

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA

ANA CLÁUDIA COELHO NERY DIEZ

**Avaliação da função da fibrilina-1 na  
trombogênese arterial**

Orientador: Dr. Claudio Chrysostomo Werneck

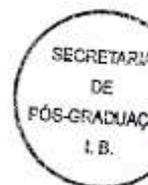
Campinas

2013



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**INSTITUTO DE BIOLOGIA**



**ANA CLÁUDIA COELHO NERY DIEZ**

**Avaliação da função da fibrilina-1 na  
trombogênese arterial**

Este exemplar corresponde à redação final  
de tese defendida pelo(a) candidato (a)  
ANA CLÁUDIA COELHO NERY DIEZ  
Cláudia C. Diez  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de  
Biologia para obtenção do título de  
Doutora, em Biologia Funcional e  
Molecular, na área de Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Claudio Chrysostomo Werneck

Campinas, 2013

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Biologia  
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

N359a Nery-Diez, Ana Cláudia Coelho, 1980-  
Avaliação da função da fibrilina-1 na trombogênese arterial / Ana Cláudia  
Coelho Nery Diez. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Cláudio Chrysostomo Werneck.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Fibrilina-1. 2. Matriz extracelular. 3. Trombose. 4. Agentes hipotensores. 5.  
Fator de crescimento transformador beta1. I. Werneck, Cláudio  
Chrysostomo, 1966-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.  
III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Evaluation of the role of fibrillin-1 in arterial thrombosis Fbn1mg?/+ mice

**Palavras-chave em inglês:**

Fibrillin-1

Extracellular matrix

Thrombosis

Antihypertensive agents

Transforming growth factor beta1

**Área de concentração:** Biologia Funcional e Molecular

**Titulação:** Doutora em Biologia Funcional e Molecular

**Banca examinadora:**

Cláudio Chrysostomo Werneck [Orientador]

Edson Rosa Pimental

Marcelo Brocchi

Robson de Queiroz Monteiro

Maria Luiza Vilela Oliva

**Data de defesa:** 07-06-2013

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 07 de junho de 2013

**BANCA EXAMINADORA**

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Claudio Chrysostomo Werneck

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Edson-Rosa Pimentel

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Marcelo Broechi

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Robson de Queiroz Monteiro

  
\_\_\_\_\_  
Profª. Dra. Maria Luiza Vilela Oliva

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Sérgio Luis Felisbino

\_\_\_\_\_  
Dra. Daniela Carla da Silva Damico

\_\_\_\_\_  
Dra. Cíntia Maria Saia Cereda

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a minha família por ter me dado suporte, caráter, sabedoria e  
encorajamento;

Manifesto aqui a minha gratidão a todos os professores, funcionários, colegas e amigos  
do Instituto de Biologia e, em particular, ao meu laboratório de Fibras Elásticas e sua  
equipe: Talita, Danielle, Neto, Catherine, Fabiana e Isabela e, em especial a Tallita e  
Guilherme;

Em especial ao suporte financeiro prestado pela FAPESP pela bolsa de doutorado e  
auxílio ao projeto;

Ao meu grande exemplo de sabedoria, inteligência, paciência, persistência e carisma,  
meu orientador Cláudio Chrysostomo Werneck, que me acolheu e soube me conduzir de  
forma exemplar;

Em especial a prof<sup>a</sup>. Cristina Pontes Vicente por ter me apoiado e me orientado na hora  
que eu mais precisei;

Neste período aprendi muito e espero que tudo fique consolidado e sirva de base para a  
vida;

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE TABELAS.....	XII
RESUMO.....	XIII
ABSTRACT.....	XIV
INTRODUÇÃO GERAL.....	2
1. Introdução.....	5
2. Objetivo Geral.....	23
2.1. Objetivos Específicos.....	23
3. Materiais e Métodos.....	25
3.1. Materiais.....	25
3.2. Animais.....	25
3.3. Genotipagem dos animais.....	27
3.4. Tratamento com fármacos.....	28
3.5. Aferição da pressão arterial dos animais.....	28
3.6. Indução fotoquímica de trombos na artéria carótida.....	29
3.7. Contagem de plaquetas.....	30
3.8. Ativação no tempo de tromboplastina (TTPA).....	30
3.9. Ativação no tempo de protrombina (TTP).....	31
3.10. Ativação no tempo de trombina (TT).....	31
3.11. Quantificação de TGF- $\beta$ plasmático.....	32
3.12. Ensaio de agregação plaquetária.....	33
3.13. Ensaio de adesão plaquetária espontânea.....	33
3.14. Análise morfológica da carótida direita.....	34
3.15. Análise morfológica das plaquetas.....	35
3.16. Análise morfológica dos trombos.....	36
3.17. Zimografia <i>in situ</i> .....	36
4. Análise estatística.....	37
5. Resultados.....	39
6. Discussão.....	60
7. Conclusão.....	68
8. Referências Bibliográficas.....	70
9. Anexos.....	76
Anexo I.....	76
Anexo II.....	77

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A = Ativos

ACD = Ácido citrato dextrose

ADP = Adenosina difosfato

AT1 = Receptor de angiotensina II AT1

ATP = Adenosina trifosfato

BMP = Proteína Morfogênica Óssea

CAPT = Captopril

DNA = Ácido desoxirribonucleico

ERK = Proteína quinase regulada por sinais extracelulares

ECA = Enzima conversora de Angiotensina

EDTA = Ácido etilenodiaminotetracético

EGF-like = fator de crescimento epidérmico

JNK = Jun N-terminal quinase

LAP = Peptídeo associado à latência

LIMK = LIM quinase

LOS = Losartan

LTBP = Proteína ligante do complexo latente do TGF- $\beta$

MAGP-1 = Glicoproteína associada à microfibrila-1

MAPK = Proteínas quinase ativada por mitógenos

Fbn1<sup>mg<sup>s</sup>/+</sup> = Animal heterozigoto para mutação no gene da fibrilina-1

MMP = Metaloproteinase de matriz

Neo = Neomicina fosfotransferase

NGF = fator de crescimento neural

PAI-1 = Inibidor dos ativadores do plasminogênio

PCR = Reação em cadeia da polimerase

PLA = Placebo

PPP = Plasma pobre em plaquetas

PRP = Plasma rico em plaquetas

PGK = Promotor e terminador de transcrição da fosfoglicerato quinase

RNAse = Ribonuclease

ROCK = Rho quinase

T = Totais

TGF = fator de crescimento transformante Beta

TGF-like ou TB-like = Domínio semelhante àquele de ligação ao fator de crescimento transformante

TF = Fator tissular

Tsp-1 = trombospondina 1

TPPa = Tempo de tromboplastina parcial

TP = Tempo de protrombina

TT = Tempo de Trombina

WT = Animal selvagem

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Representação esquemática das principais etapas de montagem das microfibrilas e fibras elásticas em três exemplos de tecidos.....	7
Figura 1.2. TGF- $\beta$ na síndrome de Marfan.....	14
Figura 1.3. Esquema da inibição do receptor AT1 por losartan.....	15
Figura 1.4. Mutação no gene fibrilina-1, com a deleção dos éxons 19 a 24 e a inserção do cassete de neomicina, em que resultou nos animais <i>Fbn1</i> <sup>mg<math>\Delta</math>/+</sup> .....	20
Figura. 3.1. Fluxograma experimental.....	26
Figura 3.2. Genotipagem de camundongos.....	28
Figura 3.3. Imagem do aparelho de pletismografia.....	29
Figura 3.4. Imagem da indução fotoquímica de trombo na artéria carótida direita de camundongo.....	30
Figura 5.1. Resultado do tempo de oclusão trombótica após a indução fotoquímica de trombo na artéria carótida direita de camundongos selvagens e de <i>Fbn1</i> <sup>mg<math>\Delta</math>/+</sup> .....	40
Figura 5.2. Resultado do tempo de oclusão trombótica após a indução fotoquímica de trombo na artéria carótida direita de camundongos selvagens e de <i>Fbn1</i> <sup>mg<math>\Delta</math>/+</sup> , ambos os grupos foram tratados com losartan e captopril.....	42
Figura 5.3. Imagem gráfica do tempo de oclusão trombótica após a indução fotoquímica de trombo na artéria carótida direita de camundongos selvagens e de <i>Fbn1</i> <sup>mg<math>\Delta</math>/+</sup> , ambos os grupos foram tratados com losartan e captopril.....	43
Figura 5.4. Resultado do tempo de oclusão trombótica após a indução fotoquímica de trombo na artéria carótida direita de camundongos <i>Fbn1</i> <sup>mg<math>\Delta</math>/+</sup> e de <i>MAGP1</i> <sup>-/-</sup> , ambos os grupos foram tratados com losartan e captopril.....	45
Figura 5.5. Resultado do tempo de oclusão trombótica após a indução fotoquímica de trombo na artéria carótida direita de camundongos selvagens e de <i>Fbn1</i> <sup>mg<math>\Delta</math>/+</sup> após a injeção de 50 $\mu$ g/mL de MAGP-1 na veia caudal do animal.....	47
Figura 5.6. Resultado do teste de agregação plaquetária induzida pelos agonista trombina (100uU/mL e 50uU/mL).....	50
Figura 5.7. Resultado do teste de agregação plaquetária induzida pelos agonista ADP (20 $\mu$ mol/mL e 50 $\mu$ mol/mL).....	51
Figura 5.8. Resultados da análise do teste adesão plaquetária espontânea.....	52
Figura 5.9. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de plaquetas de animais selvagens e <i>Fbn1</i> <sup>mg<math>\Delta</math>/+</sup> .....	53
Figura 5.10. Imagens de microscopia de varredura de trombo de animais selvagens e <i>Fbn1</i> <sup>mg<math>\Delta</math>/+</sup> .....	54
Figura 5.11. Imagens de microscopia de luz da carótida esquerda após a indução fotoquímica do trombo de animais selvagens e <i>Fbn1</i> <sup>mg<math>\Delta</math>/+</sup> .....	55
Figura 5.12. Resultado dos níveis de TGF- $\beta$ totais e ativos no plasma de camundongos selvagens e de <i>Fbn1</i> <sup>mg<math>\Delta</math>/+</sup> .....	56

Figura 5.13. Imagem in situ da atividade de degradação de gelatina da artéria aorta de animais selvagens e *Fbn1*<sup>mgΔ/+</sup> .....58

## LISTAS DE TABELAS

Tabela 5.1. Resultados das médias do peso dos animais selvagens e <i>Fbn1</i> <sup>mgΔ/+</sup> .....	26
Tabela 5.2. Parâmetros hemodinâmicos.....	48
Tabela 5.3. Resultados da análise dos testes de coagulação sanguínea e contagem do número de plaquetas.....	49

## Resumo

As mutações no gene da fibrilina-1, presente na fibra elástica, estão relacionadas à síndrome de Marfan, doença genética autossômica dominante. Acredita-se que a maioria dos seus sintomas esteja relacionada a uma hiper-ativação do fator TGF- $\beta$ . Quando camundongos modelo para síndrome são tratados com losartan apresentam uma melhora significativa nos sinais clínicos. Assim, neste estudo, investigamos o papel de fibrilina-1 na análise de trombose arterial em modelos de camundongos para a síndrome de Marfan (*Fbn1*<sup>mg $\Delta$ /+</sup>). Foram analisados a formação de trombos, os níveis de plaquetas, APTT, PT e TT, agregação e adesão plaquetária, parâmetros hemodinâmicos, níveis de TGF- $\beta$ , atividade das MMPs, bem como a morfologia das plaquetas, das fibras elásticas e dos trombos. Foi observado que os animais *Fbn1*<sup>mg $\Delta$ /+</sup> necessitam de cerca de 120 $\pm$ 21,07 minutos para formarem o trombo, enquanto os animais selvagens precisam de 58 $\pm$ 7,16 minutos. Mas, quando os animais *Fbn1*<sup>mg $\Delta$ /+</sup> foram tratados com anti-hipertensivos losartan e captopril, ocorreu uma recuperação no tempo de formação do trombo, com redução de 57,5% e 67,5% no tempo, respectivamente. Além disso, constatou-se que os animais *Fbn1*<sup>mg $\Delta$ /+</sup> apresentam um aumento na atividade das MMPs e TGF- $\beta$  ativos, quando tratados com os anti-hipertensivos, houve uma diminuição apenas na atividade das MMPs. Ademais, não foi verificada diferença significativa entre todos os outros parâmetros analisados. Este estudo sugere que, de alguma forma, as drogas interferem na remodelação da matriz elástica, devido a uma diminuição da atividade das metaloproteinases de matriz e, conseqüentemente, leva à recuperação na formação do trombo.

Palavras-chave: Fibrilina-1, matriz extracelular, trombose, agentes hipotensores, TGF- $\beta$ .

## Abstract

Recent works show that an increased activation of the TGF- $\beta$  is associated with most of the symptoms of the Marfan syndrome. Studies using mouse models of Marfan treated with losartan have been shown to prevent the degradation of the elastic matrix. Other investigators suggest that the metalloproteinases and the noncanonical ERK signaling are involved in the breakdown of the elastic fiber, which results in the aneurysm. In this study we investigated the role of fibrillin-1 in the arterial thrombosis model using mouse models of Marfan. We analysed thrombus formation, platelet levels, APTT, PT and TT time, hemodynamic parameter, TGF- $\beta$  levels, MMP activity as well as platelets, elastic fibers morphology and thrombus. This study demonstrated that *Fbn1*<sup>mg $\Delta$ /+</sup> mice take about 120 $\pm$ 21,07 minutes for the thrombus to be formed when compared with wild type, 58 $\pm$ 7,16. When these *Fbn1*<sup>mg $\Delta$ /+</sup> mice were treated with antihypertensive losartan and captopril the time taken for the thrombus formation was reduced in 57,5% and 67,5%, respectively. The activity of metalloproteinases and activity TGF- $\beta$  was increased in the *Fbn1*<sup>mg $\Delta$ /+</sup>, however no significant difference between the hemodynamic parameters, levels of totals TGF- $\beta$ , morphological platelets, elastic fiber and thrombus were observed. Finally, the results suggested that fibrillin-1 interferes with this process and antihypertensive affect the physiology of *Fbn1*<sup>mg $\Delta$ /+</sup> mice. This study suggested that somehow drugs interfere with elastic matrix remodeling due to a decrease in the activity of matrix metalloproteinases which results in the recovery time of thrombus formation.

**Keywords:** Fibrillin-1; extracellular matrix; thrombus; antihypertensive agents; TGF- $\beta$ .

# **INTRODUÇÃO GERAL**

---

# INTRODUÇÃO GERAL

---

## 1. Introdução Geral

As fibras elásticas são importantes componentes da matriz extracelular de estruturas e órgãos que são submetidos a constante estresse mecânico, tais como pulmão, pele e grandes vasos. Por meio de análise ultra-estrutural, é possível identificar dois componentes bem distintos: uma rede de microfibrilas com diâmetro de aproximadamente 12 nm entremeada por uma substância mais elétron-densa e amorfa formada pela elastina. 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. 2002a; Kielty et al. 2002b). Há algum tempo, muitos pesquisadores têm demonstrado a importância de moléculas da matriz extracelular, 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- $\beta$  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, que dentre outras atividades, diminui a expressão de TGF- $\beta$ , leva a reversão dos sinais clínicos característicos de Marfan em camundongos transgênicos (Habashi et al. 2006). Recentemente, publicamos um artigo que demonstra a importância da MAGP-1, outro componente estrutural das microfibrilas, no processo de formação de trombos em um modelo de trombose arterial em camundongos. Aparentemente, a MAGP-1 participa no processo por interagir com moléculas que fazem parte do trombo, como fibrinogênio e fator de von Willebrand (Werneck et al. 2008), mas, além disso, a MAGP-1 tem a capacidade de interagir com o TGF- $\beta$  ativo, o que sugere que, de certa forma, poderia estar envolvida na regulação da ação deste fator de crescimento (Weinbaum et al. 2008a). Estudos relacionando as microfibrilas, presentes na parede vascular, e a formação de trombos demonstraram que microfibrilas ricas em fibrilina são importantes no processo de adesão plaquetária em modelos *in vitro* (Ross et al. 1998a). No presente trabalho, propomos estudar a formação de trombos em camundongos deficientes em Fibrilina-1 e verificar se o TGF  $\beta$  tem participação neste processo *in vivo* tratando estes animais com Losartan. Sendo assim, submetemos camundongos deficientes em fibrilina-1 a um modelo de trombose. Os dados obtidos mostram que estes animais necessitam do dobro do tempo para formação do trombo quando comparados aos animais selvagens. Verificamos que o tratamento com losartan resgata o tempo normal de formação de trombos e que, aparentemente, esta ação parece estar relacionada com ação de metaloproteinases.

# INTRODUÇÃO

---

As fibras elásticas são importantes estruturas presentes em tecidos conjuntivos, estão sob constante estresse mecânico, como pele, pulmão e grandes vasos (Kielty et al. 2002a). Elas são responsáveis pela distensão reversível do tecido conjuntivo, uma vez que exibem deformação elástica e são capazes de armazenar energia para restaurar o tecido deformado na sua configuração original. As fibras elásticas são grandes complexos da matriz extracelular formadas por numerosos componentes, dos quais se destacam dois componentes distintos - a elastina e as microfibrilas - quando analisados por microscopia eletrônica (Cleary et al. 1981).

A fibra elástica madura é formada a partir da deposição de tropoelastina, molécula de aproximadamente 70 kDa, que apresenta como principal característica a presença de domínios hidrofóbicos alternados por domínios de reações cruzadas (*cross-link*) ricos em lisina. Na matriz extracelular, a tropoelastina se auto-agrega num processo denominado coacervação, no qual domínios hidrofóbicos de diferentes moléculas se alinham, formando o agregado que, por ação de enzimas do tipo lisil oxidases sobre os resíduos de lisina dos domínios de reações cruzadas, são covalentemente ligadas, formando a elastina (Thomassin et al. 2005; Wagenseil and Mecham 2007). As microfibrilas são formadas principalmente por fibrilinas, embora contenham outras moléculas associadas como as glicoproteínas associadas às microfibrilas (MAGPs), fibulinas e emilinas (Kielty et al. 2002a). As microfibrilas são filamentos que apresentam de 10 a 12 nm de diâmetro e têm como principal componente estrutural as fibrilinas. Em análises por microscopia eletrônica de extratos obtidos de tecidos ricos em microfibrilas, é possível identificar estrutura semelhante a um colar de “contas”, com periodicidade de ~54 nm, enquanto o comprimento do monômero de fibrilina é de ~ 160 nm (Lin et al. 2002). As fibrilinas são

glicoproteínas de alto peso molecular, aproximadamente 340 kDa, e apresentam uma grande complexidade de domínios (Sakai et al. 1991). Até o momento, foram caracterizadas três fibrilinas 1, 2 e 3. Estas glicoproteínas se caracterizam por apresentar domínios semelhantes àqueles que se ligam ao Fator de Crescimento Epidérmico (*EGF-like*), intercalados por domínios semelhantes àqueles encontrados nas proteínas que se ligam ao complexo latente do Fator de Crescimento Transformante (*TGF-like ou TB-like*). A principal diferença estrutural entre Fibrilina 1 e 2 é que a primeira apresenta um domínio rico em prolina no éxon 10, enquanto a segunda é rica em glicina. Além disso, ambas apresentam em seu éxon 37 um sítio de ligação de integrina, RGD; na fibrilina-2, porém, há um sítio adicional no éxon 24 (Werneck et al. 2004). Embora diferentes, estas isoformas apresentam distribuições distintas, mas que, algumas vezes, coincidem em determinados momentos nos tecidos durante o desenvolvimento e na fase adulta, sendo a isoforma mais encontrada em humanos adultos a fibrilina-1 (Kielty et al. 2005). A fibrilina-3 é o membro da família que foi menos estudado e pouco se sabe sobre sua função. A fibrilina-1 apresenta como principal característica estrutural 47 domínios *EGF-like*, sendo que destes, 43 são do tipo que ligam cálcio, importante por manter o correto enovelamento destes domínios. Além disso, ela apresenta 7 domínios *TGF-like* (Kielty et al. 2005).

Muito embora, até o momento, não haja nenhuma evidência experimental da ligação destes complexos latentes de TGF- $\beta$  diretamente a estes domínios da fibrilina-1, existem dados na literatura demonstrando que o complexo formado pelo TGF- $\beta$  com a proteína LTBP-1 (Latent-TGF  $\beta$  Binding Protein-1”) é capaz de se ligar à fibrilina-1

(Isogai et al. 2003), sugerindo que a fibrilina-1 possa ser importante para a homeostase deste fator crescimento.

As fibras elásticas e as microfibrilas são organizadas em tecidos específicos e estão dispostas de acordo com as exigências mecânicas do sistema de órgãos individuais. Na pele, as microfibrilas estão dispostas desde a membrana basal da derme até a derme reticular, a qual permanece paralelamente com as fibras elásticas e confere elasticidade à pele. Na aorta, as microfibrilas se associam com a elastina na camada média para formar as lâminas concêntricas que separam a camada muscular lisa. Nos olhos, as microfibrilas formam feixes paralelos com a lente, conforme figura 1.1 (Ramirez et al. 2004).

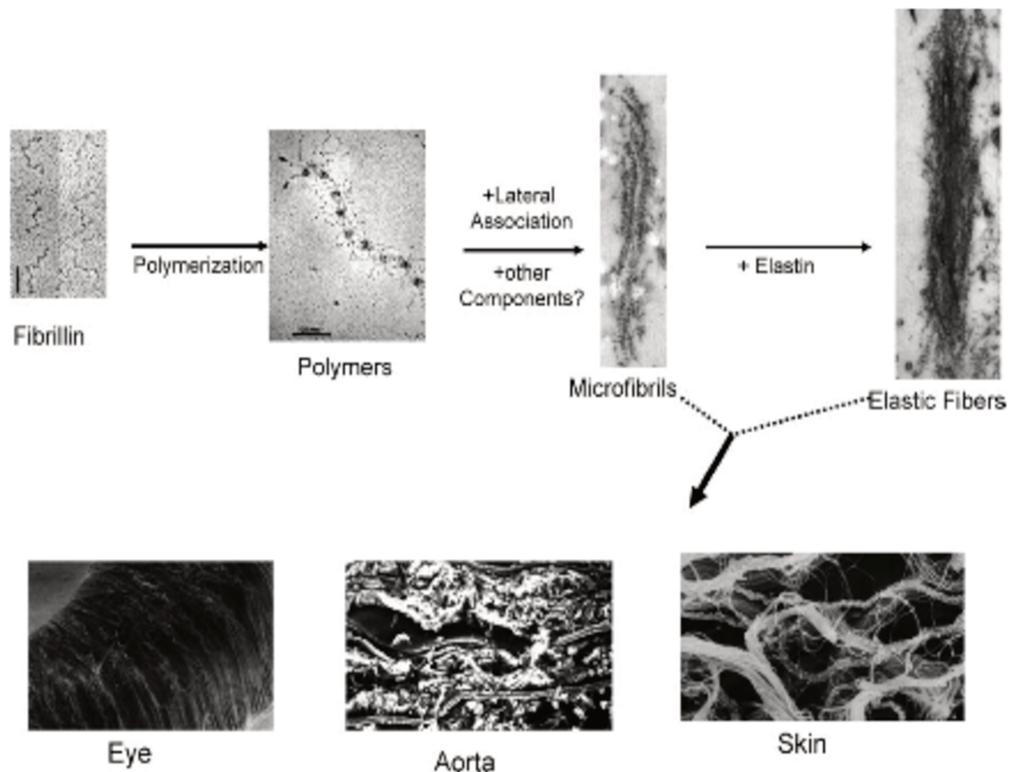


Figura 1.1. Representação esquemática das principais etapas de montagem das microfibrilas e fibras elásticas em três exemplos de tecidos (Ramirez et al. 2004).

O processo de formação das fibras elásticas é bastante complexo e depende da ação coordenada de várias moléculas (Wagenseil and Mecham 2007). Esta complexidade torna este processo vulnerável, por exemplo, ao aparecimento de mutações que levam a patologias associadas à formação das fibras elásticas.

Mutações no gene da fibrilina-1 estão relacionadas à Síndrome de Marfan (Judge and Dietz 2005). Esta doença é caracterizada por uma desordem sistêmica do tecido conjuntivo e tem como principais manifestações clínicas aneurismas na aorta proximal, deslocamento do cristalino e crescimento exacerbado dos ossos. A Síndrome de Marfan é uma doença hereditária autossômica dominante. Ela foi pela primeira vez descrita em 1896, por um pediatra francês, Antoine Bernard Marfan, que descreveu o caso de uma menina de cinco anos que apresentava membros e dedos alongados e magros, contraturas nas articulações dos dedos e joelhos, crânio estreito e alongado, altura superior para sua idade, cifo-escoliose torácica, deformidade do esterno e enfisema pulmonar. No decorrer de sua carreira, relatou outros inúmeros casos e verificou características semelhantes nestes pacientes como sub-luxação do cristalino, malformação da válvula aórtica, além de constatar que ambos os sexos eram acometidos por estas alterações patológicas (Pyeritz 2000).

De acordo com os dados epidemiológicos, a incidência dessa patologia é de 2 a 3 casos a cada 10000 nascimentos (Judge and Dietz 2005). A mutação no gene da fibrilina-1 leva a uma deficiência desta na matriz extracelular e resulta em anormalidade na matriz elástica da camada média da parede de grandes vasos, como da aorta por exemplo, o que pode ocasionar aneurisma aórtico. Esta anormalidade, também presente nos ligamentos articulares, provoca uma hiper mobilidade articular e uma perda de contenção do

crescimento dos ossos, que crescem demais e deformam-se. No coração, o sangue que é bombeado com muita força a cada batimento cardíaco, ejeta-se diretamente na aorta, cujas paredes estão fragilizadas e podem chegar a romper-se (Neptune et al. 2003). Os portadores dessa síndrome apresentam, frequentemente, anomalias nas estruturas esquelética, pulmonar, cardíaca, ocular, vasos sanguíneos entre outras, e uma sobrevida de aproximadamente dois terços do normal — 40 anos em média —, no entanto, atualmente, o tratamento cirúrgico aumentou a expectativa de vida destes pacientes. Fisicamente, são indivíduos altos, com escoliose, braços e mãos alongadas e deformidade torácica (Neptune et al. 2003) (Robinson et al. 2006), em que cerca de 90% dos casos, a morte é causada por falha cardiovascular (dissecção da aorta, problemas da válvula aórtica e doença cardíaca congestiva) (McKusick 1991). Nos Estados Unidos, o número de óbitos resultantes dessa doença foi bastante reduzido com a cirurgia de reconstrução do tronco aórtico, evitando, assim, a principal causa de morte, o que faz com que os pacientes diagnosticados tenham expectativa de vida de uma pessoa normal (Judge and Dietz 2008).

A identificação precoce de pessoas portadoras desta doença é importante, pois ela tem um impacto bastante significativo, diminuindo a expectativa de vida destes pacientes. Porém, não há nenhum método de diagnóstico molecular rápido e eficiente (Judge and Dietz 2008). Em relação ao diagnóstico, é preciso cautela, pois as características presentes na síndrome de Marfan são semelhantes a outras patologias do tecido conjuntivo. Sendo assim, o diagnóstico é feito de acordo com o estabelecido pelo Comitê Internacional de Nosologia, o qual recomenda ser necessária a presença de alterações nos sistemas ocular, ósseo e cardiovascular. As mutações identificadas no gene da fibrilina-1

não são correlacionadas com os fenótipos, mas mutações em determinadas regiões do gene estão relacionadas com a gravidade da doença (Robinson and Godfrey 2000).

A patogênese da Síndrome de Marfan foi inicialmente explicada devido a algum problema na fibra elástica, principalmente pelos pacientes apresentarem uma menor quantidade e uma maior fragmentação nas fibras elásticas da pele e das aortas. Problemas relacionados com o gene da elastina foram facilmente descartados, já que os pacientes apresentavam manifestações clínicas em tecidos onde a expressão de elastina não estava presente (Judge and Dietz 2005). Sakai e colaboradores (Sakai et al. 1986) foram os pioneiros em identificar a fibrilina-1 como o principal componente das microfibrilas presentes em todos os tecidos acometidos nos pacientes com Síndrome de Marfan. O gene da fibrilina-1 contém 65 éxons (235 kb) que codificam uma glicoproteína de aproximadamente 340 kDa. A maioria das mutações identificadas em pacientes com a Síndrome ocorre em um dos 47 domínios semelhantes ao fator de crescimento epidérmico (*EGF-like domains*), muitas delas alterando o espaçamento entre os seis resíduos de cisteína presentes nestes domínios, que são importantes no correto dobramento da cadeia ou alterando resíduos importantes na interação com cálcio, por exemplo. Estas perturbações levam ao aumento da degradação proteolítica da molécula, que pode culminar com menor quantidade depositada na matriz extracelular (Reinhardt et al. 1997a; Reinhardt et al. 1997b). Baseados em outras doenças do tecido conjuntivo, a síndrome de Marfan passou, então, a ser explicada pelo modelo de dominância negativa. Neste modelo, a molécula mutante atua impedindo a deposição normal, estabilidade ou função da proteína não mutante expressa pelo alelo normal, levando a um distúrbio pela diminuição da presença destas moléculas na matriz. A análise de tecidos de pacientes

portadores da Síndrome demonstrou que muitos pacientes apresentavam em seus tecidos, aproximadamente, 50% da quantidade esperada de fibrilina-1, o que corresponderia a expressão de um alelo (Hollister et al. 1990). Outros autores demonstraram que a severidade da doença estava ligada aos níveis de expressão da forma mutante da proteína, em que baixos níveis de expressão foram relacionados com quadros clínicos mais brandos (Dietz et al. 1993; Nijbroek et al. 1995). Porém, esta correlação foi descartada diante de dados de pacientes, que apresentavam a doença clássica severa e baixos níveis de transcritos de fibrilina-1 que apresentava um códon de terminação prematura (Halliday et al. 1999). Atualmente, acredita-se que a haplo-insuficiência, ou seja, metade da produção da molécula normal, é crítica para a expressão clínica da doença. Esta hipótese é baseada em resultados obtidos em estudos com camundongos transgênicos.

Em um primeiro momento, quando utilizados camundongos que apresentam uma mutação no resíduo número 1039, substituindo uma cisteína por uma glicina, gerou uma super-expressão de uma forma mutante de fibrilina-1 (C1039G). Foi observado, portanto, que em um “background” (Bunton et al. 2001; Carta et al. 2006) genético de um camundongo expressando quantidades normais de fibrilina-1, a expressão da molécula mutante não foi suficiente para produzir o problema vascular presente em camundongos heterozigotos para a mutação C1039G/+. Os camundongos heterozigotos para esta mutação apresentam os mesmos sinais clínicos visto em camundongos nulos para a expressão de fibrilina-1 (Carta et al. 2005). Finalmente, quando um animal transgênico super-expressando fibrilina-1 normal em um background heterozigoto para a mutação (C1039G/+) foi criado, observou-se que este animal apresentava-se normal, sem nenhuma das alterações vasculares antes observadas (Judge et al. 2004).

Em trabalhos realizados com outros modelos murinos de síndrome de Marfan, foi observado que microfibrilas formadas por fibrilina-1 não são essenciais para a formação da fibra elástica, e, sim, importantes para a manutenção das fibras elásticas durante a vida pós-natal. Aparentemente, a ausência de comunicação de forma correta entre as fibras elásticas e as células musculares lisas, papel supostamente desempenhado pela fibrilina 1, leva estas células a expressarem moléculas como as metaloproteinases (MMPs) 2 e 9, promovendo a calcificação da fibra elástica, inflamação da parede vascular, hiperplasia da íntima devido à migração e hiperplasia de células musculares lisas e, finalmente, colapso estrutural da parede do vaso (Pereira et al. 1997c; Pereira et al. 1999). Estas características patológicas também foram encontradas em grandes artérias musculares de pacientes com síndrome de Marfan (Bunton et al. 2001).

A função estrutural das microfibrilas ricas em fibrilina-1 é bastante óbvia, mas ultimamente tem aumentado as evidências de que estas microfibrilas têm papel crítico na regulação de citocinas, que são moléculas que afetam o desenvolvimento de tecidos, bem como a homeostase, regulando a atividade celular, como proliferação, migração, capacidade de síntese e morte (Ramirez and Rifkin 2003). A molécula de Fibrilina-1 apresenta um alto grau de homologia com as proteínas que pertencem a mesma família e que ligam ao TGF (LTBP- Latent TGF- $\beta$  Binding Protein) (Pereira et al. 1993). Citocinas da família do TGF- $\beta$  são sintetizadas e secretadas para matriz extracelular como um grande complexo latente, formado por duas moléculas de TGF- $\beta$  ligadas ao peptídeo, que confere latência à citocina (LAP- Latency associated peptide) e a uma das isoformas de LTBP (LTBP 1, 3 e 4) (Dallas et al. 2000; Sinha et al. 1998). Dados recentes da literatura dão suporte à hipótese de que mutações no gene da fibrilina-1 levam à fragmentação das

fibras elásticas e a uma diminuição na quantidade de fibrilina-1, que resulta em ativação exacerbada do complexo latente de TGF- $\beta$ . Conforme demonstrado na figura 1.2, TGF- $\beta$  está ligado ao peptídeo associada à latência (LAP), o qual está ligado à proteína ligante do complexo latente do TGF- $\beta$  (LTBP), que, por sua vez, se liga na parte N-terminal da fibrilina-1, presente na matriz extracelular, que caracteriza a forma inativa. Essa maior ativação do TGF- $\beta$  aparentemente é decorrente de uma redução na quantidade de fibrilina-1, com isso o complexo latente não permanece ligado à fibrilina, tornando-se mais exposto e susceptível à ativação (Neptune et al. 2003). Esta atividade exacerbada, quando estabelecida em camundongos por mutação no gene da fibrilina-1, leva ao aparecimento de determinados sinais clínicos encontrados na Síndrome de Marfan, como os aneurismas aórticos e dissecação (rompimento).

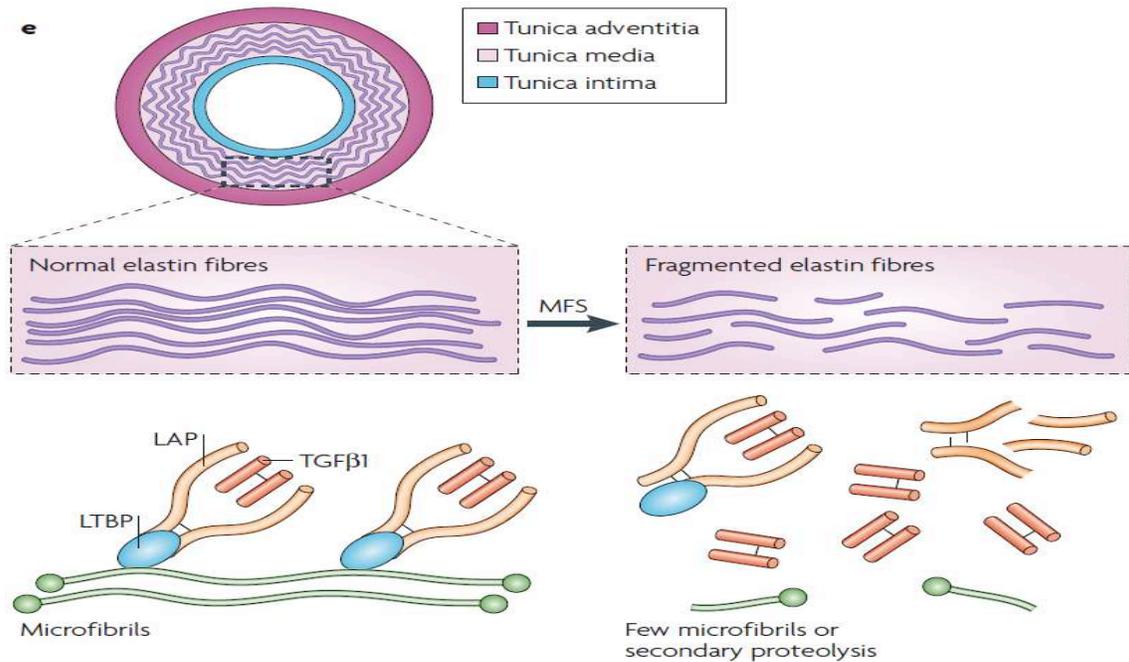


Figura 1.2. TGF- $\beta$  na síndrome de Marfan. LAP = peptídeo associada à latência; LTBP = proteína ligante do complexo latente do TGF- $\beta$ ; TGF- $\beta$  = Fator de crescimento transformante Beta (ten Dijke and Arthur 2007).

Os portadores da síndrome de Marfan, por apresentarem hipertensão arterial, são tratados com beta-bloqueadores ou antagonistas de receptores AT1 de angiotensina II, a fim de reduzirem a frequência cardíaca, para prevenir complicações, como aneurisma. Estudos demonstram a utilização do fármaco losartan como antagonista do TGF- $\beta$ , o qual melhora significativamente a redução no desenvolvimento do aneurisma, devido a um bloqueio no receptor (AT1) de angiotensina II, diminuindo os níveis de TGF- $\beta$  ativo, conforme demonstrado na figura 1.3 (Habashi et al. 2006). Além disso, o tratamento de camundongos modelos de síndrome de Marfan com antagonistas do TGF- $\beta$ , tais como anticorpos anti-TGF- $\beta$  ou com um bloqueador dos receptores AT1 de angiotensina II,

Losartan, previne o aparecimento destes sintomas (Habashi et al. 2006), onde ocorre uma melhora na arquitetura das fibras elásticas. Estes dados reforçam a hipótese de que a fibrilina-1 participa na regulação da atividade do TGF- $\beta$ .

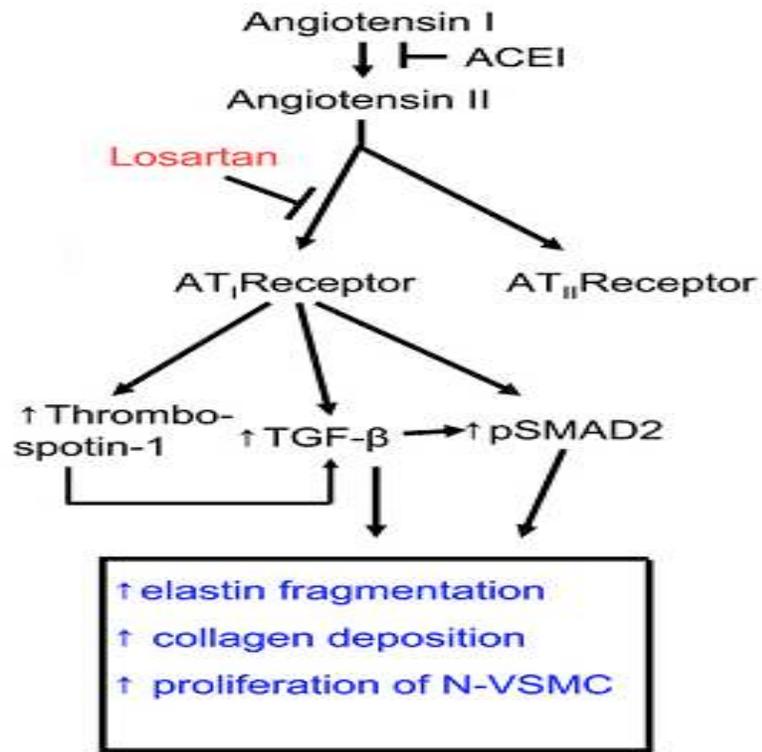


Figura 1.3. Esquema da inibição do receptor AT1 por losartan (Brooke et al. 2008a)

Outro medicamento usado no tratamento da síndrome é aquele composto por fármacos inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA), que são utilizados em estados hipertensivos e insuficiência cardíaca. Eles atuam no sistema renina angiotensina, o qual vai inibir a conversão da angiotensina I em angiotensina II. Nos pacientes portadores da síndrome de Marfan, eles são indicados pela hipertensão presente e consequentemente, na prevenção do aneurisma do arco aórtico, o qual é causado por uma

fragmentação e desorganização das fibras elásticas, que resultam no enfraquecimento e a propensão à ruptura da parede aórtica.

Estudos recentes demonstram que o uso do fármaco losartan é mais efetivo na prevenção dos sinais clínicos de Marfan em comparação aos inibidores de ECA, devido à inibição na sinalização da via ERK por meio da inibição do receptor AT1. Habashi e colaboradores (2011) verificaram que o tratamento com losartan leva a prevenção de aneurisma em camundongos (C1039G) em comparação com inibidor da enzima ECA (enalapril); ambos medicamentos atenuam a sinalização de TGF- $\beta$  na aorta, mas apenas o losartan, inibidor do receptor AT1, foi efetivo em inibir a sinalização da via ERK.

Vale ressaltar que pacientes portadores da síndrome de Marfan, tratados com inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA), apresentaram uma redução na rigidez arterial em 60% e uma diminuição de 3 a 7 mm no diâmetros da aorta (Ahimastos et al. 2007). Geralmente, drogas anti-hipertensivas reduzem a rigidez arterial, possivelmente, por meio da redução da pressão arterial, além de possuírem efeitos adicionais sobre a estrutura da parede arterial, pois contribui para a redução na rigidez e no diâmetro arterial (Wojakowski et al. 2001). Tais resultados poderiam estar relacionados com os níveis de TGF- $\beta$  e de MMP's (Ahimastos et al. 2007).

As metaloproteinases de matriz (MMPs) constituem uma família de enzimas com atividade proteolítica responsáveis pela degradação dos componentes da matriz extracelular. Da classe das MMPs a MMP-2 são de mais interesse para a síndrome de Marfan, por serem responsáveis por quebrar colágeno e elastina (Kadar et al. 1981; Page-McCaw et al. 2007).

Recentes trabalhos demonstram que as MMPs exercem papel na formação do aneurisma, a principal causa de morte para os pacientes com a síndrome de Marfan. Sua inibição diminui a degradação das fibras elásticas e melhora a arquitetura das fibras. Além disso, está descrito que as MMPs, incluindo as MMP-2, MMP-3 e MMP-9, são responsáveis por liberar TGF- $\beta$  da matriz, mas somente a MMP-2 é capaz de clivar o TGF- $\beta$  do LAP, que ficará livre e ativado (Ge and Greenspan 2006; Wang et al. 2006).

Yang e colaboradores demonstraram que o tratamento com losartan em modelo da síndrome de Marfan foi efetivo em diminuir a expressão de MMP-2, em que foi sugerido um mecanismo alternativo do losartan em proteger a não quebra das fibras elásticas e, conseqüentemente, o aparecimento do aneurisma (Yang et al. 2010). Outros pesquisadores sugerem o tratamento com doxiciclina em modelo para síndrome de Marfan, pois foi verificado uma diminuição na expressão de MMP-2, SMAD2 e ERK1/2 fosforilação, em que houve uma proteção para a ruptura do aneurisma (Xiong et al. 2012). O fato da expressão das MMPs estarem aumentadas na síndrome de Marfan ainda não é clara.

Além da função estrutural na formação das fibras elásticas e da regulação de fatores de crescimento como TGF- $\beta$ , dados da literatura sugerem que microfibrilas ricas em fibrilina são importantes suportes para a adesão e agregação de plaquetas, demonstrando ter função trombogênica em condições dinâmicas *in vitro* (Ross et al. 1998a) sugerindo sua participação na hemostase. Esse processo de formação de trombos ocorre após uma injúria, que dispara uma seqüência de eventos, logo, inicia-se o recrutamento das plaquetas, as quais são ativadas para o recrutamento de novas plaquetas. A adesão inicial dessas à superfície lesionada ocorre pelas proteínas de adesão presentes

na sua membrana, sendo as principais os receptores da glicoproteína IIb/IIIa (GP IIb/IIIa). O resultado dessa sequência é a formação de um trombo rico em plaquetas, que provisoriamente tampona a lesão endotelial. Esse trombo rico em plaquetas é rapidamente infiltrado pela fibrina, transformando-se em um trombo fibrinoso. Em seguida, os eritrócitos são capturados por essa rede fibrinosa, principal responsável pela oclusão do vaso sanguíneo rompido. Este, além de limitar a perpetuação da perda de constituintes circulatórios para os interstícios celulares, fornece uma matriz preliminar, que alicerçará a migração das células responsáveis pelo desencadeamento do processo de reparo (Ross et al. 1998b).

As plaquetas possuem principalmente três tipos diferentes de organelas de estocagem: a) lisossomos — compostos de várias proteínas hidrolíticas; b) grânulos alfa — estocam proteínas de adesão e reparação, como fator von Willebrand, fibronectina, trombospondina, TGF- $\beta$ , entre outros; e c) grânulos densos — estocam principalmente compostos não protéicos, como cálcio, nucleotídeos, serotonina, pirofosfato, fosfato inorgânico e polímeros de fosfato, que modulam a coagulação e fibrinólise (O'Neill et al. 2002). As plaquetas estão envolvidas ainda, na geração de desordens trombóticas e apresentam papel importante nas doenças arteriais e no processo da arteriosclerose (Sakamoto et al. 2005).

Considerando a distribuição destas microfibrilas na parede dos vasos, principalmente dos grandes vasos como a aorta, esta característica pode ser importante, juntamente com outras moléculas da região sub-endotelial, na modulação da resposta das plaquetas diante da lesão do vaso sanguíneo (Ross et al. 1998a).

Nosso laboratório tem se dedicado ao estudo da possível participação destas moléculas que compõem as fibras elásticas, mais especificamente a rede de microfibrilas, estruturas estas presentes na parede de grandes vasos no processo de formação de trombos. Além disso, nós possuímos um modelo de trombose arterial, cuja formação de trombos na artéria carótida é disparada por espécies reativas de oxigênio produzidas *in situ* pela foto-estimulação de um corante, rosa de Bengala (He et al. 2002). O fluxo sanguíneo é medido neste vaso por meio de uma sonda de ultrassom, até o ponto em que o trombo formado revela-se grande o suficiente para bloquear a carótida, determinando o tempo de oclusão. Este modelo foi aplicado em camundongos deficientes em MAGP-1<sup>-/-</sup>, molécula, aparentemente, sem função primordial durante o desenvolvimento de camundongos C57BL6, já que estes não apresentam nenhuma alteração fenotípica evidente, com tempo de vida e capacidade de reprodução normais. Neste experimento, os animais deficientes em Magp-1 (MAGP-1<sup>-/-</sup>) apresentaram tempo de oclusão maior, quando comparados com os animais selvagens. Mediante técnicas bioquímicas, demonstrou-se que a MAGP-1 é capaz de ligar o fibrinogênio e o fator de von Willebrand, sugerindo, assim, um possível mecanismo de ação por meio da interação com estas moléculas (Werneck et al. 2008).

No presente trabalho, tivemos como objetivo geral estudar a função da fibrilina-1 na trombose arterial, para tanto, utilizamos como modelo experimental camundongos modificados geneticamente (Fbn1<sup>mg<sup>s</sup>/+</sup>), cuja estratégia foi a substituição dos éxons 19 a 24 pelo cassete que confere resistência à neomicina (neo), com o promotor PGK, conforme figura 1.4. Esta modificação resultou em animais denominados mg $\Delta$ , que apresentavam uma diminuição na quantidade de fibrilina-1 nos tecidos em 10 vezes. Os

animais heterozigotos apresentam início da vida adulta normal, devido a uma maior expressão de proteínas normais que suprimem o efeito negativo da mutação ( $Fbn1^{mg\Delta/+}$ ). Já os animais homozigotos ( $Fbn1^{mg\Delta/mg\Delta}$ ) morrem na primeira semana de vida, devido a complicações vasculares similares à síndrome de Marfan (Pereira et al. 1997b).

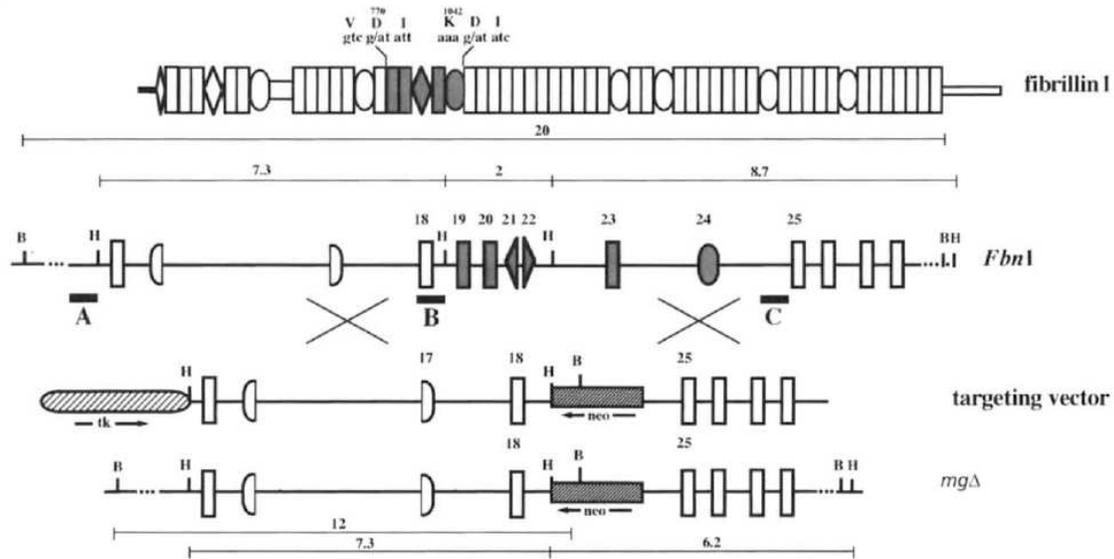


Figura 1.4. Mutação no gene fibrilina-1, com a deleção dos éxons 19 a 24 e, a inserção do cassete de neomicina, em que resultou nos animais  $Fbn1^{mg\Delta/+}$  (Pereira et al. 1997b).

Dados preliminares mostraram um aumento no tempo de oclusão quando este ensaio foi realizado com camundongos deficientes em fibrilina-1,  $Fbn1^{mg\Delta/+}$ , com tempo aproximado de 124 minutos em comparação ao tempo dos camundongos selvagens de 58 minutos. Levando em consideração a importância do TGF- $\beta$  em processos de cicatrização/manutenção dos tecidos e a suposta excessiva ativação do TGF- $\beta$  nestes camundongos, o presente projeto objetivou caracterizar o papel da fibrilina-1 no processo

de trombose arterial em camundongos *Fbn1*<sup>mgΔ/+</sup> e verificar se o tratamento com losartan interfere neste processo.

# **OBJETIVOS**

---

## **2. Objetivo Geral**

O objetivo geral deste projeto foi caracterizar o papel da fibrilina-1 no processo de trombose arterial.

### **2.1. Objetivos específicos**

**2.1.1.** Verificar se o fármaco losartan e captopril tem capacidade de reestabelecer o tempo de oclusão normal para formação do trombo;

**2.1.2.** Analisar a funcionalidade das plaquetas obtidas de animais selvagens, deficientes em fibrilina-1 tratados ou não tratados com losartan e captopril;

**2.1.3.** Analisar a cascata de coagulação dos animais selvagens, deficientes em fibrilina-1 tratados ou não tratados com losartan e captopril;

**2.1.4.** Analisar a morfologia dos trombos obtidos de animais selvagens, deficientes em fibrilina-1 tratados ou não tratados com losartan e captopril;

**2.1.5.** Analisar a morfologia das fibras elásticas presentes na carótida direita de animais selvagens, deficientes em fibrilina-1 tratados ou não tratados com losartan e captopril;

**2.1.6.** Analisar o tempo de formação do trombo nos animais selvagens, deficientes em fibrilina-1 após a injeção de MAGP-1 recombinante;

**2.1.7.** Quantificar os níveis de TGF- $\beta$  no plasma em camundongos selvagens e deficientes em fibrilina-1 tratados ou não com losartan e captopril;

**2.1.8.** Analisar a atividade das metaloproteinases de matriz na artéria de animais selvagens, deficientes em fibrilina-1 tratados ou não tratados com losartan e captopril.

# **MATERIAIS E MÉTODOS**

---

### **3. Materiais e métodos**

#### *3.1. Materiais*

Os reagentes de uma maneira geral foram obtidos da Invitrogen (Carlsbad, USA) Greiner (Americana, SP) e GE Healthcare (UK). O anestésico cloreto de ketamina foi adquirido da Agener União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, SP e o cloreto de xilazina da Vetbrands Saúde Animal, Paulínia, SP. O fármaco losartan foi obtido da Biolab Sanus Pharmaceutical LTDA, São Paulo, e o atenolol e o captopril foram obtidos da Sigma-Aldrich Chemical, St. Louis, EUA. Os demais reagentes foram produtos analíticos de uso corrente adquiridos no comércio local.

#### *3.2. Animais*

Para o experimento, foram utilizados animais heterozigotos para a modificação genética ( $Fbn1^{mg/+}$ ), pois os homozigotos morrem na primeira semana de vida (Pereira et al. 1997a), que foram cedidos pela Dra. Lygia Veiga Pereira do Instituto de Biociência, da Universidade de São Paulo. Já para o controle, foram utilizados camundongos selvagens machos da linhagem C57BL/6, com 5 semanas de idade ( $25 \pm 2g$ ), provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB), da Universidade Estadual de Campinas, SP. Os camundongos foram mantidos em temperatura de  $22 \pm 1^\circ C$  em ciclo de claro-escuro de 12h, com livre acesso à água e à 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 1774-1. Além disso, para os roedores, foram utilizadas dietas padrão (Nuvilab CR1<sup>®</sup>) e foram divididos em grupos experimentais:

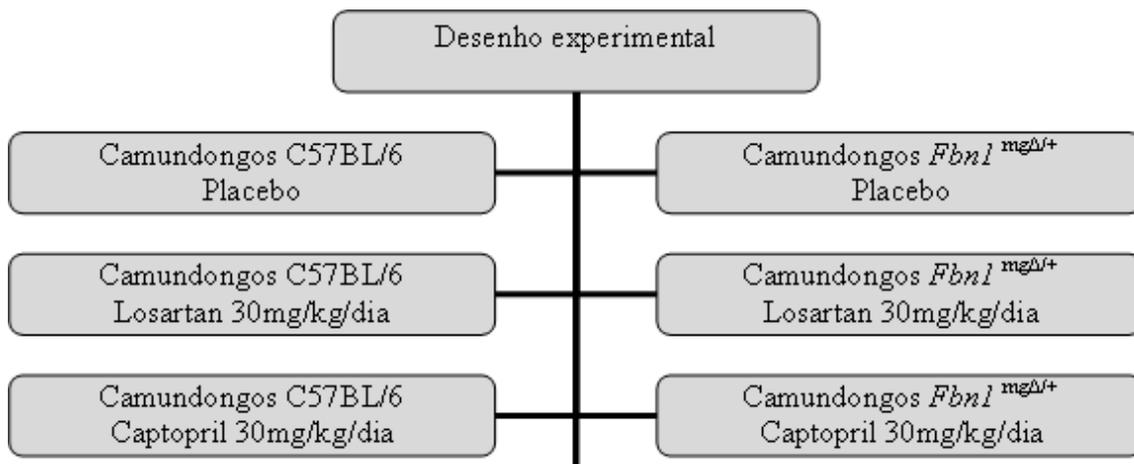


Figura. 3.1. Fluxograma experimental.

Os pesos dos animais não diferiram estatisticamente entre os grupos estudados, conforme demonstrado na tabela 3.1.

Tabela 3.1. Resultados das médias do peso dos animais selvagens e *Fbn1*<sup>mgΔ/+</sup>.

Grupo Experimental	Peso (gramas)
WT + PLA	23±1
WT + LOS	23±1
WT + CAPT	23±2
<i>Fbn1</i> <sup>mgΔ/+</sup> + PLA	24±2
<i>Fbn1</i> <sup>mgΔ/+</sup> + LOS	23±1
<i>Fbn1</i> <sup>mgΔ/+</sup> + CAPT	23±1

Os resultados estão expressos em médias ± DP. WT + PLA: selvagem + placebo; WT + LST: selvagem + losartan 30mg; WT + CAPT: selvagem + captopril 30mg; *Fbn1*<sup>mgΔ/+</sup> + PLA: deficiente em fibrilina-1 + placebo; *Fbn1*<sup>mgΔ/+</sup> + LST: deficiente em fibrilina-1 + losartan 30mg; *Fbn1*<sup>mgΔ/+</sup> + CAPT: deficiente em fibrilina-1+ captopril 30mg. Não foi observada diferença significativa entre os grupos.

### 3.3. Genotipagem dos animais

A ponta da cauda do camundongo foi cortada para extração do DNA e colocada em eppendorf autoclavado, com 600µl de tampão TNES (tris 10mM; NaCl 125mM; EDTA 10mM e SDS 0,5%, pH 8,0) e 3µl de proteinase K (20mg/ml), incubada a 55°C por 16h. Em seguida, foi acrescentado 3µl de RNase A (4mg/ml) e incubada a 37°C por 30 minutos. Foi colocado 200µl de NaCl 5M e a solução foi centrifugada (eppendorf centrifuge 5810R) a 15000xg por 10 minutos a 25°C. O sobrenadante foi transferido para um eppendorf com 600µl de álcool isopropílico e centrifugada a 15000xg por 10 minutos a 25°C. O sobrenadante foi descartado e, logo, adicionou-se 600µl de etanol 70% no pellet e centrifugado a 15000xg por 10 minutos a 25°C. Finalmente, foi descartado o sobrenadante e o pellet formado foi ressuspenso com tampão TE (tris 10mM e EDTA 0,1mM, pH 8,0). Em seguida, foi realizada a reação de PCR com Ready to go beads seguindo as instruções do fabricante (GE HealthCare UK). Foram utilizados os seguintes *primers*: NeoF (5' – GAGGCTATTCGGCTATGACT – 3') e NeoR (5' – CTCTTCGTCCAGATCATCCT – 3') (IDT, Technology) nas concentrações finais de 10,0µmol/L em tampão TE com 2µL do DNA *template* e *MasterMix* (GE Healthcare UK). O programa dos ciclos para o termo ciclador (Agilent Technologies) foi: etapa 1 (1 ciclo: 94°C – 2 minutos e 30 segundos), etapa 2 (29 ciclos: 94°C – 30s, 60°C – 1 minuto, 72°C – 1 minuto) e etapa 3 (1 ciclo: 72°C – 7 minutos, 4°C∞) com duração de 2 horas. Depois, a corrida foi feita em gel de agarose 0,75% com brometo de etídio e analisado em um fotodocumentador (GE Healthcare) por meio do software Image Quant 150.

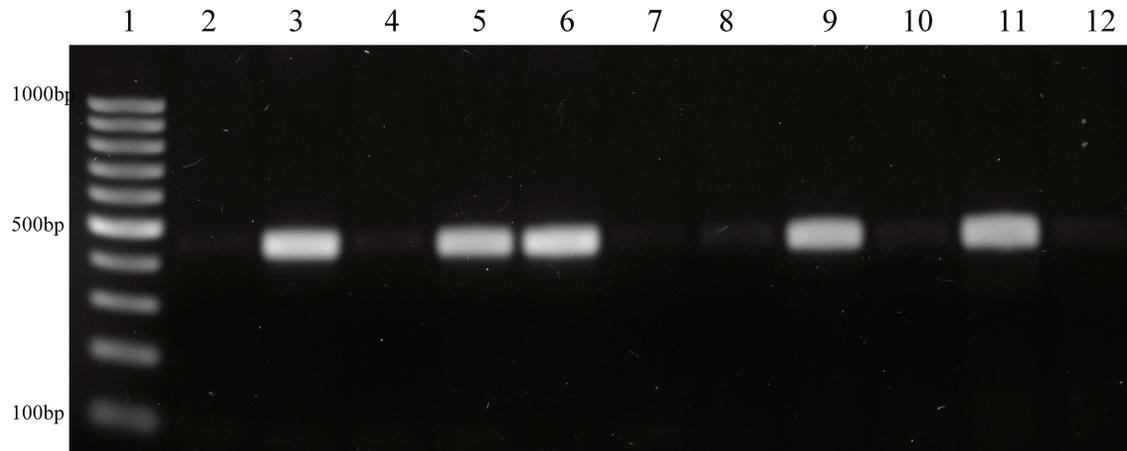


Figura 3.2. Genotipagem de camundongos. As bandas claras indicam animais heterozigotos positivos para o gene *Fbn1*<sup>mgΔ/+</sup>, que corresponde as canaletas 3,5,6 e 9; 1- padrão de peso molecular com 100 pares de bases; 11- controle positivo e 12 - controle negativo.

#### 3.4. Tratamento com fármacos

Os animais foram tratados por quatro semanas com losartan (Sigma Aldrich, St Louis-USA) (30mg/kg/dia), captopril (Sigma Aldrich, St Louis-USA) (30mg/kg/dia) ou placebo (água filtrada/kg/dia), os quais foram administrados via gavagem.

#### 3.5. Aferição da pressão arterial dos animais

Um grupo de quatro animais foi posicionado no aparelho de plestismografia (Kent Scientific, Connecticut-USA), em seguida, suas caudas foram colocadas no esfingomanômetro, a fim de aferir a pressão sanguínea. Para aferição utilizou-se seis animais para cada grupo. Além disso, camundongos também foram anestesiados com os cloretos de ketamina (10% - 100mg/kg de peso) e de xilazina (2% - 16mg/kg de peso) e, em seguida, foi novamente aferida a pressão e para cada grupo utilizou-se seis animais. Abaixo, na figura 3.1, está demonstrado o aparelho de plestismografia utilizado para aferição da pressão sanguínea.

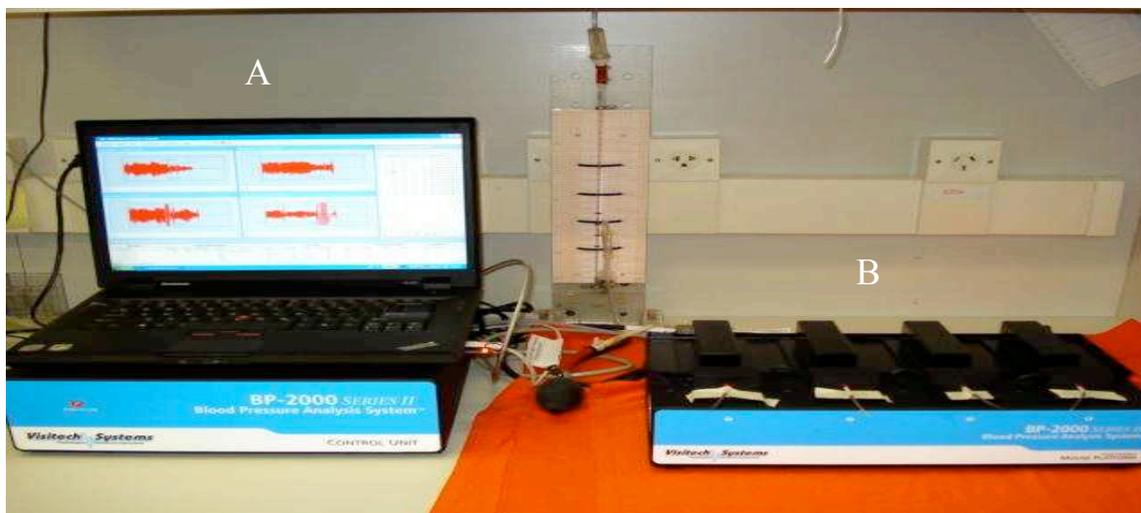


Figura 3.3. Imagem do aparelho de plestismografia. A) plataforma de controle e em cima o notebook com o software para aferição da pressão sanguínea e B) plataforma aquecida onde os camundongos ficam posicionados com o esfignomanômetro preso na base caudal.

### 3.6. *Indução fotoquímica de trombos na artéria carótida*

Este procedimento foi realizado conforme descrito por (He et al. 2002), porém com algumas modificações. Os animais ( $n= 8-10$ ) foram anestesiados com os cloretos de ketamina (10% - 100mg/kg de peso) e de xilazina (2% - 16mg/kg de peso) injetado de forma intramuscular e foram colocados na posição supina. Em seguida, foi feita uma incisão na média cervical do lado direito, a fim de isolar a artéria carótida e posicionada a sonda (model 0.5 VB; Transonic Systems, Ithaca, NY). Na veia caudal do animal, foi injetada uma solução de rosa de Bengala (Sigma Aldrich, St Louis-USA) com volume de 120 $\mu$ l com concentração de 50mg/kg que utilizou uma agulha de 29-gauge. Após tal procedimento, foi aplicado um laser verde a 1.5mW com 540nm (Melles Griot, Carlsbad, CA), posicionado a uma distância de 6cm da incisão. O laser permaneceu ligado até a formação do trombo, onde o fluxo foi monitorado por uma sonda de ultrassom (Transonic

Syztem Inc TS420), conforme demonstrado na figura abaixo. O processo de trombose após a injeção de rosa de Bengala está relacionado com a formação de espécies reativas de oxigênio a partir da estimulação do corante pela luz do laser, que levam à lesão do endotélio (He et al. 2002).

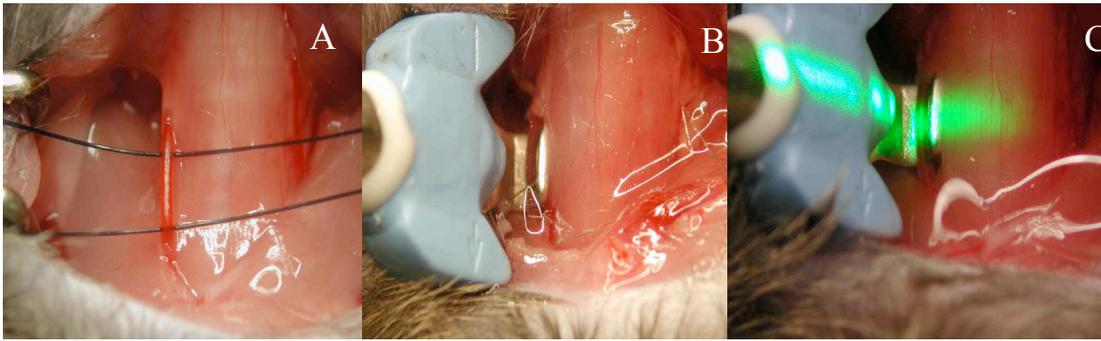


Figura 3.4. Imagem da indução fotoquímica de trombo na artéria carótida direita de camundongo. A) Isolamento do vaso; B) Posicionamento da ultra-sonda e C) Aplicação do laser 540nm.

### 3.7. Contagem de plaquetas

O sangue (n=5) foi coletado por punção cardíaca com seringa com solução de ACD, após os animais serem anestesiados com os cloridratos de ketamina (10% - 100mg/kg de peso) e de xilazina (2% - 16mg/kg de peso). O sangue coletado foi centrifugado a 150xg por 3 minutos a 25°C. Em seguida, foi coletado o plasma e a leitura foi realizada no equipamento Cell – Dyn 1600 da Abbott (Illinois-USA).

### 3.8. Ativação no tempo de trombolastina (TTPA)

O tempo de coagulação do plasma citratado (3,2%) foi determinado após o sangue (n =4) ser retirado da veia cava e centrifugado a 3000rpm por 15 minutos a 25°C. Em seguida, uma alíquota de 50µl de plasma foi pré aquecida a 37°C por 2 minutos e, depois foi adicionado 50µl de reagente TTPA CLOT e incubado a 37°C por 2 minutos. Finalmente,

a reação foi disparada assim que foi adicionado 50µl de cloreto de cálcio. Esta análise foi realizada em duplicata, por meio do Kit TTPA CLOT da CLOT diagnóstico e mensurado por meio do CLOTimer – Laser Sensor (Sorocaba-SP, Brazil).

### *3.9. Ativação no tempo de protrombina (TP)*

O tempo de coagulação do plasma citratado (3,2%) foi analisado após o sangue (n =4) ser retirado da veia cava e centrifugado a 3000rpm por 15 minutos a 25°C. Logo, uma alíquota de 50µl de plasma foi pré aquecida a 37°C por 2 minutos e, em seguida, em um tubo limpo, foi acrescentado 100µl do reagente TP CLOT e foi incubado por 4 minutos a 37°C. Para finalizar, foi adicionado 50µl de plasma, disparando a reação. Tal experimento foi realizado em duplicata, por meio do Kit TP CLOT da CLOT diagnóstico e mensurado por meio do CLOTimer – Laser Sensor (Sorocaba-SP, Brazil).

### *3.10. Ativação no tempo de trombina (TT)*

Foi determinado o tempo de trombina no plasma citratado (3,2%), após o sangue (n = 3) ser retirado da veia cava e centrifugado a 1500xg por 15 minutos a 25°C incubado. Depois, uma alíquota de 50µl de plasma foi pré aquecida a 37°C por 1 minuto e, em seguida, foi adicionado 100µl de reagente de trombina, que já estava pré aquecido a 37°C e foi disparada a reação. Esse procedimento foi realizado em duplicata, por meio do Kit TESTE THROMBIN da SIEMENS (Marburg, Germany) e foi mensurado por meio do CLOTimer – Laser Sensor (Sorocaba-SP, Brazil).

### 3.11. *Quantificação de TGF- $\beta$ plasmáticos*

O sangue (n = 4) foi coletado pela veia cava com seringa com solução de EDTA (10%) com a proporção de 1:9 (volume/volume). Logo após, submetido à centrifugação 1000xg por 20 minutos; o plasma obtido foi centrifugado a 10000xg por 10 minutos e congelado a -20°C. A análise foi realizada a partir do kit ELISA (R&D Systems, Minneapolis-USA). Uma alíquota de 40 $\mu$ l do plasma foi ativada com 10  $\mu$ l de HCL 1N por 10 minutos, em seguida, neutralizada com 8 $\mu$ l da solução de NaOH 1,2N / HEPES 0,5M, e diluída em diluente de calibração na concentração de 1:60. A placa de ELISA foi sensibilizada com anticorpo primário, na qual foi adicionado 50 $\mu$ l do diluente RD1-73 e 50 $\mu$ l do padrão, controle ou amostra ativada em cada poço. Posteriormente, a placa foi coberta e incubada por 2 horas em temperatura ambiente. Após a incubação, lavada com auxílio de um aparelho automático (Multiwash II, Tricontinent scientific - USA) com tampão de lavagem por 4 vezes; 100 $\mu$ l do TGF- $\beta$  conjugado foi adicionado a cada poço e, novamente, incubada por 2 horas. Em seguida, a placa foi lavada por 4 vezes com tampão de lavagem, foi adicionado 100 $\mu$ l de solução de substrato e protegida da luz e incubada por 30 minutos. Finalmente, foi adicionado 100 $\mu$ l de solução *Stop* em cada poço e realizada a leitura no comprimento de onda de 450nm (com correção fixada em 540nm ou 570nm). A leitura foi realizada no aparelho Synergy<sup>TM</sup> H1 Hybrid Reader, Biotek, Winooski-USA) e analisada no software: Gen5<sup>TM</sup>

### *3.12. Ensaio de agregação plaquetária*

O sangue (n = 4-6) foi coletado pela veia cava com seringa citratada (3,2%) com a proporção de 1:9 (volume/volume) e centrifugado 100xg por 15 minutos, a fim de se obter o plasma rico em plaquetas (PRP). Em seguida, o PRP foi coletado e adicionado 1mL de tampão de lavagem (NaCl 140mM; KCl 0,5mM; citrato trissódico 12mM; glicose 10mM; sacarose 12,5mM, pH 6) e centrifugado 800xg por 12 minutos. O sobrenadante foi descartado, o pellet obtido foi ressuspensionado com solução de Krebs (NaCl 118mM; NaHCO<sub>3</sub> 25mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM; MgSO<sub>4</sub> 1,7mM; glicose 5,6mM, pH 7,4). O número de plaquetas foi ajustado para  $1,2 \times 10^8$  plaquetas/mL na presença de CaCl<sub>2</sub> 1mM. Em seguida, 400µL de suspensão de plaquetas foram adicionadas na cuveta e desafiadas com dois agonistas ADP 50µmol/mL e 20 µmol/mL e trombina 0,1uU/mL e 0,05uU/mL. A leitura foi realizada no aparelho Chrono-log, Kordia Life Sciences, (Leiden-Netherlands) e utilizado o programa Aggrolink Software (Chrono-log).

### *3.13. Ensaio de adesão plaquetária espontânea.*

O sangue (n = 4-6) foi coletado pela veia cava com seringa citratada (3,2%) com a proporção de 1:9 (volume/volume) e centrifugado 100xg por 15 minutos, a fim de se obter o plasma rico em plaquetas (PRP). Em seguida, o PRP foi coletado e adicionado 1mL de tampão de lavagem (NaCl 140mM; KCl 0,5mM; citrato trissódico 12mM; glicose 10mM; sacarose 12,5mM, pH 6) e centrifugado 800xg por 12 minutos. O sobrenadante foi descartado, o pellet obtido ressuspensionado com solução de Krebs (NaCl 118mM; NaHCO<sub>3</sub> 25mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM; MgSO<sub>4</sub> 1,7mM; glicose 5,6mM, pH 7,4). O número de plaquetas foi ajustado para  $1,2 \times 10^8$  plaquetas/mL na presença de CaCl<sub>2</sub> 1mM.

O ensaio de adesão plaquetária foi realizado conforme descrito por Bellavite et al. Uma placa de 96 poços foi incubada com 50µL de fibrinogênio humano (50mg/mL) durante 12 horas a 4°C. Em seguida, a placa foi lavada com solução de Krebs por duas vezes e bloqueada com 1% de BSA por 1 hora a 37°C. Depois, foi novamente lavada com solução de Krebs e permaneceu em temperatura ambiente durante 30 minutos a fim de secar. Em seguida, 50 µL da suspensão de plaquetas foi adicionada nos poços 30 minutos a 37°C. Logo, a placa foi lavada por duas vezes com 200µL de solução de Krebs a fim de remover qualquer plaqueta que não aderiu. A mensuração da adesão plaquetária foi realizada mediante a atividade da fosfatase ácida. Por fim, 150µL de solução de substrato de fosfatase ácida foi adicionada nos poços (tampão de citrato 0,1M, pH 5,4; p-nitrofenil fosfato 5mM e Triton X-100 0,1%) e permaneceu incubada por 1 hora à temperatura ambiente. Depois, a reação foi finalizada pela adição de 100µL de NaOH 2M, que resultou na coloração da placa; em seguida, foi realizada a leitura no comprimento de onda de 405nm. A leitura foi realizada no aparelho Synergy™ H1 Hybrid Reader, Biotek, Winooski-USA) e analisada no software: Gen5™.

### 3.14 Análise morfológica da carótida direita após a indução fotoquímica do trombo em animais selvagens e dos deficientes em *fibrilina-1* por meio de microscopia de luz.

A artéria carótida direita (n = 3-4) foi fixada com paraformaldeído 4% e 0,5% de glutaraldeído (Merck, Darmstadt, Alemanha) em 0,1 M de PBS (pH 7,4) durante 24 horas a 4°C. Em seguida, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool, embutidos em historesina (Leica Microsystems Heidelberg, Alemanha) e seccionadas transversalmente com uma largura de 2µm. Logo, as seções resultantes de

série foram montados em lâminas e coradas com Giemsa. As seções foram examinadas pela Nikon Eclipse E800 microscópio de luz (ampliação original 60x).

### *3.15. Análise morfológica das plaquetas de animais selvagens e dos deficientes em fibrilina-1 por meio de microscopia eletrônica de transmissão.*

Esta análise foi realizada conforme descrito por White (White 2002), porém com algumas modificações. O sangue (n = 3-4) foi coletado em seringa citratada (3,2%) por meio da veia cava e centrifugado a 2300xg por 10 segundos a 25°C para obter o plasma rico em plaquetas (PRP), em seguida, o PRP foi coletado e centrifugado por 1 minuto a 25°C a fim de obter o plasma pobre em plaquetas (PPP). O PPP foi fixado com glutaraldeído 0,5% por 10 minutos a 37°C. Depois, foi centrifugado a 800xg por 1 minuto e o sobrenadante foi descartado, o pellet obtido foi fixado com glutaraldeído 3% por 2 horas em temperatura ambiente. O sobrenadante foi novamente descartado e o pellet foi lavado com tampão e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1%, por 1 h a 4°C. Em seguida, foram desidratados com álcool etílico em concentrações crescentes e pré-embebidos em mistura de óxido de propileno e em resina Epon na proporção de 1:1, 3:1, durante 2 h e, depois, embebidos em resina Epon 100% *overnight*. As amostras foram incluídas em resina e mantidas em estufa a 57°C, durante 72 h. Posteriormente, foram feitos cortes semi-finos (1µm) do material e corados, a quente, com solução de 0,5% de Azul de Toluidina. Além disso, foram feitos cortes ultrafinos (70nm), a fim de estudar a morfologia da área de interesse. Estes cortes foram fotografados em microscópio eletrônico de transmissão (LEO 906-Zeiss) (ampliação original 27800x), no Laboratório de Microscopia Eletrônica (LME) do Instituto de Biologia – Unicamp.

### *3.16. Análise morfológica dos trombos obtidos de animais selvagens e dos deficientes em fibrilina-1 por meio de microscopia de varredura.*

Os trombos (n = 4) foram obtidos por meio do ensaio fotoquímico e fixados em solução de glutaraldeído 2,5%, tampão cacodilato 1M e ácido tânico 0,3% por 12 horas. Em seguida, eles foram colocados em solução de sacarose de ordem crescente, cada etapa com duração de 12 horas (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3M). Foi realizada uma criofratura no material em nitrogênio líquido e, posteriormente, o material foi pós-fixado em tetróxido de ósmio 1% por 1 hora e lavado por 3 vezes em água destilada. Após esta lavagem, o material foi desidratado com etanol em ordem crescente (50, 70, 80, 95 e 100%). O material foi seco em ponto crítico (CPD 030, Balzers) e banhado com ouro no sputter coat (SCD 050, Balzers). As imagens foram realizadas no aparelho de microscopia eletrônica de varredura (ISM 5800 LV, JEOL).

### *3.17. Zimografia in situ*

Artéria aorta (n = 4) foi coletada, embebida em O.C.T. (Tissue-Tek Optimal Cutting temperature Compound, Torrance-USA) e armazenada no biofreezer à -80°C. Em seguida, foram feitos cortes longitudinais de 8- $\mu$ m de espessura em criostato e circuladas com caneta. Foi preparado 1mg/mL de DQ-gelatina (Invitrogen) com solução tampão de reação de gelatinase (CaCl<sub>2</sub> 10mM, ZnCl<sub>2</sub> 1mM, Tris 50mM, pH 7,6). Logo, foi adicionado 20 $\mu$ l DQ-gelatina na lâmina, a qual foi e incubada à 37°C em câmara escura úmida por 2 horas e meia e lavada 3 vezes com PBS. Posteriormente, os cortes foram examinados por microscopia de fluorescência (Observer Z.1, Zeiss, Oberkochen, Germany) na magnitude de 400x (AxioVision 4.8 software). A atividade proteolítica foi

detectada como uma luz verde fluorescente e quantificada por meio do programa ImageJ (National Institutes of Health).

#### **4. Análise estatística**

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

# **RESULTADOS**

---

## 5. Resultados

Para obtermos os dados referentes à trombose arterial - nosso principal modelo - nós utilizamos animais com 5 semanas de idade, fase na qual os camundongos têm aproximadamente  $25 \pm 2$ g de peso corporal, tamanho essencial para o tipo de sonda de ultrassom usada na medição do fluxo sanguíneo, bem como para a quantidade e tipo de anestésico utilizado. Como os camundongos homozigotos para a mutação genética em questão, não sobrevivem por tanto tempo, utilizamos os camundongos heterozigotos ( $Fbn1^{mg/+}$ ). Esta mutação consiste na substituição dos éxons 19-24 da fibrilina-1 por um cassete de resistência à neomicina, o que leva a uma diminuição dos conteúdos de fibrilina-1 na matriz extracelular. Esta molécula, além da sua importante contribuição estrutural, formando a rede de microfibrilas, essencial para a formação da fibra elástica madura, ela também parece estar envolvida na regulação de fatores de crescimento como TGF- $\beta$  e BMP.

Atualmente, acredita-se que os sinais clínicos observados na Síndrome de Marfan em humanos e em modelos de camundongos sejam explicados por uma excessiva ativação do fator de crescimento TGF- $\beta$ . Este fator é sintetizado e secretado na sua forma latente, sendo assim, depositado na matriz extracelular. A rede de microfibrilas formada, dentre outros componentes, pela fibrilina-1, parece ser importante, neste processo de mantê-lo inativo até o momento propício para sua ativação. Na presença de quantidades diminuídas desta molécula, há, aparentemente, uma super-ativação deste fator, que fica mais suscetível à ativação por proteases, por exemplo. Esta super-ativação pode ser revertida ou evitada, por exemplo, utilizando losartan, droga anti-hipertensiva que leva à diminuição dos níveis de TGF- $\beta$  ativo e a uma diminuição nos sinais clínicos, devido,

possivelmente, à inibição do receptor AT1 de angiotensina II (Brooke et al. 2008b; Habashi et al. 2006; Robinson et al. 2006).

Diante desse quadro, os camundongos heterozigotos foram previamente identificados, então, submetidos ao ensaio de trombose arterial. Os dados obtidos neste experimento são apresentados na figura 5.1, na qual se observa que os animais deficientes em fibrilina-1 ( $Fbn1^{mg\Delta/+}$ ) necessitam de aproximadamente  $120\pm 21,07$  minutos para terem a artéria carótida ocluída pelo trombo formado, enquanto este tempo foi de  $58\pm 7,16$  minutos nos animais selvagens. Estes dados sugerem que, direta ou indiretamente, a fibrilina-1 toma parte neste processo.

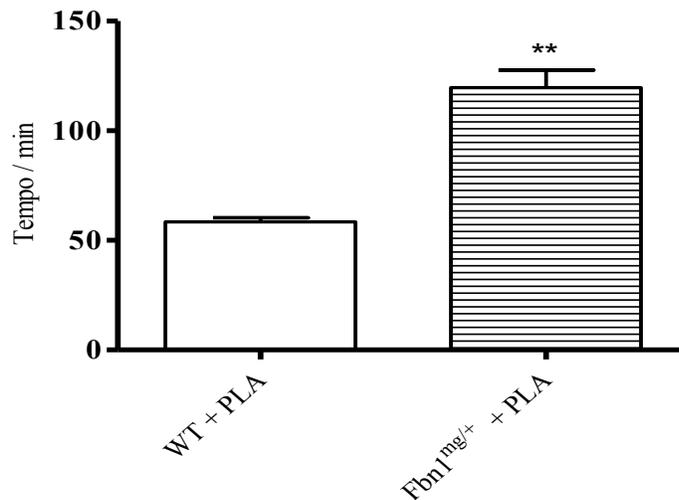


Figura 5.1. Resultado do tempo de oclusão trombótica após a indução fotoquímica de trombo na artéria carótida direita de camundongos selvagens e de  $Fbn1^{mg\Delta/+}$ . WT + PLA: selvagem + placebo e  $Fbn1^{mg\Delta/+}$  + PLA: deficiente em fibrilina-1 + placebo. Os resultados estão expressos em médias  $\pm$  DP. No gráfico, o símbolo \*\* representa diferença significativa entre os diferentes grupos,  $p < 0,0001$ .

Considerando a importância atribuída a esta molécula na regulação da atividade de TGF- $\beta$  e que plaquetas, quando ativadas durante o processo de formação de trombos, secretam para o meio o TGF- $\beta$  - estocado em seus grânulos – gerou o questionamento se ele pudesse ser importante na trombogênese, alterando o tempo de formação de trombo, como encontrado nos animais deficientes em fibrilina-1. Considerando ainda os trabalhos recentes da literatura, que utilizam o losartan como um atenuador da atividade deste fator de crescimento, utilizamos o tratamento com esta droga, com o intuito de verificar a sua possível participação na formação de trombos. Os camundongos foram tratados por 4 semanas com losartan por meio de doses diárias de 30 mg/kg de peso por gavagem e, em seguida, foram submetidos ao ensaio de trombose arterial.

Os dados obtidos do ensaio de trombose estão apresentados na figura 5.2 e 5.3. Como pode ser observado, o tempo de formação de trombo nos camundongos tratados com losartan ( $51 \pm 11,36$  minutos) foi reduzido, principalmente o dos animais deficientes em fibrilina-1, que passaram a apresentar o mesmo tempo de formação de trombos dos animais selvagens. O tratamento não teve atividade tão evidente nos animais selvagens ( $WT+LST = 61 \pm 19,01$  minutos). A atividade farmacológica conhecida do losartan é a de inibir os receptores AT1 de angiotensina II, que no caso de hipertensão arterial é desejável. Uma das consequências desta inibição é a diminuição da expressão de TGF- $\beta$  e de trombospondina-1, molécula responsável por ativar TGF- $\beta$  dos complexos latentes (Cohn et al. 2007; Habashi et al. 2006; Uchida et al. 2008). Para verificar se uma diminuição nos níveis de angiotensina II levaria aos mesmos resultados em relação à formação de trombos, os animais foram tratados com captopril, inibidor da enzima conversora de angiotensina I (ECA). Como pode ser observado na figura 5.2 e 5.3, a

diminuição do tempo de formação de trombos também foi obtida com o tratamento com esta droga, onde novamente, o efeito foi mais evidente nos animais deficientes em fibrilina-1 ( $Fbn1^{mg\Delta/+} + CAPT = 39 \pm 13$  minutos;  $WT + CAPT = 51 \pm 15,62$  minutos), sugerindo que uma diminuição nos níveis de angiotensina II promove o mesmo resultado do que a inibição dos receptores AT1, ocasionada pelo losartan. É importante ressaltar que, na literatura, o tratamento com estas drogas é citado como antitrombótico, principalmente por diminuir os níveis de angiotensina II ou de sua ação, com os tratamentos de captopril e losartan, respectivamente.

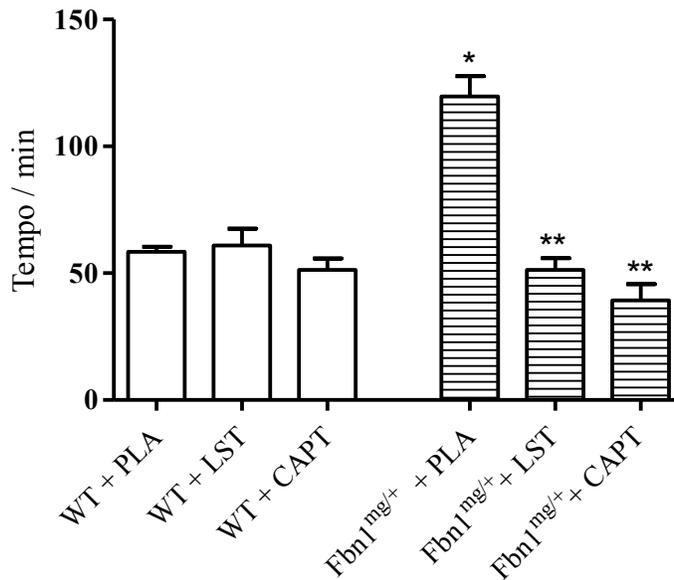


Figura 5.2. Resultado do tempo de oclusão trombótica após a indução fotoquímica de trombo na artéria carótida direita de camundongos selvagens e de  $Fbn1^{mg\Delta/+}$ , ambos os grupos foram tratados com losartan e captopril. WT + PLA: selvagem + placebo; WT + LST: selvagem + losartan 30mg; WT + CAPT: selvagem + captopril 30mg;  $Fbn1^{mg\Delta/+} + PLA$ : deficiente em fibrilina-1 + placebo;  $Fbn1^{mg\Delta/+} + LST$ : deficiente em fibrilina-1 + losartan 30mg e  $Fbn1^{mg\Delta/+} + CAPT$ : deficiente em fibrilina-1 + captopril 30mg. Os resultados estão expressos em médias  $\pm$  DP, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,0001$ .

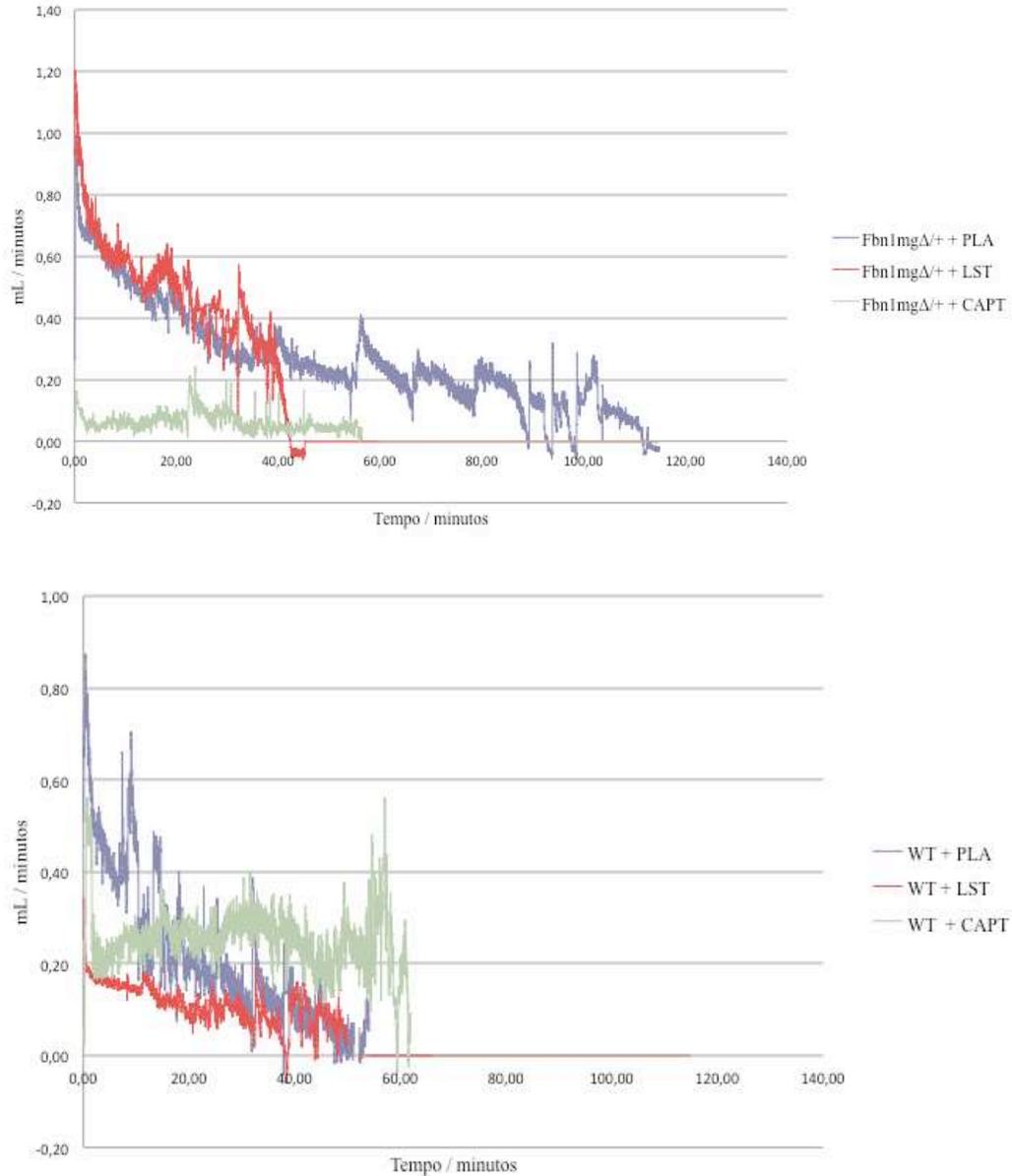


Figura 5.3. Imagem gráfica do tempo de oclusão trombótica após a indução fotoquímica de trombo na artéria carótida direita de camundongos selvagens e de *Fbn1<sup>mgΔ/+</sup>*, ambos os grupos foram tratados com losartan e captopril. WT + PLA: selvagem + placebo; WT + LST: selvagem + losartan 30mg; WT + CAPT: selvagem + captopril 30mg; *Fbn1<sup>mgΔ/+</sup>* + PLA: deficiente em fibrilina-1 + placebo; *Fbn1<sup>mgΔ/+</sup>* + LST: deficiente em fibrilina-1 + losartan 30mg e *Fbn1<sup>mgΔ/+</sup>* + CAPT: deficiente em fibrilina-1+ captopril 30mg.

Um outro questionamento que surgiu foi se o efeito de recuperação do losartan e do captopril era específico para camundongos com deficiência em fibrilina-1, já que o efeito sobre camundongos selvagens era muito pequeno. Para isto, camundongos deficientes em uma outra molécula componente da rede de microfibrilas, a MAGP-1 (glicoproteína associada a microfibrila-1), os quais também apresentam o tempo de formação de trombos maior do que o de animais selvagens; foram tratados com losartan com diferentes doses e captopril, então ensaiados no modelo de trombose. Assim como visto para os camundongos deficientes em fibrilina-1, o tempo de formação de trombos foi diminuído, além de ser dose dependente, como pode ser visto na figura 5.4.

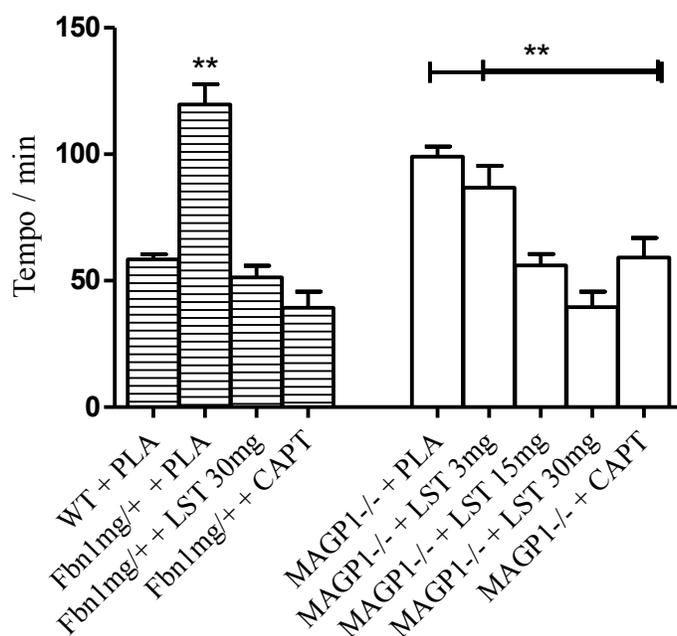


Figura 5.4. Resultado do tempo de oclusão trombótica após a indução fotoquímica de trombo na artéria carótida direita de camundongos *Fbn1*<sup>mg $\Delta$ /+</sup> e de MAGP1, ambos os grupos foram tratados com losartan e captopril. WT + PLA: camundongo selvagem + placebo; *Fbn1*<sup>mg $\Delta$ /+</sup> + PLA: deficiente em fibrilina-1 + placebo; *Fbn1*<sup>mg $\Delta$ /+</sup> + LST: deficiente em fibrilina-1 + losartan 30mg; *Fbn1*<sup>mg $\Delta$ /+</sup> + CAPT: deficiente em fibrilina-1+ captopril 30mg; MAGP1<sup>-/-</sup> + PLA: camundongos deficientes em MAGP1+ placebo; MAGP1<sup>-/-</sup> + LST 3mg: camundongos deficientes em MAGP1 + losartan 3mg; MAGP1<sup>-/-</sup> + LST 15mg: camundongos deficientes em MAGP1 + losartan15mg; MAGP1<sup>-/-</sup> + LST 30mg: camundongos deficientes em MAGP1 + losartan30mg e MAGP1<sup>-/-</sup> + CAPT: camundongos deficientes em MAGP1 + captopril30mg. Os resultados estão expressos em médias  $\pm$  DP. No gráfico, o símbolo \*\* representa diferença significativa no mesmo grupo de animais, mas com diferentes tratamentos, \*\* $P < 0,0001$ .

De acordo com o trabalho de Werneck e colaboradores (Werneck et al. 2008), a injeção de MAGP-1 recombinante em camundongos nulos para MAGP-1 (MAGP-1<sup>-/-</sup>) resultou em recuperação do tempo de formação de trombo. Esse resultado despertou o nosso interesse em verificar como o camundongo deficiente em fibrilina-1 responderia ao modelo de formação de trombo quando fosse injetado MAGP-1 na veia caudal.

Logo, verificamos que os animais deficientes em fibrilina-1 quando foram submetidos à indução do trombo e com prévia injeção de 50µg/kg de peso corporal de MAGP-1 recombinante, houve uma recuperação no tempo de formação do trombo ( $Fbn1^{mg\Delta/+} + \text{MAGP-1} = 69 \pm 19,65$ ;  $Fbn1^{mg\Delta/+} = 120 \pm 21,07$ ). Tal efeito também foi observado com animais deficientes em MAGP-1 ( $\text{MAGP1}^{-/-} + \text{MAGP-1} = 58 \pm 10,07$ ;  $\text{MAGP1}^{-/-} = 99 \pm 18,07$ ) e, não foi observado nenhuma alteração quando injetado nos animais selvagens ( $\text{WT} + \text{MAGP-1} = 58 \pm 10,07$ ;  $\text{WT} = 58 \pm 7,16$ ), conforme demonstrado na figura 5.5. Estes dados indicam, portanto, que a MAGP-1 exerce um papel na formação do trombo nestes dois modelos de animais geneticamente modificados.

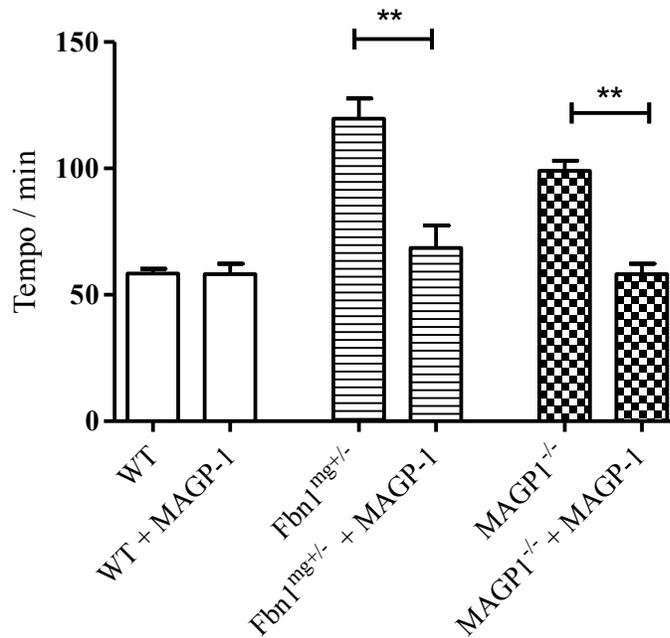


Figura 5.5. Resultado do tempo de oclusão trombótica após a indução fotoquímica de trombo na artéria carótida direita de camundongos selvagens e de *Fbn1*<sup>mgΔ/+</sup> após a injeção de 50μg/mL de MAGP-1 na veia caudal do animal. WT: selvagem; WT + MAGP-1: selvagem + 50μg/mL de MAGP-1; *Fbn1*<sup>mgΔ/+</sup>: deficiente em fibrilina-1; *Fbn1*<sup>mgΔ/+</sup> + MAGP-1: deficiente em fibrilina-1 + 50μg/mL de MAGP-1; MAGP1<sup>-/-</sup>: camundongos deficientes em MAGP1; MAGP1<sup>-/-</sup> + MAGP-1: camundongos deficientes em MAGP1 + 50μg/mL de MAGP-1. Os resultados estão expressos em médias ± DP. No gráfico, o símbolo \*\* representa diferença significativa no mesmo grupo de animais, mas com diferentes tratamentos, p < 0,0001.

Uma outra possibilidade levada em consideração foi a de que, em função do tratamento com as drogas anti-hipertensivas, a pressão arterial destes animais poderiam ser alteradas e, conseqüentemente, termos uma resposta a esta alteração. Para verificar isto, os animais tiveram a pressão arterial aferida e os dados obtidos foram apresentados na tabela 5.1. Como pode ser observado, todos os camundongos são normotensos, descartando esta possibilidade.

Ademais, a pressão de todos os grupos de animais foi aferida com os camundongos anestesiados, pois é assim que eles permanecem no decorrer da cirurgia. Logo, observou-se que todos os animais são normotensos, embora tenha havido bradicardia em todos os grupos, conforme tabela 5.1. Tal experimento foi realizado com os animais anestesiados, pois na literatura relata que uma hipotensão pode acarretar na ativação da cascata de coagulação, mas este fato só foi constatado em vasos venosos (Kakar and Lip 2007).

Tabela 5.1. Parâmetros hemodinâmicos.

<b>Grupo experimental</b>	<b>Sistólica mmHg</b>	<b>Sistólica mmHg ANES</b>	<b>Diastólica mmHg</b>	<b>Diastólica mmHg ANES</b>	<b>Bat. / min.</b>	<b>Bat. / min. ANES</b>
WT + PLA	105±9,47	87±1,41	72±7,11	54±0,71	586±41,23	242±6,36
WT + LST	102±5,02	94±6,02	69±4,89	71±9,64	579±49,22	266±17,95
WT + CAPT	100±3,01	82±5,55	69±5,59	62±7,45	591±28,68	265±14,15
<i>Fbn1</i> <sup>mgΔ/+</sup> + PLA	106±3,16	80±12,71	70±3,86	59±7,94	604±48,56	234±1,71
<i>Fbn1</i> <sup>mgΔ/+</sup> + LST	106±6,90	96±14,68	73±3,19	67±7,27	570±33,45	263±16,03
<i>Fbn1</i> <sup>mgΔ/+</sup> + CAPT	107±8,85	88±11,62	72±6,24	63±12,42	598±68,59	223±12,69

Os resultados estão expressos em médias ± DP. WT + PLA: selvagem + placebo; WT + LST: selvagem + losartan 30mg; WT + CAPT: selvagem + captopril 30mg; *Fbn1*<sup>mgΔ/+</sup> + PLA: deficiente em fibrilina-1 + placebo; *Fbn1*<sup>mgΔ/+</sup> + LST: deficiente em fibrilina-1 + losartan 30mg; *Fbn1*<sup>mgΔ/+</sup> + CAPT: deficiente em fibrilina-1+ captopril 30mg. Bat. / min. = batimentos / minutos e ANES = anestesiado. Não foi observada diferença significativa entre os grupos.

Para verificar se os componentes da cascata de coagulação estão funcionando de forma apropriada, foram considerados os testes de tempo de tromboplastina parcial (TTPA), que avalia a via intrínseca e comum, o tempo de protrombina (TP), que avalia a via extrínseca e comum e, por fim, o tempo de trombina que avalia os níveis de fibrinogênio no plasma. Os resultados estão apresentados na tabela 5.2. De uma maneira

geral, observa-se que os valores são bem próximos para os parâmetros analisados nos diferentes grupos, em que resultou em não diferença estatística.

Adicionalmente, foi realizada contagem de plaquetas, a fim de verificar se há variação em relação a sua quantidade nos diferentes grupos, e se este parâmetro poderia ser uma explicação para o tempo aumentado no tempo de formação do trombo nos animais  $Fbn1^{mg\Delta/+}$ . Como pode ser constatado na tabela 5.2, não foi observada diferença significativa entre os diferentes grupos de animais estudados.

Tabela 5.2. Resultados da análise dos testes de coagulação sanguínea e contagem do número de plaquetas.

<b>Grupo experimental</b>	<b>Tempo de tromboplastina (TTPA) (s)</b>	<b>Tempo de protrombina (TP) (s)</b>	<b>Tempo de trombina (TT) (s)</b>	<b>Número de plaquetas X 10<sup>9</sup>/mL</b>
WT + PLA	39 ± 2,98	20 ± 0,87	13 ± 1,07	667 ± 146,44
WT + LST	37 ± 4,57	20 ± 1,28	14 ± 0,92	631 ± 70,90
WT + CAPT	33 ± 3,07	16 ± 1,13	14 ± 0,10	573±101,57
$Fbn1^{mg\Delta/+}$ + PLA	42 ± 2,42	18 ± 3,43	14 ± 0,37	609±100,48
$Fbn1^{mg\Delta/+}$ + LST	38 ± 5,77	18 ± 1,11	14 ± 0,08	624±120,77
$Fbn1^{mg\Delta/+}$ + CAPT	44 ± 2,90	20 ± 1,94	15 ± 1,33	667±79,58

Os resultados estão expressos em médias ± DP. WT + PLA: selvagem + placebo; WT + LST: selvagem + losartan 30mg; WT + CAPT: selvagem + captopril 30mg;  $Fbn1^{mg\Delta/+}$  + PLA: deficiente em fibrilina-1 + placebo;  $Fbn1^{mg\Delta/+}$  + LST: deficiente em fibrilina-1 + losartan 30mg;  $Fbn1^{mg\Delta/+}$  + CAPT: deficiente em fibrilina-1+ captopril 30mg. (s) = segundos. Não foi observada diferença significativa entre os grupos.

Além disso, foi realizado testes de agregação e adesão plaquetária a fim de verificar se há algum problema funcional nestas plaquetas, as quais seriam responsáveis pelo aumento no tempo de formação do trombo nos animais deficientes em fibrilina-1.

Porém, foi observado que não há diferença significativa na agregação plaquetária quando induzidos com dois agonistas trombina 100 uU/mL e trombina 50 uU/mL e, ADP 50  $\mu\text{mol/mL}$  e ADP 20  $\mu\text{mol/mL}$ . Em relação à adesão plaquetária espontânea, também não foi observada diferença significativa entre os animais  $Fbn1^{\text{mg}\Delta/+}$  em comparação aos animais selvagens, conforme demonstrado nas figuras 5.6, 5.7 e 5.8, respectivamente.

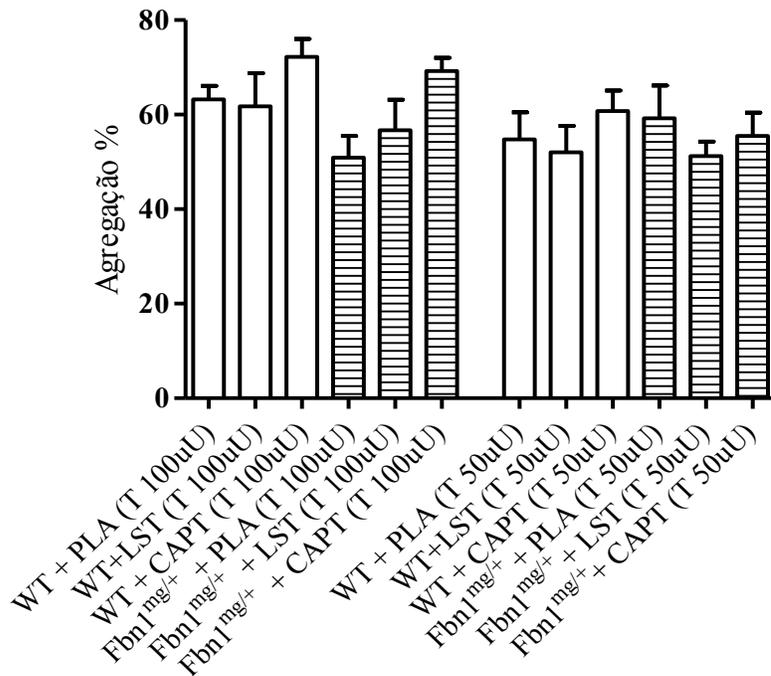


Figura 5.6. Resultado do teste de agregação plaquetária induzida pelos agonista trombina (100uU/mL e 50uU/mL). Plaquetas lavadas ( $1.2 \times 10^8$  plaquetas/mL) foram desafiadas com o agonista trombina. WT + PLA: selvagem + placebo; WT + LST: selvagem + losartan 30mg; WT + CAPT: selvagem + captopril 30mg;  $Fbn1^{\text{mg}\Delta/+}$  + PLA: deficiente em fibrilina-1 + placebo;  $Fbn1^{\text{mg}\Delta/+}$  + LST: deficiente em fibrilina-1 + losartan 30mg e  $Fbn1^{\text{mg}\Delta/+}$  + CAPT: deficiente em fibrilina-1+ captopril 30mg. Os resultados estão expressos em médias  $\pm$  DP. Não foi observada diferença significativa entre os grupos.

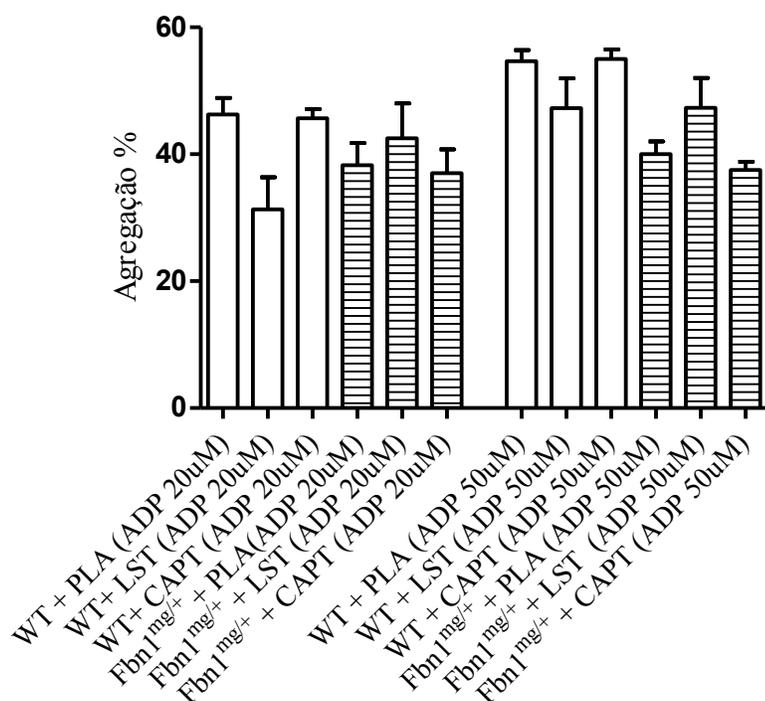


Figura 5.7. Resultado do teste de agregação plaquetária induzida pelos agonista ADP (20 $\mu$ mol/mL e 50 $\mu$ mol/mL). Plaquetas lavadas ( $1.2 \times 10^8$  plaquetas/mL) foram desafiadas com o agonista ADP. WT + PLA: selvagem + placebo; WT + LST: selvagem + losartan 30mg; WT + CAPT: selvagem + captopril 30mg; *Fbn1*<sup>mg $\Delta$ /+</sup> + PLA: deficiente em fibrilina-1 + placebo; *Fbn1*<sup>mg $\Delta$ /+</sup> + LST: deficiente em fibrilina-1 + losartan 30mg e *Fbn1*<sup>mg $\Delta$ /+</sup> + CAPT: deficiente em fibrilina-1+ captopril 30mg. Os resultados estão expressos em médias  $\pm$  DP. Não foi observada diferença significativa entre os grupos.

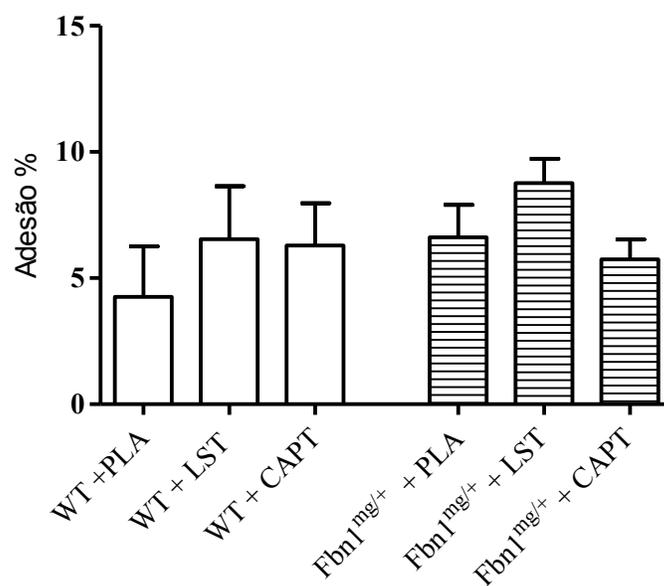


Figura 5.8. Resultados da análise do teste adesão plaquetária espontânea. Plaquetas lavadas ( $1.2 \times 10^8$  plaquetas/mL) foram incubadas em placa com  $50 \mu\text{L}$  de fibrinogênio. WT + PLA: selvagem + placebo; WT + LST: selvagem + losartan 30mg; WT + CAPT: selvagem + captopril 30mg; *Fbn1*<sup>mgΔ/+</sup> + PLA: deficiente em fibrilina-1 + placebo; *Fbn1*<sup>mgΔ/+</sup> + LST: deficiente em fibrilina-1 + losartan 30mg e *Fbn1*<sup>mgΔ/+</sup> + CAPT: deficiente em fibrilina-1+ captopril 30mg. Os resultados estão expressos em médias  $\pm$  DP. Não foi observada diferença significativa entre os grupos.

Outro ponto analisado foi a morfologia das plaquetas (Figura 5.9) e dos trombos (Figura 5.10), nos animais deficientes em fibrilina-1. Mas, de acordo com as imagens, não houve diferença tanto na morfologia plaquetária como na estrutura dos trombos em todos os grupos de animais.

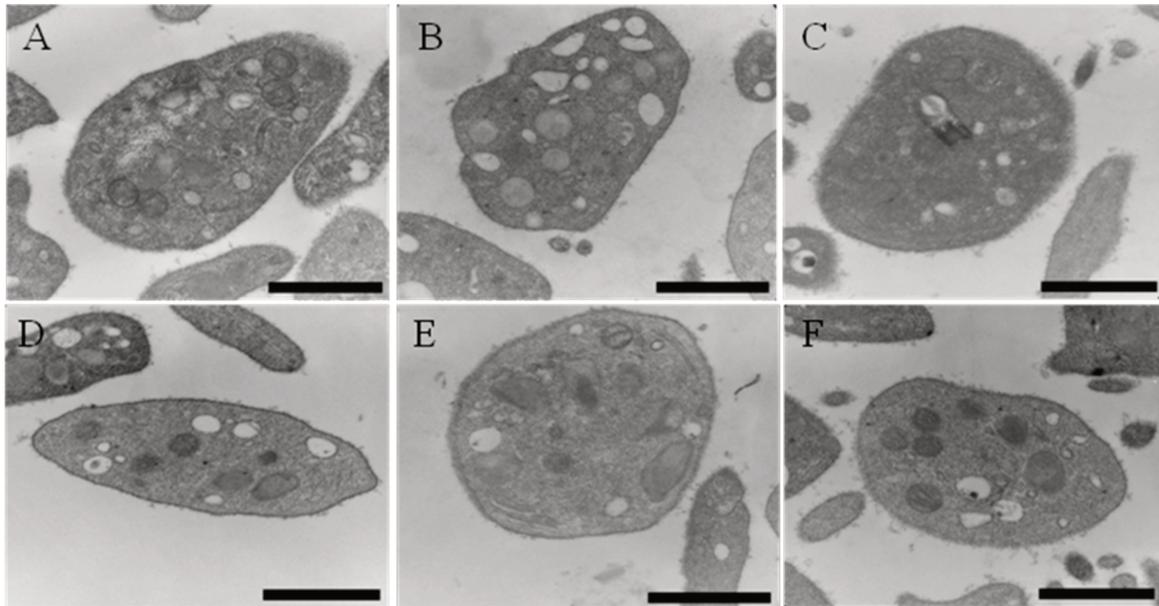


Figura 5.9. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de plaquetas de animais selvagens e *Fbn1*<sup>mgΔ/+</sup>. (A) WT + PLA: selvagem + placebo; (B) WT + LST: selvagem + losartan 30mg; (C) WT + CAPT: selvagem + captopril 30mg; (D) *Fbn1*<sup>mgΔ/+</sup> + PLA: deficiente em fibrilina-1 + placebo; (E) *Fbn1*<sup>mgΔ/+</sup> + LST: deficiente em fibrilina-1 + losartan 30mg; (F) *Fbn1*<sup>mgΔ/+</sup> + CAPT: deficiente em fibrilina-1+ captopril 30mg. (ampliação original 27800x)

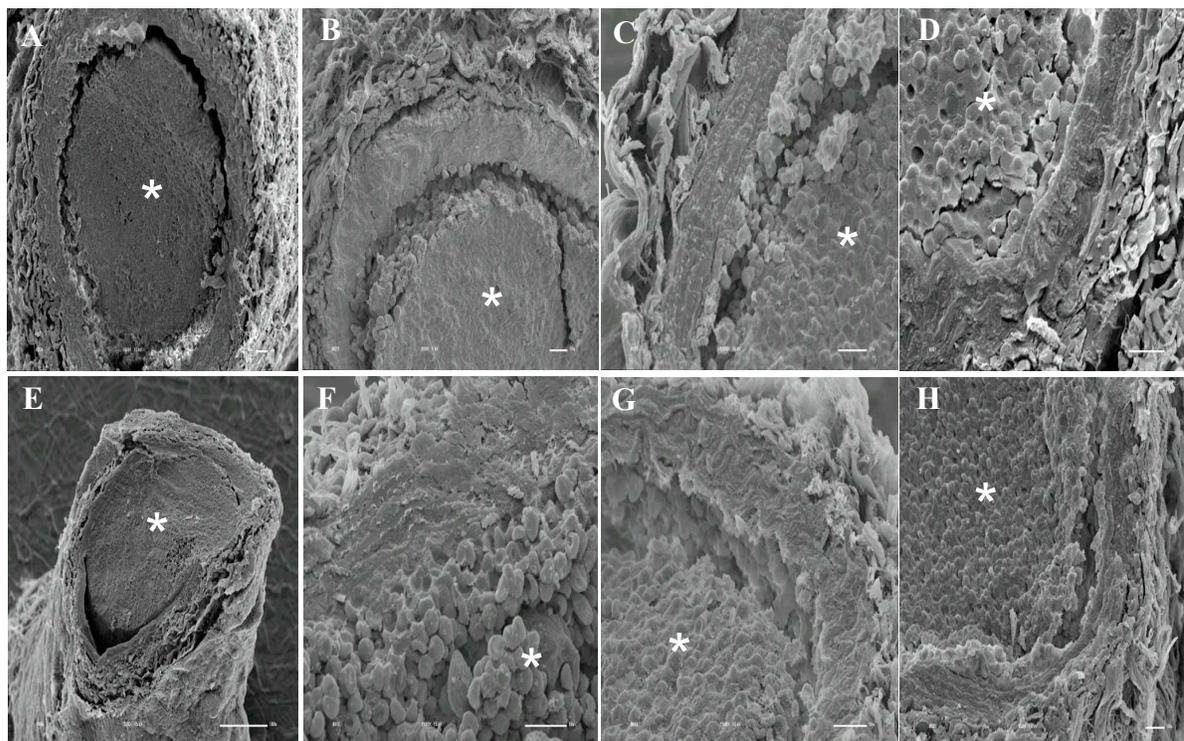


Figura 5.10. Imagens de microscopia de varredura de trombo de animais selvagens e *Fbn1*<sup>mgΔ/+</sup>. No gráfico, os asteriscos representam os trombos. (A) WT: selvagem; (B) WT + PLA: selvagem + placebo; (C) WT + LST: selvagem + losartan 30mg; (D) WT + CAPT: selvagem + captopril 30mg; (E) *Fbn1*<sup>mgΔ/+</sup>: deficiente em fibrilina-1; (F) *Fbn1*<sup>mgΔ/+</sup> + PLA: deficiente em fibrilina-1 + placebo; (G) *Fbn1*<sup>mgΔ/+</sup> + LST: deficiente em fibrilina-1 + losartan 30mg; (H) *Fbn1*<sup>mgΔ/+</sup> + CAPT: deficiente em fibrilina-1 + captopril 30mg. (ampliação original em A 550x; E 270X; B,C,D,F,G e H 1300X).

A fim de verificar se o tempo aumentado de formação do trombo está relacionado com a estrutura das fibras elásticas, foi analisada a morfologia dessas fibras na estrutura da parede da carótida (Figura 5.11). Mas, de acordo com as imagens, não foram observadas diferenças na estrutura das fibras elásticas na parede da carótida.

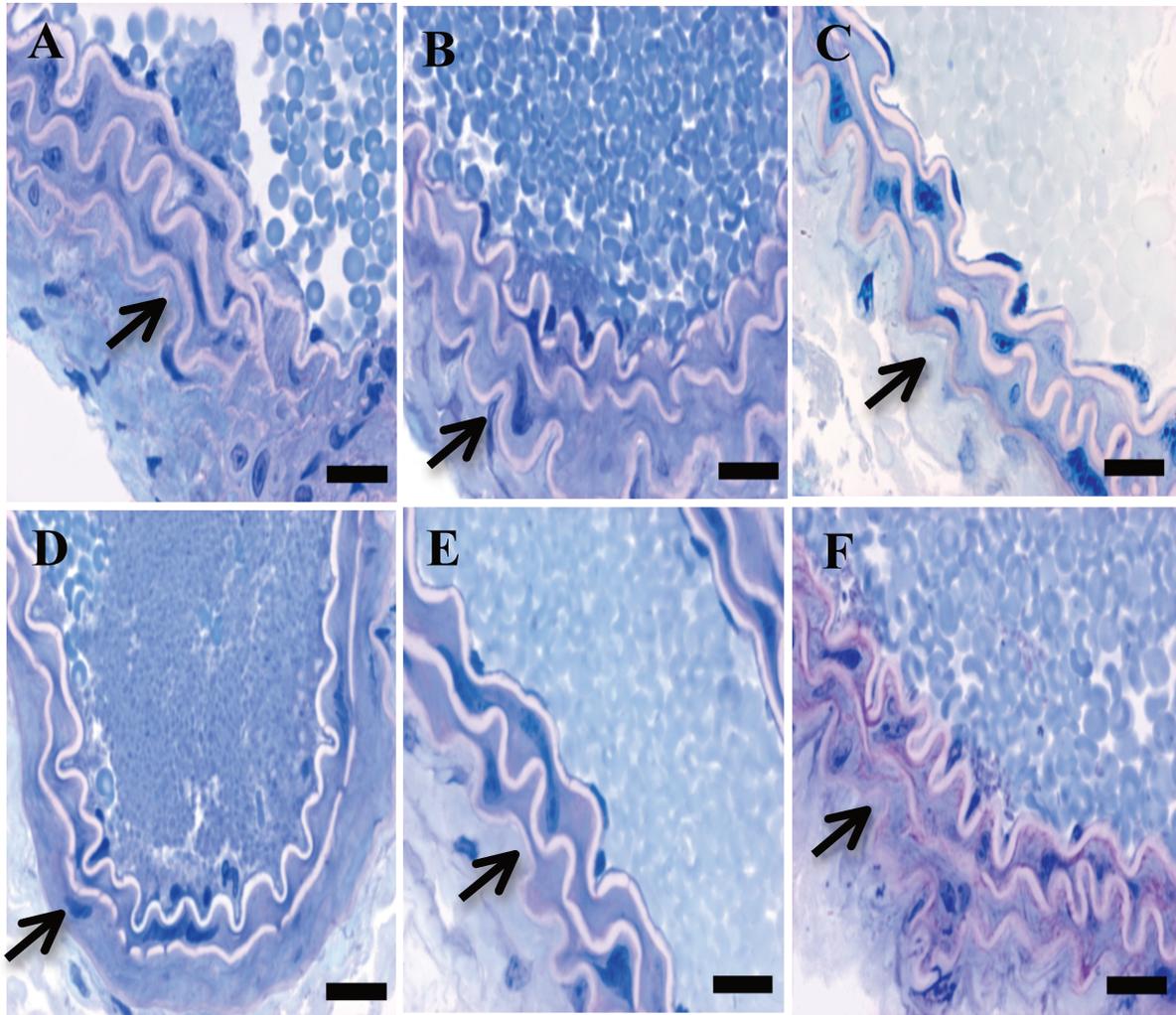


Figura 5.11. Imagens de microscopia de luz da carótida esquerda após a indução fotoquímica do trombo de animais selvagens e *Fbn1*<sup>mgΔ/+</sup>. No gráfico, as setas representam as fibras elásticas. (A) WT + PLA: selvagem + placebo; (B) WT + LST: selvagem + losartan 30mg; (C) WT + CAPT: selvagem + captopril 30mg; (D) *Fbn1*<sup>mgΔ/+</sup> + PLA: deficiente em fibrilina-1 + placebo; (E) *Fbn1*<sup>mgΔ/+</sup> + LST: deficiente em fibrilina-1 + losartan 30mg; (F) *Fbn1*<sup>mgΔ/+</sup> + CAPT: deficiente em fibrilina-1+ captopril 30mg. (ampliação original 60x).

Considerando que o tratamento com o losartan diminui os níveis de TGF-β ativo e que modelos da síndrome de Marfan deveriam levar a um aumento dos níveis deste fator de crescimento (Habashi et al. 2006), análises para a quantificação de TGF-β ativos e

totais (figura 5.12) nos plasmas dos camundongos tratados com placebo ou com as drogas foram realizadas. Os níveis de TGF- $\beta$  totais e ativos. Observou-se diferença significativa nos animais *Fbn1*<sup>mg $\Delta$ /+</sup>+PLA em comparação com WT+PLA; além disso, quando os animais *Fbn1*<sup>mg $\Delta$ /+</sup> foram tratados com os anti-hipertensivos, não houve diminuição nos níveis de TGF- $\beta$  ativo.

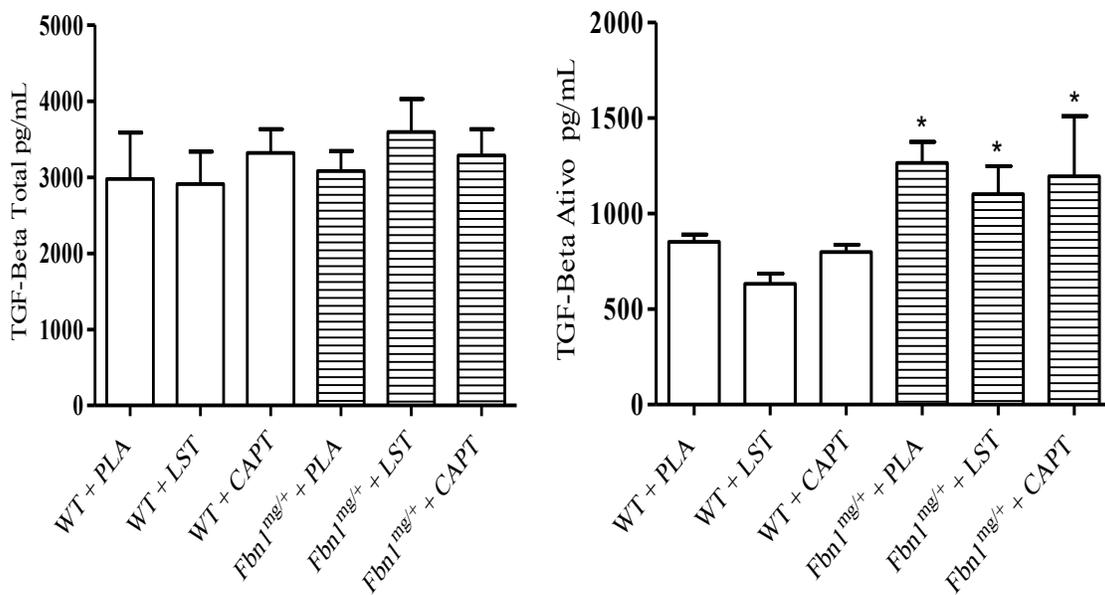
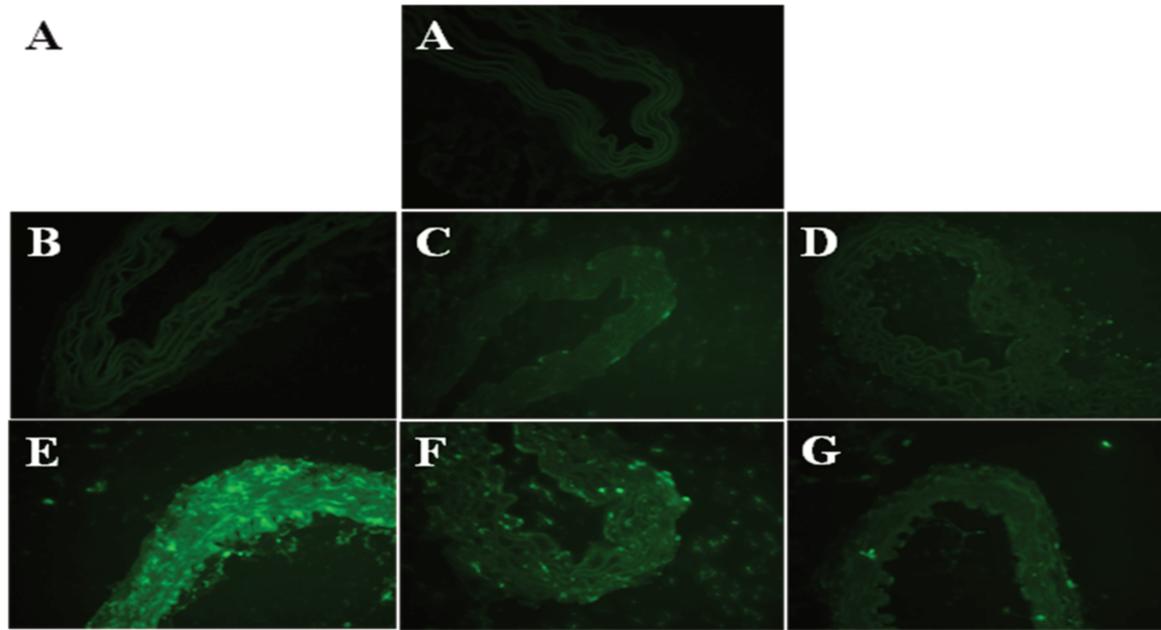


Figura 5.12. **A.** Resultados dos níveis de TGF- $\beta$  totais no plasma de camundongos selvagens e de *Fbn1*<sup>mg $\Delta$ /+</sup>. **B.** Comparação dos níveis de TGF- $\beta$  ativos no plasma de camundongos selvagens e de *Fbn1*<sup>mg $\Delta$ /+</sup>. WT + PLA: selvagem + placebo; WT + LST: selvagem + losartan 30mg; WT + CAPT: selvagem + captopril 30mg; *Fbn1*<sup>mg $\Delta$ /+</sup> + PLA: deficiente em fibrilina-1 + placebo; *Fbn1*<sup>mg $\Delta$ /+</sup> + LST: deficiente em fibrilina-1 + losartan 30mg; e *Fbn1*<sup>mg $\Delta$ /+</sup> + CAPT: deficiente em fibrilina-1+ captopril 30mg. Os resultados estão expressos em médias  $\pm$  DP. Não foi observada diferença significativa entre os grupos nos níveis de TGF- $\beta$  totais. Em B \*  $P < 0,05$ .

Os níveis aumentados de TGF- $\beta$ , nos levou a verificar a atividade das metaloproteinases, pois recentemente foi descrito na literatura que o aumento da sua atividade está relacionado a um aumento na sinalização por TGF- $\beta$  (Xiong et al. 2012). Foi observado que nos animais *Fbn1*<sup>mg $\Delta$ /+</sup> +PLA (12 $\pm$ 4,61) apresentam uma atividade maior de metaloproteinases em comparação com todos os outros grupos, inclusive com os animais deficientes em fibrilina-1 que foram tratados com losartan e captopril, em que foi observada uma diminuição na sua atividade, conforme demonstrado na figura 5.13.



**B**

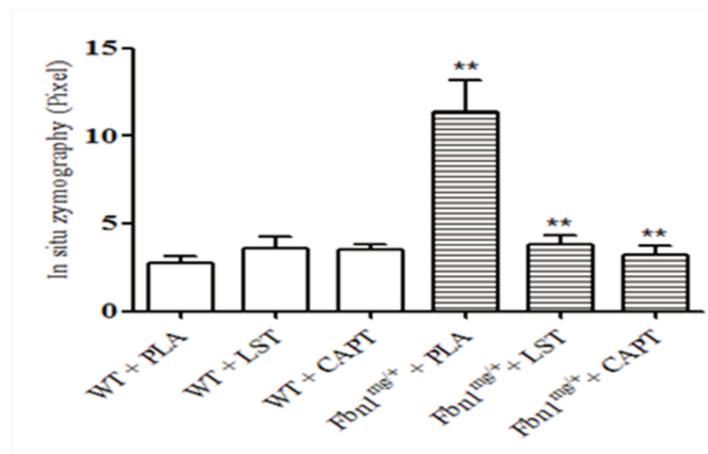


Figure 5.13. **A.** Imagem in situ da atividade de degradação de gelatina da artéria de animais selvagens e *Fbn1*<sup>mgΔ/+</sup>. **B.** Semi quantificação da atividade das gelatinases, que reflete a atividade gelatinolítica da MMP. **A.** (A) Padrão (B) WT + PLA: selvagem + placebo; (C) WT + LST: selvagem + losartan 30mg; (D) WT + CAPT: selvagem + captopril 30mg; (E) *Fbn1*<sup>mgΔ/+</sup> + PLA: deficiente em fibrilina-1 + placebo; (F) *Fbn1*<sup>mgΔ/+</sup> + LST: deficiente em fibrilina-1 + losartan 30mg; (G) *Fbn1*<sup>mgΔ/+</sup> + CAPT: deficiente em fibrilina-1+ captopril 30mg. **A.** ampliação original 400x. Os resultados estão expressos em médias ± DP. No gráfico, o símbolo \* representa diferença significativa no mesmo grupo de animais, mas com diferentes tratamentos, \*\**P* < 0,0001.

# **DISCUSSÃO**

---

## 6. Discussão

A fibrilina-1 é o maior componente das microfibrilas, a qual confere sustentação aos tecidos. As fibras elásticas são organizadas em tecidos específicos e estão dispostas de acordo com as exigências mecânicas dos órgãos, como na pele, pulmão e grandes vasos (Charbonneau et al. 2003). Podem ocorrer inúmeras mutações nos genes das fibrilinas que resultam em patologia. Estas mutações estão relacionadas à síndrome de Marfan, caracterizada por uma desordem no tecido conjuntivo que afeta, principalmente, o sistema esquelético, cardiovascular e ocular (Dietz et al. 1991; Dietz and Pyeritz 1995; Pyeritz 2000). Entre as manifestações clínicas, o aneurisma aórtico destaca-se como o mais severo. Sendo assim, a maioria dos pacientes são tratados com beta bloqueadores, com intuito de diminuir a frequência cardíaca e o stress na aorta (Murdoch et al. 1972).

Atualmente, acredita-se que a maioria dos seus sintomas esteja relacionada a uma hiper-ativação do fator TGF- $\beta$ , efeito este observado em camundongos modelo para síndrome de Marfan que, ao serem tratados com losartan, apresentam uma melhora significativa nos sinais clínicos (Brooke et al. 2008a; Dietz et al. 1991; Habashi et al. 2006).

Além disso, a rede de microfibrila, rica em fibrilina, são importantes suportes para a adesão e agregação de plaquetas, demonstrando ter função trombogênica em condições dinâmicas *in vitro* (Ross et al. 1998a) sugerindo sua participação na hemostase. Devido à importância destas proteínas, fibrilina-1, para a formação da fibra elástica, e a uma diminuição na sua produção que acarreta na desorganização do tecido conjuntivo, foi de nosso interesse estudar o efeito desta proteína no modelo de trombose arterial. Sendo assim, utilizamos animais *Fbn1*<sup>mg $\Delta$ /+</sup> heterozigotos, que embora apresentem uma

diminuição de 10 vezes na produção de fibrilina-1, aparentemente, apresentam um desenvolvimento normal. Em relação aos animais homozigotos, estes morrem na primeira semana de vida, em decorrência de complicações vasculares similares a portadores da síndrome de Marfan (Pereira et al. 1997a).

Pela primeira vez, foi demonstrado por nós que animais deficientes em fibrilina-1 necessitam do dobro do tempo para formarem trombo, quando comparados a animais selvagens. De acordo com dados da literatura, que demonstram que mulheres grávidas portadoras da síndrome de Marfan apresentam hemorragia após o parto, em que, possivelmente, apresentam alguma alteração para formação de trombo (Rahman et al. 2003).

Todos os dados apresentados até aqui demonstram que o tratamento com estas drogas favorece a formação de trombos que se encontra alterada na deficiência de fibrilina-1. Os dados apresentados na literatura foram obtidos, na maioria das vezes, em modelos de hipertensão arterial, uma condição conhecidamente trombogênica, e, quando tratados os animais com as drogas anti-hipertensivas, passam a apresentar um menor risco de desenvolver trombose, pela diminuição da pressão arterial, mas tal mecanismo não está totalmente esclarecido (Leu et al. 2004; Schwieler et al. 2013). Os animais deficientes em fibrilina-1 não são hipertensos, muito embora a hipertensão esteja associada à Síndrome de Marfan em humanos (Jeppesen et al. 2012).

A utilização do tratamento com bloqueadores de receptores AT1 de angiotensina II tem demonstrado ser eficaz em reverter ou bloquear o aparecimento dos sinais clínicos da síndrome de Marfan em camundongos deficientes em fibrilina-1 (Brooke et al. 2008b; Habashi et al. 2006; Yang et al. 2009) ou ainda, no caso específico de tratamento com

ramipril, inibidor da enzima conversora de angiotensina, em aumentar a expressão de moléculas relacionadas à formação da fibra elástica, tais como fibrilina-1 e elastina, e em inibir a expressão de metaloproteinases relacionadas com a degradação da fibra elástica, como MMP-2 e 3 em cultura de células (Ahimastos et al. 2005).

Estes mesmos efeitos podem ser importantes em nosso modelo de trombose. Ao considerarmos o tratamento crônico dos camundongos normotensos com as referidas drogas - losartan e captopril – elas poderão atuar na maior deposição dos componentes formadores das fibras elásticas, corrigindo possíveis alterações impostas pela diminuição das moléculas em questão, na matriz extracelular destes animais.

Dados do nosso laboratório, ainda não publicados, demonstraram uma redução na deposição de fibrilina-2, MAGP-1 e tropoelastina, na matriz extracelular em culturas de células primárias de fibroblastos de derme de animais deficientes em fibrilina-1, conforme demonstrado, respectivamente, nas figuras 10.1, 10.2 e 10.3 (anexo II). Adicionalmente, foi verificado que, quando esta cultura de fibroblastos, proveniente de animais deficientes em fibrilina-1, foram tratadas com o fármaco losartan, resultou em um aumento na deposição das proteínas da matriz extracelular, no caso da tropoelastina e MAGP-1, conforme demonstrado, respectivamente, nas figuras 10.4 e 10.5 (anexo II).

Outro ponto que surgiu no decorrer deste projeto foi como o camundongo deficiente em fibrilina-1 responderia ao modelo de formação de trombo, quando fosse injetado MAGP-1 na veia caudal, componente presente na microfibrila, uma glicoproteína importante para formação das fibras elásticas. Foi observado que os animais *Fbn1*<sup>mgΔ/+</sup> recuperaram o tempo de formação do trombo. Este mesmo efeito foi observado quando o modelo de trombose arterial foi aplicado em camundongos

deficientes em MAGP-1<sup>-/-</sup>, molécula, aparentemente, sem função primordial durante o desenvolvimento de camundongos C57BL6, já que estes não apresentam nenhuma alteração fenotípica evidente, com tempo de vida e capacidade de reprodução normais. Neste experimento, os animais deficientes em MAGP-1<sup>-/-</sup> apresentaram tempo de oclusão maior quando comparados com os animais selvagens. Mediante técnicas bioquímicas, demonstrou-se que a MAGP-1 é capaz de ligar o fibrinogênio e o fator de von Willebrand, sugerindo, assim, um possível mecanismo de ação por meio da interação com estas moléculas (Werneck et al. 2008).

De acordo com dados da literatura, a MAGP-1 inibe a ligação da proteína ligante do complexo latente do TGF- $\beta$  (LTBP) à região N-terminal da fibrilina-1, que resulta na estimulação da fosforilação da SMAD2 e no aumento da atividade de TGF- $\beta$  em cultura de fibroblastos da derme humana (Massam-Wu et al. 2010). Ademais, foi observado em camundongos nulos para MAGP-1, que a falta desta glicoproteína poderia resultar em um aumento da ligação da microfibrila com o peptídeo associada à latência (LAP), que, por sua vez, resulta em uma diminuição da ativação de TGF- $\beta$  (Weinbaum et al. 2008b). Além disso, foi observado pelo grupo do Massam – Wu (Massam-Wu et al. 2010), que a deposição do peptídeo associada à latência (LAP) e da proteína ligante do complexo latente do TGF- $\beta$  (LTBP) é dependente da interação entre LTBP, heparan sulfato, fibrilina-1 e moléculas associadas às microfibrilas.

Ademais, está descrito na literatura que não há alterações na estrutura elástica em animais deficientes em MAGP-1, devido, possivelmente, à diminuição da expressão das MMPs, promovendo um efeito protetor à fibra elástica, como relatado por Huang e colaboradores (Huang et al. 1998). O aumento da expressão das moléculas que compõem

a fibra elástica poderia protegê-la da ação de metaloproteinases de matriz, mesmo na deficiência de fibrilina-1 ou na ausência de MAGP-1.

Trabalhos recentes demonstraram que a inibição de MMP pode também contribuir para efeito protetor na formação de aneurisma da aorta por inibição da degradação das fibras elásticas (Xiong et al. 2012; Yang et al. 2010). A fim de manter a estrutura destas, as MMP-2 desempenham um papel fundamental na síndrome de Marfan, cujo o aneurisma é o principal responsável por morte entre os portadores da síndrome de Marfan (Murdoch et al. 1972). As MMP-2 são produzidas por ambas estruturas, as células mesenquimais e as células musculares lisas, que estão presentes na camada média da aorta (Kadar et al. 1981). Além disso, as MMPs são capazes de clivagem TGF- $\beta$  do LAP (Ge and Greenspan 2006; Wang et al. 2006).

No presente estudo, mostrou-se que houve um aumento da atividade de metaloproteinases arterial de camundongos *Fbn1*<sup>mg $\Delta$ /+</sup> +PLA, quando comparados com todos os grupos, assim como observado pelo grupo do Xiong e do Yang (Xiong et al. 2012; Yang et al. 2010). Além disso, observou-se que, quando os animais foram tratados com um anti-hipertensivo, houve uma diminuição da atividade de MMP. Assim, possivelmente, ambas as drogas e a MMP interferem com a remodelação da matriz elástica, pois houve uma diminuição do tempo de formação do trombo. Ademais, observou-se que o TGF- $\beta$  não faz parte desta regulação, pois seus níveis não foram normalizados quando os animais *Fbn1*<sup>mg $\Delta$ /+</sup> foram tratados com as drogas anti-hipertensivas.

Além disso, dados obtidos em culturas de células primárias de fibroblastos de derme de animais deficientes em fibrilina-1 demonstraram um pequeno aumento (20%)

na expressão das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9, conforme demonstrado na figura 10.6 (anexo II). Estes resultados estão de acordo com a literatura, uma vez que ela defende que a perda do conteúdo protéico das fibras elásticas resulta em um desarranjo da trama microfibrilar na matriz extracelular, a qual fica mais susceptível a sofrer degradação pelas metaloproteinases (Chung et al. 2007) (Ikonomidis et al. 2006) (Yasmin et al. 2005).

De um modo geral, pode-se afirmar que a deficiência de fibrilina-1 na fibra elástica acarreta um tempo aumentado de formação do trombo. Ademais, pelos dados apresentados é possível sugerir que o aumento da atividade de metaloproteinases está relacionado com a deficiência de fibrilina-1, como vem sendo descrito na literatura (Habashi et al. 2006). Sendo assim, o tratamento com losartan provavelmente, está relacionado ao remodelamento ou há uma maior deposição dos componentes das fibras elásticas, assim como demonstrado por Braga e colaboradores (dados não publicados) em modelos de cultura de células. Esta maior deposição poderia, então, favorecer a formação de trombos no tempo de camundongos selvagens, por oferecer mais pontos de ancoragem do trombo junto a parede vascular. Isto, de certa forma, está de acordo com os dados obtidos por Werneck e colaboradores (Werneck et al. 2008) que fizeram a imunolocalização da Magp-1 recombinante injetada em camundongos nulos para Magp-1. Nestes experimentos foi possível verificar que a Magp-1 injetada se localiza, principalmente, na região de interface entre o trombo e a parede arterial, sugerindo que a sua capacidade em resgatar o tempo normal de formação de trombos nestes camundongos, pode estar relacionada a esta função estrutural de ancoragem. Adicionado a isto, verificamos que não há alteração na cascata de coagulação e na funcionalidade das

plaquetas sugerindo que a capacidade de formar o trombo está mantida, porém, durante a sua formação, repetidas vezes é embolizado, o que leva a um tempo aumentado para que o vaso em estudo seja ocluído. Mais uma vez, isto pode estar relacionado a uma diminuição dos sítios de ligação do trombo com a parede do vaso, ocasionada pela deficiência de fibrilina-1. Ademais, as vias de sinalização envolvidas neste processo ainda não estão esclarecidas e, portanto, serão objeto de estudos em nosso laboratório.

# CONCLUSÃO

---

## 7. Conclusão

Os resultados obtidos demonstraram que:

- O tratamento com losartan 30mg recupera o tempo normal de formação de trombo, assim como com o captopril 30mg;
- A cascata de coagulação funciona apropriadamente nestes animais, ou seja, a deficiência em fibrilina-1 não altera este parâmetro;
- O número de plaquetas não está alterado nos animais *Fbn1*<sup>mgΔ/+</sup>;
- Não foi observada alteração morfológica nas plaquetas dos animais *Fbn1*<sup>mgΔ/+</sup>, nem nas estruturas dos trombos;
- Não houve diferença na morfologia das fibras elásticas presente na carótida;
- Após a injeção de MAGP-1 recombinante nos animais *Fbn1*<sup>mgΔ/+</sup>, houve recuperação do tempo de formação do trombo;
- Os níveis de TGF-β ativos estão alterados nos animais *Fbn1*<sup>mgΔ/+</sup>, quando comparados com os animais selvagens;
- O tratamento com losartan não alterou os níveis de TGF-β ativos nos animais *Fbn1*<sup>mgΔ/+</sup>, nem quando estes animais foram tratados com captopril;
- Houve um aumento da atividade de MMP nos animais *Fbn1*<sup>mgΔ/+</sup>;
- O tratamento com os anti-hipertensivos, resultou em diminuição da atividade de MMP nos animais *Fbn1*<sup>mgΔ/+</sup>, em que, provavelmente, está relacionado há uma maior deposição dos componentes das fibras elásticas.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## 8. Referências Bibliográficas

- Ahimastos AA, Aggarwal A, D'Orsa KM, Formosa MF, White AJ, Savarirayan R, Dart AM, and Kingwell BA. 2007. Effect of perindopril on large artery stiffness and aortic root diameter in patients with Marfan syndrome: a randomized controlled trial. *Jama* 298(13):1539-1547.
- Ahimastos AA, Natoli AK, Lawler A, Blombery PA, and Kingwell BA. 2005. Ramipril reduces large-artery stiffness in peripheral arterial disease and promotes elastogenic remodeling in cell culture. *Hypertension* 45(6):1194-1199.
- Brooke BS, Habashi JP, Judge DP, Patel N, Loeys B, and Dietz HC, 3rd. 2008a. Angiotensin II blockade and aortic-root dilation in Marfan's syndrome. *N Engl J Med* 358(26):2787-2795.
- Bunton TE, Biery NJ, Myers L, Gayraud B, Ramirez F, and Dietz HC. 2001. Phenotypic alteration of vascular smooth muscle cells precedes elastolysis in a mouse model of Marfan syndrome. *Circ Res* 88(1):37-43.
- Carta L, Pereira L, Arteaga-Solis E, Lee-Arteaga SY, Lenart B, Starcher B, Merkel CA, Sukoyan M, Kerkis A, Hazeki N et al. . 2006. Fibrillins 1 and 2 perform partially overlapping functions during aortic development. *J Biol Chem* 281(12):8016-8023.
- Charbonneau NL, Dzamba BJ, Ono RN, Keene DR, Corson GM, Reinhardt DP, and Sakai LY. 2003. Fibrillins can co-assemble in fibrils, but fibrillin fibril composition displays cell-specific differences. *J Biol Chem* 278(4):2740-2749.
- Chung AW, Au Yeung K, Sandor GG, Judge DP, Dietz HC, and van Breemen C. 2007. Loss of elastic fiber integrity and reduction of vascular smooth muscle contraction resulting from the upregulated activities of matrix metalloproteinase-2 and -9 in the thoracic aortic aneurysm in Marfan syndrome. *Circ Res* 101(5):512-522.
- Cleary EG, Fanning JC, and Prosser I. 1981. Possible roles of microfibrils in elastogenesis. *Connect Tissue Res* 8(3-4):161-166.
- Cohn RD, van Erp C, Habashi JP, Soleimani AA, Klein EC, Lisi MT, Gamradt M, ap Rhys CM, Holm TM, Loeys BL et al. . 2007. Angiotensin II type 1 receptor blockade attenuates TGF-beta-induced failure of muscle regeneration in multiple myopathic states. *Nat Med* 13(2):204-210.
- Dallas SL, Keene DR, Bruder SP, Saharinen J, Sakai LY, Mundy GR, and Bonewald LF. 2000. Role of the latent transforming growth factor beta binding protein 1 in fibrillin-containing microfibrils in bone cells in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res* 15(1):68-81.
- Dietz HC, Cutting GR, Pyeritz RE, Maslen CL, Sakai LY, Corson GM, Puffenberger EG, Hamosh A, Nanthakumar EJ, Curristin SM et al. . 1991. Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene. *Nature* 352(6333):337-339.
- Dietz HC, McIntosh I, Sakai LY, Corson GM, Chalberg SC, Pyeritz RE, and Francomano CA. 1993. Four novel FBN1 mutations: Significance for mutant transcript level and EGF-like domain calcium binding in the pathogenesis of Marfan syndrome. *Genomics* 17:468-475.

- Dietz HC, and Pyeritz RE. 1995. Mutations in the human gene for fibrillin-1 (FBN1) in the Marfan syndrome and related disorders. *Hum Mol Genet* 4 Spec No:1799-1809.
- Ge G, and Greenspan DS. 2006. BMP1 controls TGFbeta1 activation via cleavage of latent TGFbeta-binding protein. *J Cell Biol* 175(1):111-120.
- 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(5770):117-121.
- Halliday D, Hutchinson S, Kettle S, Firth H, Wordsworth P, and Handford PA. 1999. Molecular analysis of eight mutations in FBN1. *Hum Genet* 105(6):587-597.
- He L, Vicente CP, Westrick RJ, Eitzman DT, and Tollefsen DM. 2002. Heparin cofactor II inhibits arterial thrombosis after endothelial injury. *J Clin Invest* 109(2):213-219.
- Hollister DW, Godfrey M, Sakai LY, and Pyeritz RE. 1990. Immunohistologic abnormalities of the microfibrillar-fiber system in the Marfan syndrome. *N Engl J Med* 323(3):152-159.
- Huang W, Alhenc Gelas F, and Osborne-Pellegrin MJ. 1998. Protection of the arterial internal elastic lamina by inhibition of the renin-angiotensin system in the rat. *Circ Res* 82(8):879-890.
- Ikonomidis JS, Jones JA, Barbour JR, Stroud RE, Clark LL, Kaplan BS, Zeeshan A, Bavaria JE, Gorman JH, 3rd, Spinale FG et al. . 2006. Expression of matrix metalloproteinases and endogenous inhibitors within ascending aortic aneurysms of patients with Marfan syndrome. *Circulation* 114(1 Suppl):I365-370.
- Isogai Z, Ono RN, Ushiro S, Keene DR, Chen Y, Mazzieri R, Charbonneau NL, Reinhardt DP, Rifkin DB, and Sakai LY. 2003. Latent transforming growth factor beta-binding protein 1 interacts with fibrillin and is a microfibril-associated protein. *J Biol Chem* 278(4):2750-2757.
- Jeppesen J, Berg ND, Torp-Pedersen C, Hansen TW, Linneberg A, and Fenger M. 2012. Fibrillin-1 genotype and risk of prevalent hypertension: a study in two independent populations. *Blood Press* 21(5):273-280.
- Judge DP, Biery NJ, Keene DR, Geubtner J, Myers L, Huso DL, Sakai LY, and Dietz HC. 2004. Evidence for a critical contribution of haploinsufficiency in the complex pathogenesis of Marfan syndrome. *J Clin Invest* 114(2):172-181.
- Judge DP, and Dietz HC. 2005. Marfan's syndrome. *Lancet* 366(9501):1965-1976.
- Judge DP, and Dietz HC. 2008. Therapy of Marfan syndrome. *Annu Rev Med* 59:43-59.
- Kadar A, Bihari-Varga M, and Csonka E. 1981. The synthesis, transport and excretion of connective tissue macromolecules by smooth muscle cells. *Connect Tissue Res* 8(3-4):175-180.
- Kakar P, and Lip GY. 2007. Hypertension: endothelial dysfunction, the prothrombotic state and antithrombotic therapy. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 5(3):441-450.
- Kielty CM, Sherratt MJ, Marson A, and Baldock C. 2005. Fibrillin microfibrils. *Adv Protein Chem* 70:405-436.
- Kielty CM, Sherratt MJ, and Shuttleworth CA. 2002a. Elastic fibres. *J Cell Sci* 115(Pt 14):2817-2828.

- Leu HB, Charng MJ, and Ding PY. 2004. A double blind randomized trial to compare the effects of eprosartan and enalapril on blood pressure, platelets, and endothelium function in patients with essential hypertension. *Jpn Heart J* 45(4):623-635.
- Lin G, Tiedemann K, Vollbrandt T, Peters H, Batge B, Brinckmann J, and Reinhardt DP. 2002. Homo- and heterotypic fibrillin-1 and -2 interactions constitute the basis for the assembly of microfibrils. *J Biol Chem* 277(52):50795-50804.
- Massam-Wu T, Chiu M, Choudhury R, Chaudhry SS, Baldwin AK, McGovern A, Baldock C, Shuttleworth CA, and Kielty CM. 2010. Assembly of fibrillin microfibrils governs extracellular deposition of latent TGF beta. *Journal of cell science* 123(Pt 17):3006-3018.
- McKusick VA. 1991. The defect in Marfan syndrome. *Nature* 352(6333):279-281.
- Murdoch JL, Walker BA, Halpern BL, Kuzma JW, and McKusick VA. 1972. Life expectancy and causes of death in the Marfan syndrome. *N Engl J Med* 286(15):804-808.
- Neptune ER, Frischmeyer PA, Arking DE, Myers L, Bunton TE, Gayraud B, Ramirez F, Sakai LY, and Dietz HC. 2003. Dysregulation of TGF-beta activation contributes to pathogenesis in Marfan syndrome. *Nat Genet* 33(3):407-411.
- Nijbroek G, Sood S, McIntosh I, Francomano CA, Bull E, Pereira L, Ramirez F, Pyeritz RE, and Dietz HC. 1995. Fifteen novel FBN1 mutations causing Marfan syndrome detected by heteroduplex analysis of genomic amplicons. *Am J Hum Genet* 57(1):8-21.
- O'Neill EE, Brock CJ, von Kriegsheim AF, Pearce AC, Dwek RA, Watson SP, and Hebestreit HF. 2002. Towards complete analysis of the platelet proteome. *Proteomics* 2(3):288-305.
- Page-McCaw A, Ewald AJ, and Werb Z. 2007. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(3):221-233.
- Pereira L, Andrikopoulos K, Tian J, Lee SY, Keene DR, Ono R, Reinhardt DP, Sakai LY, Biery NJ, Bunton T et al. . 1997a. Targetting of the gene encoding fibrillin-1 recapitulates the vascular aspect of Marfan syndrome. *Nat Genet* 17(2):218-222.
- Pereira L, D'Alessio M, Ramirez F, Lynch JR, Sykes B, Pangilinan R, and Bonadio J. 1993. Genomic organization of the sequence coding for fibrillin, the defective gene product in Marfan syndrome. *Human Mol Genet* 2:961-968.
- Pereira L, Lee SY, Gayraud B, Andrikopoulos K, Shapiro SD, Bunton T, Biery NJ, Dietz HC, Sakai LY, and Ramirez F. 1999. Pathogenetic sequence for aneurysm revealed in mice underexpressing fibrillin-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:3819-3823.
- Pyeritz RE. 2000. The Marfan syndrome. *Annu Rev Med* 51:481-510.
- Rahman J, Rahman FZ, Rahman W, al-Suleiman SA, and Rahman MS. 2003. Obstetric and gynecologic complications in women with Marfan syndrome. *J Reprod Med* 48(9):723-728.
- Ramirez F, and Rifkin DB. 2003. Cell signaling events: a view from the matrix. *Matrix Biol* 22(2):101-107.
- Ramirez F, Sakai LY, Dietz HC, and Rifkin DB. 2004. Fibrillin microfibrils: multipurpose extracellular networks in organismal physiology. *Physiol Genomics* 19(2):151-154.

- Reinhardt DP, Mechling DE, Boswell BA, Keene DR, Sakai LY, and Bachinger HP. 1997a. Calcium determines the shape of fibrillin. *J Biol Chem* 272(11):7368-7373.
- Reinhardt DP, Ono RN, and Sakai LY. 1997b. Calcium stabilizes fibrillin-1 against proteolytic degradation. *J Biol Chem* 272(2):1231-1236.
- Robinson PN, Arteaga-Solis E, Baldock C, Collod-Beroud G, Booms P, De Paepe A, Dietz HC, Guo G, Handford PA, Judge DP et al. . 2006. The molecular genetics of Marfan syndrome and related disorders. *J Med Genet* 43(10):769-787.
- Robinson PN, and Godfrey M. 2000. The molecular genetics of Marfan syndrome and related microfibrillopathies. *J Med Genet* 37(1):9-25.
- Ross JM, McIntire LV, Moake JL, Kuo HJ, Qian RQ, Glanville RW, Schwartz E, and Rand JH. 1998a. Fibrillin containing elastic microfibrils support platelet adhesion under dynamic shear conditions. *Thromb Haemost* 79(1):155-161.
- Sakai LY, Keene DR, and Engvall E. 1986. Fibrillin, a new 350-kD glycoprotein, is a component of extracellular microfibrils. *J Cell Biol* 103:2499-2509.
- Sakai LY, Keene DR, Glanville RW, and Bachinger HP. 1991. Purification and partial characterization of fibrillin, a cysteine-rich structural component of connective tissue microfibrils. *J Biol Chem* 266(22):14763-14770.
- Sakamoto Y, Miyazaki A, Tamagawa H, Wang GP, and Horiuchi S. 2005. Specific interaction of oxidized low-density lipoprotein with thrombospondin-1 inhibits transforming growth factor-beta from its activation. *Atherosclerosis* 183(1):85-93.
- Schwieler JH, Kahan T, Wallen NH, Nussberger J, and Hjerdahl P. 2013. Inhibition of the renin-angiotensin system does not reduce platelet activity at rest or during stress in hypertension. *J Hypertens*.
- Sinha S, Nevett C, Shuttleworth CA, and Kielty CM. 1998. Cellular and extracellular biology of the latent transforming growth factor-beta binding proteins. *Matrix Biol* 17(8-9):529-545.
- ten Dijke P, and Arthur HM. 2007. Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(11):857-869.
- Thomassin L, Werneck CC, Broekelmann TJ, Gleyzal C, Hornstra IK, Mecham RP, and Sommer P. 2005. The Pro-regions of lysyl oxidase and lysyl oxidase-like 1 are required for deposition onto elastic fibers. *J Biol Chem* 280(52):42848-42855.
- Uchida H, Kuroki M, Shitama T, and Hayashi H. 2008. Activation of TGF-beta1 through up-regulation of TSP-1 by retinoic acid in retinal pigment epithelial cells. *Curr Eye Res* 33(2):199-203.
- Wagenseil JE, and Mecham RP. 2007. New insights into elastic fiber assembly. *Birth Defects Res C Embryo Today* 81(4):229-240.
- Wang M, Zhao D, Spinetti G, Zhang J, Jiang LQ, Pintus G, Monticone R, and Lakatta EG. 2006. Matrix metalloproteinase 2 activation of transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) and TGF-beta1-type II receptor signaling within the aged arterial wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26(7):1503-1509.
- Weinbaum JS, Broekelmann TJ, Pierce RA, Werneck CC, Segade F, Craft CS, Knutsen RH, and Mecham RP. 2008b. Deficiency in microfibril-associated glycoprotein-1 leads to complex phenotypes in multiple organ systems. *J Biol Chem* 283(37):25533-25543.

- 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(22):23045-23051.
- 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(8):4137-4144.
- White JG. 2002. Electron microscopy methods for studying platelets structure and function. p 47-63.
- Wojakowski W, Gminski J, Siemianowicz K, Goss M, and Machalski M. 2001. The influence of angiotensin-converting enzyme inhibitors on the aorta elastin metabolism in diet-induced hypercholesterolaemia in rabbits. *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS* 2(1):37-42.
- Xiong W, Meisinger T, Knispel R, Worth JM, and Baxter BT. 2012. MMP-2 regulates Erk1/2 phosphorylation and aortic dilatation in Marfan syndrome. *Circulation research* 110(12):e92-e101.
- Yang HH, Kim JM, Chum E, van Breemen C, and Chung AW. 2009. Long-term effects of losartan on structure and function of the thoracic aorta in a mouse model of Marfan syndrome. *British journal of pharmacology* 158(6):1503-1512.
- Yang HH, Kim JM, Chum E, van Breemen C, and Chung AW. 2010. Effectiveness of combination of losartan potassium and doxycycline versus single-drug treatments in the secondary prevention of thoracic aortic aneurysm in Marfan syndrome. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 140(2):305-312 e302.
- Yasmin, McEniery CM, Wallace S, Dakham Z, Pulsalkar P, Maki-Petaja K, Ashby MJ, Cockcroft JR, and Wilkinson IB. 2005. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), MMP-2, and serum elastase activity are associated with systolic hypertension and arterial stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25(2):372.

# ANEXOS

---



CEEA/Unicamp

**Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEA/Unicamp**

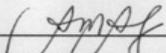
**CERTIFICADO**

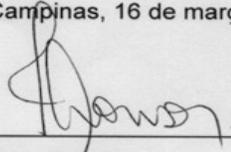
Certificamos que o Protocolo nº **1774-1**, sobre "**Avaliação da função da Fibrilina-1 na trombogênese arterial**", sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Claudio C. Werneck**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em **16 de março de 2009**.

**CERTIFICATE**

We certify that the protocol nº **1774-1**, entitled "**Evaluation of Fibrillin-1's role in arterial thrombogenesis**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **March 16, 2009**.

Campinas, 16 de março de 2009.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva

CEEA – Unicamp  
Caixa Postal 6109  
13083-970 Campinas, SP – Brasil

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

## Anexo II

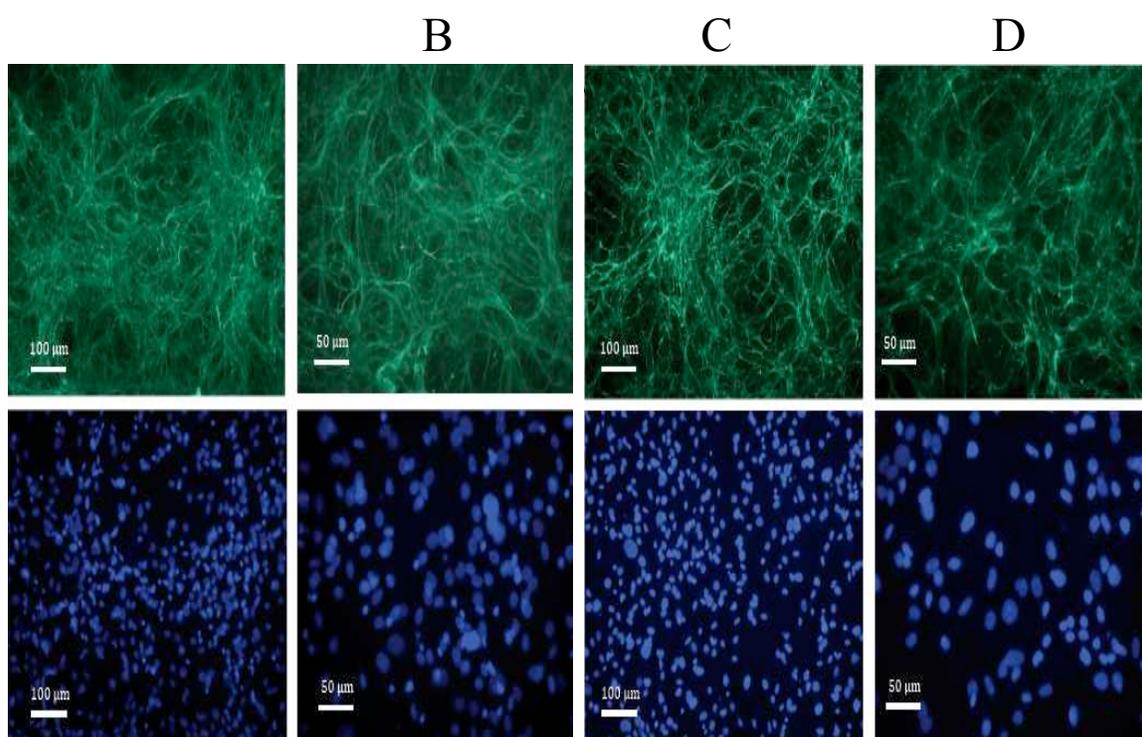


Figura 10.1. Imunofluorescência para Fibrilina-2 em cultura primária de fibroblastos de derme de camundongos selvagens (A e B) e heterozigotos *Fbn1*<sup>mgΔ+/-</sup> (C e D): 4 dias após plaqueamento ( $1 \times 10^5$  células/mL). **A e C** – Fibras elásticas e marcação nuclear com DAPI - Barra = 100 μ; **B e D** – Fibras elásticas e marcação nuclear com DAPI - Barra = 50 μm. Anticorpo secundário conjugado a FITC.

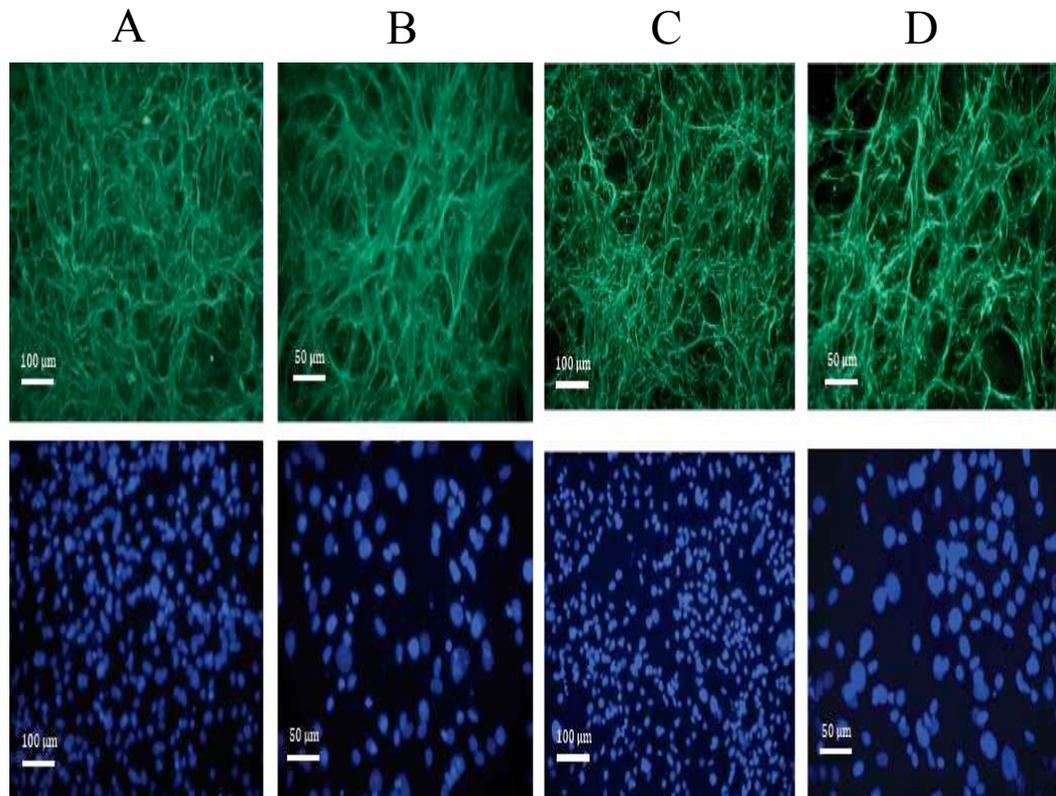


Figura 10.2. Imunofluorescência para MAGP-1 em cultura primária de fibroblastos de derme de camundongos selvagens (A e B) e heterozigotos *Fbn1*<sup>mgΔ/+</sup> (C e D): 4 dias após plaqueamento ( $1 \times 10^5$  células/mL). A e C – Fibras elásticas e marcação nuclear com DAPI - Barra = 100 μ; B e D – Fibras elásticas e marcação nuclear com DAPI - Barra = 50 μ. Anticorpo secundário conjugado a FITC.

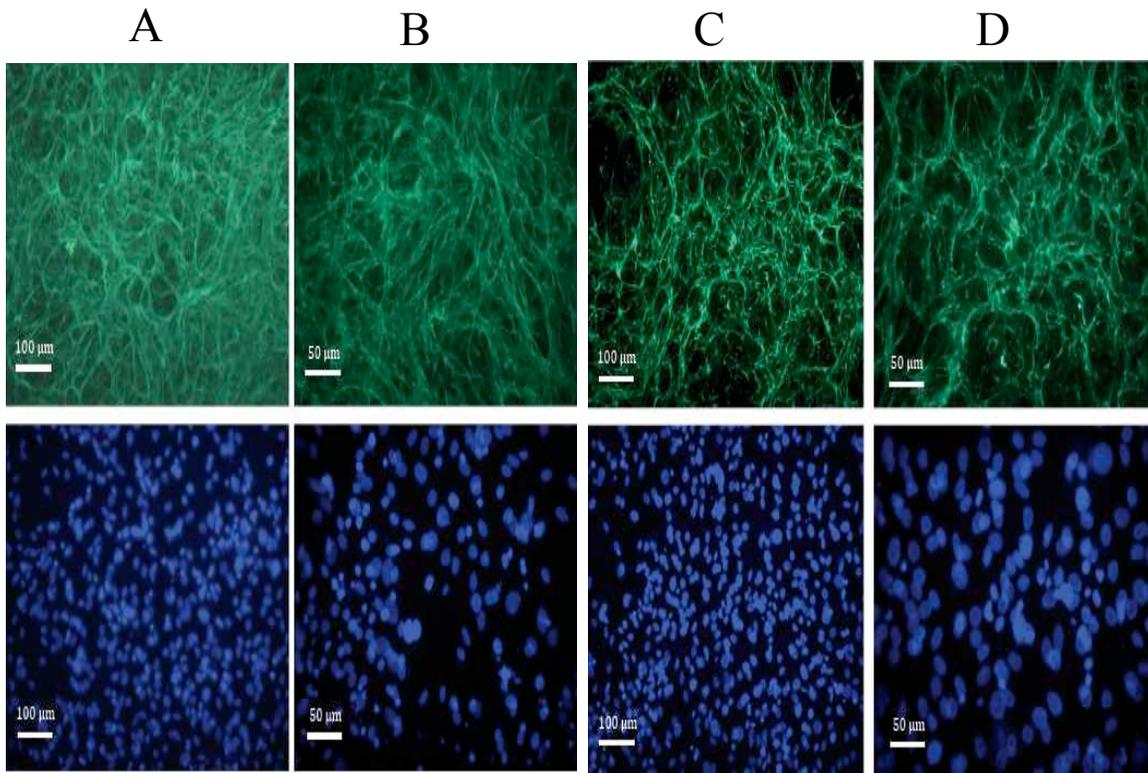


Figura 10.3. Imunofluorescência para Tropoelastina em cultura primária de fibroblastos de derme de camundongos selvagens (A e B) e heterozigotos *Fbn1*<sup>mgΔ<sup>+/</sup></sup> (C e D): 4 dias após plaqueamento (1 x 10<sup>5</sup> células/mL). **A e C** – Fibras elásticas e marcação nuclear com DAPI - Barra = 100 μ; **B e D**– Fibras elásticas e marcação nuclear com DAPI - Barra = 50 μm. Anticorpo secundário conjugado a FITC.

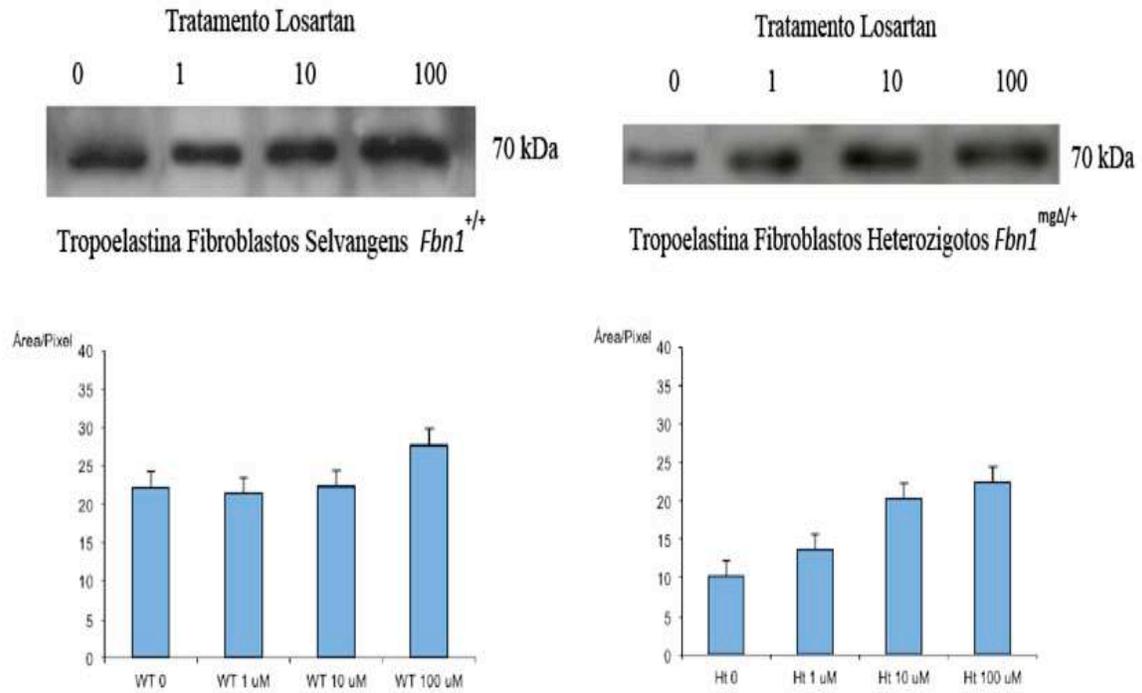


Figura 10.4. A) Western-Blotting da tropoelastina para o genótipo selvagem e heterozigotos *Fbn1*<sup>mgΔ/+</sup> (HT): tratamento com o fármaco Losartan nas concentrações de 0, 1, 10 e 100 μM/L por 4 dias após plaqueamento. B) Análise gráfica das bandas pixel/área.

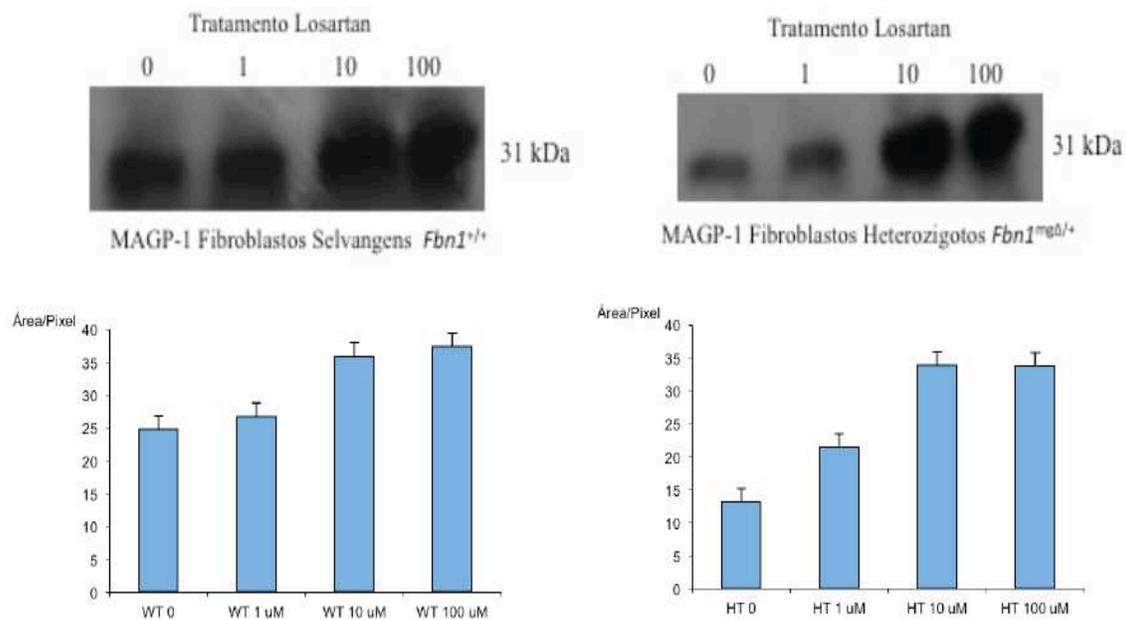


Figura 10.5. A) Western-Blotting da glicoproteína MAGP-1 para o genótipo selvagem (WT) heterozigotos *Fbn1*<sup>mgΔ/+</sup> (HT), tratamento com o fármaco Losartan nas concentrações de 0, 1, 10 e 100 μM/L por 4 dias após plaqueamento. B) Análise gráfica das bandas pixel/área.

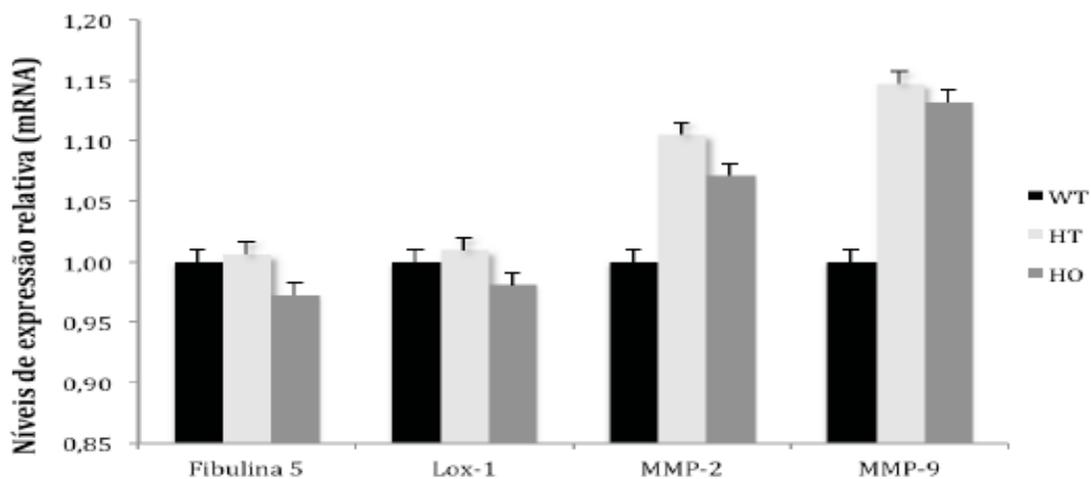


Figura 10.6. Níveis de mRNA das proteínas Fibulina-5, Lox-1, MMP-2 e MMP-9 quantificados por PCR-Real time, nos genótipos selvagem (WT), heterozigoto *Fbn1*<sup>mgΔ/+</sup> (HT) e homozigoto (HO).