



Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Fisiologia e Biofísica  
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia

Fernando Pedro de Souza Neto

**EFEITOS DA ALAMANDINA NO REMODELAMENTO VASCULAR INDUZIDO  
PELA CONSTRIÇÃO DA AORTA TRANSVERSA EM CAMUNDONGOS**

Belo Horizonte - MG

2017

Fernando Pedro de Souza Neto

**EFEITOS DA ALAMANDINA NO REMODELAMENTO VASCULAR INDUZIDO  
PELA CONSTRIÇÃO DA AORTA TRANSVERSA EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

**Orientadora:** Profa. Dra. Rafaela Fernandes da Silva

**Co-orientador:** Prof. Dr. Robson Augusto Souza dos Santos

Belo Horizonte - MG

2017

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia Renal e no Laboratório de Hipertensão, ambos do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e contou com suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação do Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

*“Um galo sozinho não tece uma manhã:  
ele precisará sempre de outros galos.  
De um que apanhe esse grito que ele  
e o lance a outro; de um outro galo  
que apanhe o grito que um galo antes  
e o lance a outro; e de outros galos  
que com muitos outros galos se cruzem  
os fios de sol de seus gritos de galos,  
para que a manhã (**a nossa ciência**), desde uma tela tênue,  
se vá tecendo, entre todos os galos.”*

*João Cabral de Melo Neto, adaptado pelo Prof. Sérgio Henrique Ferreira*

*À minha mãe, Sandra, e aos meus avós,  
Fernando, Edna, Zé Ferreira e Nara.  
De vocês se originam as profundas raízes do  
amor que me envolve todos os dias.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida.

À Profa. Rafaela, por que confiou no meu trabalho e me acolheu com tanta sabedoria. Quero que saiba que a sua sensibilidade como orientadora me inspira a pesquisar. Muito obrigado por sempre está disposta a conversar comigo com tanta atenção e por tudo que tem me ensinado.

Ao Prof. Robson, pela imensa contribuição para a pesquisa científica e, em especial, para o nosso projeto. Tenho em mente todas discussões que tivemos sobre este trabalho e irei levar os seus ensinamentos para a vida.

À Profa. Maria Aparecida, por toda a atenção, carinho e pelas conversas sempre muito produtivas; e aos seus alunos do Laboratório de Fisiologia Renal. Agradeço em especial a Esdras, o meu primeiro amigo mineiro, que me fez acreditar que era possível imigrar do Ceará para cá para ingressar neste curso e por ter sido meu primeiro elo com minha orientadora; e à Leda, que me ajuda a compreender a vida com suas palavras e discernimentos.

À minha família mineira: Alan, Bebeto e Rafael. Obrigado pela companhia diária e por sempre estarem dispostos a discutir sobre a alamandina e angiotensina-(1-7). A Markos, por ser a melhor companhia nos almoços e cafés na UFMG e por emanar somente coisas boas.

Ao meu amigo André Moratty, que é para mim a representação mais objetiva da alegria e da generosidade com que Minas Gerais me recebeu. Tenho certeza de que nossa amizade irá durar até o mundo acabar! À Gabriela Gomes (Gabi), pela amizade, companheirismo e por tantas conversas produtivas.

Aos meus amigos Mário Morais, Itamar Couto, Nádia Leão, Filipe Silva, Gabriel Sanglard, Jônathas Almeida, Gisele Magalhães, Juliana Gregório, Mariana Oliveira, Gleissy Kelly, Dani Alves, Lucas Araújo, Giovanni Canta, Lucas Alves, Sílvia Zebral, Lorena Fernandes, Flávia Araújo, Gisele Etelvino, Onésia, Natália Ferreira, Sérgio Scalzo, Walma Vasconcelos, Douglas Lamounier, Gabriela Cerri, Melissa Santuchi, André Mota e demais amigos do ICB, por dividirem comigo os dias de trabalho e pelas discussões sempre recheadas de risos, ciência e companheirismo.

Aos Professores e amigos do Laboratório de Hipertensão. Muito, muito obrigado por todas as oportunidades que tenho de discutir e aprender com vocês e pelo carinho com o qual fui recebido.

À Hugo Seeman, por ter me apresentado aos camundongos e por todas as técnicas ensinadas a mim. Muito obrigado pela companhia nos meus primeiros passos no ICB.

À Aline Oliveira pelas conversas intermináveis sobre o Ceará, pelos ensinamentos tão preciosos sobre microscopia e por traduzir o meu dialeto para os nossos colegas de trabalho.

À Profa. Lucíola Barcelos e os seus alunos Puebla e Camila, que foram tão importantes para a realização dos experimentos de histologia.

À Profa. Sílvia Guatimosim e à sua orientada Thaís Alcântara, que foram essenciais para a realização dos procedimentos cirúrgicos deste projeto.

À Grazielle, por ter me ensinado os experimentos de imunofluorescência com tanta clareza.

À Daisy, pela ajuda com os experimentos de PCR, pela disponibilidade e entusiasmo!

A Marcos Mello, pela realização dos experimentos de Doppler.

À Stephanie Viana, por ser tão solícita e gentil.

A todos os professores da Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, pelos conhecimentos que me fazem ressignificar todos os dias aquilo que aprendo. Em especial ao Prof. Cândido, Profa. Maristela e Prof. Rafael, por terem me proporcionado momentos tão ricos em suas disciplinas.

Aos membros da secretaria do PGFisFar, técnicos de laboratório, técnicos administrativos, bioteristas e pessoal da limpeza.

À FAPEMIG, CAPES e CNPq, pelo financiamento do nosso trabalho.

## LISTA DE ABREVIATURAS

2R1C	Modelo experimental de hipertensão “2 rins 1 clipe”
AGT	Angiotensinogênio
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
Ang-(1-7)	Angiotensina-(1-7)
Ang-(1-9)	Angiotensina-(1-9)
ANOVA	Análise de variância
ApoE <sup>-/-</sup>	Apolipoproteína E
ASTv	Área de secção transversa vascular
AT1	Receptor da angiotensina II tipo 1
AT2	Receptor da angiotensina II tipo 2
AVC	Acidente vascular cerebral
CEBIO	Centro de bioterismo
CHO	Ovário de hamster chinês
CTGF	Fator de crescimento de tecido conectivo
DHE	Dihidroetídio
DNase	Desoxirribonuclease
D-Pro7-ang-(1-7)	Antagonista dos receptores Mas e MrgD
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ECA2	Enzima conversora de angiotensina- 2
ECA <sup>EC<sup>-/-</sup></sup>	Camundongos com deleção específica da ECA em células endoteliais
ECA <sup>SMC<sup>-/-</sup></sup>	Camundongos com deleção específica da ECA em células do músculo liso vascular



EGF	Fator de crescimento epididimal
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EPM	Erro padrão da média
ERK1/2	Kinase regulada por sinal extracelular1/2
EROs	Espécies reativas de oxigênio
HPBCD	2-Hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
L-NAME	N <sup>w</sup> -nitro-arginina-metil-ester
MCP-1	Proteína de quimioatração de macrófagos
MEC	Matriz extracelular
MMLV	Moloney murine leucemia vírus
MMP-2	Metaloproteinase- 2
MMP-9	Metaloproteinase- 9
MMPs	Metaloproteinases de matriz
MPO	Mieloperoxidase
MrgD	Receptor relacionado ao Mas do tipo D acoplado à proteína G
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NEP	Endopeptidase neutra
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
ONOO-	Peroxinitrito
PCP	Prolicarboxipeptidase

PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PEP	Polil-endorpeptidase
RNA	Ácido ribonucleico
SRA	Sistema renina-angiotensina
TAC	Constricção da aorta transversa
TAC+ALA	Animais operados e submetidos à administração de alamandina
TGF- $\beta$	Fator de crescimento e transformação-beta
VCV	Ventilação controlada por volume
VSMC	Células do músculo liso vascular
$\alpha$ -SMA	Alfa actina do músculo liso

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Síntese da alamandina a partir da Ang A e da Ang-(1-7) .....	12
<b>Figura 2</b> Tipos de remodelamento vascular.....	15
<b>Figura 3.</b> Distribuição de forças que compõe o estresse aórtico .....	13
<b>Figura 4.</b> Procedimentos experimentais e fluxograma de tempo.....	21
<b>Figura 5.</b> Representação esquemática do modelo de constrição da aorta transversa (TAC).....	23
<b>Figura 6.</b> Representação do processo de isolamento da aorta ascendente dos camundongos C57BL/6 submetidos à TAC .....	24
<b>Figura 7.</b> Alterações hemodinâmicas induzidas pela TAC na aorta, artéria inominada e carótida esquerda.....	31
<b>Figura 8.</b> Imagens representativas das alterações hemodinâmicas provocadas pela TAC em camundongos.....	32
<b>Figura 9.</b> Efeitos da TAC e da administração oral de alamandina nas alterações morfológicas e remodelamento da parede vascular aórtica.....	34
<b>Figura 10.</b> Efeitos da TAC e da administração oral de alamandina na disposição das fibras de elastina da camada média da aorta ascendente .....	35
<b>Figura 11.</b> Efeitos da TAC e da administração oral de alamandina no conteúdo de colágeno na aorta ascendente. ....	37
<b>Figura 12.</b> Efeitos da TAC e da administração oral de alamandina na atividade gelatinolítica de MMPs e na expressão de MMP-2 na aorta ascendente.....	39
<b>Figura 13.</b> Efeitos da TAC e da administração oral de alamandina na produção EROs na aorta ascendente. ....	40
<b>Figura 14.</b> Efeitos da TAC e da administração oral de alamandina na expressão do receptor MrgD na aorta ascendente.....	42
<b>Figura 15.</b> Efeitos da TAC e da administração oral de alamandina na expressão de genes relacionados à inflamação na aorta ascendente. ....	44

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Efeitos biológicos da alamandina in vitro e in vivo .....	14
<b>Tabela 2.</b> Sequência dos primers utilizados.....	29

## RESUMO

**Introdução** A alamandina foi recentemente descoberta e caracterizada como um novo componente do sistema renina-angiotensina. Até o momento, sabe-se que ela deriva da ação catalítica da ECA2 sobre a Angiotensina A e da descarboxilação da Angiotensina-(1-7). A alamandina, através da interação com o seu receptor, o MrgD, tem mostrado efeitos protetores para o sistema cardiovascular. Além disto, é bem estabelecida a participação de certos componentes do sistema renina-angiotensina clássico nas doenças vasculares caracterizadas pelo remodelamento arterial. Entretanto, não se tem conhecimento sobre os efeitos da alamandina no remodelamento vascular induzido pela constrição da aorta transversa (TAC). **Objetivo** Avaliar os efeitos da alamandina no remodelamento da aorta ascendente induzido pela TAC. **Material e Métodos** Neste estudo foram utilizados camundongos C57BL/6 machos (20-25g) com idade de 10-12 semanas (CEUA 349/2016). Os animais foram divididos nos grupos Sham (falso operados), TAC (operados) e TAC+ALA (operados tratados com alamandina, 30 µg/kg/dia, via gavagem). Após um período de tratamento de 14 dias, os animais foram eutanasiados e a aorta ascendente foi coletada para as análises. **Resultados** Os resultados demonstram que a administração oral de alamandina atenua o remodelamento da aorta ascendente induzido pela TAC, bem como diminuiu a fibrose, a atividade gelatinolítica das metaloproteinases de matriz (MMPs) e a expressão da MMP-2. Os resultados também demonstram que a alamandina diminuiu a produção de espécies reativas de oxigênio e a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, a administração de alamandina também modulou a expressão proteica do receptor MrgD e atenuou o aumento da expressão gênica do receptor AT1 induzido pela TAC. **Conclusões** Nossos resultados mostram que o tratamento com alamandina atenua o remodelamento vascular após TAC e apresenta efeitos anti-fibróticos, anti-oxidantes e anti-inflamatórios. Assim, este trabalho abre caminhos para estudos que visem a alamandina como um promissor alvo terapêutico para as doenças cardiovasculares.

## ABSTRACT

**Introduction** The peptide alamandine has been recently discovered and characterized as the newest component from the renin angiotensin system. So far, alamandine is derived from the catalytic action of ECA2 over Angiotensin A and from the decarboxylation of Angiotensin-(1-7). Through the interaction with its receptor, MrgD, alamandine has shown to have protective effects to the cardiovascular system. It is well established the participation of certain components of the classic renin angiotensin system in vascular diseases characterized by arterial remodeling. However, there is no knowledge about the effects of alamandine in the animal model of transverse aortic constriction-induced vascular remodeling. **Aim** To evaluate the effects of alamandine on mice ascending aorta remodeling after transverse aortic constriction. **Materials and Methods** We used C57BL/6 male mice (20-25g) from 10-12 weeks age (CEUA 349/2016). The animals were split into the following groups: Sham (false operated), TAC (operated) and TAC+ALA (operated and treated with alamandine, 30 µg/kg/day, by gavage). After a period of 14 days of treatment, the animals were euthanized and the ascending aorta was collected. The results show that oral administration of alamandine attenuated the remodeling in the ascending aorta induced by TAC, as well as reduced the fibrosis, the gelatinolytic activity of the matrix metalloproteinases (MMPs) and the expression of MMP-2. The results also demonstrate that alamandine decreased the production of reactive oxygen species and the gene expression of proinflammatory cytokines. Furthermore, treatment with alamandine also modulated the protein expression of MrgD receptor and reduced the increase of gene expression of AT1 receptor-induced by TAC. **Conclusions** Our results demonstrate that alamandine treatment reduces the vascular remodeling after TAC through anti-fibrotic, anti-oxidant and anti-inflammatory effects. Hence, this work opens new avenues for the use of alamandine as a promising therapeutic target in cardiovascular diseases.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	1
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	4
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	5
<b>RESUMO</b> .....	6
<b>ABSTRACT</b> .....	7
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	10
1.1 Sistema renina-angiotensina.....	10
1.2 Alamandina e o receptor MrgD.....	12
1.3 Remodelamento vascular e estresse biomecânico.....	15
1.4 Remodelamento vascular e o sistema renina-angiotensina.....	18
1.5 Remodelamento vascular, sobrecarga pressórica e sistema-renina angiotensina.....	19
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	20
2.1 Objetivo Geral.....	20
2.2 Objetivos Específicos.....	20
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	21
3.1 Animais.....	21
3.2 Indução do remodelamento da aorta ascendente.....	22
3.3 Administração oral de alamandina.....	23
3.4 Procedimentos de doppler e ecocardiografia.....	23
3.5 Estudo histomorfométrico.....	24
3.6 Avaliação da deposição de colágeno total.....	25
3.7 Ensaio de imunofluorescência.....	26
3.8 Análise da disposição das fibras elásticas.....	26
3.9 Quantificação da atividade gelatinolítica total através da zimografia <i>in situ</i> .....	27
3.10 Mensuração de EROs em cortes congelados de aorta.....	27
3.11 Avaliação da expressão de RNAm por qRT-PCR.....	28
3.12 Análise estatística.....	29
<b>4. RESULTADOS</b> .....	30
4.1 A cirurgia de constrição da aorta transversa (TAC) induz alterações hemodinâmicas no arco aórtico.....	30

4.2 A administração oral de alamandina reduz o remodelamento vascular induzido pela TAC .....	33
4.3 A administração oral de alamandina atenua a fibrose na parede vascular induzida pela TAC .....	36
4.4 A administração oral de alamandina reduz a atividade total de MMPs e expressão de MMP-2 induzidas pela TAC.....	38
4.5 Administração oral de alamandina reduz a produção EROs induzida pela TAC .....	40
4.6 A administração oral de alamandina modula a expressão do receptor MrgD na aorta ascendente alterada pela TAC.....	41
4.7 A administração oral de alamandina modula as alterações da expressão do receptor AT1 e de genes relacionados à inflamação na aorta ascendente provocadas pela TAC. ....	43
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>45</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>51</b>



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Sistema renina-angiotensina

O sistema renina-angiotensina (SRA) é um importante sistema endócrino e tecidual capaz de regular as funções cardiovasculares e renais, podendo atuar de forma parácrina, autócrina e intácrina em órgãos e tecidos (MEHTA e GRIENGLING, 2006; LU *et al.*, 2016; FERRARIO *et al.*, 2016). O SRA clássico é composto por diversos componentes, dentre eles a renina, enzima que foi descoberta há mais de 100 anos (TIGERSTEDT e BERGMAN, 1898) que hidrolisa o angiotensinogênio (AGT) em angiotensina I (Ang I). A Ang I, por sua vez, é convertida em angiotensina II (Ang II) pela ação da enzima conversora de angiotensina (ECA) (NG e VANE, 1967). Considerada como o principal peptídeo efetor do SRA, a Ang II promove suas ações através de sua ligação aos receptores AT1 e AT2, que pertencem à superfamília dos receptores acoplados à proteína G, e apresentam efeitos fisiológicos distintos (MICHEL *et al.*, 2016; GALADRIN *et al.*, 2016; ZHU *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2003).

As ações da Ang II sobre o AT1 ocorrem predominantemente via proteína  $G_{q/11}$ , mas também  $G_{12/12}$  e  $G_{i/o}$  (HUNYADY e CATT, 2006; GASPARO *et al.*, 2000). A hiperatividade do eixo ECA/Ang II/AT1 tem sido relacionada à diversas doenças cardiovasculares, como a insuficiência cardíaca, o aneurisma da aorta torácica e a hipertensão arterial sistêmica. Seu envolvimento nestas doenças está relacionado à vasoconstrição excessiva, fibrose e remodelamento cardiovascular e renal (KUANG *et al.*, 2013; WRIGHT, MIZUTANI, HARDING, 2008). Como citado anteriormente, a Ang II é também um ligante endógeno do receptor AT2, que é muito abundante durante o período fetal. Após o nascimento, este receptor tem uma redução significativa de sua distribuição, sendo expresso novamente em certas condições patológicas, como após a lesão cardiovascular ou renal. As ações do receptor AT2 incluem efeito cronotrópico negativo, diminuição de fibrose e da hipertrofia cardíaca, promove vasodilatação dependente de endotélio e apresenta efeitos antiproliferativos e pró-apoptóticos em células do músculo liso vascular (VSMC) após lesão (TSUTSUMI *et al.*, 1999; NOUET e NAHMIAS, 2000; SUZUKI *et al.*, 2002; JONES *et al.*, 2008).

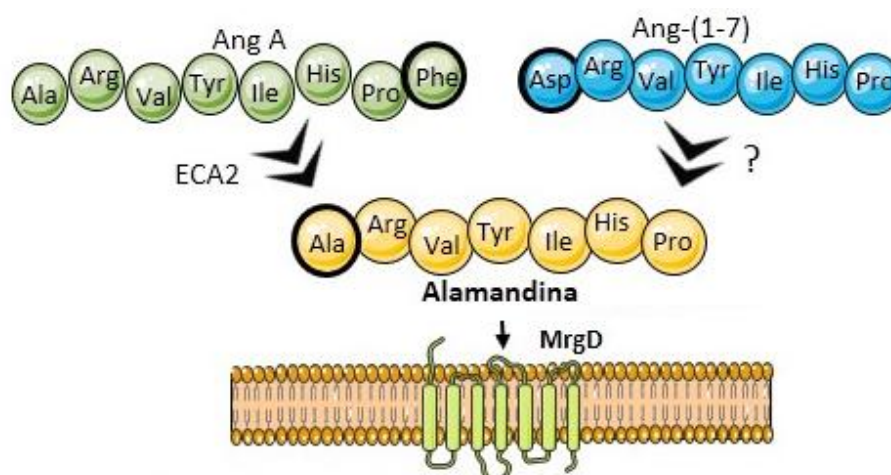
Nos últimos anos, novos componentes do SRA foram descobertos e caracterizados, o que demonstra o quanto este sistema é dinâmico e complexo. Diante disto, foram incluídos no SRA novos receptores, peptídeos e enzimas, como a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), a angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] e o receptor Mas, que juntos constituem um importante eixo contrarregulatório ao eixo ECA/Ang II/AT1. A Ang-(1-7) é um heptapeptídeo amino-terminal que pode ser formado de diferentes maneiras: diretamente a partir da Ang II pela ação da ECA2, prolicarboxipeptidase (PCP) e polil-endorpeptidase (PEP); pela ação da endopeptidase neutra (NEP) e PEP sobre os resíduos Pro7-Phe8 da Ang I; bem como via atividade enzimática da ECA e NEP sobre a Angiotensina 1-9 [Ang-(1-9)]. (SANTOS *et al.*, 2000; DONOGHUE *et al.*, 2000; VICKERS *et al.*, 2002; RICE *et al.*, 2004). No ano de 2003, Santos *et al.* caracterizaram, através do uso de ferramentas farmacológicas e animais transgênicos, o receptor Mas como ligante da Ang-(1-7) e responsável pelo seu efeito vasorrelaxante e antidiurético em camundongos. Na sequência, um número crescente de trabalhos surgiram demonstrando em diversos modelos animais e em humanos os efeitos benéficos promovidos pela ativação do eixo ECA2/Ang-(1-7)/receptor Mas. Entre outros, já foi demonstrado que a administração de Ang-(1-7) atenua o remodelamento cardíaco em ratos hipertensos (mRen2)<sup>27</sup> e em camundongos C57BL/6 submetidos à infusão crônica de Ang II, atenua o remodelamento pulmonar e a hiperresponsividade brônquica na inflamação alérgica pulmonar crônica em animais BALB/C, reduz o estresse oxidativo e a fibrose no corpo cavernoso de camundongos com hipercolesterolemia (FRAGA-SILVA *et al.*, 2015; MAGALHÃES *et al.*, 2015; KANGUSSU *et al.*, 2016; LIN *et al.*, 2016).

Em relação às desordens vasculares, estudos mais recentes relatam os efeitos benéficos da Ang-(1-7), como a proteção contra o desenvolvimento de hemorragia por aneurisma (SHIMADA *et al.*, 2015), inibição do remodelamento vascular e a proliferação, migração e apoptose de VMSC em modelo experimental de acidente vascular cerebral (BIHL *et al.*, 2015), ação vasodilatadora na hipertensão renovascular (OLIVON *et al.*, 2015), atenuação da inflamação em placas ateroscleróticas (FRAGA-SILVA *et al.*, 2014), dentre outros. Além dos efeitos promovidos pela Ang-(1-7) ao se ligar ao receptor Mas, recentemente, GALADRIN *et al.* (2016) relacionaram parte da sua atividade ao receptor AT1. Esse estudo demonstrou, pela primeira vez, que a Ang-(1-7) é um antagonista competitivo do AT1, inibindo a sinalização da Ang II

dependente das proteínas G, que são cardiodeletérias, além de ativar a sinalização da  $\beta$ -arrestina, que é uma via cardioprotetora.

## 1.2 Alamandina e o receptor MrgD

Recentemente, um novo peptídeo do SRA foi identificado e caracterizado por Lautner e Vilella *et al.*, (2013), o qual foi denominado de alamandina [Ala1-Ang-(1-7)]. A alamandina pode ser formada pela ação enzimática da ECA2 sobre a Ang A, que é um octapeptídeo que difere da Ang II apenas por ter seu resíduo Asp1 descarboxilado em Ala1 (Figura 1). Além disto, a alamandina também pode ser produto da ação enzimática da ECA2 diretamente sobre a Ang-(1-7) através da descarboxilação do resíduo de Asp1 em sua porção N-terminal (ETELVINO, PELUSO e SANTOS, 2014).



**Figura 1. Síntese da alamandina a partir da Ang A e da Ang-(1-7)**

Embora a diferença molecular entre a Ang-(1-7) e a alamandina seja apenas de um aminoácido, o trabalho de Lautner e Vilella *et al.*, (2013) demonstrou que os efeitos vasorrelaxante e hipotensor da alamandina em anéis de aorta de camundongos e em ratos anestesiados, respectivamente, não eram bloqueados pelo antagonista do receptor Mas, o A779, sugerindo uma nova via de sinalização para este recém descoberto peptídeo. Por conseguinte, no mesmo estudo, os autores com o uso do D-Pro7-ang-(1-7), um antagonista farmacológico do *Mas-related G protein-coupled receptor D* - MrgD, evidenciaram o bloqueio total dos efeitos vasculares da alamandina. Corroborando a hipótese da existência deste importante receptor no SRA, eles demonstraram que a alamandina se ligava às células CHO transfectadas com o receptor MrgD, o que não ocorreu na presença do D-Pro7-ang-(1-7).

A partir da descoberta e caracterização da alamandina e seu receptor MrgD, novos estudos começam a ser publicados evidenciando o efeito protetor da ativação desta via. Habiyaqare *et al.* (2014) mostrou que o receptor MrgD está expresso tanto na aorta de coelhos saudáveis, quanto em animais que apresentam placas ateroscleróticas, e que a alamandina melhorou a vasodilatação dependente de endotélio em animais controles, mas não apresentou efeitos em animais submetidos à dieta aterogênica. Os efeitos da ativação da via alamandina/receptor MrgD também foram analisados na aterosclerose induzida por dieta hiperlipídica em camundongos deficientes em apolipoproteína E (apoE<sup>-/-</sup>). A administração de uma dose de 24 µg/kg/h de alamandina por via subcutânea foi associada com uma redução dos níveis séricos de enzimas neutrofílicas, a metaloproteinases do tipo -9 (MMP-9) e mieloperoxidase, assim como na expressão da MMP-9 nas placas ateroscleróticas da porção inicial da aorta ascendente (DA SILVA *et al.*, 2016). Recentemente, Hekmat *et al.* (2017) observaram que a alamandina apresenta uma resposta bifásica em parâmetros cardiovasculares de ratos após serem submetidos ao modelo experimental de hipertensão “2R1C”. A administração intravenosa 75 µg/kg deste peptídeo nos animais com hipertensão renovascular produziu efeito pressórico mediado pelo receptor AT1, seguida por uma resposta hipotensora duradoura que foi mediada, em parte, pelos receptores AT2 e MrgD. Os efeitos biológicos da alamandina identificados até o momento estão sumarizados na tabela 1.

**Tabela 1.** Efeitos biológicos da alamandina *in vitro* e *in vivo*

	<b>Alamandina</b>	<b>Referência</b>
Células humanas ECA2	Formação de alamandina pela ECA2	
Coração isolado de ratos	Formação de alamandina após perfusão com Ang-(1-7)	
Células transfectadas com o MrgD	Ligação da alamandina ao MrgD, que é abolida pelo PD123319 (antagonista do AT2)	
Anéis de aorta de camundongos FVB/N, camundongos Mas-KO e AT2-KO, ratos Wistar	Vasodilatação dependente de endotélio, que é atenuada pelo pré-tratamento com L-NAME, completamente bloqueado pelo D-PRO7 (antagonista do Mas e MrgD, não influenciado pelo A-779 (antagonista do Mas), preservado em animais Mas-KO e AT2-KO, inibida pela pré-incubação com $\alpha$ -alanina	Lautner e Vilella <i>et al.</i> , 2013
Neutrófilos peritoneais de camundongos ApoE <sup>-/-</sup>	↓ degranulação de MMP-9 e mieloperoxidase de cultura primária de neutrófilos.	Da Silva <i>et al.</i> , 2016
Artérias aorta, ilíaca, carótida e renal de coelhos	↑ vasodilatação mediada pela acetilcolina nas artérias aorta e ilíaca de animais saudáveis sem efeitos na vasodilatação mediada pela acetilcolina na carótida ↓ diminuição da vasodilatação mediada pela acetilcolina na artéria renal sem efeitos vasoativos em vasos de animais alimentados com dieta aterogênica ↓ da vasoconstrição mediada pela angiotensina A, sem efeitos na vasoconstrição induzida pela ang II.	Habiyakare <i>et al.</i> , 2014
Microinjeção nas áreas: medulla ventrolateral caudal e rostral	Efeito pressor na medula ventrolateral rostral e efeito depressor na medula ventrolateral caudal bloqueados pela D-PRO7, mas não influenciado pelo A-779	
Dose única de alamandina em ratos espontaneamente hipertensos	Efeitos anti-hipertensivos de longa duração	Lautner e Vilella <i>et al.</i> , 2013
Dose 50 $\mu$ g/kg/dia de alamandina em ratos Wistar tratados com isoproterenol	↓ Colágeno I, III, e fibronectina no tecido cardíaco	
Infusão intracerebroventricular em ratos Sprague-Dawley	↑ do componente bradicárdico do barorreflexo	Villela, Passos-Silva, Santos, 2014
Infusão subcutânea de uma dose de 24 $\mu$ g/kg/dia em animais apoE <sup>-/-</sup> tratados com dieta ocidental	↓ níveis séricos de enzimas neutrofilicas (MMP-9 e mieloperoxidase) e expressão de MMP-9 na placa aterosclerótica aórtica. Sem efeitos na deposição de lipídeos, de colágeno e na quantidade de macrófagos e neutrófilos intraplaca.	Da Silva <i>et al.</i> , 2016
Infusão de uma dose de 75 $\mu$ g/kg de alamandina em ratos hipertensos (2R1C) e em ratos normotensos	Efeitos pressor mediado pelo AT1, seguido por um efeito depressor mediado parcialmente por receptores sensíveis ao PD123319 em ratos hipertensos. Efeito pressor mediado pelo AT1 em ratos normotensos	Hekmat <i>et al.</i> , 2017

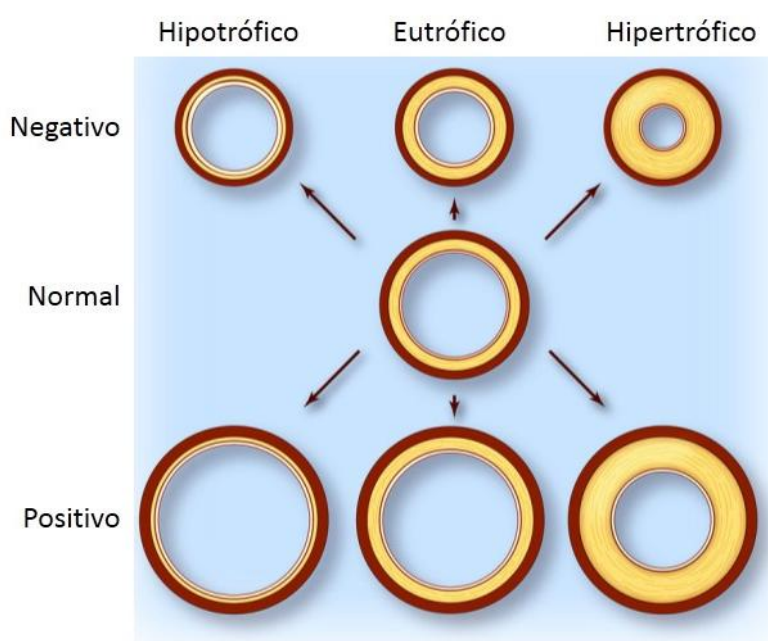
(Adaptado de Hrenak, Paulis e Simko, 2016)

### 1.3 Remodelamento vascular e estresse biomecânico

Remodelamento vascular refere-se às alterações estruturais e funcionais da parede vascular que são provocadas em resposta à doença, lesão ou envelhecimento, estando associadas, portanto, a importantes alterações hemodinâmicas e doenças cardiovasculares (VARIK *et al.*, 2012)

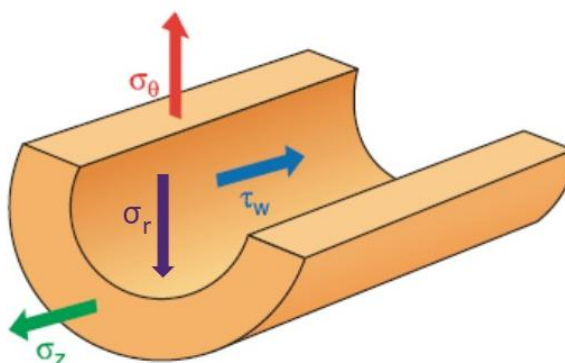
O remodelamento arterial é caracterizado por uma complexa interação entre mecanismos fisiopatológicos que influenciam componentes celulares e não celulares da parede vascular, como crescimento e proliferação celular, adesão, migração, alterações fenotípica, apoptose, bem como síntese e degradação de matriz extracelular (MEC) (GIBBONS e DZAU, 1994; VARIK *et al.*, 2012; HUMPHREY *et al.*, 2016)

Do ponto de vista macroscópico, diversos tipos de remodelamento podem ocorrer, os quais estão relacionados com o tipo de leito vascular que participa do processo adaptativo (Figura 2). O remodelamento hipertrófico ocorre quando há espessamento da parede vascular provocado por hiperplasia e/ou hipertrofia celular, ou ainda, deposição aumentada de MEC. Já o remodelamento do tipo eutrófico é caracterizado pela variação no diâmetro do lúmen, sem que haja alteração na espessura do vaso. Enquanto que no remodelamento do tipo hipotrófico há um adelgaçamento da parede vascular (MULVANY *et al.*, 1996; VARIK *et al.*, 2012)



**Figura 2. Tipos de remodelamento vascular.** Adaptado de VARIK *et al.*, 2012

As alterações vasculares adaptativas são caracterizadas por, pelo menos, cinco componentes: 1. Estímulo; 2. Sensor; 3. Sinal; 4. Efetores; e 5. Respostas. Múltiplos estímulos podem levar a um processo de remodelamento vascular, dentre eles o estresse biomecânico, definido como uma força aplicada a um objeto, dividido pela área superficial sobre a qual a força é aplicada (Figura 3). (WAGENSEIL e MECHAM, 2009; HUMPHREY *et al.*, 2016). Para que uma resposta vascular seja produzida ao estresse biomecânico gerado pelo fluxo sanguíneo, é necessário que haja o processo de conversão de forças físicas para mecanismos bioquímicos intracelulares, o que é denominado de mecanotransdução vascular. (CHISTIAKOV *et al.*, 2017)



**Figura 3. Distribuição de forças que compõe o estresse aórtico.** O estresse hemodinâmico inclui *shear stress* ( $\tau_w$ ), que é causado pela fricção do fluxo sanguíneo diretamente nas células endoteliais; Estresse circunferencial ( $\sigma_\theta$ ), provocado pela pressão do sangue que altera ciclicamente a circunferência do vaso; Estresse axial ( $\sigma_z$ ), que são vetores de força aplicados no eixo longitudinal; e Estresse radial ( $\sigma_r$ ), gerado pela pressão do sangue e por restrições perivasculares. Adaptado de Wagenseil e Mechan, 2009.

Os componentes do estresse mecânico afetam de forma distinta as células que compõe os vasos sanguíneos, que são constituídos por três diferentes camadas: a camada íntima, composta de células endoteliais, a camada média, onde estão presentes as células do músculo liso capazes de regular o diâmetro vascular, e a camada adventícia, onde estão presentes os fibroblastos, células inflamatórias e tecido conjuntivo (LI e XU, 2007).

Células endoteliais são particularmente sensíveis às alterações do estresse de cisalhamento (*shear stress* -  $\tau_w$ ), posto que as mesmas estão diretamente expostas

ao fluxo sanguíneo (CHIU e SHU CHIEN, 2011). Variações hemodinâmicas podem gerar uma gama de alterações estruturais e funcionais em células endoteliais. Zonas de baixo estresse de cisalhamento podem aumentar a permeabilidade endotelial à lipoproteína de baixa densidade (LDL), diminuir a expressão da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), aumentar a expressão de mediadores pró-inflamatórios e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (HUNG *et al.*, 2015).

Localizadas na camada média, as células do músculo liso vascular (VSMC) estão constantemente expostas ao estresse dos tipo circunferencial ( $\sigma\theta$ ) e radial ( $\sigma_r$ ). A resposta destas células às alterações do estresse mecânico está relacionada à hiperplasia, hipertrofia, migração, apoptose e alteração de fenótipo funcional. Ao assumir o fenótipo do tipo secretor, VSMC passam a expressar fatores inflamatórios como proteína de quimioatração de monócitos (MCP-1), interleucina 6 (IL-6) e o fator de crescimento e transformação (TGF- $\beta$ ), que é um importante mediador para sinalização de síntese de MEC, assim como fatores de crescimento e proliferação (PDGF, EGF e IGF) (LI e XU, 2000; LI e XU 2007; HUMPHREY *et al.*, 2016). Além disto, estas células também aumentam a expressão de metaloproteinases de matriz (MMPs), que são endopeptidases compostas por um sítio catalítico que contém  $Zn^{2+}$  e cálcio responsáveis tanto por processos fisiológicos de degradação da MEC como em casos de remodelamento vascular mal adaptativo. A MMP-2 é encontrada na aorta em condições fisiológicas, sendo considerada, portanto, como constitutiva. Já a MMP-9 é encontrada normalmente em macrófagos e neutrófilos em situações patológicas como a aterosclerose. (NEWMAN *et al.*, 1994; MCMILLAN *et al.*, 1995; GUIMARÃES *et al.*, 2010; BELO, GUIMARÃES e CASTRO, 2015). As MMP-2 e -9 são gelatinases capazes de degradar o colágeno desnaturado e sua expressão está aumentada no tecido cardíaco e vascular em modelo animal de sobrecarga pressórica.

Na camada adventícia estão localizados os fibroblastos que são absolutamente essenciais para a manutenção e integridade dos vasos sanguíneos. Fibroblastos são sensíveis também ao estresse circunferencial ( $\sigma\theta$ ) e radial ( $\sigma_r$ ) e, em resposta à lesão, eles podem se diferenciar em miofibroblastos, quando passam a expressar alfa actina do músculo liso ( $\alpha$ -SMA). Esta alteração de fenótipo tem repercussão funcional na contribuição destas células para a homeostase vascular, tanto no que se refere à deposição de colágeno quanto à produção de citocinas que medeiam a resposta inflamatória (MAIELLARO e TAYLOR, 2007).



Mesmo não apresentando uma densidade muito alta na parede vascular em situações fisiológicas, macrófagos são igualmente sensíveis ao estresse mecânico, estando também envolvidos na resposta vascular a este tipo de estímulo (McWHORTER, DAVIS e WENDY, 2015).

#### **1.4 Remodelamento vascular e o sistema renina-angiotensina**

O eixo clássico do SRA tem participação no remodelamento vascular por estar envolvido na ativação de vias de sinalização relacionadas à inflamação, síntese e degradação de MEC, crescimento, proliferação e morte celular.

Um modelo bem estabelecido para analisar a participação do eixo ECA/Ang II/AT1 no remodelamento vascular é a infusão de Ang II em camundongos. No estudo realizado por Tieu *et al.* (2009), mostrou-se que o tratamento com uma dose diária de Ang II administrada por 10 dias em camundongos C57BL/6 com idade entre 7 e 12 meses, provocou o aumento da expressão de IL-6 e MCP-1, formação de EROs, recrutamento de monócitos, ativação de macrófagos e remodelamento da MEC na aorta ascendente. Recentemente, Trachet *et al.* (2016) mostraram que a infusão subcutânea de Ang II por um período de 14 semanas em animais apoE<sup>-/-</sup>, provoca espessamento das camadas média e adventícia, microhemorragia, fragmentação das fibras elásticas e dissecação da aorta ascendente.

Já no trabalho realizado por Kuang *et al.* (2013), o objetivo foi avaliar a participação do receptor AT1 no remodelamento da aorta ascendente induzido por sobrecarga pressórica após constrição da aorta transversa (TAC) em camundongos C57BL/6. A administração de losartan na água de beber por um período de 17 dias bloqueou completamente o aumento da expressão gênica de citocinas inflamatórias (IL-6, MCP-1, MMP-2 e MMP-9), o recrutamento de macrófagos/monócitos, e ainda atenuou o remodelamento e fibrose da aorta ascendente induzido pela TAC nestes animais.

Chen *et al.* (2016) analisaram a contribuição da atividade da ECA em células endoteliais e VSMC na aterosclerose. Para isto, os autores utilizaram animais ApoE<sup>-/-</sup>, que foram cruzados com animais que sofreram deleção genética específica da ECA em células endoteliais (ECA<sup>EC<sup>-/-</sup></sup>) e em células do músculo liso (ECA<sup>SMC<sup>-/-</sup></sup>). O estudo mostrou que a deficiência da ECA reduziu a extensão das lesões

ateroscleróticas em cerca de 50% nos animais ECA<sup>SMC<sup>-/-</sup></sup>, não sendo observadas diferenças neste parâmetro nos animais ECA<sup>EC<sup>-/-</sup></sup>.

Por outro lado, a ativação do receptor Mas pela Ang-(1-7) apresenta efeitos contrários aos do eixo ECA/Ang II/AT1. Em um modelo experimental de acidente vascular cerebral induzido por administração intracerebral de colagenase em camundongos C57BL/6, a infusão de Ang-(1-7) atenuou o remodelamento da artéria cerebral média provocado pela administração de Ang II. Entretanto, este efeito protetor foi completamente bloqueado ao serem administrados simultaneamente a Ang-(1-7) e o A-779, o que demonstra a importância do eixo Ang-(1-7)/receptor Mas em contrastar os efeitos da Ang II e promover a vaskulo-proteção (BIHL *et al.*, 2015).

A Ang-(1-7) também inibe o remodelamento em artérias de resistência. Ratos espontaneamente hipertensos de 17 semanas de idade foram submetidos à inibição crônica da síntese de NO com a administração de L-NAME, inibidor não seletivo das NOS, na água de beber. O tratamento com a Ang-(1-7) por 4 semanas atenuou o remodelamento das artérias mesentéricas nestes animais, quando comparados aos seus respectivos controles (BENTER *et al.*, 2006).

### **1.5 Remodelamento vascular, sobrecarga pressórica e sistema renina-angiotensina**

Sabe-se que a interação entre o remodelamento vascular e os componentes do SRA é fundamental para a instalação e progressão de diversas doenças cardiovasculares como aneurisma cerebral, acidente vascular cerebral (AVC) e doença arterial coronariana. Além disto, dados da literatura demonstram que a prevalência de hipertensão arterial nos grupos de pacientes acometidos por aneurisma ou dissecação aguda da aorta torácica é maior que 75%, e que o SRA clássico está hiperativado nestas condições (LEMAIRE *et al.*, 2011). Entretanto, ainda não há na literatura nenhum trabalho que tenha avaliado os efeitos da alamandina no remodelamento da aorta ascendente em resposta à sobrecarga pressórica. Considerando as recém descobertas ações anti-fibróticas, vasodiladoras e anti-inflamatórias da alamandina, a nossa hipótese é de que a administração oral de alamandina seja capaz de melhorar o remodelamento vascular promovido pela cirurgia de constrição da aorta transversa (TAC) e, com isso, possa representar um novo alvo terapêutico pleiotrópico para as doenças cardiovasculares.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar os efeitos da administração oral de alamandina no remodelamento da aorta ascendente induzido pela cirurgia de constrição da aorta transversa (TAC) em camundongos C57BL/6.

### **2.2 Objetivos Específicos**

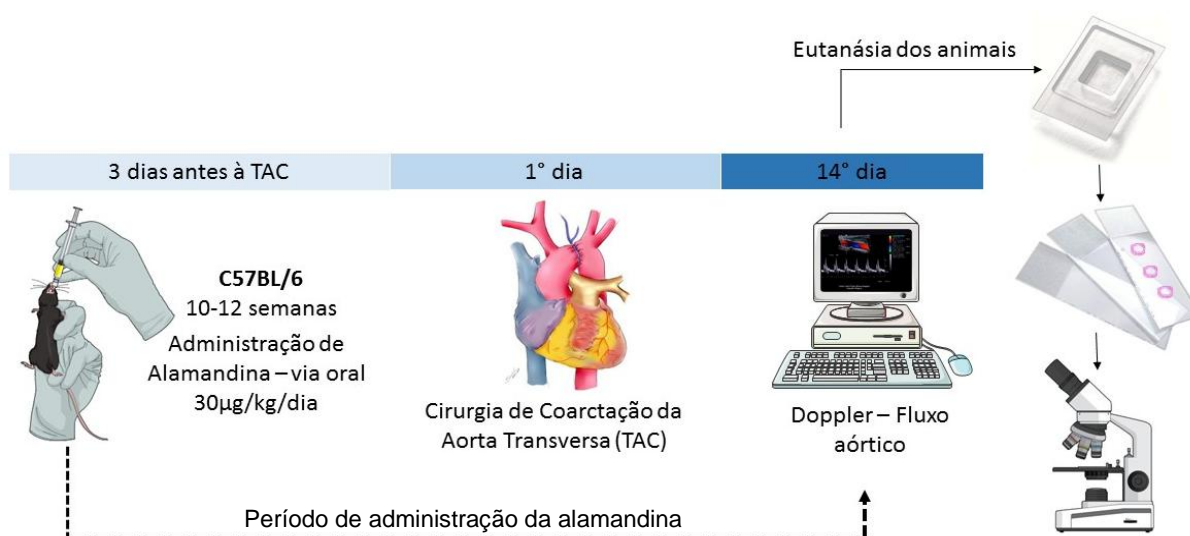
- I. Analisar parâmetros hemodinâmicos do arco aórtico através do Doppler no 14º dia após os animais serem submetidos à TAC;
- II. Avaliar os efeitos da alamandina sobre as alterações morfométricas induzidas pela cirurgia de TAC;
- III. Identificar os efeitos promovidos pela administração da alamandina na fibrose vascular e componentes da MEC, bem como na expressão do receptor MrgD;
- IV. Avaliar se a alamandina é capaz de prevenir o aumento da produção de EROs induzido pela TAC.
- V. Avaliar se alamandina modula a expressão gênica de citocinas inflamatórias induzidas pela TAC.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos selvagens (wild-type) da linhagem C57BL/6J com idade entre 10 e 12 semanas e 23 g de peso, em média. Os camundongos foram obtidos a partir do CEBIO – Centro de Bioterismo do ICB / UFMG, e mantidos no Biotério de Camundongos do Departamento de Fisiologia e Biofísica da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sob condições controladas de temperatura e ciclo claro-escuro de 12 h (12 horas de luz e 12 horas de escuro), bem como de temperatura (22° C). Tanto a ração (Labina) quanto a água filtrada foram oferecidas *ad libitum*. O projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (349/2016).

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais: (1) Sham - animais falsamente operados, os quais passaram pelo procedimento cirúrgico com exceção da TAC; (2) TAC - animais coarctados e submetidos à gavagem apenas com o veículo de administração do peptídeo; (3) TAC+Ala - animais coarctados e submetidos à administração de alamandina por via oral através de gavagem. Após a randomização dos animais, os mesmos foram submetidos aos procedimentos experimentais, conforme exposto na Fig. 6.

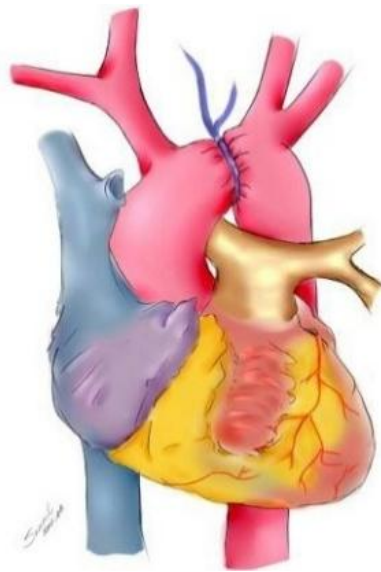


**Figura 4. Procedimentos experimentais e fluxograma de tempo.**

### **3.2 Indução do remodelamento da aorta ascendente**

A cirurgia de TAC foi um modelo originalmente desenvolvido para indução de hipertrofia ventricular esquerda (ROCKMAN *et al.*, 1991). A TAC gera um gradiente pressórico que provoca remodelamento na câmara ventricular esquerda, que pode culminar em falha cardíaca. Entretanto, nos últimos anos este modelo tem sido utilizado também para se estudar a relação entre sobrecarga pressórica e remodelamento vascular, em virtude da possibilidade de se avaliar alterações morfológicas e funcionais do vaso em resposta ao estresse biomecânico, no intuito de compreender os mecanismos que podem estar envolvidos na fisiopatologia das doenças da aorta torácica.

Para realização da TAC os animais foram previamente anestesiados com injeção intraperitoneal de ketamina (2,5%) e xilazina (0,2%) na dose de 150 mg/kg e 12 mg/kg, respectivamente, diluídas em salina estéril. Confirmada a anestesia, os animais foram submetidos à tricotomia da região anterior do tórax com uso de uma lâmina com posterior assepsia da região com uso de álcool 70%. Logo em seguida, foi realizada a intubação endotraqueal e, então, os animais foram mantidos sob ventilação mecânica do tipo VCV – ventilação controlada por volume, com volume corrente de 0,5 ml (ar ambiente) e frequência respiratória de 110 ipm. Para confirmação do sucesso da intubação, foi realizada a inspeção para análise da mobilidade torácica e ritmo respiratório do animal. A toracotomia foi iniciada com uma incisão à nível do segundo espaço intercostal esquerdo superior. O timo e o tecido adiposo foram delicadamente separados dos vasos da base, favorecendo a visualização da aorta transversa, que é localizada entre as artérias inominada e carótida esquerda. Após isto, foi utilizado um fio de sutura cardiovascular [7.0 TIL-CRON] para realização da constrição (Figura 6A e B). Durante esta etapa do procedimento cirúrgico, uma agulha de calibre 27 foi posicionada perpendicularmente ao vaso, a qual serviu de molde para determinar o grau de constrição promovida pelo fio após ser dado um nó duplo. Em seguida, a agulha foi retirada e a sutura foi realizada. Os animais do grupo Sham foram submetidos aos mesmos procedimentos acima descritos, exceto ao da constrição da aorta transversa. Após o procedimento cirúrgico, os animais foram acondicionados para recuperação e mantidos por 30 minutos em oxigênio medicinal (2 ml/min).



**Figura 5: Representação esquemática do modelo de constrição da aorta transversa (TAC).** A linha azul no esquema mostra o ponto de constrição da aorta transversa, que está entre a artéria inominada e a artéria carótida esquerda. O aumento do estresse biomecânico gerado pela diminuição do lúmen provoca alterações na parede vascular anterior à constrição, incluindo inflamação e fibrose.

### **3.3 Administração oral de alamandina**

A administração da alamandina foi iniciada três dias antes da realização da TAC, permanecendo até o 14<sup>o</sup> dia após a cirurgia. Os animais foram submetidos a uma dose de 30  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$  de alamandina incluída em HP $\beta$ CD [(2-Hidroxiopropil)- $\beta$ -ciclodextrina], administrada por via oral (gavagem). A diluição do complexo alamandina- HP $\beta$ CD foi calculada de forma que fosse administrado, no máximo, 1,5ml de solução para cada animal. Esta dose foi utilizada em virtude de dados prévios do nosso laboratório ainda não publicados.

### **3.4 Procedimentos de doppler e ecocardiografia**

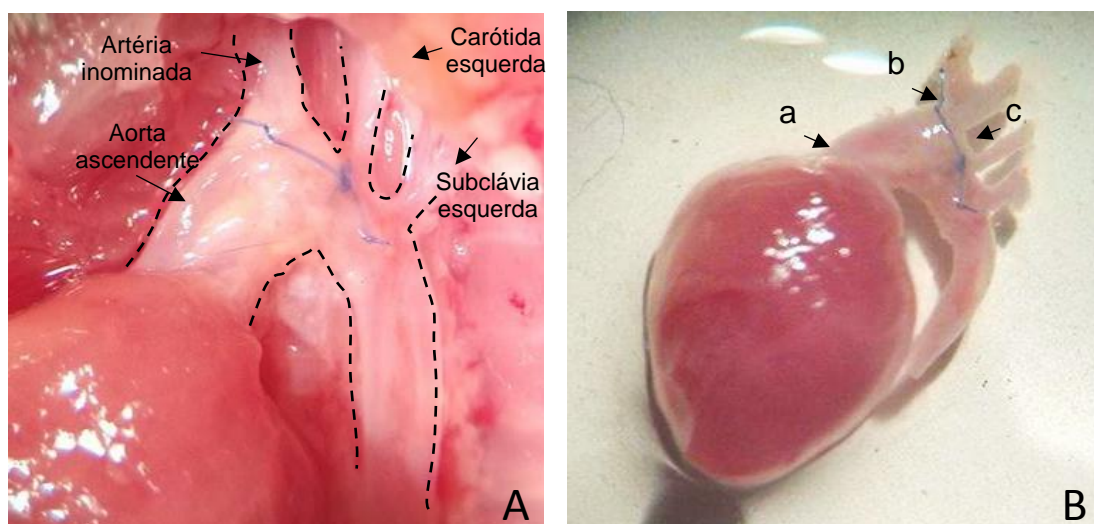
Para realização do Ecodoppler, os animais foram anestesiados com Isoflurano (5%) durante 1 minuto com uso de uma câmara de inalação, e mantidos anestesiados na dose de 1,25% de isoflurano durante o registro do Doppler. A região anterior do tórax foi submetida à tricotomia com o uso de creme depilatório.

A velocidade do fluxo sanguíneo na aorta ascendente, artéria inominada e artéria carótida esquerda foi gravada e as imagens foram então exportadas para o programa Sante DICOM Editor (SanteSodt LTD, Athens Greece) para análises

apresentadas. Para obtenção destes dados, foi utilizado um sistema de Ecodoplercardiografia de alta frequência e alta resolução que consiste em uma máquina de ultra-som VEVO 2100 equipado com um transdutor de 30-40 MHz bifrequencial (Visual Sonics, Toronto, Canadá).

### 3.5 Estudo histomorfométrico

Os animais foram anestesiados e, em seguida, foi realizada a abertura da caixa torácica com consequente perfusão do coração com 10 ml de solução salina com uso de seringa, que teve a agulha posicionada no interior do ventrículo esquerdo. Após isto, o tecido adiposo foi cuidadosamente retirado do arco aórtico. O coração e os vasos da base foram coletados e transferidos para uma placa de vidro contendo solução salina, onde a aorta ascendente foi removida. Os pontos anatômicos que funcionaram como o limite para o segmento aórtico utilizado para análise foram: (a) início da aorta ascendente, imediatamente após a valva semilunar; (b) imediatamente antes da artéria inominada; (c) anterior à constrição.



**Figura 6. Representação do processo de isolamento da aorta ascendente dos camundongos C57BL/6 submetidos à TAC.** (A) Arco aórtico já livre do timo e tecido adiposo, embora ainda ligado ao interior da caixa torácica dos camundongos. (B) As setas indicam os pontos utilizados como referência para delimitar a porção da aorta ascendente utilizada para análises histológicas.

Posteriormente, o fragmento aórtico de aproximadamente 3mm de comprimento foi embebido em Optimal Cutting Temperature (OCT) (Tissue Tek), e congelado em  $-20^{\circ}$  C. Com a utilização de um criostato (Leica CM1950) foram feitos

cortes transversais da aorta ascendente de 8 um de espessura, à -20° C, de forma que os cortes iniciaram sempre da extremidade proximal ao coração. A colocação dos cortes transversais nas lâminas polarizadas ocorreu de forma sequencial. Ao final da última lâmina por animal, eram desprezados 100 um e, então, seguiam-se os cortes a partir da primeira lâmina.

Para o estudo morfométrico, as lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E), seguindo o protocolo padrão. As imagens foram capturadas e gravadas com a utilização de uma câmera conectada ao microscópio de luz em duas ampliações. Com a utilização da objetiva de 40 x, os cortes transversais foram divididos em 4 quadrantes, sendo assim, capturadas uma imagem de cada um destes; uma imagem de todo o vaso também foi feita para cada corte transversal utilizando-se a objetiva de 10 x. Para análise das alterações morfométricas foram mensurados duas medidas para o cálculo da área de secção transversa vascular (ASTv), as quais foram o diâmetro maior e o diâmetro menor do corte, utilizando-se como limites a membrana elástica externa de um lado ao lado contralateral correspondente. Com a média destes dois diâmetros, obteve-se o valor do raio (r), para, então, ser calculada a área do círculo com a fórmula:  $A = \pi \cdot r^2$ . Seguiu-se o mesmo procedimento para mensurar a luz do vaso, entretanto, tendo como limites um bordo ao outro oposto do endotélio vascular. A diferença entre essas duas áreas foi utilizada para determinação da área da parede, que compreende as áreas das camadas média e íntima (NOGUEIRA, 2005)

### **3.6 Avaliação da deposição de colágeno total**

A análise da deposição de colágeno total na parede da aorta ascendente foi realizada através da coloração PicroSirius Red. Inicialmente, as lâminas contendo os cortes transversais hidratadas com água durante 5 minutos. Após isto, as lâminas foram incubadas durante 1 hora e 30 minutos em solução líquida contendo o PicroSirius Red diluído em ácido pícrico saturado. Na sequência, as lâminas foram incubadas em uma solução de HCl 0,01 % durante dois minutos. Finalmente, foram realizados os protocolos padrões de desidratação com álcoois de diferentes concentrações (álcool absoluto, 95 %, 85 % e 75 %) e xilol. As lâminas foram, então, seladas com Entellan e esmalte incolor. As imagens dos cortes corados com PicroSirius foram analisadas por microscopia óptica. Foram feitas 4 imagens de cada



um dos 6 cortes dispostos nas lâminas. Estas imagens foram quantificadas através do programa Image ProPlus 6.0. Foi analisada a região da imagem com tonalidades avermelhadas, cujo valor foi normalizado pela própria área selecionada automaticamente pelo *software*. Já para a análise da entropia (ondulação) das fibras de colágeno, foi utilizado o *plugin* OrientationJ, do programa ImageJ. Foram também feitas imagens representativas com uso de um filtro polarizador, que foi acoplado ao microscópio. Nestas imagens é possível observar o colágeno presente na parede vascular, de forma que as tonalidades avermelhadas, alaranjadas e amareladas, correspondem às fibras grossas, enquanto que as fibras finas são aquelas que aparecem em coloração esverdeada.

### **3.7 Análise da disposição das fibras elásticas**

As lâminas corada com H&E foram levadas ao microscópio para análise qualitativa da disposição das fibras de elastina através da sua própria autofluorescência. Para isto, foi utilizado o microscópio confocal Zeis 510 Meta equipado com o filtro GFP (480 nm). Foram analisados 6 cortes transversais por cada animal.

### **3.8 Ensaio de imunofluorescência**

Para realização da imunofluorescência, as lâminas foram inicialmente fixadas com acetona gelado, durante 15 minutos. Após isto, as mesmas foram lavadas com solução de BSA 1%. Em seguida, foi realizado o bloqueio com uma solução de BSA 3% diluído em PBS 1 x com 0,1 % de Triton-X durante 30 minutos. Após nova lavagem com BSA 1 %, foram incubados os seguintes anticorpos primários: anti-MMP-2 (1:450), anti-MMP-9 (1:350) e anti-MrgD (1:300). Os anticorpos foram diluídos na mesma solução de bloqueio, e incubados em câmara úmida à 4° C, durante 16 h. Após lavagem no dia seguinte, os anticorpos secundários foram adicionados na diluição de 1:200 por 1 hora em uma temperatura de 37° C. Em seguida foi utilizado o DAPI (Vector Laboratories) para coloração dos núcleos. As lâminas foram seladas com esmalte incolor e as imagens foram capturadas com o uso do microscópio APOTOME. A quantificação da intensidade de fluorescência nas imagens capturadas

foi realizadas através do programa Image J. Este parâmetro foi normalizado pela área selecionada durante a quantificação.

### **3.9 Quantificação da atividade gelatinolítica total através da zimografia *in situ***

A zimografia *in situ* foi realizada para que fosse analisada a atividade total das MMPs. Para isto, os cortes transversais da aorta foram incubados com PBS em temperatura ambiente durante 10 minutos. Em seguida, o PBS foi retirado e as lâminas foram incubadas com DQ Gelatin (E12055, Molecular Probes, Oregon 411, USA), em uma diluição de 50ug/ml em câmara úmida e escura em temperatura ambiente, por 16 horas. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS e fixadas com PFA 4% durante 10 minutos. Após nova lavagem, as lâminas foram seladas com uso de Fluoromount e as imagens foram capturadas com o uso do microscópio APOTOME, equipado com o filtro com comprimento de onda de excitação de 488 nm. Foram feitas 4 imagens de dois cortes transversais escolhidos aleatoriamente, somando um total de 8 imagens por animal. A intensidade de luz por área de imagem foi quantificada através do programa ImageJ.

### **3.10 Mensuração de EROs em cortes congelados de aorta**

O corante fluorescente oxidativo dihidroetídio (DHE) foi utilizado para avaliar a produção de EROs (BRAGA, 2015). Cortes transversais de aorta foram inicialmente incubados a 37° C por 10 minutos com PBS 1 x. Após isto, as lâminas foram novamente incubadas, mas desta vez com DHE (10 µM) em câmara escura, úmida e protegida da luz, com temperatura de 37° C, durante 30 minutos. As lâminas de controle negativo receberam a mesma quantidade de tampão sem o DHE. Após este período, as imagens foram capturadas com o uso do microscópio APOTOME, equipado com filtro no comprimento de onda 545 nm, usando a objetiva de 40x. Foram feitas 4 imagens de dois cortes transversais escolhidos aleatoriamente. A densidade integrada da fluorescência emitida pelos produtos da oxidação do DHE em uma determinada área foi quantificada através do programa ImageJ.

### **3.11 Avaliação da expressão de RNAm por qRT-PCR**

Após o sacrifício dos animais, a aorta ascendente foi retirada para análise de expressão gênica. Estas amostras foram coletadas em RNA Later, e permaneceram nesta solução por 24h. Após isto, as mesmas foram armazenadas em freezer (-80° C) para prevenir a degradação do RNA. A extração do RNA total foi realizada com Trizol (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA) e a purificação para se evitar contaminação com DNA genômico utilizando-se a DNaseI Amplification Grade (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA). A quantificação do RNA foi realizada através de espectrofotômetro (NanoDrop® ND-1000, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA ) e a razão 260/280 foi superior a 1,8. Para o RT-PCR foi utilizado 1 ug de RNA e a enzima MMLV (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA) seguindo-se todas as especificações do fabricante. O programa utilizado no termocilador foi o seguinte: - 25° C por 10 min, - 37° C por 50 min, - 80° C por 10 min - 4° C (tempo infinito). As amostras de cDNA foram então armazenadas em -20° C até a realização do qPCR. O cDNA foi diluído 50 x (concentração final de 40 ng) e utilizado 2,2 ul por reação (volume final de 5 ul). Para o qPCR foi utilizado SYBR green qPCR Master Mix (Qiagen, Hilden, Alemanha), a máquina ViiA7 (Applied Biosystems, Foster City, Ca, USA). Todos os iniciadores foram previamente padronizados sendo verificadas tanto a curva padrão quanto a curva de dissociação. A sequência dos iniciadores utilizados estão expostos na tabela 2, exposta a seguir.

**Tabela 2.** Sequência dos iniciadores utilizados

Gene	Sequência
AT1_FW	5'- ATGGCTGGCATT TTTGTCTGG -3'
AT1_RV	5'- GTTGAGTTGGTCTCAGACAC -3'
CCL2_FW	5'-TTAAAAACCTGGATCGGAACCAA -3'
CCL2_RV	5'-GCATTAGCTTCAGATTTACGGGT -3'
CD206_FW	5'- CATGAGGCTTCTCCTGCTTCTG -3'
CD206_RV	5'- TTGCCGTCTGAACTGAGATGG -3'
Colágeno I_FW	5' - CTTACCTACAGCACCC TTGTG -3'
Colágeno I_RV	5'- GATGACTGTCTTGCCCCAAGTT -3'
Colágeno III_FW	5'- GGTGGTTTTTCAGTTCAGCTATGG -3'
Colágeno III_RV	5'- CTGGAAAGAAGTCTGAGGAATGC -3'
FIZZ_FW	5'- CCCTCCACTGTAACGAAGACTC -3'
FIZZ_RV	5'- CACACCCAGTAGCAGTCATCC -3'
GAPDH_FW	5' - TGCGACTTCAACAGCAACTC -3'
GAPDH_RV	5' - ATGTAGGCCATGAGGTCCAC -3'
IL-1 $\beta$ _FW	5'- GCAACTGTTCTGAACTCAACT -3'
IL-1 $\beta$ _RV	5'- ATCTTTTGGGGTCCGTC AACT -3'
TGF- $\beta$ 1_FW	5'- GAAAGCCCTGTATTCCGTCTCCTT -3'
TGF- $\beta$ 1_RV	5'- CAACAATTCCTGGCGTTACCTTGG -3'
TNF- $\alpha$ _FW	5'- CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA -3'
TNF- $\alpha$ _RV	5'- TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC -3'
YM-1_FW	5'- GGGCATCCTTTATCCTGAG -3'
YM-1_RV	5'- CCACTGAAGTCATCCATGTC -3'

### 3.12 Análise estatística

Os dados foram expressos como a média dos valores quantificados  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Foi realizado teste de normalidade e as diferenças estatísticas entre os grupos foi feita pela análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo pós-teste de Newman Kewls. Foi realizado o teste *t* de Student não pareado para análise das variáveis hemodinâmicas. Diferenças estatísticas foram consideradas quando  $p < 0,05$ . Para isto, foi utilizado o programa GraphPrism.

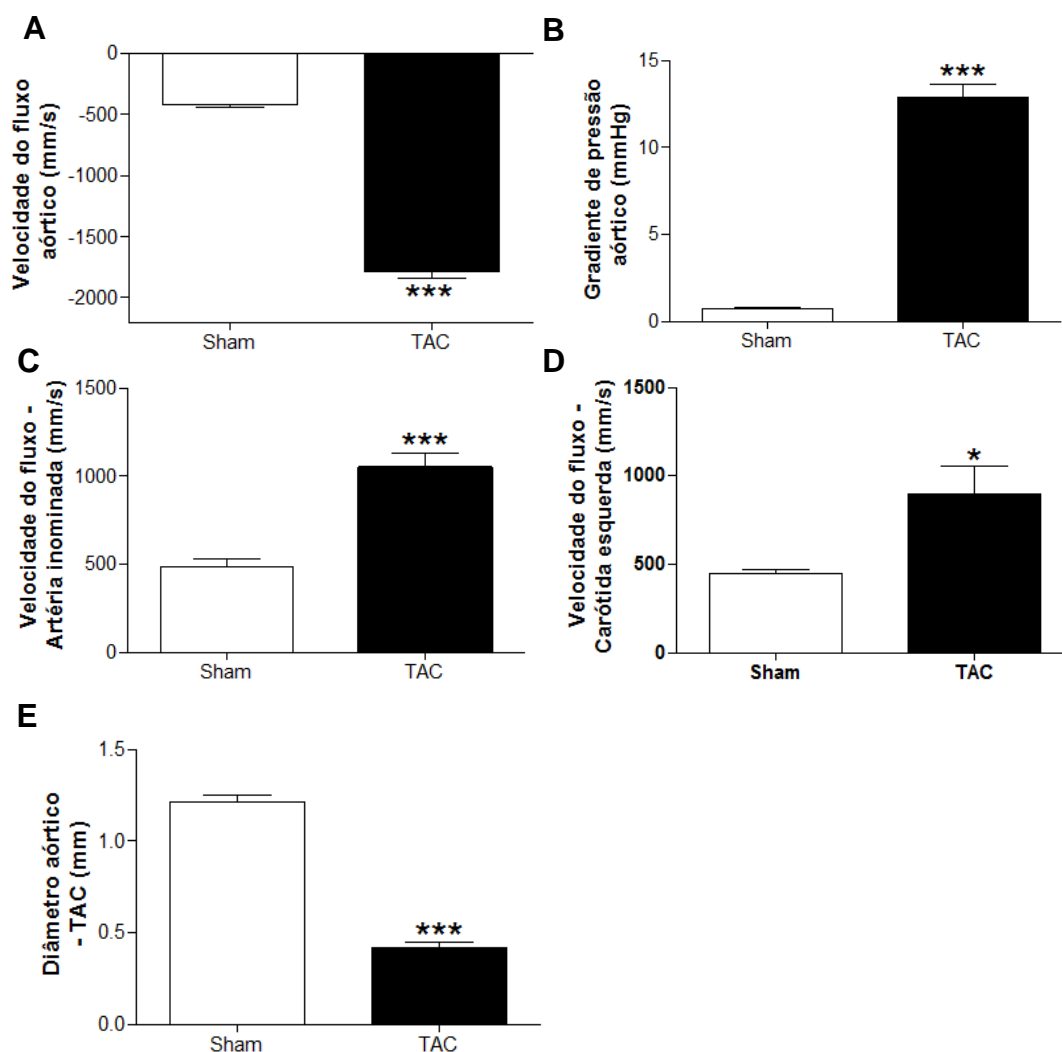
## 4. RESULTADOS

### 4.1 A cirurgia de constrição da aorta transversa (TAC) induz alterações hemodinâmicas no arco aórtico

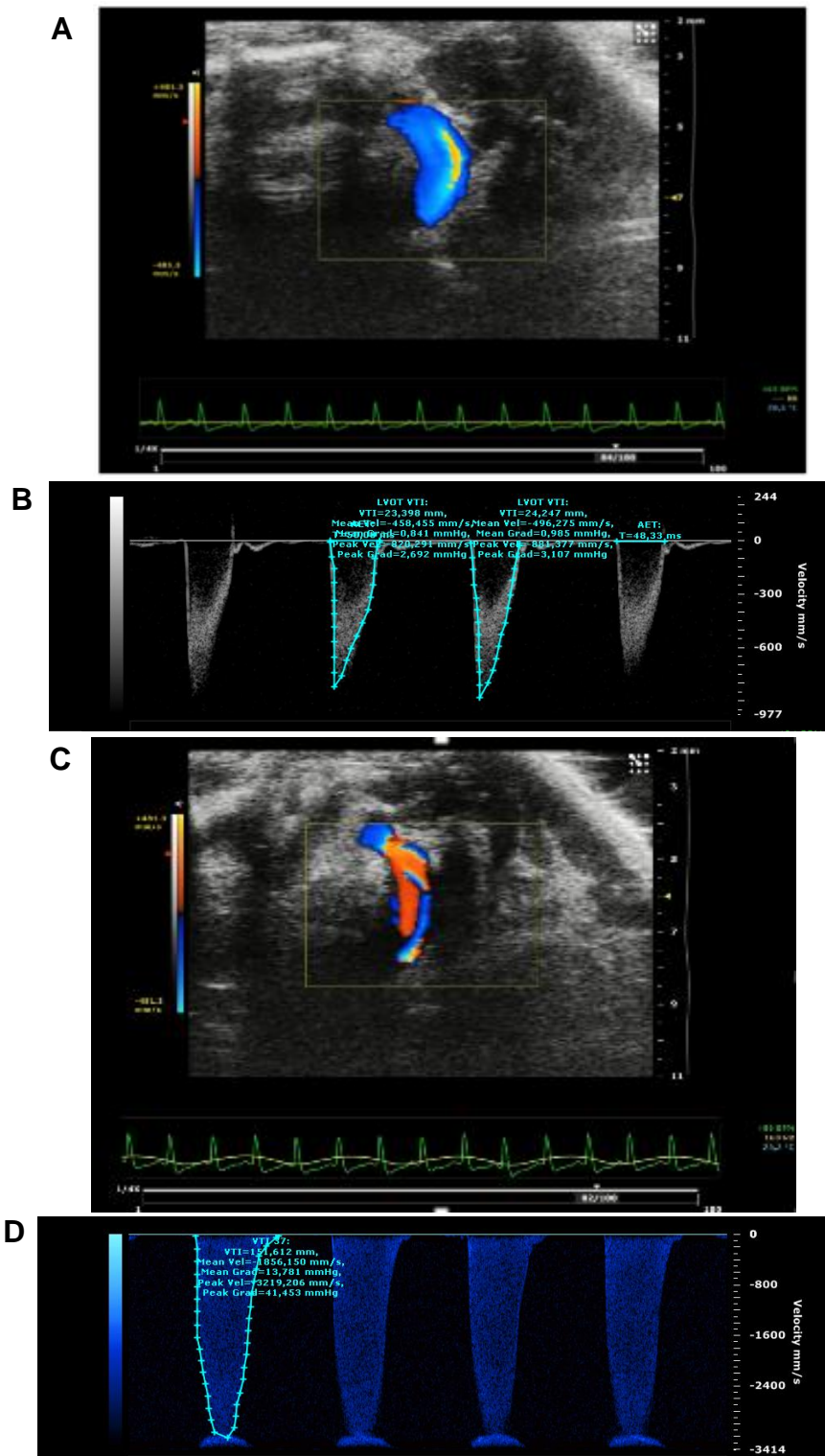
Com o intuito de avaliar a eficácia da TAC e confirmar a efetividade do modelo, foi realizado o Doppler para análise das repercussões hemodinâmicas e magnitude da constrição do mesmo. Conforme pode ser visualizado na Figura 7A, a TAC gerou uma velocidade do fluxo aórtico cerca de 3 x maior ( $-1791,00 \pm 51,82$  mm/s), assim como um gradiente de pressão aórtico também também superior ( $12,90 \pm 0,73$  mmHg) (Figura 7B), quando comparado aos animais do grupo Sham ( $-417,40 \pm 23,80$  mm/s e  $0,71 \pm 0,07$  mmHg, respectivamente). O aumento do fluxo também foi observado para as artérias inominada ( $1045,00 \pm 83,09$  mm/s) (Figura 7C) e carótida esquerda ( $895,70 \pm 162,60$  mm/s) (Figura 7D), quando comparados aos animais do grupo Sham ( $488,30 \pm 40,13$  mm/s;  $444,60 \pm 27,38$  mm/s, respectivamente).

Conforme o esperado, a TAC promoveu uma diminuição significativa do diâmetro desta porção da aorta, que foi, em média, de 66,6% (Sham  $1,21 \pm 0,05$  vs TAC  $0,41 \pm 0,03$  mm) (Figura 7F).

Em animais do grupo Sham, o fluxo aórtico foi do tipo laminar, caracterizado nas imagens obtidas através do doppler pela cor azul, com pontos de pequeno turbilhonamento apenas próximo das bifurcações presentes no arco aórtico (Figura 8B). Já nos animais do grupo TAC, observa-se um padrão de fluxo com colorações avermelhadas, indicando um fluxo turbilhonar intenso (Figura 8D). Além disto, foi possível observar através das imagens representativas o aumento da velocidade do fluxo aórtico induzida pela TAC quando comparado com grupo Sham (Figuras 8C e A, respectivamente).



**Figura 7. Alterações hemodinâmicas induzidas pela TAC na aorta, artéria inominada e carótida esquerda.** Gráficos de barra mostram a velocidade do fluxo sanguíneo aórtico (A), gradiente de pressão aórtico (B), velocidade do fluxo na artéria inominada (C), velocidade do fluxo na artéria carótida esquerda (D), e o diâmetro do ponto da aorta transversa submetido à coarctação (E) duas semanas após a TAC. Os valores representam a média ± EPM. \*  $p < 0,05$  e \*\*\*  $p < 0,0001$  em relação ao grupo Sham. Resultados representam os grupos Sham (n=8) e TAC (n=7).



**Figura 8.** Imagens representativas das alterações vasculares hemodinâmicas provocadas pela TAC em camundongos. Representação do padrão e da velocidade do fluxo aórtico em animais Sham (n=8) (A-B, respectivamente), e em animais submetidos à TAC (n=7) (C-D).

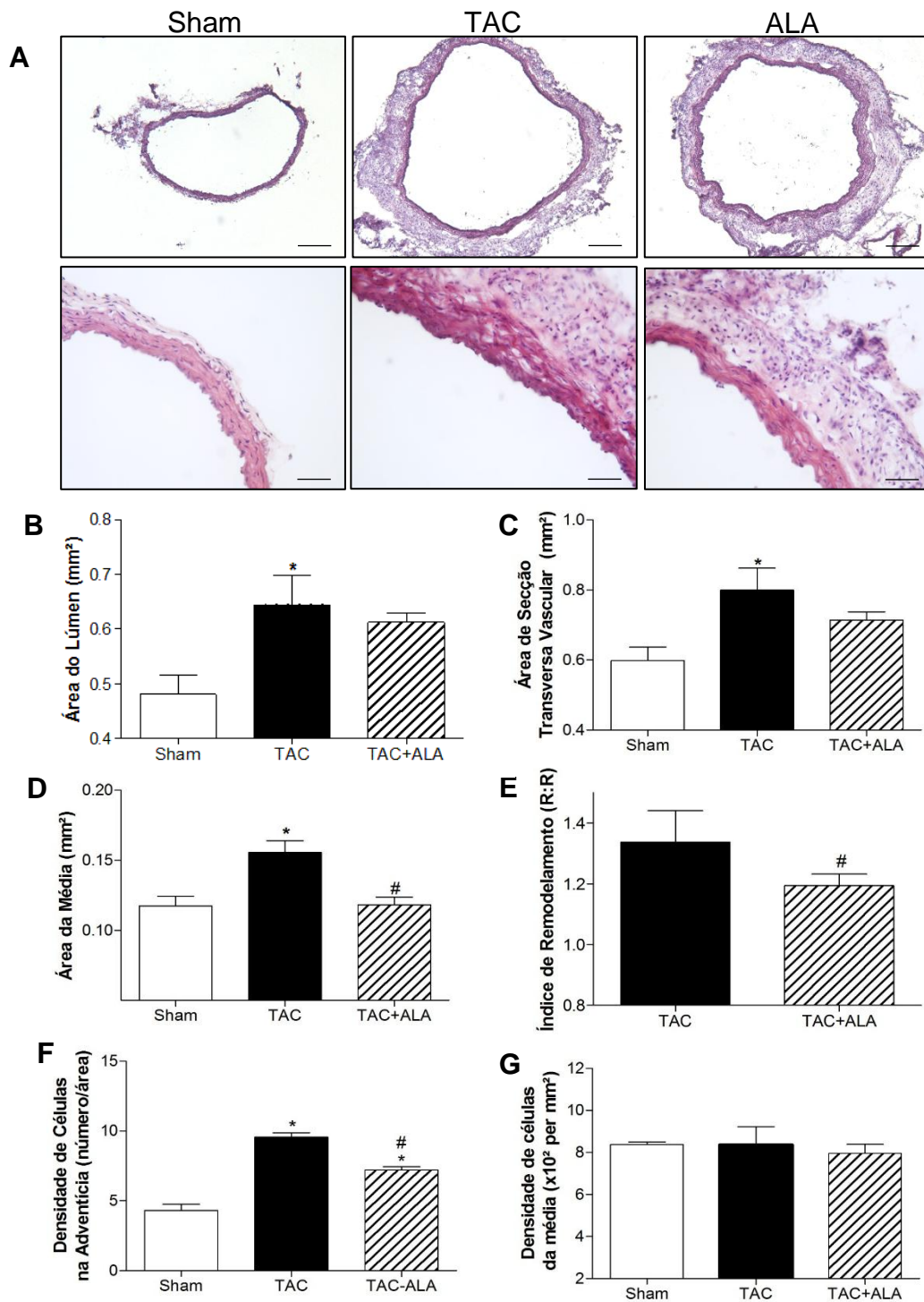
## 4.2 A administração oral de alamandina reduz o remodelamento vascular induzido pela TAC

O remodelamento vascular foi avaliado após a coloração da aorta ascendente com H&E. Análises histológicas mostraram que a TAC induziu um remodelamento vascular positivo após duas semanas, o qual é caracterizado pelo aumento da área de secção transversa e do lúmen (TAC  $0,80 \pm 0,06$  e  $0,64 \pm 0,05$  vs Sham  $0,60 \pm 0,04$  e  $0,48 \pm 0,03$  mm<sup>2</sup>, respectivamente) (Figuras 9A, B e C). Além disto, a TAC provocou aumento da camada média da aorta ascendente (TAC  $0,1554 \pm 0,01$  vs Sham  $0,12 \pm 0,01$  mm<sup>2</sup>) (Figura 9D). Este efeito foi revertido em animais submetidos à administração de alamandina ( $0,12 \pm 0,01$  mm<sup>2</sup>). Adicionalmente, a administração oral de alamandina reduziu a razão de remodelamento vascular ( $1,19 \pm 0,04$ ), quando comparado aos animais do grupo TAC ( $1,34 \pm 0,10$ ) (Figura 9E).

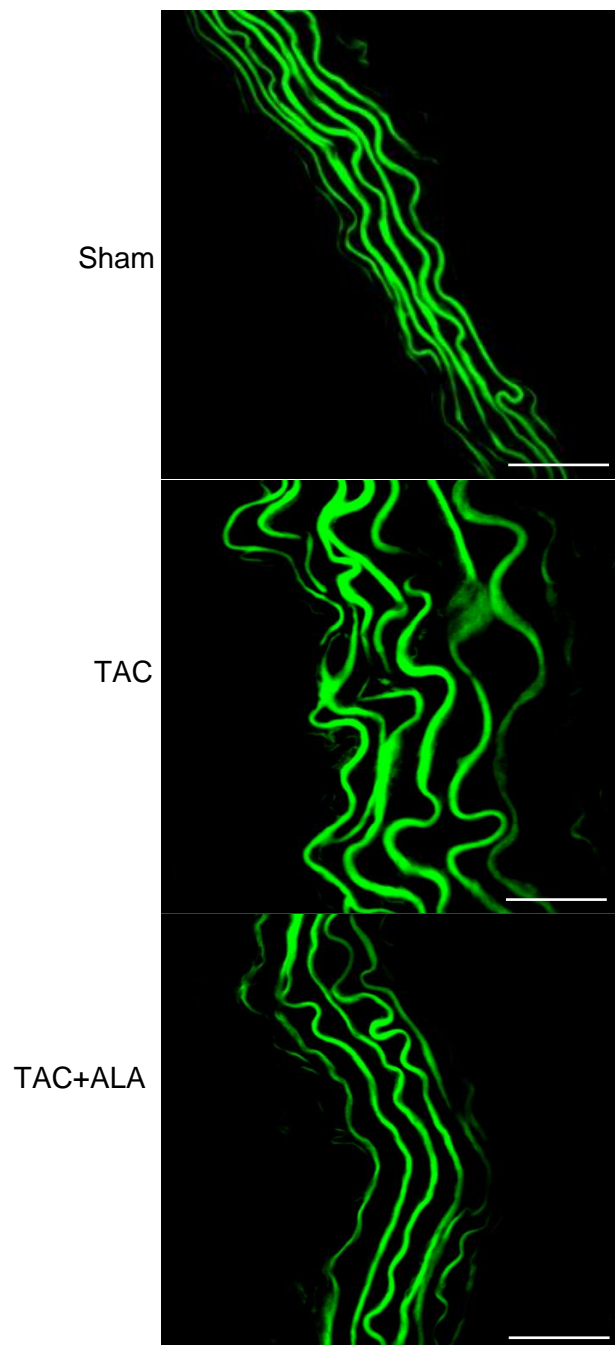
As alterações morfométricas na parede vascular provocadas pela TAC podem ocorrer por diversos motivos. Dentre eles, está o aumento do número de células que compõe as diferentes camadas vasculares. Sendo assim, foi analisada a densidade de células na túnica média e adventícia. Não foram observadas diferenças entre os grupos na densidade de células na túnica média (Figura 9G). Entretanto, como observado na figura 9F, a TAC gerou um aumento importante desse parâmetro na adventícia ( $9,56 \pm 0,31$  número/área), o qual foi atenuado pela administração de alamandina ( $7,20 \pm 0,22$ ).

Como os vasos do grupo TAC apresentaram um aumento na área da camada média, sem alterar de forma significativa o número de células nessa mesma porção do vaso, foi avaliada de forma qualitativa a disposição das fibras de elastina entre os grupos. De fato, a TAC por 2 semanas promoveu alteração no distanciamento entre as fibras de elastina, o qual foi atenuado com a administração da alamandina (Figura 10).





**Figura 9. Efeitos da TAC e da administração oral de alamandina nas alterações morfométricas e remodelamento da parede vascular aórtica. (A)** Imagens representativas de cortes transversais da aorta ascendente coradas com Hematoxilina e Eosina. Imagens superiores e inferiores foram capturadas com a objetiva de 4x e 40x, respectivamente. Gráficos de barra representam a quantificação da área do lúmen (**B**), área de secção transversa vascular (**C**), área da camada média (**D**), índice de remodelamento (**E**), densidade de células da camada adventícia (**F**) e da camada média (**G**). Os valores representam a média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo Sham e #  $p < 0,05$  em relação ao grupo TAC. Resultados representam os grupos Sham (n=5), TAC (n=6) e TAC+ALA (n=7).

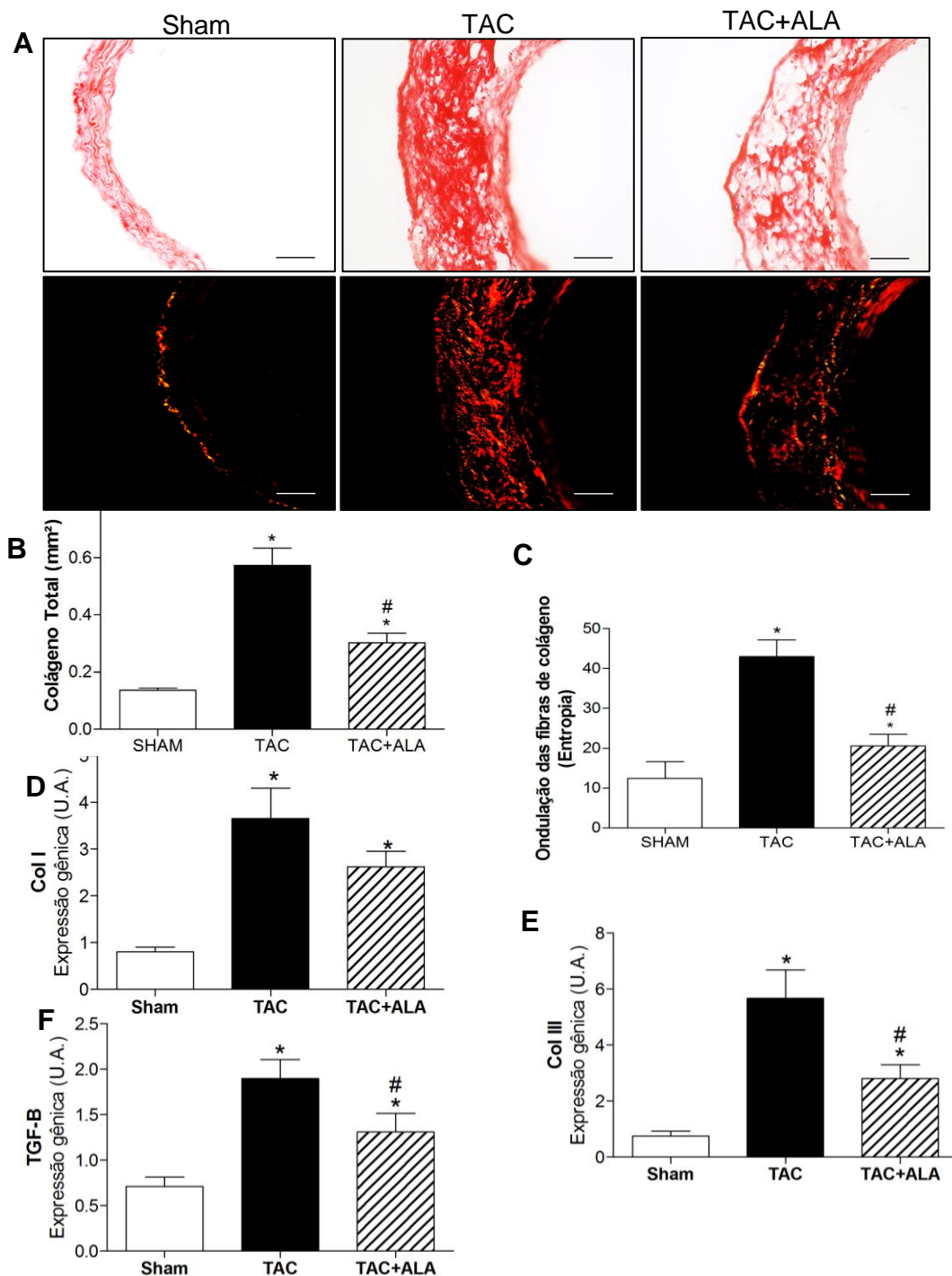


**Figura 10. Efeitos da TAC e da administração oral de almandina na disposição das fibras de elastina da camada média da aorta ascendente.** As imagens foram capturas através de microscopia confocal utilizando-se um filtro com comprimento de onda de 488 nm e objetiva de 63x, no qual pode ser observada a autofluorescência da elastina. Setas brancas indicam os pontos de maior distanciamento entre as fibras elásticas nas imagens apresentadas. Imagens representativas dos grupos Sham (n=5), TAC (n=6) e TAC+ALA (n=7).

### **4.3 A administração oral de alamandina atenua a fibrose na parede vascular induzida pela TAC**

A quantificação da deposição de colágeno total na parede da aorta ascendente através da coloração com PicroSirius Red, indicou um aumento no conteúdo de colágeno no grupo TAC ( $0,57 \pm 0,06 \text{ mm}^2$ ), quando comparado ao grupo Sham ( $0,14 \pm 0,01 \text{ mm}^2$ ). Já o grupo submetido à administração oral de alamandina apresentou uma atenuação na quantidade de colágeno total ( $0,30 \pm 0,03 \text{ mm}^2$ ), como pode ser observado nas Figuras 11 A e B. Foi realizado também o qRT-PCR para análise do mRNA das isoformas do colágeno I e III. Assim como na deposição do colágeno total, a administração oral de alamandina atenuou o aumento da expressão gênica do colágeno tipo III induzida pela TAC. Entretanto, este efeito não ocorreu para o colágeno tipo I. Além disso, foi analisada a disposição espacial (entropia) das fibras de colágeno. Como pode ser observado na Figura 11C, a TAC promoveu um aumento na ondulação das fibras de colágeno ( $42,96 \pm 4,26$ ), quando comparado com grupo Sham ( $12,41 \pm 4,20$ ), e a administração oral de alamandina atenuou esse efeito ( $20,60 \pm 2,93$ ).

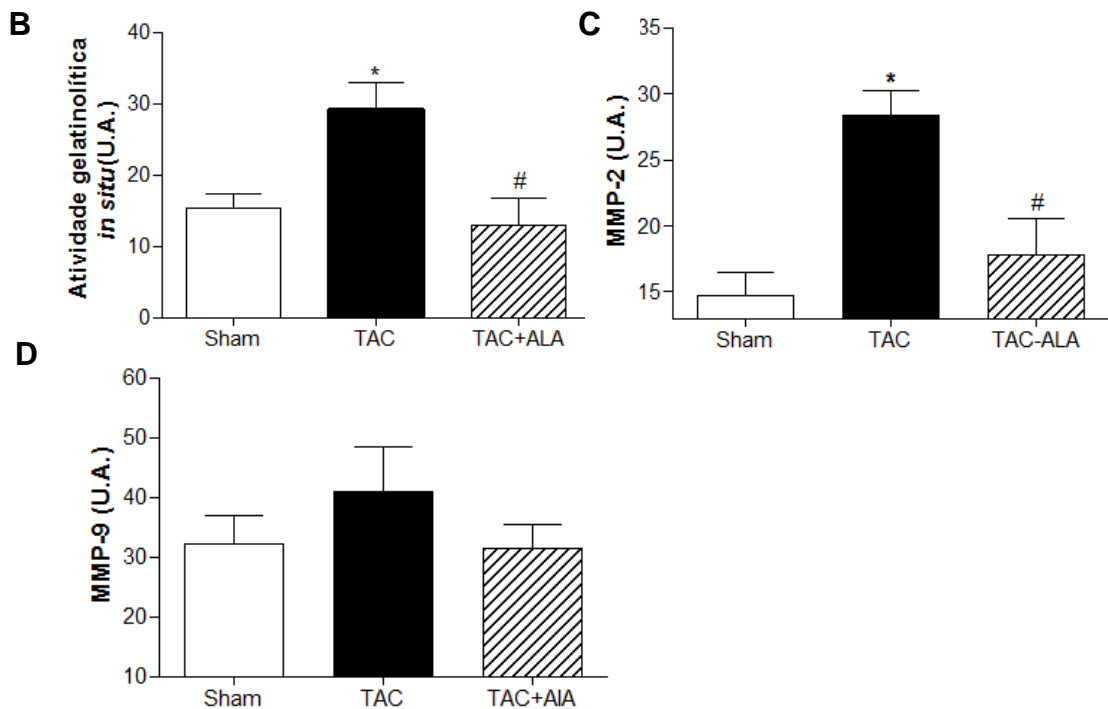
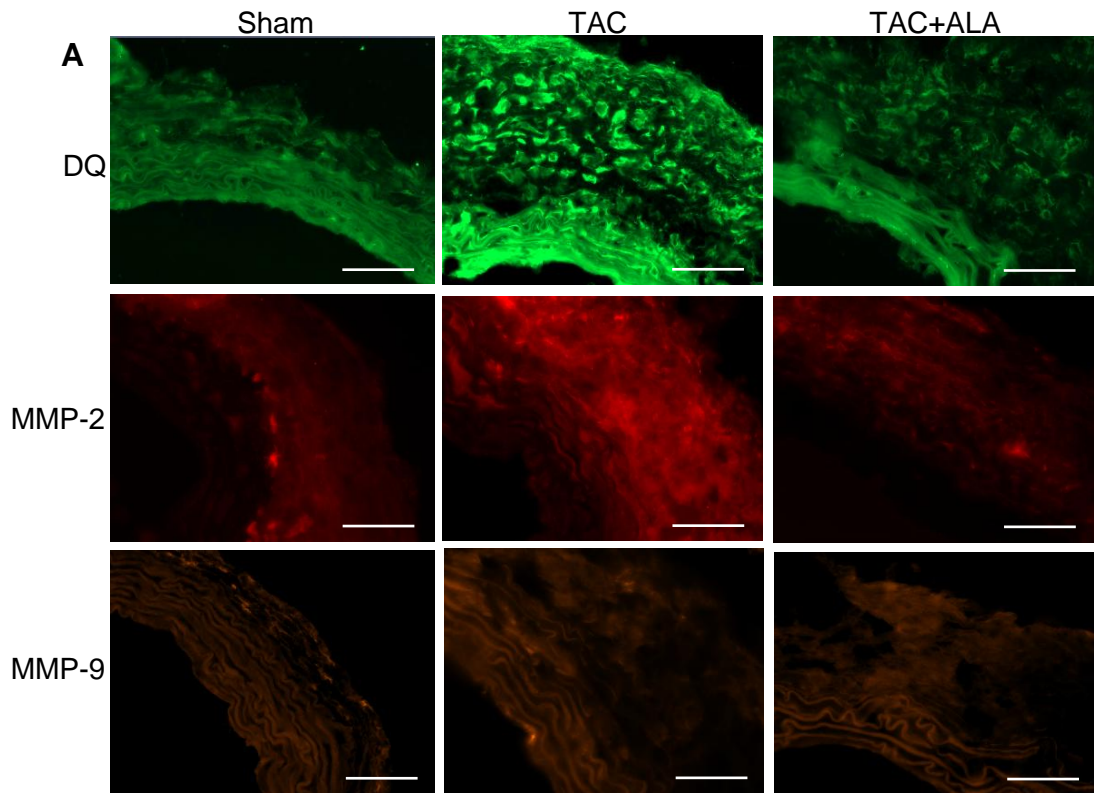
Sabendo que a diferenciação de fibroblastos e a fibrose na parede vascular pode ser mediado pela sinalização do TGF- $\beta$ , avaliamos também a expressão gênica do mesmo em resposta à TAC e à administração com alamandina. Nossos resultados demonstram que alamandina atenuou também o aumento da expressão gênica de TGF- $\beta$  induzido pela TAC ( $1,90 \pm 0,21$  vs  $1,31 \pm 0,20$  U.A.)



**Figura 11. Efeitos da TAC e da administração oral de alaminadina no conteúdo de colágeno na aorta ascendente.** Imagens representativas de cortes transversais da aorta ascendente coradas com PicroSirius Red iluminadas com luz branca (painel superior) e polarizada (painel inferior), capturadas com a objetiva de 40x (A). Gráficos de barra representam a quantificação do colágeno total (B), quantificação da ondulação das fibras de colágeno realizada através do *plugin* OrientationJ, do programa ImageJ (C) e expressão gênica do mRNA para colágeno I (D) e colágeno III (E). Os valores representam a média ± EPM. \*  $p < 0,05$  grupo vs Sham; #  $p < 0,05$  grupo vs TAC. Resultados representam os grupos Sham (n=7), TAC (n=6) e TAC+ALA (n=7).

#### **4.4 A administração oral de alamandina reduz a atividade total de MMPs e expressão de MMP-2 induzidas pela TAC**

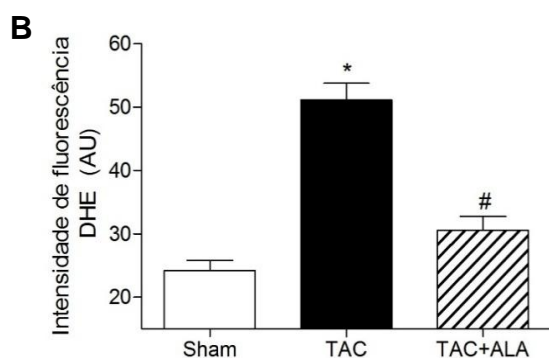
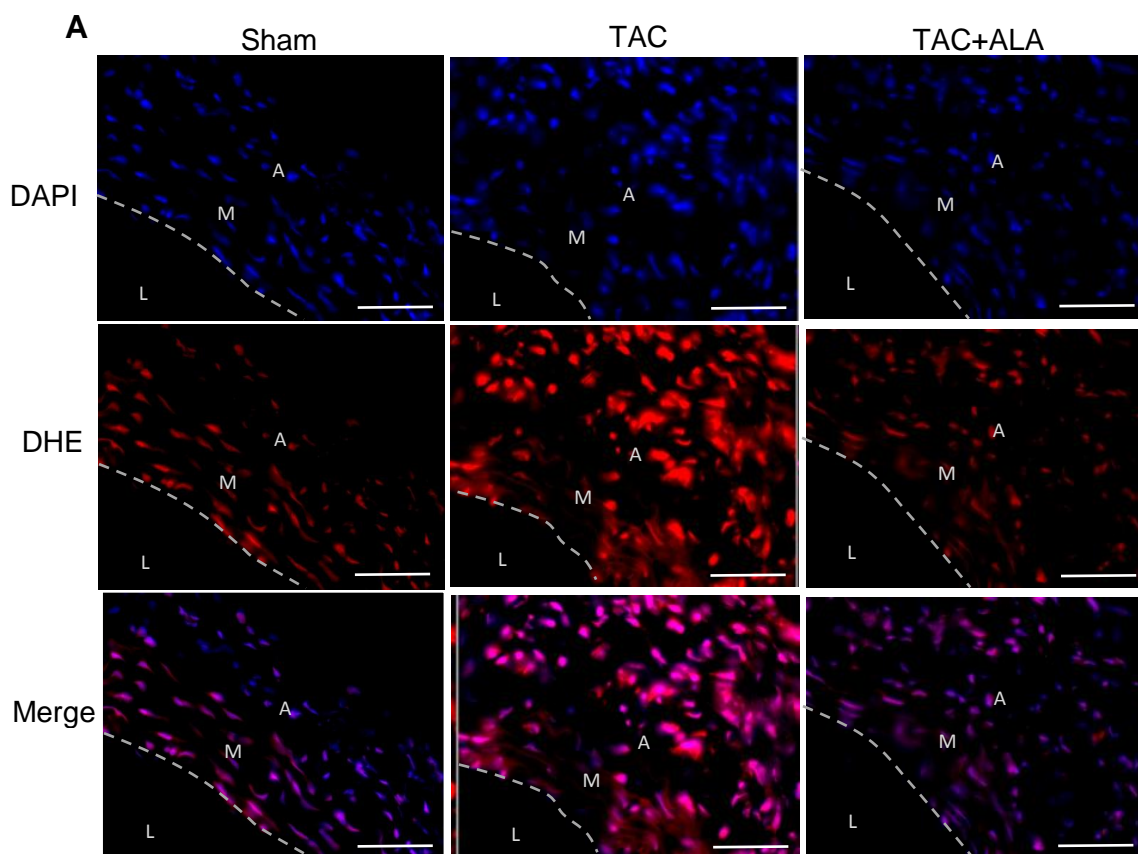
Foi avaliada a atividade gelatinolítica total da parede vascular através da zimografia *in situ*. Os resultados mostraram que a TAC induziu aumento da atividade gelatinolítica total (TAC  $15,34 \pm 2,00$  vs Sham  $29,18 \pm 3,82$  U.A.), especialmente na túnica média e adventícia, e tratamento com alamandina reduziu a mesma ( $12,88 \pm 3,91$  U.A.) (Figura 12A; painel superior em verde e Figura 12D). Com intuito de investigar qual MMP estaria envolvida no aumento da atividade gelatinolítica, avaliou-se a expressão das MMP-2 e MMP-9 no tecido vascular através de imunofluorescência. De forma interessante, a expressão proteica da MMP-2 foi detectada majoritariamente na túnica média e adventícia, com aumento importante provocado pela TAC nestas camadas (TAC  $28,36 \pm 1,88$  vs Sham  $14,67 \pm 1,86$  U.A.). (Figura 12A; painel do meio em vermelho e Figura 12B). Os resultados mostraram que a administração oral de alamandina reduziu este aumento a níveis similares aos do grupo Sham ( $17,79 \pm 2,73$  U.A.). Em relação a MMP-9, o sinal de imunofluorescência desta isoforma foi ligeiramente fraco e em contraste com a MMP-2, não foi observado diferenças significativas entre os grupos estudados.



**Figura 12.** Efeitos da TAC e da administração oral de alamandina na atividade gelatinolítica de MMPs e na expressão de MMP-2 e -9 na aorta ascendente. Paineis com imagens representativas da zimografia *in situ* e imunofluorescência (A). Quantificação para atividade gelatinolítica (zimografia *in situ*) (B), expressão de MMP-2 (C) e para expressão de MMP-9 (D). Os dados foram expressos em média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  grupo vs Sham; #  $p < 0,05$  grupo vs TAC. Resultados representam os grupos Sham (n=4), TAC (n=6) e TAC+ALA (n=7).

#### 4.5 Administração oral de alamandina reduz a produção EROs induzida pela TAC

A fluorescência emitida pelo DHE mostrou que a TAC aumenta a produção de EROs na túnica média e adventícia da aorta ascendente (TAC  $51,12 \pm 2,64$  vs Sham  $24,19 \pm 1,60$  U.A.), que foi reduzida pela administração de alamandina ( $30,55 \pm 2,197$  U.A.) (Figuras 13A e B).



**Figura 13. Efeitos da TAC e da administração oral de alamandina na produção EROs na aorta ascendente.**

Painel com imagens representativas de cortes transversais de aorta ascendente corados com dihidroetidium (DHE) (A).

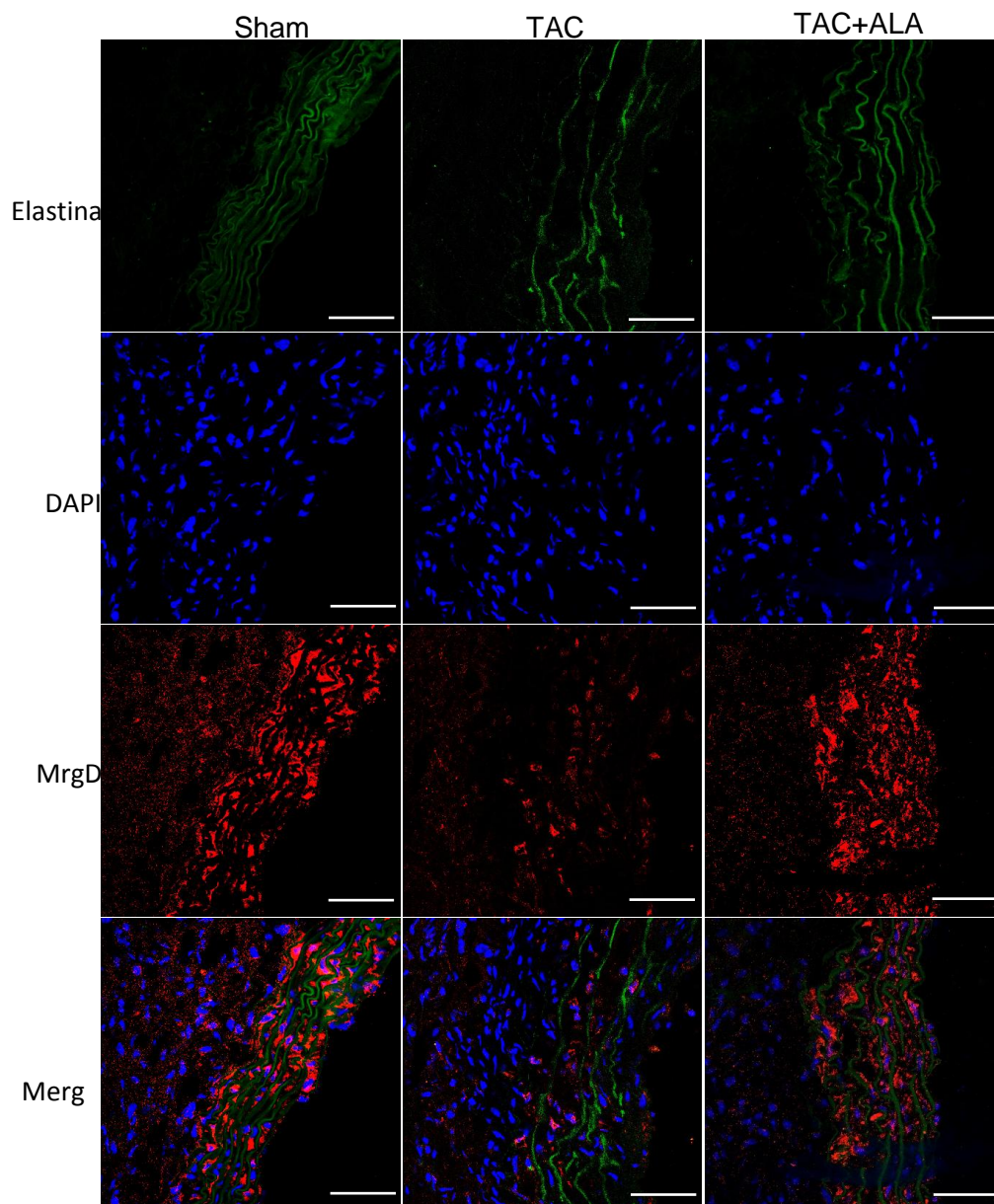
Gráfico de barras que mostra a produção

de EROs mensurada através da intensidade de fluorescência emitida pelo DHE (B). Os dados foram expressos em média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  grupo vs Sham; #  $p < 0,05$  grupo vs TAC. Resultados representam os grupos Sham (n=4), TAC (n=6) e TAC+ALA (n=7).

#### **4.6 A administração oral de alamandina modula a alteração da expressão dos receptor MrgD na aorta ascendente provocada pela TAC.**

A expressão e localização do receptor MrgD na aorta ascendente foi analisada através de imunofluorescência. Foi observado em animais Sham que o receptor MrgD é expresso em toda extensão da parede vascular, desde endotélio até a camada adventícia, tendo uma expressão mais pronunciada na túnica média (Figura 14B). Em resposta à TAC, foi observada uma diminuição da expressão do receptor nas três camadas vasculares, especialmente na túnica média. Entretanto, a administração de alamandina modula este efeito provavelmente impedindo que a parede vascular sofra redução da expressão deste receptor.





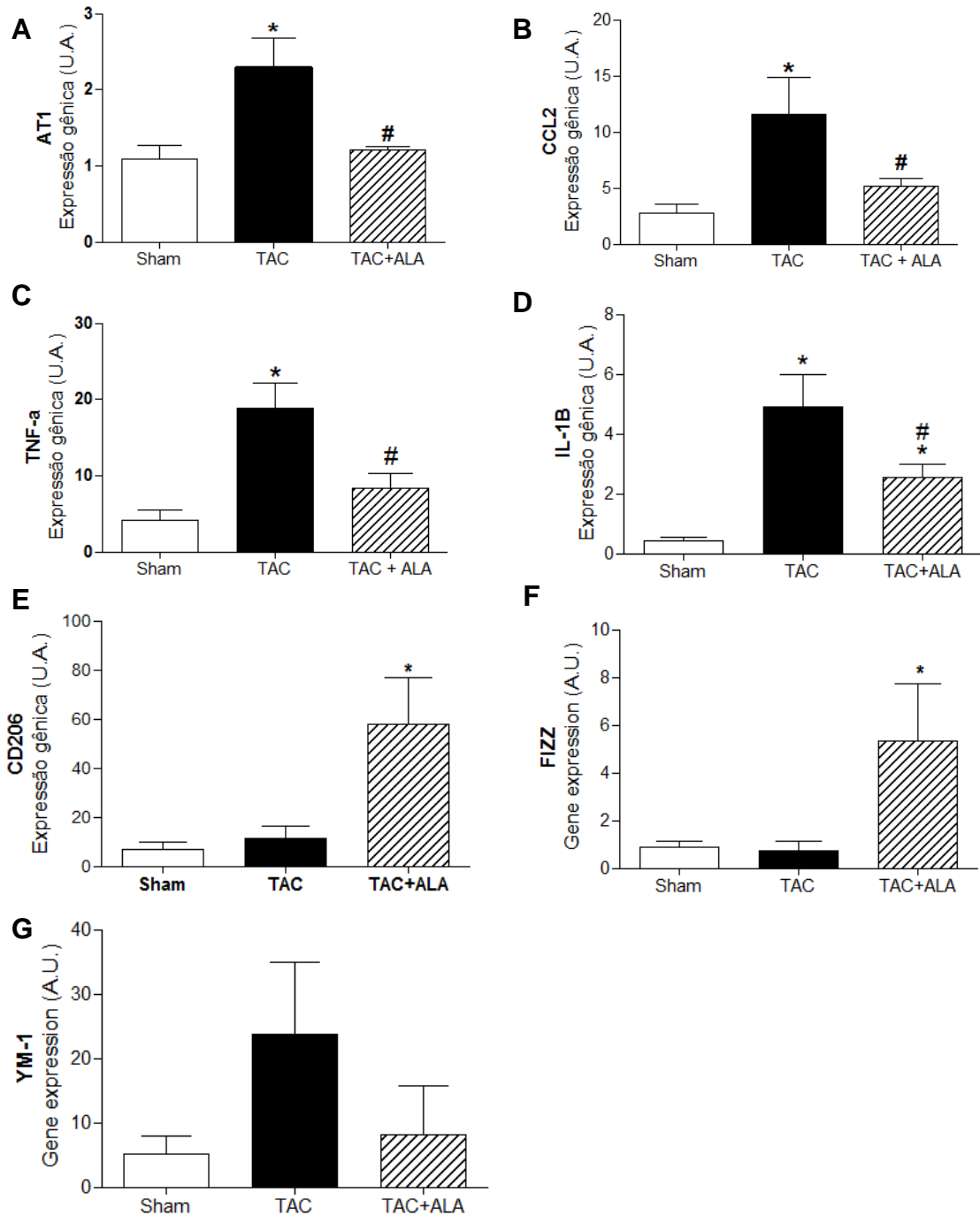
**Figura 14. Efeitos da TAC e da administração oral de alamandina na expressão do receptor MrgD na aorta ascendente.** Imagens representativas da imunofluorescência para expressão e localização do receptor MrgD na aorta ascendente. As imagens foram capturas através de microscopia confocal utilizando-se objetiva de 63 x. Resultado representa os grupos Sham (n=4), TAC (n=6) e TAC+ALA (n=7).

#### **4.7 A administração oral de alamandina modula as alterações da expressão do receptor AT1 e de genes relacionados à inflamação provocadas pela TAC.**

A expressão do mRNA para o receptor AT1 foi analisado através do qRT-PCR. Como observado na Figura 14A, a TAC induziu aumento da expressão gênica do AT1 (TAC  $2,29 \pm 0,39$  vs Sham  $1,09 \pm 0,17$  U.A.) e a administração oral de alamandina reduziu este aumento para níveis similares ao grupo Sham ( $1,205 \pm 0,04$  U.A.).

Nós também analisamos a expressão de um conjunto de genes relacionados à inflamação. Os resultados mostraram que a TAC induz o aumento da expressão gênica dos seguintes fatores pró-inflamatórios: CCL2 (TAC  $11,60 \pm 3,27$  vs Sham  $2,76 \pm 0,812$  U.A.), TNF- $\alpha$  (TAC  $18,84 \pm 3,33$  vs Sham  $4,22 \pm 1,35$  U.A.) e IL-1 $\beta$  (TAC  $4,91 \pm 1,09$  vs Sham  $0,43 \pm 0,12$  U.A.) A administração oral de alamandina foi capaz de modular a expressão de todos estes genes, revertendo o aumento observado para o CCL2 (ALA  $5,21 \pm 0,63$  U.A.) e TNF- $\alpha$  (ALA  $8,29 \pm 2,08$  U.A.) e atenuando a expressão da IL-1 $\beta$  (ALA  $2,53 \pm 0,43$  U.A.).

A expressão gênica de genes considerados anti-inflamatórios como CD206, FIZZ e YM-1 também foi analisada. De forma surpreendente, nós encontramos não há diferença entre os grupos Sham e TAC para nenhum dos grupos, mas que a alamandina provoca um aumento considerável da expressão do CD206 e do FIZZ. Entretanto, não foram observadas diferenças entre os grupos para a expressão gênica do YM-1.



**Figura 15. Efeitos da TAC e da administração oral de alamandina na expressão de genes relacionados à inflamação na aorta ascendente.** Expressão gênica para o receptor AT1 (A) e fatores inflamatórios (B-G). Os dados foram expressos em média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  grupo vs Sham; #  $p < 0,05$  grupo vs TAC. Resultados representam os grupos Sham (n=8), TAC (n=7) e TAC+ALA (n=6).

## 5. DISCUSSÃO

Os principais achados do nosso estudo foram que a administração oral de alamandina atenua as alterações da aorta ascendente relacionadas ao remodelamento, fibrose, estresse oxidativo, e inflamação provocadas pela cirurgia de TAC em camundongos. Diversos estudos têm demonstrado que a administração de peptídeos que apresentam funções contrarregulatórias àquelas apresentadas pela Ang II geram ações vaso-protetoras. Contudo, o nosso trabalho demonstra pela primeira vez os efeitos da administração oral de alamandina no remodelamento vascular na aorta ascendente.

Evidências recentes têm demonstrado que a alamandina e o seu receptor, o MrgD, estão envolvidos na modulação de processos fisiopatológicos relacionados com o remodelamento vascular, como é o caso da hipertensão arterial. Uma dose única de 50 µg/Kg de alamandina administrada por gavagem em ratos espontaneamente hipertensos produziu efeitos hipotensores de 110 a 310 minutos após a administração oral deste peptídeo (LAUTNER e VILELA *et al.*, 2013). Além destes efeitos sistêmicos, os mesmos autores demonstraram que a alamandina promove vasodilatação dependente do endotélio em anéis de aorta de camundongos FVB/N. Nossos resultados demonstram que a TAC promove remodelamento vascular do tipo positivo e hipertrófico na aorta ascendente, posto que após 14 dias da intervenção cirúrgica, os resultados da morfometria indicaram que os animais apresentam um aumento do lúmen, da camada média e também o aumento da área de seção transversa vascular. Resultados semelhantes foram encontrados por Chen *et al.* (2011), também em camundongos C57BL/6 submetidos à TAC pelo tempo de 3 e 14 dias após a cirurgia. Estes autores demonstram que a área da camada média na parte proximal à TAC sofre aumento já 3 dias após a cirurgia, e esta alteração é intensificada após 14 dias. Estas mesmas alterações estruturais do remodelamento também foram encontradas na artéria carótida direita de camundongos FVB submetidos à TAC por um período de 7 dias (LI *et al.*, 2007). O remodelamento do tipo positivo e hipertrófico também foi reproduzido após 4 semanas da realização da TAC em ratos Sprague-Dawley (XU *et al.*, 2016). Em conjunto, nossos resultados reproduzem estudos anteriores, e principalmente, confirmam a efetividade da indução do modelo da TAC em camundongos, condição fundamental para execução do presente estudo.

Além das alterações relacionadas à área da aorta, a TAC também induziu um aumento da densidade de células da adventícia, mas não na camada média. Isto poderia ser explicado por achados recentes que sugerem que o espessamento da camada média ocorre principalmente por um rearranjo na disposição das VSMC, bem como pela deposição de MEC (CHEN *et al.*, 2011). Nossos resultados evidenciam que a administração oral de alamandina reverte o aumento da espessura da camada média, porém como não houve alteração no número de células nesta camada. Assim, este efeito da alamandina foi associado à redução no distanciamento entre as fibras de elastina induzidos pela TAC. Por outro lado, na camada adventícia, a alamandina foi capaz de atenuar o aumento da densidade de células induzidos pela TAC. No trabalho de Chen *et al.* (2011), foi demonstrado a TAC promoveu um aumento expressivo no número de células positivas para F4/80,  $\alpha$ SMA e SM22 $\alpha$ , indicando infiltração de macrófagos, e diferenciação de fibroblastos para miofibroblastos na adventícia. Estudos adicionais são necessários para identificar quais células estão sendo reguladas pela alamandina, bem como qual o processo celular envolvido na diminuição da densidade celular, aumento de morte celular, inibição de proliferação ou migração de células para adventícia ou ambos processos.

No presente estudo, a administração oral de alamandina preveniu o aumento da deposição e da desorganização do colágeno total na parede da aorta ascendente, assim como o aumento da expressão gênica de colágeno I e colágeno III induzidos pela TAC. Em acordo com nossos achados, Chen *et al.* (2011) demonstraram que no 3º dia após a TAC ocorre aumento da deposição de colágeno total da aorta ascendente, sendo intensificado após 14 dias de cirurgia em camundongos C57BL/6 com idade de 10-12 semanas. Em contraste com os nossos resultados, a administração subcutânea de alamandina na dose de 24  $\mu$ g/kg/h em camundongos ApoE<sup>-/-</sup> alimentados com dieta ocidental não alterou o percentual de colágeno total nas placas ateroscleróticas, tanto na base da aorta como na carótida (DA SILVA *et al.*, 2016). Entretanto, estudos no modelo de hipertrofia ventricular esquerda induzida por isoproterenol em ratos Wistar, mostraram que a administração oral de alamandina incluída em composto HP $\beta$ CD, na dose de 50  $\mu$ g/kg/dia, reduziu a deposição de colágeno I e III, e de fibronectina no tecido cardíaco destes animais (LAUTNER, VILELLA *et al.*, 2013).

A isoforma TGF- $\beta$ 1 é considerada em diversas espécies, incluindo em humanos, uma importante mediadora das respostas fibróticas e proliferativas à sobrecarga pressórica. No que diz respeito ao modelo da TAC, já foi demonstrado que os níveis de TGF- $\beta$ 1 estão aumentados na aorta ascendente de ratos Sprague-Dawley submetidos à TAC após 4 semanas de cirurgia (XU *et al.*, 2016). Em outro estudo, apresentando um protocolo experimental de indução da TAC similar ao do nosso trabalho, foi evidenciado o aumento da expressão gênica das isoformas TGF- $\beta$ 1 e 2 (KUANG *et al.*, 2013). Enquanto o tratamento dos animais operados com o antagonista seletivo do receptor AT1, losartan, bloqueou totalmente o aumento da expressão de TGF- $\beta$ 2, a expressão da isoforma TGF- $\beta$ 1 foi apenas atenuada. Em um estudo mais recente, a administração oral do peptídeo Apelina-13, análogo da Apelina endógena e segundo substrato para ECA2, promoveu uma redução da expressão gênica do TGF- $\beta$ 1, assim como de colágeno I, colágeno III e do fator de crescimento de tecido conectivo (CTGF) na aorta ascendente de ratos Sprague-Dawley (XU *et al.*, 2016). Nossos resultados estão em acordo com os relatos acima, visto que a TAC promoveu um aumento na expressão gênica do RNAm do TGF- $\beta$ 1 e a administração oral de alamandina foi capaz de atenuar este aumento. Apesar de se tratar de peptídeos diferentes, com vias de sinalização distintas, é possível notar que os seus efeitos finais são similares, visto que são funções que opõe àquelas apresentadas pelo eixo ECA/Ang II/AT1, que está hiperativado neste modelo animal.

É importante destacar que a composição da MEC da aorta ascendente dos animais do nosso estudo foi alterada, tanto pela TAC quanto pela administração oral de alamandina. A MEC vascular é suscetível à regulação constante das MMPs, visto que as elas estão envolvidas de forma muito intensa com a síntese e degradação da mesma. Os nossos resultados demonstram, pela primeira vez, que a atividade total das MMPs e a expressão proteica da MMP-2 estão aumentadas na aorta ascendente após a TAC, com intenso sinal fluorescente na camada adventícia para as duas marcações. Estes dois componentes do remodelamento foram completamente revertidos pela administração oral alamandina. De forma surpreendente, não observamos diferenças entre os grupos para a expressão proteica da MMP-9. A MMP-2 é sintetizada como uma pró-MMP-2, tornando-se ativa após a exposição do seu sítio catalítico. Embora este processo seja absolutamente comum, a pró-MMP-2 pode ser ativada também por uma via não proteolítica (KANDASAMY *et al.*, 2010). Um exemplo

disto é que esta ativação pode ocorrer diretamente pela sua interação com peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) (VIAPPIANI *et al.*, 2009).

Sabendo disto, nosso próximo objetivo foi avaliar a produção de EROs na parede da aorta ascendente. Nossos resultados demonstraram que a administração oral de alamandina previne o aumento da formação de EROs induzida pela TAC, para níveis similares aos animais do grupo Sham. A modulação da produção de EROs é de grande importância para a manutenção da homeostase vascular, visto que o dano oxidativo é uma das principais causas de lesão nos vasos sanguíneos (TOUYZ, 2004). Existem evidências que a TAC aumenta a produção de EROs via receptor AT1, e que isto ocorre, pelo menos em parte, via aumento da expressão gênica do *Cyba*, que codifica o citocromo b(-245), um importante componente da NAD(P)H oxidase (KUANG *et al.*, 2013). Além disto, sabe-se também que o aumento da expressão gênica do colágeno tipo I e tipo III induzidas pela Ang II em fibroblastos cardíacos de ratos adultos são bloqueados pela apocinina, um composto inibidor da NAD(P)H oxidase (LIJNEN, PELT e FAGARD, 2012). Partindo destes pressupostos, sugerimos que a alamandina pode haver atenuado a deposição de colágeno total e também a expressão gênica do colágeno do tipo III através de seu marcante efeito antioxidante. Entretanto, estudos adicionais são necessários para avaliar o efeito direto da alamandina na expressão e/ou atividade de enzimas pró e antioxidantes relacionados a este processo.

Além das alterações acima mencionadas, nós também demonstramos que a TAC modula a expressão gênica e proteica dos receptores AT1 e MrgD, respectivamente. Corroborando com nossos resultados, um trabalho recente demonstrou que a sobrecarga pressórica induzida pela TAC promove aumento da expressão do receptor AT1, e que a administração de antagonistas deste receptor, ou de peptídeos que contrarregulem o eixo clássico ECA/Ang II/AT1, podem reverter este aumento (KUANG *et al.*, 2013; XU *et al.*, 2016). O aumento da expressão do AT1 em resposta ao estresse mecânico pode ocorrer de forma simultânea ao aumento de sua atividade. Recentemente, Wang *et al.* (2016) demonstraram que o estresse mecânico de 24 horas aumentou a expressão proteica e atividade da ECA e do receptor AT1 em cultura de cardiomiócitos e que a TAC promoveu as mesmas alterações no tecido cardíaco. Além disto, estes autores observaram uma redução da expressão da ECA2 e do receptor Mas, mas não dos níveis de Ang-(1-7).

A expressão do receptor MrgD já foi identificada na aorta com morfologia normal de coelhos saudáveis, assim como na aorta de coelhos com aterosclerose após serem submetidos à dieta aterogênica por 4 semanas. Habiyakare *et al.* (2014) demonstraram que o MrgD está presente em células do músculo liso e células endoteliais, que são positivas para marcação com HHF-35 e eNOS, respectivamente. Além disto, os experimentos de reatividade vascular realizados por Lautner e Vilella *et al.* (2013) também confirmam a presença deste receptor em anéis de aorta torácica de camundongos FVB/N.

Nós detectamos que o MrgD está expresso nas três camadas vasculares, com marcação mais evidente na túnica média. Além disto, nós demonstramos pela primeira vez que a sobrecarga pressórica promove uma diminuição da expressão do receptor MrgD em toda a extensão da parede da aorta ascendente, com marcante redução nas células que compõe a camada média, e que isto é modulado pela administração de alamandina. Como a administração da alamandina iniciou 3 dias antes da realização da TAC e perdurou por mais duas semanas, nós acreditamos que a alamandina seja capaz de evitar a diminuição da expressão do receptor MrgD em resposta à TAC.

Por fim, analisamos também a expressão gênica de marcadores relacionados à resposta inflamatória vascular. Os resultados demonstraram que a administração de alamandina atenuou o aumento da expressão gênica de fatores pró-inflamatórios (CCL2, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ). Ao mesmo tempo, a alamandina aumentou a expressão de marcadores pró-resolutivos (CD206 e FIZZ), de forma independente do efeito da TAC. Considerando que estes genes pró-inflamatórios atenuados pela alamandina estão relacionados à macrófagos da subpopulação M1 e que, simultaneamente a este efeito, ela aumenta a expressão de genes relacionados à macrófagos da subpopulação M2, surge a hipótese de que a alamandina poderia alterar o perfil fenotípico destas células inflamatórias na aorta ascendente. Nesta linha, experimentos adicionais estão em andamento no nosso laboratório para avaliar a razão das subpopulações M1/M2 no tecido aórtico submetido à TAC, bem como se a alamandina é capaz de alterar esta razão. É importante considerar que a alteração na polarização dos macrófagos poderia resultar em uma modulação benéfica em fibroblastos. Recentemente, Zhang *et al.* (2016) demonstraram que existe um recrutamento pronunciado de macrófagos e um aumento na expressão da iNOS na túnica adventícia da aorta ascendente de ratos submetidos à TAC. Além disto, foi mostrado também que o sobrenadante de



macrófagos RAW 264.7 aumentou a produção de colágeno I e III em fibroblastos extraídos da aorta de ratos através da via de sinalização da iNOS. Os autores sugerem que esta interação entre fibroblastos e macrófagos ocorre através da IL-1 $\beta$ , visto que o tratamento dos fibroblastos com esta interleucina também aumentou a expressão da iNOS nestas células. Assim, é necessário que mais estudos sejam realizados no intuito de analisar os efeitos da alamandina nesta interação celular, já que ela foi capaz de atenuar a expressão gênica para a IL-1 $\beta$  na aorta ascendente de animais submetidos à TAC.

Em conclusão, o nosso estudo mostrou pela primeira vez que a administração oral de alamandina atenua o remodelamento e apresenta efeitos anti-fibróticos, anti-oxidativos e anti-inflamatórios na parede da aorta ascendente de camundongos submetidos à TAC. Acreditamos que seu efeito em modular o estresse oxidativo associado à sua atividade anti-inflamatória, faz com que haja uma menor ativação e expressão das MMPs, e por conseguinte, promove a diminuição da deposição de colágeno na parede vascular, melhorando a resposta vascular às alterações promovidas pela TAC. Assim, é importante que sejam analisados posteriormente os mecanismos de sinalização envolvidos nas respostas observadas, bem como a participação do receptor MrgD e de outros receptores do SRA na modulação do remodelamento vascular induzido pela TAC.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Belo, V.A., Guimarães, D.A., and Castro, M.M. (2015). Matrix Metalloproteinase 2 as a Potential Mediator of Vascular Smooth Muscle Cell Migration and Chronic Vascular Remodeling in Hypertension. *J. Vasc. Res.* 52, 221–231.
- Benter, I.F., Yousif, M.H.M., Anim, J.T., Cojocel, C., e Diz, D.I. (2006). Angiotensin-(1-7) prevents development of severe hypertension and end-organ damage in spontaneously hypertensive rats treated with L-NAME. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 290, H684-691.
- Bihl, J.C., Zhang, C., Zhao, Y., Xiao, X., Ma, X., Chen, Y., Chen, S., Zhao, B., Chen, Y. (2015). Angiotensin-(1-7) counteracts the effects of Ang II on vascular smooth muscle cells, vascular remodeling and hemorrhagic stroke: Role of the NFκB inflammatory pathway. *Vascul. Pharmacol.* 73, 115–123.
- Braga, V.A.V.N., Couto, G.K., Lazzarin, M.C., Rossoni, L.V., and Medeiros, A. (2015). Aerobic Exercise Training Prevents the Onset of Endothelial Dysfunction via Increased Nitric Oxide Bioavailability and Reduced Reactive Oxygen Species in an Experimental Model of Menopause. *PloS One* 10, e0125388.
- Chen, J., Wu, J., Li, L., Zou, Y.-Z., Zhu, D.-L., and Gao, P.-J. (2011). Effect of an acute mechanical stimulus on aortic structure in the transverse aortic constriction mouse model. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 38, 570–576.
- Chen, X., Howatt, D.A., Balakrishnan, A., Moorleghen, J.J., Wu, C., Cassis, L.A., Daugherty, A., and Lu, H. (2016). Angiotensin-Converting Enzyme in Smooth Muscle Cells Promotes Atherosclerosis-Brief Report. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 36, 1085–1089.
- Chistiakov, D.A., Orekhov, A.N., and Bobryshev, Y.V. (2017). Effects of shear stress on endothelial cells: go with the flow. *Acta Physiol. Oxf. Engl.* 219, 382–408.
- Chiu, J.-J., and Chien, S. (2011). Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives. *Physiol. Rev.* 91, 327–387.
- Da Silva, A.R., Lenglet, S., Carbone, F., Burger, F., Roth, A., Liberale, L., Bonaventura, A., Dallegri, F., Stergiopoulos, N., Santos, R.A.S., et al. (2017). Alamandine abrogates neutrophil degranulation in atherosclerotic mice. *Eur. J. Clin. Invest.* 47, 117–128.
- Donoghue, M., Hsieh, F., Baronas, E., Godbout, K., Gosselin, M., Stagliano, N., Donovan, M., Woolf, B., Robison, K., Jeyaseelan, R., et al. (2000). A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ. Res.* 87, E1-9.
- Etelvino, G.M., Peluso, A.A.B., and Santos, R.A.S. (2014). New components of the renin-angiotensin system: alamandine and the MAS-related G protein-coupled receptor D. *Curr. Hypertens. Rep.* 16, 433.
- Ferrario, C.M., Ahmad, S., Varagic, J., Cheng, C.P., Groban, L., Wang, H., Collawn, J.F., and Dell Italia, L.J. (2016). Intracrine angiotensin II functions originate from

noncanonical pathways in the human heart. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *311*, H404-414.

Fraga-Silva, R.A., Costa-Fraga, F.P., Savergnini, S.Q., De Sousa, F.B., Montecucco, F., da Silva, D., Sinisterra, R.D., Mach, F., Stergiopoulos, N., da Silva, R.F., et al. (2013). An oral formulation of angiotensin-(1-7) reverses corpus cavernosum damages induced by hypercholesterolemia. *J. Sex. Med.* *10*, 2430–2442.

Fraga-Silva, R.A., Montecucco, F., Costa-Fraga, F.P., Nencioni, A., Caffa, I., Bragina, M.E., Mach, F., Raizada, M.K., Santos, R.A.S., da Silva, R.F., et al. (2015a). Diminazene enhances stability of atherosclerotic plaques in ApoE-deficient mice. *Vascul. Pharmacol.* *74*, 103–113.

Fraga-Silva, R.A., Costa-Fraga, F.P., Montecucco, F., Sturny, M., Faye, Y., Mach, F., Pelli, G., Shenoy, V., da Silva, R.F., Raizada, M.K., et al. (2015b). Diminazene protects corpus cavernosum against hypercholesterolemia-induced injury. *J. Sex. Med.* *12*, 289–302.

Galandrin, S., Denis, C., Boullaran, C., Marie, J., M'Kadmi, C., Pilette, C., Dubroca, C., Nicaise, Y., Seguelas, M.-H., N'Guyen, D., et al. (2016). Cardioprotective Angiotensin-(1-7) Peptide Acts as a Natural-Biased Ligand at the Angiotensin II Type 1 Receptor. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 *68*, 1365–1374.

Gasparo, M., Catt, K.J., Inagami, T., Wright, J.W., and Unger, T. (2000). International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol. Rev.* *52*, 415–472.

Gibbons, G.H., and Dzau, V.J. (1994). The emerging concept of vascular remodeling. *N. Engl. J. Med.* *330*, 1431–1438.

Guimarães, D. A., Rizzi, E., Ceron, C. S., Martins-Oliveira, A., Gerlach, R. F., Santos, J. E. T.. (2010) Inibição de metaloproteinases da matriz extracelular: uma possível estratégia terapêutica na hipertensão arterial? *Rev Bras Hipertens* vol.17(4):226-230.

Habiyakare, B., Alsaadon, H., Mathai, M.L., Hayes, A., and Zulli, A. (2014). Reduction of angiotensin A and alamandine vasoactivity in the rabbit model of atherogenesis: differential effects of alamandine and Ang(1-7). *Int. J. Exp. Pathol.* *95*, 290–295.

Hrenak, J., Paulis, L., and Simko, F. (2016). Angiotensin A/Alamandine/MrgD Axis: Another Clue to Understanding Cardiovascular Pathophysiology. *Int. J. Mol. Sci.* *17*.

Humphrey, J.D., Dufresne, E.R., and Schwartz, M.A. (2014). Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 802–812.

Humphrey, J.D., Schwartz, M.A., Tellides, G., and Milewicz, D.M. (2015). Role of mechanotransduction in vascular biology: focus on thoracic aortic aneurysms and dissections. *Circ. Res.* *116*, 1448–1461.

Hung, O.Y., Brown, A.J., Ahn, S.G., Veneziani, A., Giddens, D.P., and Samady, H. (2015). Association of Wall Shear Stress with Coronary Plaque Progression and Transformation. *Interv. Cardiol. Clin.* *4*, 491–502.

- Hunyady, L., and Catt, K.J. (2006). Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 20, 953–970.
- Jones, E.S., Vinh, A., McCarthy, C.A., Gaspari, T.A., and Widdop, R.E. (2008). AT2 receptors: functional relevance in cardiovascular disease. *Pharmacol. Ther.* 120, 292–316.
- Kandasamy, A.D., Chow, A.K., Ali, M.A.M., and Schulz, R. (2010). Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: beyond the matrix. *Cardiovasc. Res.* 85, 413–423.
- Kangussu, L.M., Guimaraes, P.S., Nadu, A.P., Melo, M.B., Santos, R.A.S., and Campagnole-Santos, M.J. (2015). Activation of angiotensin-(1-7)/Mas axis in the brain lowers blood pressure and attenuates cardiac remodeling in hypertensive transgenic (mRen2)27 rats. *Neuropharmacology* 97, 58–66.
- Kuang, S.-Q., Geng, L., Prakash, S.K., Cao, J.-M., Guo, S., Villamizar, C., Kwartler, C.S., Peters, A.M., Brasier, A.R., and Milewicz, D.M. (2013). Aortic remodeling after transverse aortic constriction in mice is attenuated with AT1 receptor blockade. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33, 2172–2179.
- Lautner, R.Q., Villela, D.C., Fraga-Silva, R.A., Silva, N., Verano-Braga, T., Costa-Fraga, F., Jankowski, J., Jankowski, V., Sousa, F., Alzamora, A., et al. (2013). Discovery and characterization of alamandine: a novel component of the renin-angiotensin system. *Circ. Res.* 112, 1104–1111.
- LeMaire, S.A., McDonald, M.-L.N., Guo, D.-C., Russell, L., Miller, C.C., Johnson, R.J., Bekheirnia, M.R., Franco, L.M., Nguyen, M., Pyeritz, R.E., et al. (2011). Genome-wide association study identifies a susceptibility locus for thoracic aortic aneurysms and aortic dissections spanning FBN1 at 15q21.1. *Nat. Genet.* 43, 996–1000.
- Li, C., e Xu, Q. (2000). Mechanical stress-initiated signal transductions in vascular smooth muscle cells. *Cell. Signal.* 12, 435–445.
- Li, C., e Xu, Q. (2007). Mechanical stress-initiated signal transduction in vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo. *Cell. Signal.* 19, 881–891.
- Li, Y.-H., Hsieh, C.-Y., Wang, D.L., Chung, H.-C., Liu, S.-L., Chao, T.-H., Shi, G.-Y., and Wu, H.-L. (2007). Remodeling of carotid arteries is associated with increased expression of thrombomodulin in a mouse transverse aortic constriction model. *Thromb. Haemost.* 97, 658–664.
- Lin, L., Liu, X., Xu, J., Weng, L., Ren, J., Ge, J., and Zou, Y. (2016). Mas receptor mediates cardioprotection of angiotensin-(1-7) against Angiotensin II-induced cardiomyocyte autophagy and cardiac remodelling through inhibition of oxidative stress. *J. Cell. Mol. Med.* 20, 48–57.

Lijnen, P.J., van Pelt, J.F., and Fagard, R.H. (2012). Stimulation of reactive oxygen species and collagen synthesis by angiotensin II in cardiac fibroblasts. *Cardiovasc. Ther.* 30, e1-8.

Lu, H., Wu, C., Howatt, D.A., Balakrishnan, A., Moorleggen, J.J., Chen, X., Zhao, M., Graham, M.J., Mullick, A.E., Crooke, R.M., et al. (2016). Angiotensinogen Exerts Effects Independent of Angiotensin II. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 36, 256–265.

Magalhães, G.S., Rodrigues-Machado, M.G., Motta-Santos, D., Silva, A.R., Caliari, M.V., Prata, L.O., Abreu, S.C., Rocco, P.R.M., Barcelos, L.S., Santos, R. a. S., Campagnole-Santos, M.J.. (2015). Angiotensin-(1-7) attenuates airway remodelling and hyperresponsiveness in a model of chronic allergic lung inflammation. *Br. J. Pharmacol.* 172, 2330–2342.

Maiellaro, K., and Taylor, W.R. (2007). The role of the adventitia in vascular inflammation. *Cardiovasc. Res.* 75, 640–648.

McMillan, W.D., Patterson, B.K., Keen, R.R., Shively, V.P., Cipollone, M., and Pearce, W.H. (1995). In situ localization and quantification of mRNA for 92-kD type IV collagenase and its inhibitor in aneurysmal, occlusive, and normal aorta. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15, 1139–1144.

McWhorter, F.Y., Davis, C.T., and Liu, W.F. (2015). Physical and mechanical regulation of macrophage phenotype and function. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 72, 1303–1316.

Mehta, P.K., and Griendling, K.K. (2007). Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 292, C82-97.

Michel, M.C., Brunner, H.R., Foster, C., and Huo, Y. (2016). Angiotensin II type 1 receptor antagonists in animal models of vascular, cardiac, metabolic and renal disease. *Pharmacol. Ther.* 164, 1–81.

Mulvany, M.J., Baumbach, G.L., Aalkjaer, C., Heagerty, A.M., Korsgaard, N., Schiffrin, E.L., et al. (1996). Vascular remodeling. *Hypertension* 28, 505–506.

Newman, K.M., Jean-Claude, J., Li, H., Scholes, J.V., Ogata, Y., Nagase, H., and Tilson, M.D. (1994). Cellular localization of matrix metalloproteinases in the abdominal aortic aneurysm wall. *J. Vasc. Surg.* 20, 814–820.

NG, K. K. F.; Vane, J. R. The conversion of angiotensin I to angiotensin II in vivo. *Naunyn-Schmiedebergs Archiv fur Pharmakologie und Experimentelle Pathologie*, v. 259, p. 188–189, 1968

Nogueira, B. V. Remodelamento vascular em camundongos ateroscleróticos na coexistência de hipertensão renovascular 2R1C. *Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo. 2005.*

- Nouet, S., and Nahmias, C. (2000). Signal transduction from the angiotensin II AT2 receptor. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* 11, 1–6.
- Olivon, V.C., Aires, R.D., Santiago, L.B., Ramalho, L.Z.N., Cortes, S.F., and Lemos, V.S. (2015). Mas receptor overexpression increased Ang-(1-7) relaxation response in renovascular hypertensive rat carotid. *Peptides* 71, 250–258.
- Rice, G.I., Thomas, D.A., Grant, P.J., Turner, A.J., and Hooper, N.M. (2004). Evaluation of angiotensin-converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism. *Biochem. J.* 383, 45–51.
- Rockman, H.A., Ross, R.S., Harris, A.N., Knowlton, K.U., Steinhilber, M.E., Field, L.J., Ross, J., Chien, K.R. (1991) Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo model of cardiac hypertrophy. *Medical Sciences* 88:8277-8281.
- Santos, R. A., Campagnole-Santos, M. J., & Andrade, S. P. (2000). Angiotensin-(1-7): an update. *Regulatory Peptides*, 91(1-3), 45–62.
- Shimada, K., Furukawa, H., Wada, K., Wei, Y., Tada, Y., Kuwabara, A., Shikata, F., Kanematsu, Y., Lawton, M.T., Kitazato, K.T., et al. (2015). Angiotensin-(1-7) protects against the development of aneurysmal subarachnoid hemorrhage in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 35, 1163–1168.
- Soltani Hekmat, A., Javanmardi, K., Kouhpayeh, A., Baharamali, E., and Farjam, M. (2017). Differences in Cardiovascular Responses to Alamandine in Two-Kidney, One Clip Hypertensive and Normotensive Rats. *Circ. J. Off. J. Jpn. Circ. Soc.*
- Suzuki, J., Iwai, M., Nakagami, H., Wu, L., Chen, R., Sugaya, T., Hamada, M., Hiwada, K., and Horiuchi, M. (2002). Role of angiotensin II-regulated apoptosis through distinct AT1 and AT2 receptors in neointimal formation. *Circulation* 106, 847–853.
- Tieu, B.C., Lee, C., Sun, H., Lejeune, W., Recinos, A., Ju, X., Spratt, H., Guo, D.-C., Milewicz, D., Tilton, R.G., et al. (2009). An adventitial IL-6/MCP1 amplification loop accelerates macrophage-mediated vascular inflammation leading to aortic dissection in mice. *J. Clin. Invest.* 119, 3637–3651.
- Tigerstedt, R.; Bergman, P. Q. Niere und Kreislauf1. *Skandinavisches Archiv Für Physiologie*, v. 8, n. 1, p. 223–271, 1898.
- Touyz, R.M. (2004). Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells -- implications in cardiovascular disease. *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Medicas E Biol.* 37, 1263–1273.
- Trachet, B., Piersigilli, A., Fraga-Silva, R.A., Aslanidou, L., Sordet-Dessimoz, J., Astolfo, A., Stampanoni, M.F.M., Segers, P., and Stergiopoulos, N. (2016). Ascending Aortic Aneurysm in Angiotensin II-Infused Mice: Formation, Progression, and the Role of Focal Dissections. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 36, 673–681.
- Tsutsumi, Y., Matsubara, H., Masaki, H., Kurihara, H., Murasawa, S., Takai, S., Miyazaki, M., Nozawa, Y., Ozono, R., Nakagawa, K., et al. (1999). Angiotensin II type

2 receptor overexpression activates the vascular kinin system and causes vasodilation. *J. Clin. Invest.* 104, 925–935.

van Varik, B.J., Rennenberg, R.J.M.W., Reutelingsperger, C.P., Kroon, A.A., de Leeuw, P.W., and Schurgers, L.J. (2012). Mechanisms of arterial remodeling: lessons from genetic diseases. *Front. Genet.* 3, 290.

Viappiani, S., Nicolescu, A.C., Holt, A., Sawicki, G., Crawford, B.D., León, H., van Mulligen, T., and Schulz, R. (2009). Activation and modulation of 72kDa matrix metalloproteinase-2 by peroxynitrite and glutathione. *Biochem. Pharmacol.* 77, 826–834.

Vickers, C., Hales, P., Kaushik, V., Dick, L., Gavin, J., Tang, J., Godbout, K., Parsons, T., Baronas, E., Hsieh, F., et al. (2002). Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J. Biol. Chem.* 277, 14838–14843.

Wagenseil, J.E., and Mecham, R.P. (2009). Vascular extracellular matrix and arterial mechanics. *Physiol. Rev.* 89, 957–989.

Wright, J.W., Mizutani, S., and Harding, J.W. (2008). Pathways involved in the transition from hypertension to hypertrophy to heart failure. Treatment strategies. *Heart Fail. Rev.* 13, 367–375.

Xu, R., Zhang, Z.-Z., Chen, L.-J., Yu, H.-M., Guo, S.-J., Xu, Y.-L., Oudit, G.Y., Zhang, Y., Chang, Q., Song, B., et al. (2016). Ascending aortic adventitial remodeling and fibrosis are ameliorated with Apelin-13 in rats after TAC via suppression of the miRNA-122 and LGR4- $\beta$ -catenin signaling. *Peptides* 86, 85–94.

Zhang, C., Hein, T.W., Wang, W., and Kuo, L. (2003). Divergent roles of angiotensin II AT1 and AT2 receptors in modulating coronary microvascular function. *Circ. Res.* 92, 322–329.

Zhang, G., Li, X., Sheng, C., Chen, X., Chen, Y., Zhu, D., and Gao, P. (2016). Macrophages activate iNOS signaling in adventitial fibroblasts and contribute to adventitia fibrosis. *Nitric Oxide Biol. Chem.* 61, 20–28.

Zhu, Y.-C., Zhu, Y.-Z., Lu, N., Wang, M.-J., Wang, Y.-X., and Yao, T. (2003). Role of angiotensin AT1 and AT2 receptors in cardiac hypertrophy and cardiac remodelling. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 30, 911–918.