deleção da MAGP1. WT: animal selvagem; KO: deficiente em MAGP1 (Weinbaum *et al.*, 2008).

Recentemente, dados obtidos por nosso grupo sugerem a importância desta molécula na formação de trombos na artéria carótida de camundongos. Utilizando o modelo fotoquímico de indução de trombos em camundongos selvagens e deficientes em MAGP1, estes últimos necessitaram de quase o dobro do tempo para formar um trombo que levasse a oclusão do vaso em estudo (57 min e 99 min, respectivamente). Os dados mostram que a MAGP1 interage com importantes moléculas do processo de formação do trombo como o Fator de von Willebrand e Fibrinogênio (Werneck *et al.*, 2008).

Weinbaum e colaboradores (2008) avaliaram a importância biológica da MAGP1 utilizando os camundongos deficientes em MAGP1. Foi observado, que muito embora os

tecidos elásticos ricos em microfibrilas fossem normais e funcionais, quando em *background* genético misto, anormalidades ósseas, comprometimento do sistema cardiovascular, alterações no metabolismo energético e problemas de cicatrização estavam presentes. Fenótipos associados com mutações nas proteínas microfibrilares têm sido atribuídos a uma inabilidade de a proteína mutada ligar-se e seqüestrar fatores de crescimento, particularmente membros da família TGF- β (Fator de crescimento transformante β). Neste trabalho foi visto que essa proteína pode se ligar as formas ativas de BMP-7 (proteína morfogênica do osso) e de TGF- β , sugerindo que as alterações encontradas poderiam estar relacionadas a estes fatores de crescimento.

2.3. Importância da matriz extracelular

Há algum tempo, muitos pesquisadores tem demonstrado a importância de moléculas da matriz extracelular (EMC) não só como parte de um arcabouço estrutural, mas também na determinação do destino das células circunvizinhas através da regulação da ação de fatores que influenciam os mais diferentes processos celulares, desde a diferenciação até a proliferação. Com as moléculas que compõem as microfibrilas não tem sido diferente. Por exemplo, pacientes portadores da Síndrome de Marfan apresentam mutações no gene da fibrilina-1. Esta doença se caracteriza por um grande comprometimento do desenvolvimento do esqueleto ósseo, dos pulmões e na formação dos grandes vasos como a artéria aorta. Dados recentes da literatura demonstram que estas anomalias estão relacionadas a uma desregulação da atividade do TGF- β devido à diminuição de Fibrilina-1 na matriz extracelular. O tratamento com Losartan, anti-hipertensivo que atua como um bloqueador do receptor AT1 de angiotensina II (AngII), que

dentre outras atividades, diminui a expressão de TGF- β , leva a reversão dos sinais clínicos característicos de Marfan em camundongos transgênicos (Habashi *et al.*, 2006).

2.4. TGF- β

O TGF- β , constituído por uma grande família de proteínas, está presente sob três isoformas — TGF β -1, TGF β -2 e TGF β -3 (ten Dijke & Arthur, 2007). Ele promove diferentes respostas biológicas ligando-se a um par de receptores de membranas dos tipos I e II, que juntos ativam uma sinalização intracelular mediada pelas proteínas SMADs, que, uma vez fosforiladas, são levadas ao núcleo, onde ativam ou reprimem a transcrição de diferentes genes alvos (Massague & Gomis, 2006; Feng & Derynck, 2005). Esse fator, além de envolver-se em diferentes respostas biológicas, como no controle da proliferação e da diferenciação celular, desempenha papel importante durante a hematopoiese e a organogênese do coração, rim, osso, fígado, trato gastrointestinal e vascular. Promove ainda inibição da proliferação de células do tecido conjuntivo, diminuição da degradação do colágeno e mantém a homeostasia no adulto, com funções autócrina, parácrina e, em alguns casos, endócrina. O desbalanceamento do TGF- β está relacionado a muitas patologias, dentre elas câncer, fibrose, doença auto-imune e vascular (Zeisberg *et al.*, 2003; ten Dijke & Arthur, 2007).

A superfamília TGF- β é composta por várias citocinas multifuncionais, incluindo TGF- β , BMPs, ativinas, inibinas e micostatina. Eles participam de uma gama de processos que incluem, dentre outras, diferenciação tecidual durante o desenvolvimento através da regulação da função de células imunes e mesenquimais (Bobik, 2006). TGF- β e BMPs têm sido implicados em desordens vasculares, tais como aterosclerose, hipertensão pulmonar e

re-estenose após angioplastia (figura 2.3). TGF- β 2 e 3 e BMP-4, 5, 6 e 7 são expressos por células na parede dos vasos e são capazes de modular o desenvolvimento e remodelamento vascular por alterarem a diferenciação, proliferação, migração, produção de matriz extracelular e atividade das células imunes (Ramirez & Dietz, 2007; Yamamoto *et al.*, 2000).

Uma via de modulação do TGF- β ocorre pelo vasoconstritor angiotensina II, indutor da expressão de trombospondina 1, um potente ativador de TGF- β (Murphy-Ullrich & Poczatek, 2000). Na parede dos vasos, a sinalização via AT1 estimula a proliferação de VSMCs e fibrose da parede vascular. Estudos demonstram a utilização do fármaco losartan como antagonista de TGF- β , devido a um bloqueio no receptor AT1 de AngII e diminuindo os níveis de TGF- β . O Losartan é atualmente utilizado no tratamento clínico da hipertensão e prevenção de Acidente Vascular encefálico em adultos e crianças (Habashi *et al.*, 2006).

O excesso de sinalização de TGF- β na parede da aorta de pacientes com síndromes de aneurisma aórtico, incluindo a síndrome Loyes-Dietz (causada por mutação em TGF BR1 ou TGF BR2) e síndrome da tortuosidade arterial (causada por mutações em GLUT10) sugere que Losartan pode ser de grande relevância no tratamento das vasculopatias humanas (Habashi *et al.*, 2006).

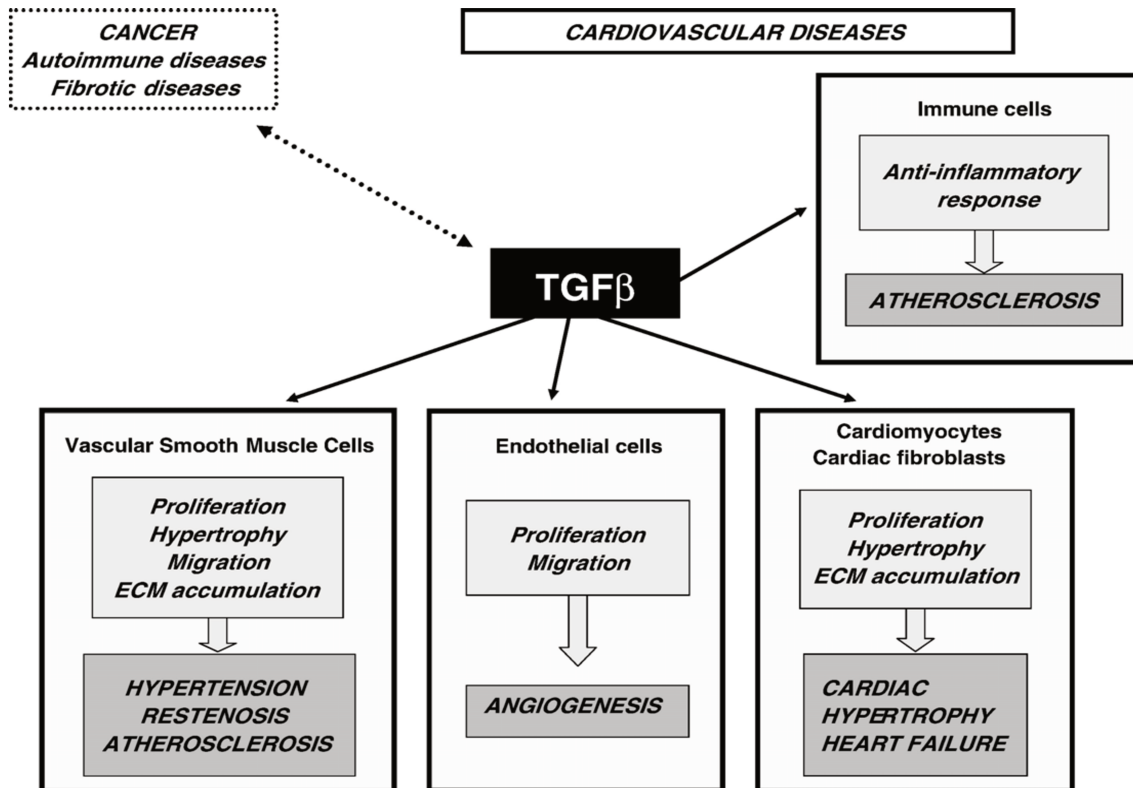


Figura 2.3. Participação de TGF- β em doenças. TGF- β participa de várias doenças humanas, incluindo câncer, doenças autoimune, bem como doenças cardiovasculares (Ruiz-Ortega et al., 2007).

2.5. SMADs

A ação do TGF- β se inicia com a ligação a uma combinação de receptores de membrana específicos dos tipos I e II com atividade serina-treonina quinase. TGF- β liga-se ao seu receptor tipo II específico, TbRII, o qual fosforila e ativa o receptor tipo I, TbRI. O receptor tipo I propaga a sinalização por meio da ativação e fosforilação de proteínas citoplasmáticas da família de SMADs, conhecidas como receptor-regulated SMADs (R-SMADs), SMAD2 e SMAD3. A fosforilação de R-SMADs permite a sua interação com common-mediator SMAD (co-SMAD), SMAD4, formando um complexo capaz de atingir o núcleo, onde irão modular a transcrição de genes-alvos (figura 2.4) (Massague, 1998). A sinalização SMAD é atenuada por SMAD7, uma SMAD inibitória (I-Smad) que previne a

fosforilação de R-SMAD e interfere na formação do complexo R-SMAD com Co-SMAD (Heldin et al., 1997). BMP, outro membro da superfamília de TGF- β , é bem conhecido pelos seus efeitos na formação óssea. De modo similar à sinalização de TGF- β e ativina, BMP atua através de seus receptores específicos e induz sinalização intracelular via R-SMADs, SMAD1, SMAD5 e SMAD8, as quais se associam à co-SMAD, SMAD4. Esse complexo se move ao núcleo para modular a transcrição de genes-alvos de BMP. SMAD6 é a SMAD inibitória para sinalização de BMP. Assim, SMAD4 além de participar da sinalização TGF- β , é uma mediadora comum para outros membros da superfamília de TGF- β . Por outro lado, SMAD2 e SMAD3 são exclusivas da sinalização de TGF- β (Massague, 1998).

Vale ressaltar que a ativação de TGF- β e das SMADs pode ser efetuada de forma independente pela angiotensina II, ou seja, as SMADs podem ser ativadas sem que ocorra a sinalização de TGF- β (Ruiz-Ortega et al., 2007).

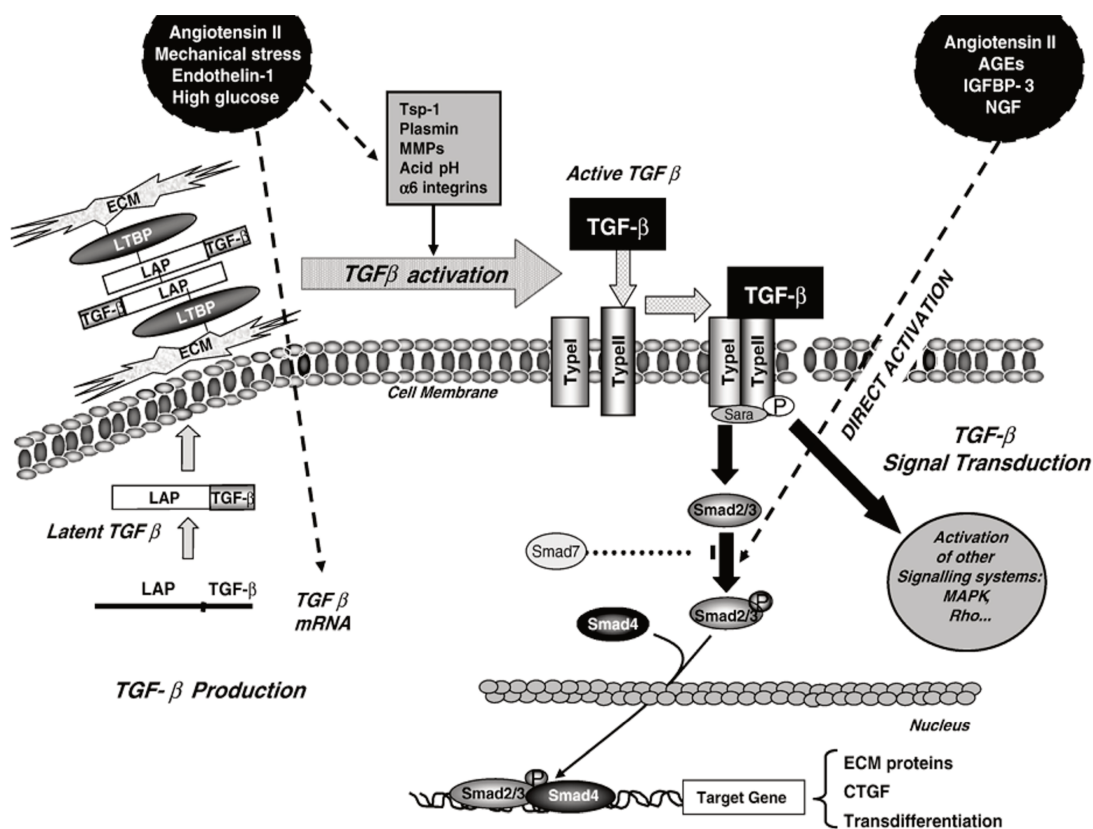


Figura 2.4. Transdução da sinalização de TGF-β pelas SMADs (Ruiz-Ortega et al., 2007).

2.6. Doença cardiovascular

As doenças cardiovasculares exercem um papel preponderante na morbimortalidade mundial. No Brasil, constituem-se na principal causa de mortalidade e têm impacto relevante na carga de doença total do país. Por outro lado, trata-se de uma área com grande disponibilidade de ensaios clínicos e experimentação animal, na qual tem havido, internacionalmente, grandes esforços para o desenvolvimento de diretrizes baseadas em evidência científica (Leite et al. 2007; Oliveira et al., 2006).

Em função da grande incidência de doenças cardiovasculares, estudos relacionados ao uso de *stents* intracoronários tem aumentado, principalmente associados ao tratamento da aterosclerose. Em muitos casos, a hiperplasia de células musculares lisas vasculares

(VSMC) e deposição de matriz extracelular, levam a formação de neoíntima, o que pode levar a reestenose do vaso em questão, constituindo assim, um grande problema após este procedimento (Yao *et al.*, 2009). Alguns estudos têm indicado que TGF- β 1 desempenha um papel importante na patogênese da reestenose, por ser um grande indutor da síntese de proteínas de matriz (Bobik, 2006; Yao *et al.*, 2009; Ruiz-Ortega *et al.*, 2007).

Estudando a apoptose celular vascular após uma lesão, Pollman e colaboradores relataram um efeito bifuncional modulador do TGF- β 1, onde essa citocina induz a morte de células endoteliais e previne a morte de VSMC. A superexpressão transitória de TGF- β 1 induz o crescimento da lesão vascular seguido por apoptose de células vasculares durante a retirada de TGF- β 1 e regressão da lesão (Pollman *et al.*, 1999).

2.7. Angioplastia

A angioplastia é, na atualidade, um dos métodos mais importantes para o tratamento das lesões obstrutivas coronárias. O procedimento usa um cateter com um balão minúsculo no interior das artérias coronárias obstruídas, para dilatá-las e restaurar o fluxo de sangue sem necessidade de cirurgia de pontes de safena. Mas logo se descobriu que as artérias se obstruíam novamente, em até metade dos pacientes dentro de seis meses após o procedimento. Sendo assim, os médicos começaram a introduzir bobinas minúsculas de fio metálico chamado stents, para manter as artérias abertas, como se fosse um arcabouço de sustentação (da Luz & Solimene, 1997).

Mas, a reoclusão dos vasos - ou reestenose - ocorre em aproximadamente 20% dos pacientes submetidos a este tipo de procedimento. Esta reestenose é causada por processos fisiológicos, que levam ao crescimento de células em direção a luz do vaso, e é o maior

fator limitante da técnica de revascularização coronária percutânea, por cateterismo (da Luz & Solimene, 1997).

No que se refere ao modelo de angioplastia em ratos *wistar*, Yao e colaboradores (2009), pesquisaram o uso de um PI poliamida (Pyrrole-imidazole polyamide) contra TGF- β 1. Os pesquisadores verificaram que as VSMC da íntima apresentaram um fenótipo sintético, após indução por PDGF (Platelet-derived growth factor), produzindo níveis elevados de várias citocinas e fatores de crescimento incluindo TGF- β , que estão envolvidos na formação neoíntima. Portanto, TGF- β 1 induz formação de neoíntima por estimulação da proliferação de VSMC da camada íntima e, pela deposição de matriz extracelular, assim suprimindo a endotelização após uso de *Stents*. Sendo assim, esses pesquisadores utilizaram o PI poliamida como inibidor do RNAm para TGF- β 1 na artéria carótida dos ratos, após injúria, e como resultado a esse tratamento, obtiveram uma rápida regeneração de células endoteliais, contribuindo para supressão da hiperplasia da íntima.

2.8. Reestenose

No processo da reestenose existe uma seqüência de eventos celulares, que podem ser divididos em três fases, embora essas fases possam não ser completamente individualizadas (Forrester et al. 1991). Na fase 1, a lesão vascular causa denudação endotelial, rompimento da neoíntima, ruptura da lâmina elástica interna, lesão das células musculares lisas da camada média e fratura e compressão da placa. Pela progressão do estiramento, pode ocorrer dissecação da camada média e dilatação da média e adventícia. Há interação de plaquetas e trombina com a parede lesada e liberação de substâncias vasoativas, tais como tromboxano e serotonina; são liberados, também, fatores de

crescimento derivados de plaquetas (PDGF – Platelet-Derived Growth Factor), fator de crescimento epidérmico (EGF – Epidermal Growth Factor), fator de crescimento fibroblástico (FGF – Fibroblast growth Factor) e TGF- β . Na fase 2, há ativação e replicação das células musculares lisas e sua migração da camada média para a íntima. Na fase 3, ocorre auto-replicação das células musculares lisas agora presentes na camada interna. Essas células sofrem uma mudança fenotípica: passam de células contráteis para células sintéticas. Quando elas perdem a capacidade de se replicar, passam a produzir proteoglicanos, sulfato de condroitina, dermatan-sulfato e heparan-sulfato, e há a modulação da matriz extracelular e remodelamento do vaso. Acontece formação de colágeno oriundo de fibroblastos e células musculares lisas, e de fibras de elastina. A fase 1 dura de minutos a horas, e a fase 2 pode demorar dias ou semanas; a neoíntima se desenvolve de 30 a 60 dias após a lesão e pode continuar a crescer durante meses. A remodelação do vaso depende da modulação da matriz; na fase 3, ocorre a reendotelização do vaso lesado. A magnitude da neoíntima pode atingir valores consideráveis quando comparada à espessura da camada média arterial. De uma estrutura praticamente linear situada logo abaixo do endotélio, a região da íntima pode atingir 4-5 vezes a espessura da camada muscular lisa, como demonstrado em coelhos normais submetidos à angioplastia (Janiszewski et al., 1996).

A figura 2.5 apresenta um corte transversal de uma artéria, onde é possível identificar suas camadas íntima (que é lesionada durante angioplastia), média e adventícia, assim como as lâminas elásticas interna e externas (Kielty *et al.*, 2007).

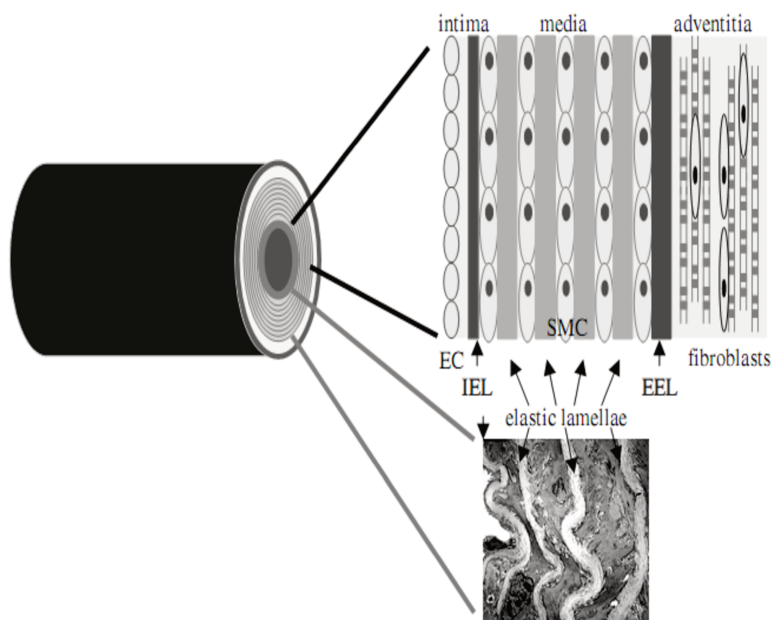


Figura 2.5. Corte transversal de uma artéria. São mostradas as camadas íntima, média e adventícia, lâmina elástica interna (IEL), lâmina elástica externa (EEL) e, na parte inferior, uma micrografia elétrica de transmissão da parede arterial. EC – Célula endotelial; SMC – Célula muscular lisa (Kielty *et al.*, 2007).

O mecanismo exato do remodelamento após a angioplastia não está determinado, frequentemente ocorre à dissecção arterial que se estende pelas camadas da média e da íntima; admite-se que a dissecção possa enfraquecer segmentos da parede do vaso e causar sua dilatação, como resposta ao estiramento resultante do crescimento da íntima; por outro lado, a resposta inflamatória à lesão pelo balão poderia iniciar o remodelamento por meio da liberação de enzimas proteolíticas (Currier *et al.*, 1995). O papel do remodelamento arterial após arterectomia ou implante de *stents* não está determinado. Na grande maioria dos estudos, cujo objetivo foi a prevenção da reestenose após a angioplastia, foram direcionados apenas à prevenção da hiperplasia neointimal ou processos trombóticos ou espasmo, e não procuraram intervir no processo de remodelamento. Talvez essa seja a principal explicação para o fato de todas as intervenções farmacológicas realizadas até o momento não terem sido bem sucedidas.

Vale ressaltar que dados preliminares em nosso laboratório mostram que camundongos deficientes em MAGP1, apresentam uma maior formação de neoíntima (re-estenose) no vaso após o procedimento de angioplastia.

2.9. Fármaco – losartan

O fármaco losartan é um inibidor do receptor AT1 de angiotensina II (ver figura 2.6). Seu efeito resulta em vasodilatação e diminuição na produção de aldosterona pelas glândulas supra-renais, que leva a não retenção de sódio e água.

Em relação aos seus efeitos, estudos com portadores da síndrome de Marfan, os quais apresentam desordem no tecido conjuntivo e frequentemente, anomalias nas estruturas esquelética, pulmonar, cardíaca, ocular, vasos sanguíneos entre outras, são tratados com o fármaco losartan, o qual melhora significativamente a redução no desenvolvimento do aneurisma, devido a um bloqueio no receptor (AT1) de angiotensina II e diminui os níveis de TGF- β (Robinson et al., 2006). Adicionalmente, o trabalho de Habashi et al. (2006) demonstrou uma melhora na arquitetura das fibras elásticas, quando trataram camundongos transgênicos que apresentavam sinais clínicos de síndrome de Marfan, com anticorpo anti-TGF- β e, conforme aumentaram as doses de anticorpo, a melhora foi mais significativa. Nesse mesmo trabalho, foram também tratados animais com os fármacos propranolol e losartan, em que pôde ser verificado uma melhora significativa nas estruturas das fibras elásticas quando este último foi utilizado.

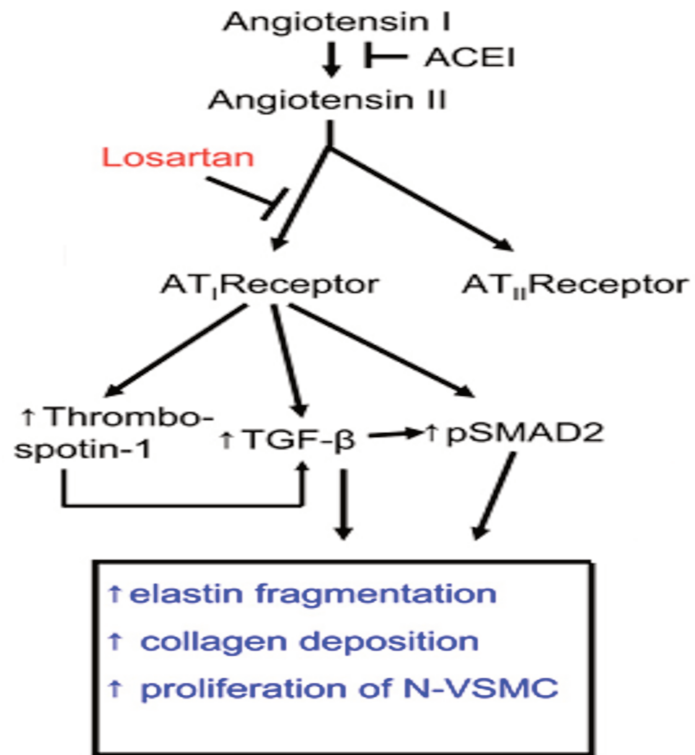


Figura 2.6. Esquema da inibição do receptor AT_I por losartan (Brooke et al., 2008).

Objetivo

3. Objetivo

3.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste projeto foi avaliar a função da MAGP1 no processo de formação de neoíntima em camundongos.

3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Verificar a formação de neoíntima em camundongos selvagens e deficientes em MAGP1 através de um modelo de angioplastia.

3.2.2. Verificar se o tratamento com losartan altera a formação de neoíntima em camundongos selvagens e deficientes em MAGP1.

3.2.3. Quantificar TGF- β no plasma dos animais selvagens e deficientes em MAGP1 tratados e não tratados com losartan, bem como sua atividade nas amostras de vasos (neoíntima) obtidas a partir da cirurgia.

Materiais e Métodos

4. Materiais e Métodos

4.1. Materiais

O anestésico cloreto de ketamina foi adquirido da Agener União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, SP, e cloreto de xilazina da Vetbrands Saúde Animal, Paulínia, SP. O fármaco Losartan foi obtido da Biolab Sanus Farmaceutical LTDA, São Paulo. Os demais reagentes foram produtos analíticos de uso corrente adquiridos no comércio local.

4.2. Animais

Para realização dos experimentos foram utilizados camundongos selvagens da linhagem C57BL6 provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB), da Universidade Estadual de Campinas, SP. Já os camundongos deficientes em MAGP1^{-/-} foram cedidos pelo Dr Robert P. Mecham, Washington University School of Medicine (WUSW), EUA. Os camundongos foram mantidos em temperatura de $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ em ciclo de claro e escuro de 12h, com livre acesso a água e ração. Os protocolos experimentais utilizados com os animais foram previamente submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA/IB/UNICAMP) protocolo número 1823-1. Além disso, para os roedores, foi utilizada dieta padrão (Nuvilab CR1®).

4.3. Tratamento com fármaco

Os animais foram tratados por quatro semanas com o fármaco losartan (15mg/kg/dia) ou placebo (água), via gavagem (introdução oral do medicamento) diária.

4.4. Aferição da pressão sanguínea por pletismografia

Grupos de quatro animais (23-25g) foram dispostos em uma plataforma aquecida a 37°C com quatro canais, em seguida suas caudas foram colocadas em um manguito, a fim de obstruir o fluxo sanguíneo, e imobilizado com fita adesiva. O fluxo sanguíneo foi avaliado fotoeletricamente através da amplitude de onda gerada quando ocorre a deflação do manguito. Foram realizadas 10 medições preliminares, para determinar o padrão de estabilidade, e outras 25 medições, com intervalo de 25 segundos entre cada aferição. Essas medições foram realizadas durante uma semana utilizando um total de seis animais para cada grupo de tratamento, sendo que os dois primeiros dias da semana foram considerados período de adaptação dos animais. O pletismógrafo está ligado a um computador onde foram registrados dados como: Pressão sanguínea Sistólica, Diastólica, Pulsação cardíaca e a Pressão sanguínea Média (Krege *et al.*, 1995). Abaixo, na figura 4.1, está demonstrado o aparelho de pletismografia utilizado para aferição da pressão sanguínea.

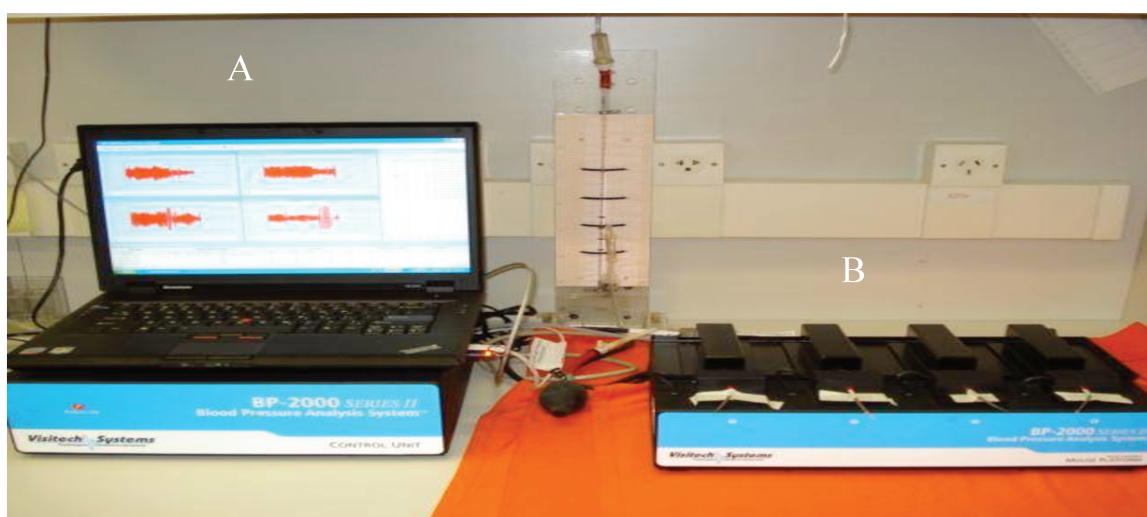


Figura 4.1. Imagem do aparelho de pletismografia. A) plataforma de controle e em cima o notebook com o software para aferição da pressão sanguínea e B) plataforma aquecida onde os camundongos ficam posicionados com o esfignomanômetro preso na base caudal.

4.5. Angioplastia

Foram utilizados camundongos selvagens e deficientes em MAGP1, tratados ou não com losartan, com peso entre 23-25g anestesiados com 16 mg/kg de xilazina e 100 mg/kg de ketamina. Foi utilizado um *n* de 18 animais para cada grupo. As artérias carótidas esquerda comum e interna foram firmadas com um grampo para a interrupção do fluxo sanguíneo e uma sonda metálica de 0,63 mm de diâmetro foi introduzida na artéria carótida comum por meio da artéria carótida externa (esse procedimento foi repetido 3x). Esta sonda provoca uma dilatação do vaso de aproximadamente 2,5x do seu tamanho, que resulta em lesão endotelial. A sonda foi retirada e a carótida externa ligada nos dois lados da arteriotomia, os grampos foram removidos e a pele suturada com fio de Ácido Poliglicólico 6.0 cor violeta (PGA-6015, Techsuture), conforme demonstrado na figura 4.2. Em seguida, os camundongos ficaram em recuperação por 4 dias e, logo após foram novamente tratados com losartan 15mg por 21 dias ou placebo (Vicente *et al.*, 2007).

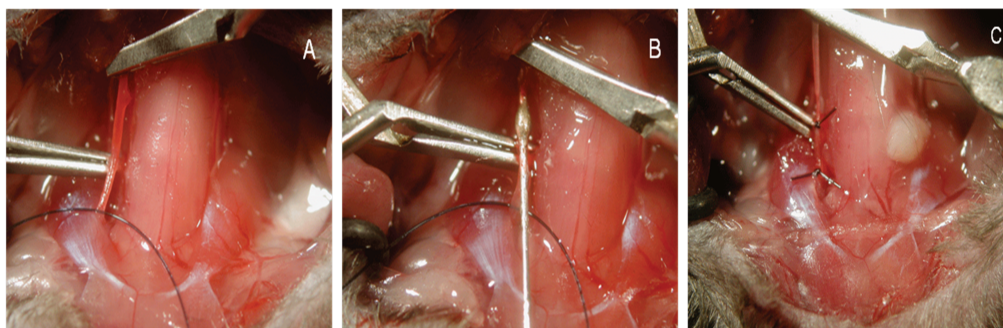


Figura 4.2. Imagem da cirurgia de angioplastia. A- Isolamento da artéria carótida esquerda e interrupção do fluxo sanguíneo através de um *clamp* colocado na artéria carótida comum e interna; B- Inserção da sonda e C- Arteriotomia.

4.6. Análise dos Cortes Histológicos

Após 21 dias da cirurgia, os camundongos foram anestesiados com 16 mg/kg de xilazina e 100 mg/kg de ketamina e, em seguida, foi realizada uma incisão no átrio direito.

Logo, no ventrículo esquerdo foi posicionado um cateter e perfundido com soro fisiológico por 5 minutos a uma pressão constante de 100 mmHg. A artéria carótida foi coletada e embebida em O.C.T. (Tissue-Tek Optimal Cutting temperature Compound). Posteriormente, foram feitos cortes de 8- μ m a partir do segmento lesionado, por meio de um micrótomo (Microm HM505E) e corado com hematoxilina e eosina. Foram montadas 25 lâminas com 5 cortes em cada lâmina. As imagens foram feitas em microscópio com lente ocular 10x e objetiva 40x (Axio Observer.Z1, Zeiss) e fotografadas com câmera digital (AxioCam MRC). A área do corte transversal da lâmina elástica externa e lâmina elástica interna foi determinada por meio do software AxioVision Rel.4.8. A área da íntima foi calculada por subtração da área do lúmen, a partir da área total englobada pela lâmina elástica interna. A área da média foi calculada por subtração da área englobada pela lâmina elástica interna, a partir da lâmina elástica externa, como representado na figura 4.3 (Vicente *et al.*, 2007).

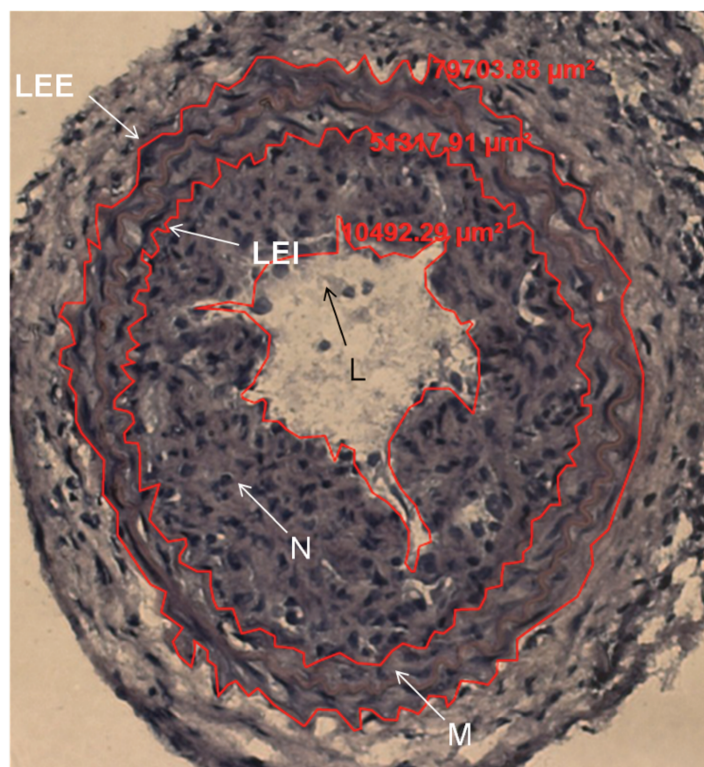


Figura 4.3. Corte transversal da artéria carótida comum esquerda de um animal deficiente em MAGP1 tratado com placebo, corado com Hematoxilina e Eosina. LEE – Lâmina elástica externa; LEI – Lâmina elástica interna; N – Área de formação de neointima; L – Lúmen do vaso

4.7. Quantificação de TGF- β no plasma por ELISA

Após quatro semanas de tratamento, os animais selvagens e deficientes em MAGP1 tratados com losartan ou placebo foram anestesiados com os cloretos de ketamina e xilazina e logo após foi retirado o sangue pela veia cava inferior, utilizando como anticoagulante o EDTA a uma concentração de 10%. O sangue foi mantido em gelo por um tempo máximo de 30 minutos. Logo após, foi submetido à centrifugação de 1000xg por 20 minutos, o plasma foi então transferido para um novo tubo e submetido a uma centrifugação de 10000xg por 10 minutos, após a segunda centrifugação o plasma foi congelado à -20°C.

A análise foi realizada a partir do kit ELISA (R&D Systems, Minneapolis-USA) seguindo as instruções do fabricante. Onde, 40µl do plasma em questão foi ativado com 10 µl de 1N HCL por 10 minutos e posteriormente foi neutralizado com 8µl da solução de 1,2N NaOH/0,5M HEPES, e em seguida, diluído em diluente de calibração na concentração de 1:60.

Na placa de ELISA, sensibilizada com anticorpo primário, foi adicionado 50µl do diluente RD1-73 e 50µl do padrão, controle ou amostra ativada, em cada poço. A placa foi coberta e incubada por 2 horas em temperatura ambiente. Após a incubação, a placa foi lavada com auxílio de um lavador de placas (Multiwash II, Tricontinent scientific - USA) com tampão de lavagem por 4 vezes, e 100µl do TGF-β conjugado foi adicionado a cada poço e novamente incubada por 2 horas e, em seguida, lavada por 4 vezes com tampão de lavagem. Foi adicionado 100µl de tampão de lavagem e a placa foi protegida da luz e incubada por 30 minutos. Em seguida, foi adicionado solução *Stop* em cada poço. A leitura foi realizada em um leitor de ELISA (Synergy 2, Biotek, Winooski - USA) a um comprimento de onda de 450nm (com correção fixada em 540nm ou 570nm).

4.8. Análise Estatística

Os valores foram expressos como média $\pm$ DP. As diferenças entre médias foram analisadas pelo teste Anova e Tukey, por meio do programa Prisma 5.0, como critério de significância $p < 0.05$.

Resultados

5. Resultados

Como descrito em materiais e métodos, os animais foram submetidos à angioplastia e após 21 dias de tratamento os animais foram novamente anestesiados e perfundidos com soro fisiológico (conforme materiais e métodos). As artérias carótidas esquerda e direita (controle) foram coletadas e preparadas para o corte histológico. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina, onde pode-se ver o núcleo das células musculares lisas e as lâminas elásticas do tecido estudado.

A figura 5.1 mostra as imagens das carótidas, esquerda e direita de animais selvagens ($MAGP1^{+/+}$) e deficientes em $MAGP1$ ($MAGP1^{-/-}$) tratados com losartan ou placebo. É possível identificar a lâmina elástica interna (LEI), lâmina elástica externa (LEE), o lúmen do vaso (circundado pela LEI), a área de formação de neoíntima (células musculares lisas que proliferaram em direção ao lúmen do vaso), e a área da camada média (entre as LEE e LEI). A partir das imagens das carótidas dos animais foi possível analisar a formação de neoíntima e a eficácia do tratamento com losartan.

Os cortes foram analisados por meio do software AxioVison Rel.4.8. onde a porcentagem de neoíntima (figura 5.2) foi dada pela área de formação de neoíntima em relação ao lúmen do vaso (área delimitada pela lâmina elástica interna). Na figura 5.3 foi analisado a área real da formação de neoíntima.

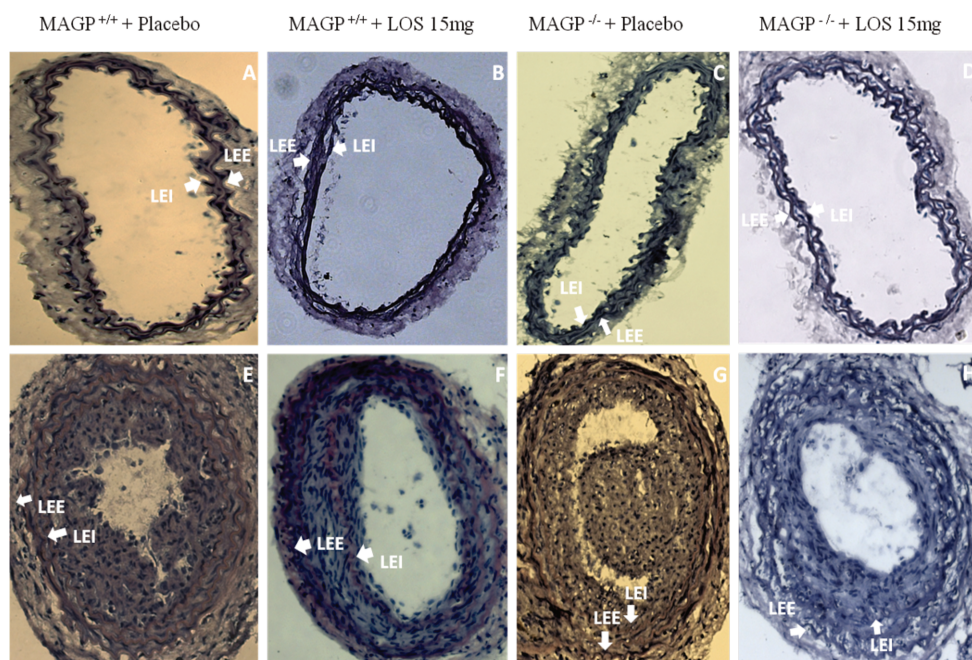


Figura 5.1. Corte histológico da artéria carótida esquerda (E, F, G e H) e direita (A, B, C e D) de animais selvagens e deficientes em MAGP1 em coloração hematoxilina e eosina, ambos os grupos foram tratados com losartan ou placebo. LEE corresponde à lâmina elástica externa e LEI lâmina elástica interna. Aumento de 200x. $n=125$ cortes por animal por grupo.

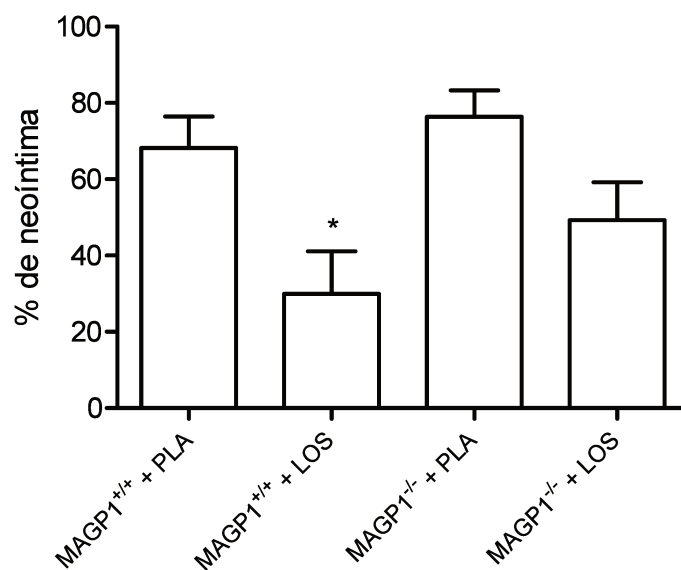


Figura 5.2. Comparação da porcentagem de neointima após cirurgia de angioplastia na artéria carótida esquerda de camundongos selvagens e deficientes em MAGP1, ambos os grupos foram tratados com losartan ou placebo. No gráfico, * representa diferença significativa, $p < 0,05$. MAGP^{+/+}: selvagem; LOS: losartan 15mg; MAGP^{-/-}: animal deficiente em MAGP1; PLA: placebo. $n=18$ animais por grupo.

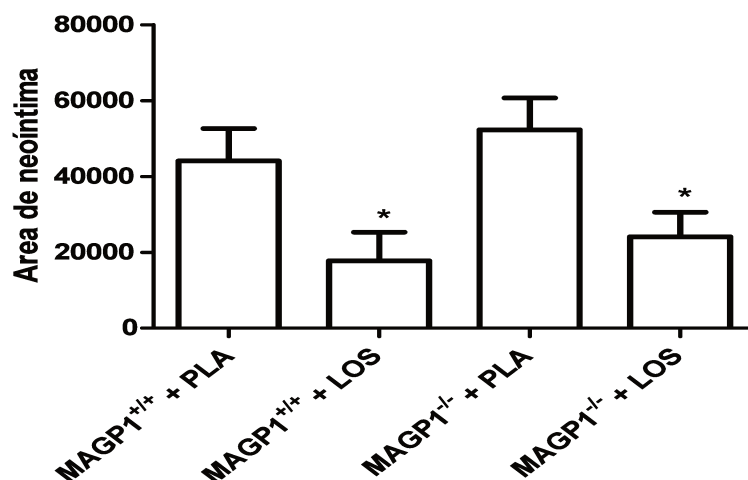


Figura 5.3. Área da formação de neointima (μ^2). Comparação da área de neointima após cirurgia de angioplastia na artéria carótida esquerda de camundongos selvagens e deficientes em MAGP1, ambos os grupos foram tratados com losartan ou placebo. No gráfico, * representa diferença significativa, $p < 0,05$. MAGP1^{+/+}: selvagem; LOS: losartan 15mg; MAGP1^{-/-}: animal deficiente em MAGP1; PLA: placebo. $n=18$ animais por grupo.

O espessamento da média foi calculado por subtração da área total englobada pela lâmina elástica interna, a partir da lâmina elástica externa (figura 5.4).

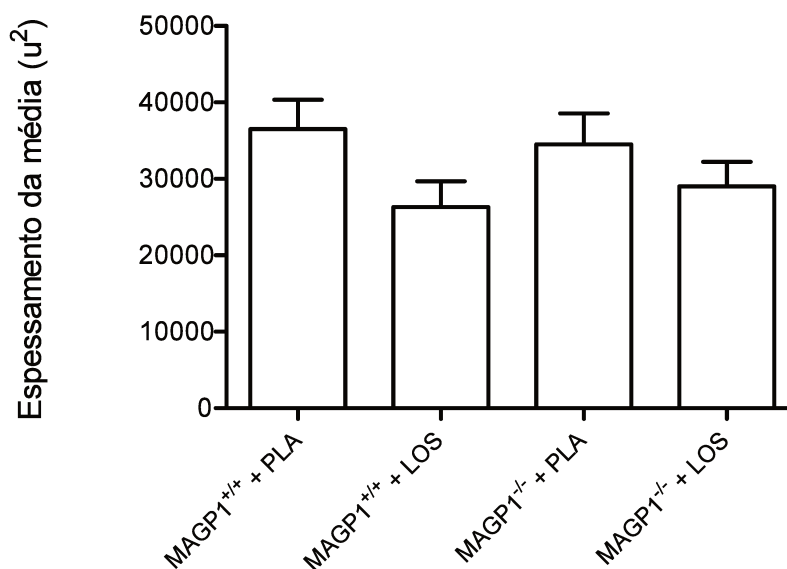


Figura 5.4. Análise do espessamento da média após a cirurgia de angioplastia na artéria carótida esquerda de camundongos selvagens e deficientes em MAGP1^{-/-}, ambos os grupos foram tratados com losartan ou placebo. MAGP1^{+/+}: selvagem; PLA: placebo; LOS: losartan 15mg; MAGP1^{-/-}: animal deficiente em MAGP1. $n=18$ animais por grupo.

Para verificar a possível ação do losartan na pressão sanguínea, e conseqüentemente na formação de neoíntima, os animais foram submetidos a um ensaio de aferição da pressão sanguínea. Foi utilizado um método não invasivo de aferição, onde os animais foram dispostos em um aparelho de pletismografia. O fluxo sanguíneo foi avaliado através da amplitude de ondas gerada, quando ocorre a deflação do manguito. A figura 5.5 mostra os parâmetros hemodinâmicos onde foi possível avaliar a pressão sanguínea sistólica (figura 5.5 A), em B, a diastólica, em C, a média entre a sistólica e a diastólica e, em D, a razão cardíaca ou pulso que é dado por batimentos/minuto.

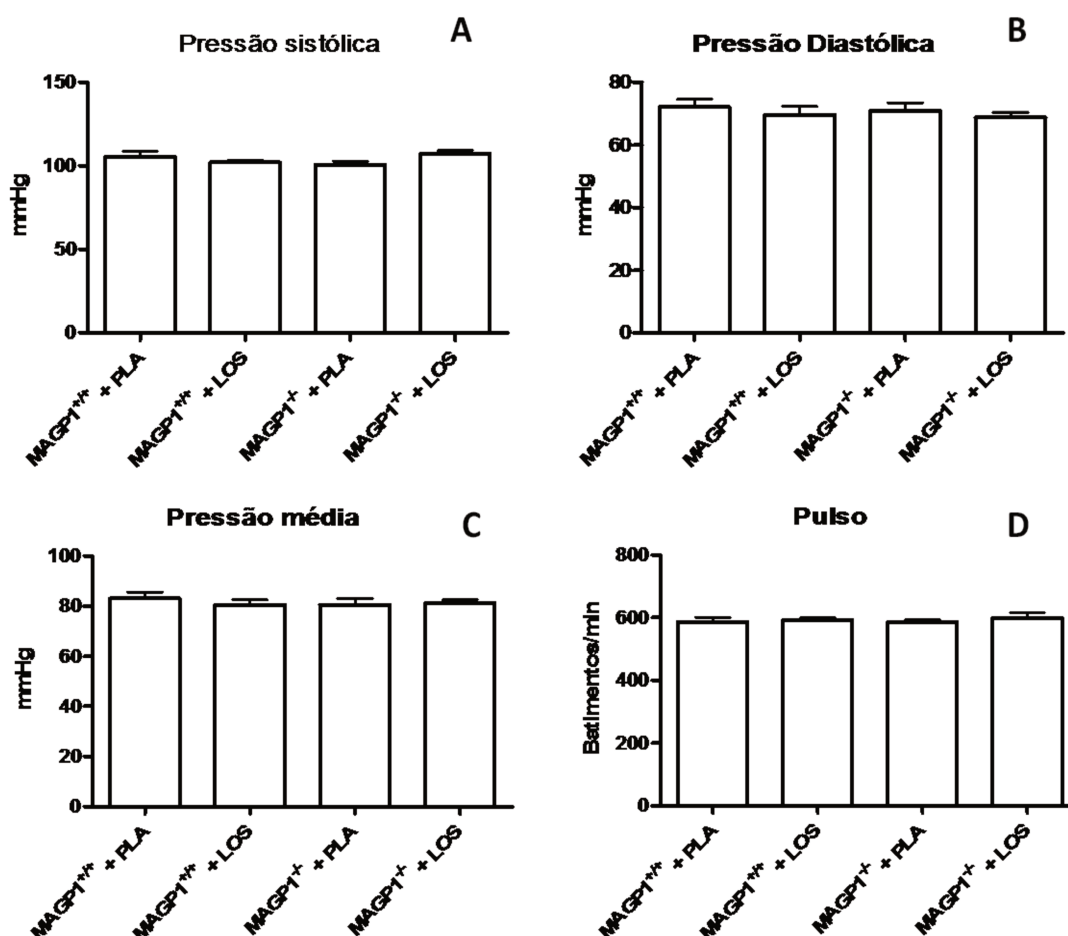


Figura 5.5. Parâmetros hemodinâmicos. A – Pressão sanguínea sistólica; B – Pressão Diastólica, C – A média da pressão sanguínea; D – Pulsação. MAGP1^{+/+}: selvagem; PLA: placebo; LOS: losartan 15mg; MAGP1^{-/-}: animal deficiente em MAGP1. *n*=6 animais por grupo.

Como o TGF- β tem sido intimamente relacionado ao processo de reestenose na literatura, e o losartan é considerado um antagonista desse fator de crescimento, foi de nosso interesse analisar os níveis séricos de TGF- β nos animais estudados. A dosagem foi realizada utilizando um kit ELISA específico para TGF- β (Figura 5.6), conforme descrito em materiais e métodos.

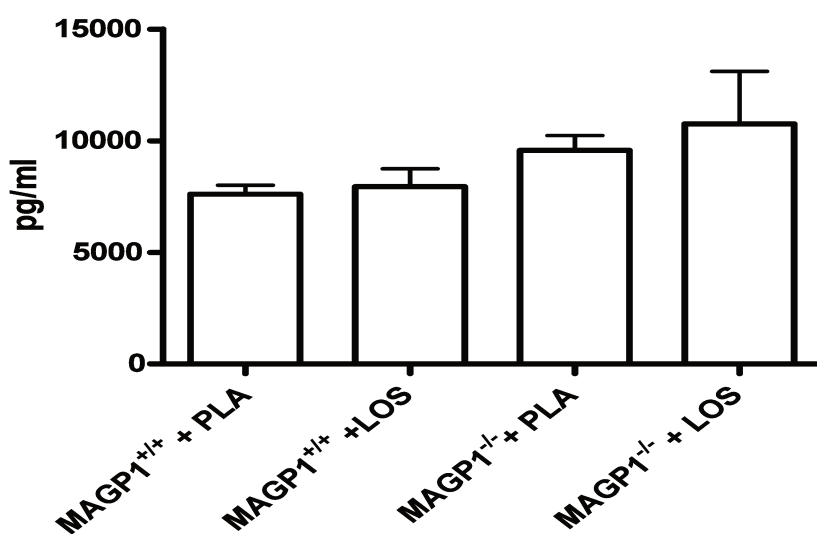


Figura 5.6. Análise de TGF- β total no plasma. MAGP1^{+/+}: selvagem; PLA: placebo; LOS: losartan 15mg; MAGP1^{-/-}: animal deficiente em MAGP1.

DISCUSSÃO

6. Discussão

Até o momento não há relatos de patologias relacionadas à ausência ou a deficiência de MAGP1, entretanto, dados preliminares, que deram origem a este trabalho, demonstram que esta proteína pode estar relacionada com processo de reestenose e formação de trombo, por aumentar a formação de neoíntima e o tempo necessário para se formar um trombo que oclua a artéria carótida, respectivamente (Weinbaum *et al.*, 2008). Sendo assim, sabendo da possível interação da MAGP1 com TGF- β ativo e da vasta descrição na literatura, onde esse fator de crescimento está relacionado à formação de neoíntima, foi de nosso interesse tratar camundongos deficientes em MAGP1 com losartan (bloqueador de receptor AT1 de AngII), a fim de comparar se a inibição do receptor AT1, provocada pelo losartan, pode atuar na inibição da resposta excessiva do TGF- β , a qual poderia estar desencadeando um aumento na proliferação da neoíntima.

Foi observado no grupo dos animais deficientes em MAGP1, tratados com losartan 15mg ($49,3\% \pm 40,86$), uma tendência a redução na porcentagem de neoíntima em comparação com os animais placebo ($76,35\% \pm 26,82$). Já nos animais selvagens tratados com losartan ($29,98\% \pm 40,14$) houve uma redução significativa em comparação com os animais tratados com placebo ($68,22\% \pm 34,99$), conforme demonstrado nas figuras 5.2 e 5.3. Foi observado, embora sem diferença estatística, uma tendência ao aumento na formação de neoíntima no grupo dos animais deficientes em MAGP1, tratados com placebo, quando comparados com animais selvagens, também tratados com placebo.

Quando a formação de neoíntima foi analisada por área real da neoíntima (figura 5.3) e não porcentagem (figura 5.2), encontramos diferença estatística quando comparamos

os animais não tratados com os animais tratados, de ambos os grupos estudados. Sugerindo que o tratamento com losartan é eficaz na redução da formação de neoíntima em ambos os modelos animais, e que ao contrário do que se pensava, a MAGP1, parece, não apresentar nenhuma função na formação de neoíntima.

Os dados encontrados divergem dos dados preliminares que deram base a esse estudo. Essa divergência pode ser explicada pelo fato dos dados iniciais terem sido realizados no laboratório do Dr Robert P. Mecham, Washington University School of Medicine (EUA), onde os camundongos da linhagem C57BL6 possivelmente apresentam alguma diferença, da mesma linhagem dos criados no Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB), da Universidade Estadual de Campinas, SP (utilizados neste trabalho). Essa hipótese foi levantada após análise dos dados obtidos, onde os animais deficientes em MAGP1 (doados pelo laboratório do Dr Robert P. Mecham) apresentaram resultados semelhantes aos obtidos nos dados preliminares (79,9%) e os animais selvagens (provenientes do CEMIB) apresentaram uma formação de neoíntima maior ($68,22\% \pm 34,99$) se comparados com os selvagens americanos (52,7%).

Conforme descrito na literatura, a angioplastia provoca um espessamento da média em relação aos animais que não sofreram angioplastia (Chen *et al.*, 2001). Nós encontramos um espessamento da média em todos os grupos de animais em relação aos não operados (dados não mostrados). Além disso, não foi observada alteração significativa no espessamento da média entre os grupos de animais operados; nos animais selvagens ($36519,16\mu\text{m}^2 \pm 15776,89$) em comparação com animais selvagens tratados com losartan 15mg/kg/dia ($26313,21\mu\text{m}^2 \pm 12223,83$) e nos animais MAGP1^{-/-} tratados com placebo ($34513,7\mu\text{m}^2 \pm 15651,99$) em comparação com os tratados com losartan 15 mg/kg/dia ($29034,20\mu\text{m}^2 \pm 13146,10$), conforme demonstrado na figura 5.4.

Dados publicados por nosso grupo demonstraram que a MAGP1 é capaz de interagir com o TGF- β 1 ativo, sugerindo que poderia estar envolvida na regulação da ação deste fator de crescimento (Weinbaum *et al.*, 2008).

Para verificar os níveis de TGF- β nos animais, este foi dosado no plasma utilizando um kit ELISA. Não foi observada diferença significativa entre os grupos analisados, embora os animais deficientes em MAGP1 apresentem uma tendência no aumento dos níveis de TGF- β (Figura 5.6). Esses dados são referentes aos níveis plasmáticos de TGF- β total.

Kauffman *et al.* (1991) estudaram a inibição da formação da neoíntima após a angioplastia em ratos tratados com losartan e observaram que a redução da neoíntima é dose dependente para o fármaco losartan. Quando foi administrada a dose de 5mg/kg/dia a redução da íntima não foi significativa (23%) em comparação com a dose de 15mg/kg/dia, que foi significativa (48%), quando comparados com o grupo placebo. Ressaltando que a dose de 15mg/kg/dia utilizado neste trabalho é uma dose eficaz na redução da formação de neoíntima, conforme visto na figura 5.3.

Os resultados encontrados estão de acordo com um estudo recente, realizado por Yi *et al.* (2010), onde a hiperplasia da neoíntima foi avaliada em machos C57Bl6 (mesma linhagem utilizada no presente estudo) submetidos a uma cirurgia de colocação de um manguito na veia femoral esquerda. Após a cirurgia os animais foram tratados, via gavagem, por 14 dias, com diferentes doses de losartan. Losartan 20mg/kg/dia reduziu significativamente a formação de neoíntima e também a proliferação celular, (analisada através da redução do número de células BrdU (Bromodeoxyuridine) positivas na íntima).

Não houve alteração na média. Esses resultados sugerem que o efeito protetor de losartan na formação de neoíntima é mediado por inibição da hiperplasia celular com consequente bloqueio da síntese de DNA.

Em relação aos efeitos causados pelo TGF- β na formação de neoíntima, o estudo de Chen *et al.* (2001) demonstrou uma atenuação da proliferação da íntima da aorta em coelhos tratados com 25mg de losartan/kg/dia na água de beber por 10 semanas. Foi observado também um aumento nos níveis de AngII e uma não alteração na expressão dos receptores AT1 na aorta.

Conforme o trabalho de Yao *et al.* (2009), que avaliou o uso de um novo silenciador de gene, pyrrole-imidazole (PI), para TGF- β em ratos, demonstrou uma diminuição significativa da porcentagem de neoíntima (57%) após 21 dias de injúria e, além disso, foi visto uma diminuição na expressão do RNAm e de proteína de TGF- β três dias após a injúria.

Yamamoto *et al.* (2000) avaliou o mecanismo de aterosclerose e restenose após angioplastia em ratos, no qual foi construído um oligonucleotídeo ribozima inibidor do gene de TGF- β . Foi observado uma redução do TGF- β e uma significativa diminuição na formação de neoíntima.

Entretanto, os dados encontrados no presente trabalho divergem dos dados apresentados na literatura acima citada, onde os modelos animais aqui estudados não apresentaram alterações nos níveis séricos de TGF- β . O fármaco losartan apresentou uma ação efetiva na redução da formação de neoíntima (figura 5.3), sem alterar os níveis de TGF- β (figura 5.6), sugerindo que sua ação seja por alguma via que possa ser independente

desse fator de crescimento. Mas, a sinalização de TGF- β (via das Smads) pode estar alterada.

Para verificar a possível ação do losartan na pressão sanguínea, e conseqüentemente na formação de neointima, os animais foram submetidos a um ensaio de aferição da pressão sanguínea. A figura 5.5 mostra os parâmetros hemodinâmicos onde foi possível avaliar a pressão sanguínea sistólica (figura 5.5 A), em B, a diastólica, em C, a média entre a sistólica e a diastólica e, em D, a razão cardíaca ou pulso que é dado por batimentos/minuto. Foi observado que todos os animais, tratados com losartan ou placebo, não apresentaram nenhuma alteração na pressão sanguínea e batimentos cardíacos, sugerindo que a ação do losartan, nesses animais, é independente de efeitos hipotensores.

No que se refere à pressão sanguínea de ratos tratados com fármacos, Oliveira et al. (2009), compararam o efeito do tratamento com os fármacos enalapril 60mg/kg/dia e losartan 20mg/kg/dia em ratos sedentários em comparação com animais com hipertrofia ventricular esquerda induzida por treinamento de natação. Assim como os resultados encontrados no modelo animal utilizado nessa dissertação, os pesquisadores acima citados demonstraram que não houve redução da pressão sistólica nos animais tratados, com losartan, e também com enalapril, quando comparados com os não tratados.

Prescott *et al.* (1991), analisaram a atuação de um inibidor da enzima conversora de Angiotensina (ACE) e de um antagonista do receptor AT1 na formação de neointima. Foi comparado o efeito do benazeprilat (metabólito ativo do benazepril – 3mg/kg/dia) com o DuP753 (antagonista específico do receptor AT1 – 10mg/kg/dia) na formação de neointima bem como na proliferação e migração de células musculares lisas em ratos, após lesão da carótida provocada por cateter inflável. Tanto o inibidor da ACE (enzima conversora de AngII) quanto o antagonista do receptor AT1 reduziram significativamente a formação de

neoíntima (35% e 49% respectivamente). O tratamento com antagonista de AT1 provocou uma redução de 53% na proliferação de SMC (células musculares lisas) da média e 94% na migração de SMC, entretanto o inibidor da ACE não apresentou efeitos na proliferação celular, reduzindo apenas, a migração de SMC em 68%. Nesse mesmo trabalho, os animais, normotensos, foram submetidos a um ensaio de aferição da pressão sanguínea após o tratamento. Foi verificado que o inibidor da ACE provocou uma redução de 15 mm Hg na pressão média, quando comparado com o grupo controle, enquanto o tratamento com antagonista de AT1 não apresentou redução na pressão dos animais. Juntos, esses dados sugerem que a inibição de compostos do sistema renina-angiotensina podem suprimir a formação da lesão vascular por outros mecanismos e não, pela redução da pressão sanguínea. Além disso, o fato do inibidor da ACE e o antagonista de AT1 serem capazes de inibir o desenvolvimento da lesão demonstram a importância da AngII na formação de neoíntima.

Gibbons *et al.* (1992) observaram que quando TGF- β foi bloqueado, AngII estimulou a síntese de DNA e divisão celular das VSMC de ratos normotensos, sugerindo que AngII estimula a hiperplasia quando PDGF-A é o fator de crescimento predominantemente expresso, sendo assim, AngII estimula a hipertrofia celular quando TGF- β é predominantemente expresso. Como mostrado na figura 6.1, TGF- β e AngII compartilham alguns mecanismos intracelulares envolvidos na fibrose, incluindo ativação de proteína quinase, produção de fatores de crescimento e ativação da via das Smads (Ruiz-Ortega *et al.*, 2007).

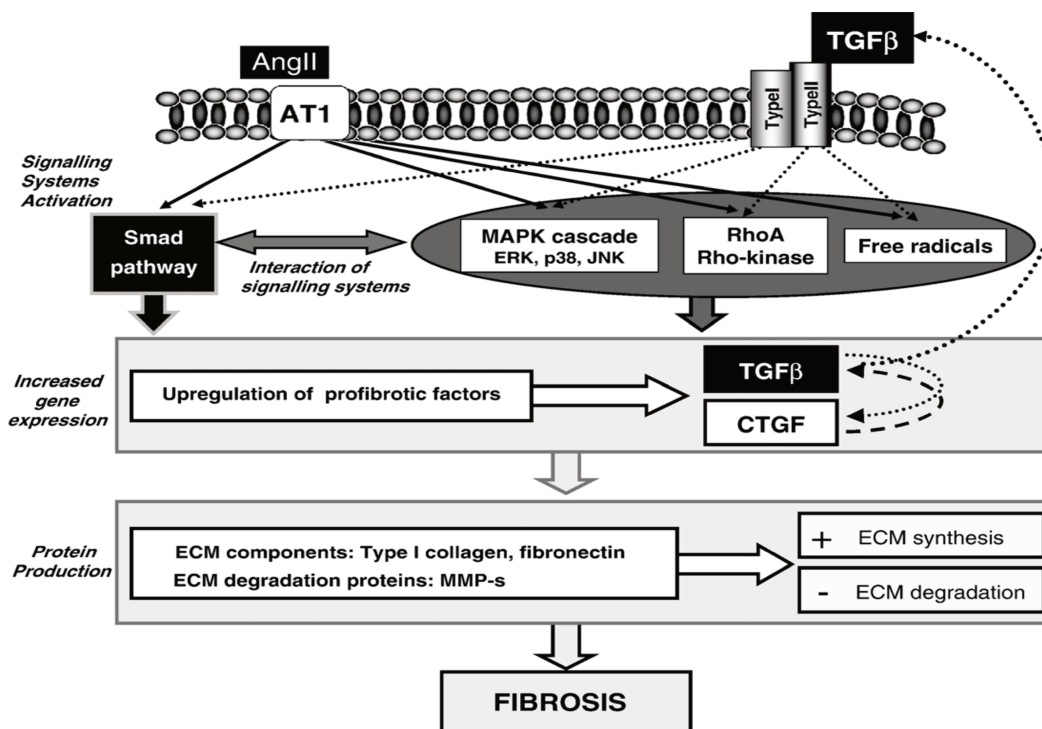


Figura 6.1. Mecanismo molecular implicado na fibrose vascular causado por AngII e TGF- β . AngII ativa vários sistemas de sinalização intracelular comum ao TGF- β , incluindo ativação da via das Smads, proteína kinases (MAPK e Rho-kinase) e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que regulam a expressão de mediadores pró-fibróticos (CTGF) e *turnover* de EMC (por aumentar a síntese de proteína de EMC e inibir sua degradação).

Lacchini *et al.* (2009) avaliaram se a formação de neoíntima induzida por manguito é influenciada por titulação do gene da ACE em camundongos. Foram utilizados camundongos geneticamente modificados que apresentavam de 1-4 cópias do gene de ACE, sem anormalidades vasculares detectáveis e sem alteração da pressão sanguínea. A formação de neoíntima na artéria femoral foi maior nos camundongos que apresentavam 3 e 4 cópias do gene quando comparados aos animais com 1 e 2 cópias. A atividade da ACE foi avaliada nos camundongos com 1 e 3 cópias (que representam o extremo da resposta observada). Essa atividade foi maior nos animais com 3 cópias quando comparados com o 1 cópia, em vasos que não sofreram injúria. Após injúria a atividade da ACE aumentou significativamente em ambos os animais, mantendo-se maior no animal 3 cópias. Como

contraprova os animais foram tratados com inibidor da ACE (enalapril) e um bloqueador do receptor AT1 de AngII (losartan). Tanto enalapril quanto losartan reduziram a formação de neointima do camundongo 3 cópias a valores semelhantes aos encontrados nos animais 1 cópia não tratados, enquanto o tratamento de animais 1 cópia com AngII aumentou a formação de neointima nesses animais em níveis semelhantes aos encontrados nos animais 3 cópias. Esses dados sugerem que a AngII parece ser o principal modulador desta resposta, uma vez que tanto inibidor da ACE quanto bloqueador do receptor AT1 foram efetivos na redução da formação de neointima.

Os dados aqui apresentados estão de acordo com o trabalho de Lacchini (2009) e Prescott (1991), onde foi sugerida a importância do sistema renina-angiotensina na formação de neointima, uma vez que nossos grupos de animais não apresentaram alterações nos níveis séricos de TGF- β .

Conclusão

7. Conclusão

- A MAGP1 parece não ser importante no processo de formação de neoíntima no modelo animal utilizado;
- O fármaco Losartan reduz a formação de neoíntima sem alterar a pressão sanguínea;
- Ação do fármaco Losartan é independente dos níveis séricos de TGF- β .

Referências Bibliográficas

8. Referências Bibliográficas

1. Bobik A. 2006. Transforming growth factor-betas and vascular disorders. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:1712-1720.
2. Brooke BS, Habashi JP, Judge DP, Patel N, Loeys B, Dietz HC. 2008. Angiotensin II blockade and aortic-root dilation in Marfan's syndrome. *N. Engl. J. Med.* 358:2787-2795.
3. Chen E, Larson JD, and Ekker SC. 2006. Functional analysis of zebrafish Microfibril-Associated Glycoprotein-1 (MAGP-1) in vivo reveals roles for microfibrils in both vascular development and function. *Blood*.
4. Chen HJ, Li DY, Saldeen T, Phillips MI, Mehta JL. 2001. Attenuation of tissue P-Selectin and MCP-1 expression and intimal proliferation by AT₁ receptor blockade in hyperlipidemic rabbits. *Biochemical and Biophysical research communications* 282: 474-479.
5. Currier JW, Faxon DP. 1995. Restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty: have we been aiming at the wrong target? *J Am Coll Cardiol* 25: 516-20.
6. Davis EC. 1994. Immunolocalization of microfibril and microfibril-associated proteins in the subendothelial matrix of the developing mouse aorta. *J Cell Sci* 107(3):727-736.
7. da Luz PL and Solimene MC. 1997. Reestenose após angioplastia transluminal coronária: o problema clínico. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 43(4):357-366.
8. Dijke PT & Arthur HM. 2007. Extracellular control of TGF β signalling in vascular development and disease 8:857-869.
9. Fahrenbach WH, Sandberg LB, Cleary EG. 1996. Ultrastructural studies on early elastogenesis. *Anat. Rec.* 155:563-576.
10. Feng XH & Derynck R. 2005. Specificity and versatility in TGF- β signaling through Smads. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21:659-693.
11. Finnis ML, and Gibson MA. 1997. Microfibril-associated glycoprotein-1 (MAGP-1) binds to the pepsin-resistant domain of the α 3(VI) chain of type VI collagen. *J Biol Chem* 272:22817-22823.

12. Forrester JS, Fishbein M, Helfant R, Fagin J. 1991. A paradigm for restenosis based on cell biology: clues for the development of new preventive therapies. *J Am Coll Cardiol* 17: 758-69.
13. Gibbons GH, Pratt RE, Dzau VJ. 1992. Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs. hyperplasia. Autocrine transforming growth factor- β 1 expression determines growth response to angiotensina. *J Clin Invest* 90:456-61.
14. Gupta PA, Putnam EA, Carmical SG, Kaitila I, Steinmann B, Child A, Danesino C, Metcalfe K, Berry SA, Chen E, et al. 2002. Ten novel FBN2 mutations in congenital contractural arachnodactyly: delineation of the molecular pathogenesis and clinical phenotype. *Hum Mutat* 19:39-48.
15. Habashi JP, Judge DP, Holm TM, Cohn RD, Loeys, BL, Cooper TK, Myers L, Klein EC, Liu G, Calvi C, et al. 2006. Losartan, an AT1 antagonist, prevents aortic aneurysm in a mouse model of Marfan syndrome. *Science* 312:117-121.
16. Janiszewski M, Laurindo FRM, Pasqualucci CA, Luz PL, Pileggi F. Effects of a single heparin bolus on neointimal growth after arterial injury in intact rabbits. *Angiology* 1996;47: 549-56.
17. Jensen SA, Reinhardt DP, Gibson MA, and Weiss AS. 2001. Protein interaction studies of MAGP-1 with tropoelastin and fibrillin-1. *J Biol Chem* 276:39661-39666.
18. Kakar P and Lip GY. 2007. Hypertension: endothelial dysfunction, the *prothrombotic* state and antithrombotic therapy. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 5:441-50.
19. Kauffman RF, Bean JS, Zimmerman KM, Brown RF, Steinberg MI. 1991. Losartan, a nonpeptide angiotensina II (Ang II) receptor antagonist, inhibits neointima formation following balloon injury to rat carotid arteries. *Life sciences* 49:223-228.
20. Kielty CM, Sherratt MJ, and Shuttleworth CA. 2002. Elastic fibres. *J Cell Sci* 115:2817-2828.
21. Kielty CM, Sherratt MJ, Marson A, and Baldock C. 2005. Fibrillin microfibrils. *Adv Protein Chem* 70:405-436.

22. Kielty CM, Stephan S, Sherratt MJ, Williamson M, Shuttleworth CA. 2007. Applying elastic fibre biology in vascular tissue engineering. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 362: 1293-1312.
23. Krege JH, Hodgin JB, Hagaman JR, Smithies O. 1995. A noninvasive computerized tail-cuff system for measuring blood pressure in mice. *Hypertension*, 25: 1111-115.1
24. Lacchini S, Heimann AS, Evangelista FS, Cardoso L, Silva GJ, Krieger JE. 2009. Cuff-induced vascular intima thickening is influenced by titration of the Ace gene in mice. *Physiol Genomics* 37:225-230.
25. Lee B, Godfrey M, Vitale E, Hori H, Mattei MG, Sarfarazi, M, Tsipouras P, Ramirez F, and Hollister DW. 1991. Linkage of Marfan syndrome and a phenotypically related disorder to two different fibrillin genes. *Nature* 352:330-334.
26. Leite IC, Schramm JMA, Gadelha AMJ, Valente JG, Campos MR, Portela MC, et al. Comparação das informações sobre as prevalências de doenças crônicas obtidas pelo suplemento saúde da PNAD/98 e as estimativas pelo estudo Carga de Doença no Brasil. 2002. *Ciência Saúde Coletiva* 7:733-41.
27. Massague J. 1998. TGFb signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67:753-91.
28. Murphy-Ullrich, J.E., and Poczatek, M. 2000. Activation of latent TGF-beta by thrombospondin-1: mechanisms and physiology. *Cytokine Growth Factor Rev* 11:59-69.
29. Oliveira EM, Sasaki MS, Cerêncio M, Baraúna VG, Krieger JE. 2009. Local renin-angiotensin system regulates left ventricular hypertrophy induced by swimming training independent of circulating renin: a pharmacological study. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 10:15-23.
30. Oliveira GMM, Klein CH e Souza e Silva NA. Mortalidade por doenças cardiovasculares em três estados do Brasil de 1980 a 2002. *Rev Panam Salud Publica*. 2006;19:85-93.
31. Prescott MF, Webb RL, Reidy MA. 1991. Angiotensin-converting enzyme inhibitor versus angiotensina II, AT1 receptor antagonist. Effects on smooth muscle cell migration and proliferation after balloon catheter injury. *American Journal of Pathology* 139(6):1291-1296.

32. Pollman MJ, Naumovski L, and Gibbons GH. 1999. Vascular cell apoptosis: cell type-specific modulation by transforming growth factor-beta1 in endothelial cells versus smooth muscle cells. *Circulation* 99:2019-2026.
33. Prosser IW, Gibson MA, and Cleary EG 1984. Microfibrillar protein from elastic tissue: a critical evaluation. *Aust J Exp Biol Med Sci* 62 (Pt 4):485-505.
34. Ramirez F, and Dietz HC. 2007. Fibrillin-rich microfibrils: Structural determinants of morphogenetic and homeostatic events. *J Cell Physiol* 213:326-330.
35. Reinhardt DP, Keene DR, Corson, GM, Poschl E, Bachinger HP, Gammie JE, and Sakai LY. 1996. Fibrillin-1: organization in microfibrils and structural properties. *J Mol Biol* 258:104-116.
36. Robinson PN, Arteaga-Solis E, Baldock C, Collod-Bérout G, Booms P, De Paepe A, Dietz HC, Guo G, Handford PA, Judge DP, Kielty CM, Loeys B, Milewicz DM, Ney A, Ramirez F, Reinhardt DP, Tiedemann K, Whiteman P, Godfrey M. 2006. The molecular genetics of Marfan syndrome and related disorders. *J Med Genet.* 43:769-787.
37. Ruiz-Ortega M, Rodriguez-Vita J, Sanchez-Lopez E, Carvajal G, and Egido J. 2007. TGF-beta signaling in vascular fibrosis. *Cardiovasc Res* 74:196-206.
38. Sage H, and Gray WR. 1981. Studies on the evolution of elastin-III. The ancestral protein. *Comp. Biochem. Physiol.* 68B:473-480.
39. Segade F, Trask BC, Broekelmann TJ, Pierce RA, and Mecham RP. 2002. Identification of a matrix-binding domain in MAGP1 and MAGP2 and intracellular localization of alternative splice forms. *J Biol Chem* 277:11050-11057.
40. Trask BC, Trask TM, Broekelmann T, and Mecham RP. 2000. The microfibrillar proteins MAGP-1 and fibrillin-1 form a ternary complex with the chondroitin sulfate proteoglycan decorin. *Mol Biol Cell* 11:1499-1507.
41. Vicente CP, He L, and Tollefsen DM. 2007. Accelerated atherogenesis and neointima formation in heparin cofactor II deficient mice. *Blood* 110:4261-4267.
42. Weinbaum JS, Broekelmann TJ, Pierce RA, Werneck CC, Segade F, Craft CS, Knutsen RH, and Mecham RP. 2008. Deficiency in microfibril-associated glycoprotein-1 (MAGP-1) leads to complex phenotypes in multiple organ systems. *J Biol Chem.*

43. Werneck CC, Trask BC, Broekelmann TJ, Trask TM, Ritty TM, Segade F, and Mecham RP. 2004. Identification of a major microfibril-associated glycoprotein-1-binding domain in fibrillin-2. *J Biol Chem* 279:23045-23051.
44. Werneck CC, Vicente CP, Weinberg JS, Shifren A, Pierce RA, Broekelmann TJ, Tollefsen DM, and Mecham RP. 2008. Mice lacking the extracellular matrix protein MAGP1 display delayed thrombotic occlusion following vessel injury. *Blood* 111:4137-4144.
45. Yamamoto K, Morishita R, Tomita N, Shimozaoto T, Nakagami H, Kikuchi A, Aoki M, Higaki J, Kaneda Y, and Ogihara T. 2000. Ribozyme oligonucleotides against transforming growth factor-beta inhibited neointimal formation after vascular injury in rat model: potential application of ribozyme strategy to treat cardiovascular disease. *Circulation* 102:1308-1314.
46. Yao EH, Fukuda N, Ueno T, Matsuda H, Nagase H, Matsumoto Y, Sugiyama H, and Matsumoto K. 2009. A pyrrole-imidazole polyamide targeting transforming growth factor-beta1 inhibits restenosis and preserves endothelialization in the injured artery. *Cardiovasc Res* 81:797-804.
47. Yi I, Lee JJ, Park JS, Zhang WY, Kim IS, Kim Y, Chin CY, Kim HS, Myung CS. 2010. Enhanced effect of losartan and rosuvastatin on neointima hyperplasia. *Arch Pharm Res* 33(4):593-600.
48. Zeisberg M, Hanai J, Sugimoto H, Mammoto T, Charytan D, Strutz F, Kalluri R. 2003. *Nat. Med.* 9:964-968.

ANEXOS

9. Anexos

Trabalhos em Congresso

- “MAGP-1 and Thrombus Formation”

X Simpósio Brasileiro de Matriz Extracelular e V International Symposium on Extracellular Matrix.

Local: Búzios-RJ, Brasil.

- “Characterization of MAGP1 Domain with Pro-thrombotic Activity”

XV Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology.

Local: São Paulo-SP, Brasil.

- “Evaluation of MAGP1 Function in Thrombus Formation”

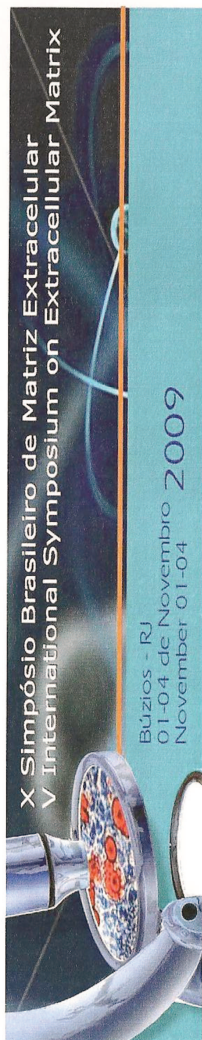
XV Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology.

Local: São Paulo-SP, Brasil.

- “Evaluation of Fibrilin-1 Role in Arterial Thrombogenesis”

XV Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology.

Local: São Paulo-SP, Brasil.



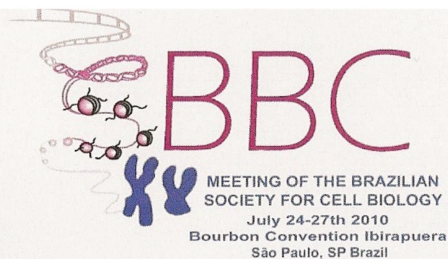
We certify that

MAGP-1 AND THROMBUS FORMATION

Denise Machado¹, Camila Kopecky Possari¹, Tallita Vassequi da Silva¹,
Cristina Pontes Vicente², Thomas John Broekelmann³, Robert Paul
Mecham³, Claudio Chrysostomo Werneck²

**was presented at the Poster Session during the X Simpósio Brasileiro de
Matriz Extracelular and V International Symposium on Extracellular
Matrix held in Armação dos Búzios, RJ, Brazil, on November 1-4, 2009.**

**Marimélia Porcionatto
Organizing Committee
SIMEC 2009**



We certify that

MACHADO, D. , VASSEQUI - SILVA, T , POSSARI, C.K. ,
CONSONNI, S.R. , JOAZEIRO, P.P. , VICENTE, P.C. ,
BROEKELMANN, T.J. , MECHAM, R.P. , WERNECK, C.C. .

presented the Poster entitled

Characterization of MAGP1 domain with pro-thrombotic activity

**at the XV Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology held in São
Paulo, Brazil on July 24-27th, 2010.**

**President
Organizing Committee
SBBC 2010**

Organizing Committee

Vilma Regina Martins
Estela Bevilacqua
Luiz Fernando Lima Reis
Patrícia Gama
Marinilce F Santos
Chao Yun Irene Yan
Marimélia Porcionatto
Flávia A Gomes
Silvana Allodi



Organizing Committee

Vilma Regina Martins
Estela Bevilacqua
Luiz Fernando Lima Reis
Patrícia Gama
Marinilce F Santos
Chao Yun Irene Yan
Marimélia Porcionatto
Flávia A Gomes
Silvana Allodi

We certify that

VASSEQUI-SILVA, T. , NERY-DIEZ, A.C. , DELLARIVA, T.C. ,
FABRIN-NETO, J.B. , VICENTE, C.P. , DOS SANTOS, L. , KRIEGER,
J.E. , MECHAM, R.P. , WERNECK, C.C

presented the Poster entitled

Evaluation of MAGP1 function in thrombus formation

**at the XV Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology held in São
Paulo, Brazil on July 24-27th, 2010.**

**President
Organizing Committee
SBBC 2010**

Documentação da Aprovação do Comitê de Ética

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação/tese de Mestrado/Doutorado intitulada Avaliação da Função da MAGP1 na Formação de Neoíntima:

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

(X) tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões) de Bioética ou Biossegurança*:

Comissão de ética na experimentação animal (CEEa), sob Protocolo(s) nº 1823-1.

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*

Tallita Vassequi da Silva
Aluno: Tallita Vassequi da Silva

Claudio B. Chrysostomo Werneck
Orientador: Claudio Chrysostomo Werneck

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido. () Indeferido

Nome:

Função:

Prof. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO
Presidente da CEUA/UNICAMP



Organizing Committee

Vilma Regina Martins
Estela Bevilacqua
Luiz Fernando Lima Reis
Patrícia Gama
Marinilce F Santos
Chao Yun Irene Yan
Marimélia Porcionatto
Flávia A Gomes
Silvana Allodi

We certify that

NERY-DIEZ, A.C. , VASSEQUI-SILVA, T. , FABRIN-NETO, J.B. ,
CONSONNI, S.R. , JOAZEIRO, P.P. , DOS SANTOS, L. , KRIEGER,
J.E. , PEREIRA, L.V. , VICENTE, C.P. , WERNECK, C.C.

presented the Poster entitled

Evaluation of fibrillin-1 role in arterial thrombogenesis

**at the XV Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology held in São
Paulo, Brazil on July 24-27th, 2010.**

**President
Organizing Committee
SBBC 2010**