

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

TALLITA VASSEQUI DA SILVA

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

Campinas - 2015

TALLITA VASSEQUI DA SILVA

Avaliação da função da MAGP-1 na trombogênese arterial

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas como
parte dos requisitos exigidos para obtenção
do título de Doutora em Biologia Funcional
e Molecular, na área de Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Claudio Chrysostomo Werneck

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA TALLITA
VASSEQUI DA SILVA, E ORIENTADA PELO PROF.
DR. CLAUDIO CHRYSOSTOMO WERNECK.



Campinas – 2015

Agência de fomento: Capes
Nº processo: 0

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

V447a Vassequi-Silva, Tallita, 1985-
Avaliação da função da MAGP1 na trombogênese arterial / Tallita Vassequi da Silva. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

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

1. Glicoproteínas associadas a microfibrila-1. 2. Trombose arterial. 3. Fator de crescimento transformador beta. 4. Losartan. 5. Captopril. I. Werneck, Claudio Chrysostomo, 1966-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of MAGP1 function in arterial thrombogenesis

Palavras-chave em inglês:

Microfibril-associated glycoprotein-1

Arterial thrombosis

Transforming growth factor beta

Losartan

Captopril

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Doutora em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Claudio Chrysostomo Werneck [Orientador]

Sisi Marcondes Paschoal

Maria Luiza Vilela Oliva

Fernanda Ramos Gadelha

Sérgio Luis Felisbino

Data de defesa: 31-08-2015

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

BANCA EXAMINADORA

CAMPINAS, 31 DE AGOSTO DE 2015.

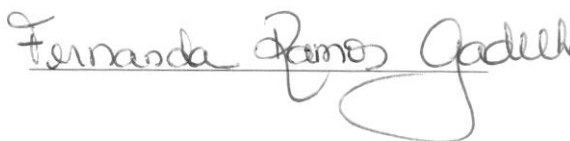
PROF. DR. CLAUDIO CHRYSOSTOMO WERNECK



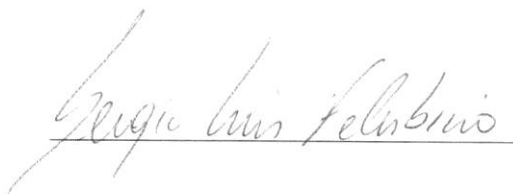
PROFA. DRA. SISI MARCONDES PASCHOAL



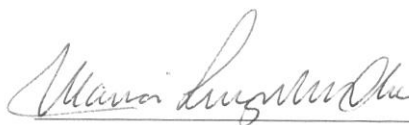
PROFA. DRA. FERNANDA RAMOS GADELHA



PROF. DR. SÉRGIO LUIS FELISBINO



PROFA. DRA. MARIA LUIZA VILELA OLIVA



DEDICATÓRIA

A minha filha Júlia,

Que encheu a minha vida de alegria e
me faz querer ser uma pessoa melhor.
Filha você é a minha fonte inspiradora.

Te amo!!!

AGRADECIMENTOS

- A Deus

Que iluminou meu caminho permitindo que mais um sonho se realizasse.

- A meu marido Bruno

Por todo amor, carinho e incentivo. Por todo apoio nas minhas decisões. Por estar sempre ao meu lado, mesmo que distante. Te amo!

- A meus pais e irmã

Por serem presença constante na minha vida e pensamento. Vocês são a base de tudo.

- Ao professor Claudio C. Werneck

Por toda paciência e dedicação ao longo de todos esses anos. O senhor foi professor, orientador, amigo e muitas vezes pai com toda sua preocupação com nosso bem estar. Obrigada por tudo! Tenha certeza que levarei adiante tudo que aprendi contigo.

- A professora Cristina P. Vicente

Por toda paciência e dedicação durante a realização desse trabalho;

- A meus colegas do laboratório de Fibras elásticas e colaboradores

Pela amizade e apoio emocional durante todos esses anos longe da família. Por todo auxílio durante a realização desse trabalho.

- Aos professores da banca de qualificação e defesa

Que aceitaram com prontidão o convite para participar da banca e contribuíram enormemente para finalização desse trabalho.

A todos que contribuíram de alguma forma para que esse sonho se realizasse o meu
muito obrigada!

AGRADECIMENTO ESPECIAL



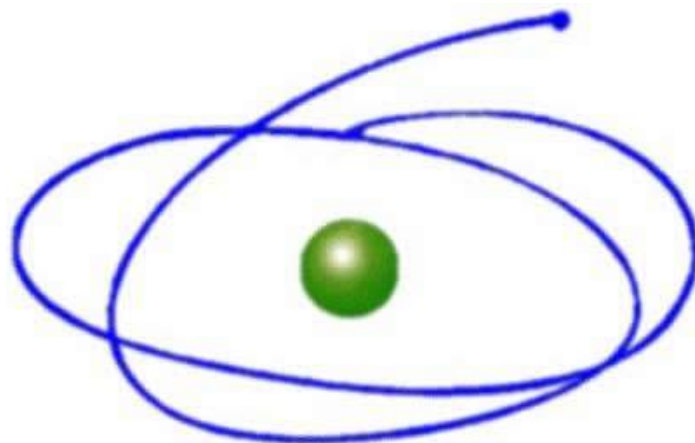
UNICAMP

Universidade Estadual de Campinas – SP

Laboratório de Fibras Elásticas – Unicamp

Laboratório de Aterosclerose e Trombose - Unicamp

FINANCIAMENTO



C A P E S

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior



Avaliação da Função da MAGP-1 na Trombogênese Arterial

Resumo

MAGP1 (Microfibril-Associated GlycoProtein) é uma glicoproteína presente nas fibras elásticas como componente das microfibrilas. Estudos tem demonstrado que sua expressão é crítica para o desenvolvimento vascular e está associada com a diminuição da interação integrina/matriz extracelular em peixes zebra. MAGP1 também interage com fator von Willebrand e formas ativas de TGF- β e BMP (proteína morfogênica óssea). Em camundongos deficientes em MAGP1 a formação de trombo encontra-se alterada, apesar da coagulação sanguínea *in vitro* normal. As microfibrilas contendo MAGP podem desempenhar um papel na hemostase e trombose. Neste trabalho nós avaliamos a função da MAGP1 e sua relação com o TGF- β no processo de trombose arterial. Para isso, foi obtida forma mutada da MAGP1 (VG1) e sua participação no processo de trombose arterial e interação com proteínas importantes para o processo de coagulação foi verificado. O tempo de formação do trombo foi avaliado em animais selvagens e deficientes em MAGP1. A mutação na molécula de MAGP1 impediu que ela recuperasse o tempo de formação de trombo. Entretanto, MAGP1 mutada continua interagindo com vWF e fibronectina. A participação do TGF- β neste processo foi avaliado pelo tratamento com losartan e captopril. Além disso, avaliamos a atividade gelatinolítica na parede das artérias. Losartan e Captopril são capazes de recuperar o tempo de formação de trombo sem alterar a pressão sanguínea dos animais, aPTT e TP, adesão plaquetária, mas reduz a atividade exacerbada das gelatinases estudadas. Nossos resultados sugerem que ambos os tratamentos são efetivos na prevenção da matriz subendotelial, permitindo a formação normal do trombo.

Evaluation of MAGP1 Function in arterial thrombogenesis

Abstract

MAGP-1 is a glycoprotein present in the elastic fibers, functioning as part of the microfibrils components. Studies have shown that MAGP-1 expression is critical for vascular development and is associated with decreased interaction between integrins and the extracellular matrix in zebra fish. Also MAGP-1 interacts with von Willebrand factor and the active form of TGF- β and BMP. In mice lacking MAGP-1, thrombus formation is delayed, increasing the occlusion time of carotid artery despite normal blood coagulation in vitro. MAGP-containing microfibrils may play a role in hemostasis and thrombosis. In this work, we evaluated the function of MAGP-1 and its relation to TGF- β in the arterial thrombosis process. For this purpose, we obtained and analyzed a mutated MAGP1 (VG1) protein, its participation in the arterial thrombosis formation and its interaction with important proteins in the coagulation process. We analyzed thrombus formation time in wild type and MAGP-1-deficiency mice. The potential participation of TGF- β in this process was accessed when we treated both wild type and MAGP-1^{-/-} mice with losartan and captopril. Besides, we evaluated the gelatinolytic activity in the arterial walls. The MAGP-1 mutation avoided its thrombus formation time recovery, although the mutated MGP-1 still interacting with vWF and fibronectin. Losartan and captopril were able to recover the thrombus formation time without changing blood pressure, aPTT and PT, platelet aggregation and adhesion, but increased gelatinases activity. Our results suggest that both treatments are effective in the prevention of the sub-endothelial ECM degradation, allowing the recovery of normal thrombus formation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Eletromicrografia de tecido em desenvolvimento.	18
Figura 1.2. Sequência de aminoácidos da proteína MAGP1	21
Figura 1.3: Esquema da deleção da MAGP1.....	22
Figura 1.4: Esquema da inibição do receptor AT1 por losartan.....	27
Figura 1.5: Distribuição topológica de MMPs	30
Figura 1.6: Colágeno e Tf associado a parede do vaso promovem uma barreira hemostática.	33
Figura 3.1: Indução fotoquímica do trombo.....	43
Figura 4.1: Sequenciamento de DNA correspondentes ao vetor MAGP-1 oriundas do animal selvagem	51
Figura 4.2: Gel de poliacrilamida 10%.....	52
Figura 4.3: Tempo de formação do trombo a partir de indução fotoquímica.....	53
Figura 4.4: Caracterização das interações da MAGP1 (selvagem e mutante) com proteínas importantes para a trombogênese.....	54
Figura 4.5: Tratamento com losartan resgata o tempo normal de formação do trombo.....	55
Figura 4.6: O tratamento com captopril diminui o tempo de formação do trombo.....	56
Figura 4.7: Aferição da pressão arterial dos camundongos por pletismografia	57
Figura 4.8: Aferição da pressão arterial dos camundongos, sob anestesia.....	58
Figura 4.9: Agregação plaquetária induzida por agonistas	60
Figura 4.10: Análise morfológica das plaquetas por meio de microscopia eletrônica de transmissão.	61
Figura 4.11: Análise morfológica de trombos na artéria carótida direita por meio de microscopia de luz	62
Figura 4.12: Análise TGF- β 1 total, no plasma sanguíneo.....	62
Figura 4.13: Análise TGF- β 1 ativo, no plasma sanguíneo	63
Figura 4.14: Zimografia in situ.....	64
Figura 4.15: Análise semiquantitativa da atividade gelatinolítica.....	64
Figura 4.16. Via de sinalização envolvendo as vias canônica e não canônica do TGF- β , NF κ -B, EROs e gelatinases.	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS: (2,2'-Azinobis [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]-diammonium salt)

ACE: Enzima Conversora de Angiotensina

ADAMTS: do inglês (*a Desintegrin and Metalloproteinase with Trombospondin Motifs*)

ADP: Adenosina difosfato

AT1: Receptor 1 de Angiotensina II

BMP: Proteína Morfogenética Óssea

BSA: Albumina de Soro Bovino

CAP: Captopril

cm: Centímetro

C-terminal: Região Carboxi-terminal

DNA: Ácido DesoxirriboNucleico

ECM: Matriz Extra Celular

ELISA: do inglês *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*

FeCl₃: Cloreto Férrico

FN: Fibronectina

h: Hora

HEPES: 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

IPTG: Isopropyl β -D-Thiogalactopyranoside

kDa: quilo Dalton

KO: do inglês *Knockout*

LAP: Peptídeo associado a latência

LOS: Losartan

LTBP: Proteína de Ligação ao TGF- β Latente

M: Molar ou moles por litro

MAGP: Glicoproteína associada as microfibrilas (Microfibril-Associated GlycoProtein)

MAGP1^{-/-}: Camundongo deficiente em MAGP1

MAGP1^{+/+}: Camundongo selvagem

mg/kg/dia: miligrama por quilograma por dia

Min: Minuto

MMP: Metaloproteinases

mW: mili Watts

Neo: Neomicina

NF- κ B: Fator Nuclear Kappa B

NTA-Níquel: Ácido Nitrilo Tri-Acético

N-terminal: Região amino terminal

°C: Grau Celsius

OCT: do inglês *Optimal Cutting Temperature*

PAR-1: Receptor ativado por proteinase-1

PBS: Tampão salina-fosfato

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

pH: Potencial Hidrogeniônico

PLA: Placebo

PPP: Plasma Pobre em Plaqueta

PRP: Plasma Rico em Plaqueta

EROs: Espécies Reativas de Oxigênio

Rpm: Rotações por Minuto

SDS: Dodecil Sulfato de Sódio

SDS-PAGE: Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio

SMC: Células Musculares Lisas

Tf: Fator Tecidual

TGF- β : Fator de Crescimento Transformante Beta (Transforming Growth Factor- β)

TP: Tempo de Protrombina

TSP: Trombospondina

TTPA: Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado

VEGF: Fator de Crescimento Endotelial Vascular

VSMC: Célula Muscular Lisa Vascular

vWF: Fator von Willebrand

WT: *Wild-Type* ou camundongos selvagens

β -bloqueador: Bloqueador beta-adrenérgico

$\mu\text{g/ml}$: micrograma por mililitro

μl : microlitro

μmol : Micro mol

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xvi
LISTA DE FIGURAS	xvi
Resumo	xvi
Abstract.....	xvi
1. Introdução.....	18
2. Objetivos.....	37
3. Materiais e Métodos	39
3.1 Animais.....	39
3.2 Mutagênese Sítio Dirigida	39
3.3 Ensaio de ligação em fase sólida (Solid Phase Binding Assay)	41
3.4 Tratamento com fármaco	42
3.5 Aferição da pressão arterial dos animais	42
3.6 Indução fotoquímica do trombo.....	42
3.7 Análise morfológica da carótida direita após a indução fotoquímica do trombo em animais selvagens e deficientes em MAGP1 por meio de microscopia de luz.....	43
3.8 Determinação de TGF- β no plasma.....	43
3.9 Análise morfológica das plaquetas por meio de microscopia eletrônica de transmissão	44
3.10 Tempo de Protrombina.....	45
3.11 Tempo de tromboplastina parcial ativada	45
3.12 Ensaio de agregação plaquetária	46
3.13 Ensaio de adesão de plaquetas não ativadas	46
3.14 Zimografia in situ	47
4. Resultados.....	50
5. Discussão.....	67
6. Conclusão	80
7. Referências Bibliográficas.....	82
8. Anexos.....	94

INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1 Fibras elásticas

As fibras elásticas estão presentes em tecidos que estão sob constante estresse mecânico, como pele, pulmão e grandes vasos. Elas são responsáveis pela distensão reversível do tecido conjuntivo, uma vez que exibem deformação elástica e são capazes de armazenar energia para restaurar o tecido deformado na sua configuração original (Charbonneau et al., 2003). Elas atuam, também, na sustentação de tecidos, como artéria aorta, intestino, pele, dentre outros e apresentam dois componentes distintos, elastina e microfibrila, quando analisadas por microscopia eletrônica (Figura 1.1) (Davis, 1994). A rede de microfibrila é a primeira a ser desenvolvida, em seguida, infiltrada por tropoelastina, que origina a elastina, a qual resulta na fibra elástica madura (Fahrenbach et al., 1996).

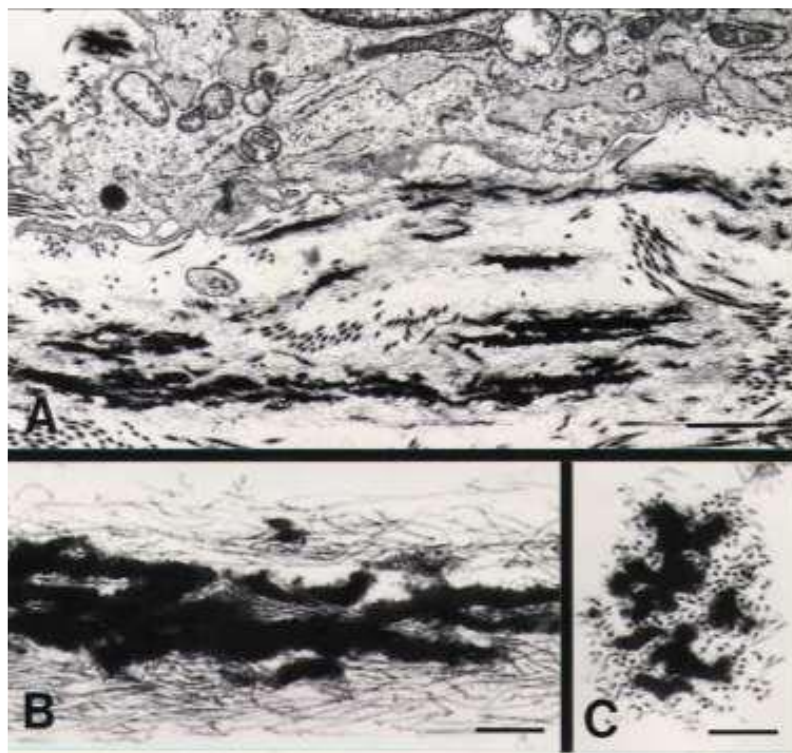


Figura 1.1: Eletromicrografia de tecido em desenvolvimento, rico em fibra elástica (aorta). A - Visão geral do tecido. B e C - Presença de uma região mais eletrondensa (elastina) e da rede de microfibrila. B - Corte longitudinal. C - Corte transversal (Davis, 1994).

Os pesquisadores acreditam que a principal função da rede de microfibrila é atuar como um molde para a formação das fibras elásticas. Dessa forma, ocorre a deposição de tropoelastina e, conseqüentemente, a formação da fibra elástica madura. Isso se deve à ação das enzimas lisil oxidases que promovem as reações cruzadas (de “cross-linking”) entre estes monômeros, levando a formação do polímero insolúvel e amorfo de elastina. As microfibrilas possuem uma composição muito complexa onde podemos destacar as glicoproteínas: fibrilinas e MAGPs (Microfibril-Associated GlycoProtein) (Reinhardt et al., 1996).

As fibrilinas são moléculas de alta massa molecular, aproximadamente 350 kDa, e em humanos são codificadas por três genes (*FBN-1*, -2 e -3) e apenas dois genes funcionais em camundongos (*Fbn-1*, -2). Em camundongos, a deficiência combinada de Fibrilina-1 e -2 resulta em morte no período embrionário, demonstrando que as microfibrilas são necessárias para o desenvolvimento normal e sobrevivência (Carta et al., 2006).

Mutações no gene da Fibrilina-1 estão relacionadas à Síndrome de Marfan, uma doença genética autossômica dominante, cujo portador, frequentemente, apresenta anomalias nas estruturas esquelética, pulmonar, cardíaca, ocular, vasos sanguíneos entre outras. Os sinais clínicos observados na Síndrome de Marfan em humanos e em modelos de camundongos estão sendo associados a uma excessiva ativação do TGF- β . Em ensaios utilizando camundongos como modelo de síndrome de Marfan, o tratamento com losartan, que atua diminuindo a expressão e ativação de TGF- β , leva à inibição destes sinais clínicos quando comparados a animais não tratados ou tratados com outros medicamentos anti-hipertensivos como beta bloqueadores (Brooke et al., 2008; Habashi et al., 2006; Holm et al., 2011).

Por outro lado, mutações no gene da fibrilina-2 levam à aracnodactilia contratural congênita, uma doença autossômica dominante, que apresenta algumas características em comum com a Síndrome de Marfan (Gupta et al., 2002; Lee et al., 1991). Já a fibrilina-3, o mais novo membro dessa família, não foi associada a nenhuma patologia até o momento.

1.2 MAGPs (Microfibril-Associated GlycoProtein)

As MAGPs formam outro grupo de proteínas aparentemente importante para a função estrutural das microfibrilas e seu desenvolvimento, muito embora, atualmente, saiba-se da ocorrência de isoformas intracelulares que podem desempenhar importante função na sinalização celular. Os dois membros da família das MAGPs (MAGP1 e 2) apresentam como principal característica uma sequência de 60 aminoácidos na região C-terminal que foi identificada como sendo o domínio de ligação com a matriz extracelular (Segade et al., 2002).

O gene da MAGP1 (*MFAP2*), localizado na região cromossômica 4qD3 murina, possui aproximadamente 1037 pares de bases divididos em 9 éxons (Y. Chen et al., 1993). A proteína MAGP1 é formada por 183 aminoácidos (Gibson et al., 1991), e possui dois domínios distintos (figura 1.2): a região N-terminal (exon 3-6), com características ácidas, é rica em prolina e contém um segmento rico em resíduos de glutamina, e a região C-terminal (exon 7-9), que apresenta todos os 13 resíduos de cisteína presentes na molécula e carga total líquida positiva em pH fisiológico. Esta região é muito importante na determinação da estrutura terciária e na interação dessa proteína com outras moléculas presentes nas fibras elásticas, através da formação de pontes bissulfeto (Brown-Augsburger et al., 1994).

1 10 20 30
MRAASLFLFLPAFLLAQGQYDLDPLPPYPDHVQYTH

 40 50 60 70
YSEQIENPDYYDYPEMTPRPPEEQFQFQSQQQVQQEV

 80 90 100 110
IPAPTLEPGTVETEPTEPGPLDCREEQYPCTRLYSIHK

 120 130 140
PCKQCLNEVCFYSLRRVYVVNKEICVRTVCAQEELLR

 150 160 170 180
ADLCRDKFSKCGVLASSGLCQSVAACARSCGGC

Figura 1.2. Sequência de aminoácidos da proteína MAGP1. Região C-terminal está sublinhada. GenBank: AAG49554.1

Embora o significado biológico não seja conhecido, muitos estudos bioquímicos têm demonstrado a interação da MAGP1 com várias moléculas *in vitro*, dentre elas, fibrilinas 1 e 2, tropoelastina, biglican, decorina, colágeno tipo VI, TGF- β , BMPs (proteína morfogênica do osso), entre outras (Finnis & Gibson, 1997; Jensen et al., 2001; Trask et al., 2000; Weinbaum et al., 2008; Werneck et al., 2004). Até o momento, nenhuma patologia foi relacionada à deficiência ou mutações no gene da MAGP1.

Estudos comparativos das sequências de MAGP1 mostram que é uma proteína altamente conservada, não somente entre os mamíferos, mas também entre vertebrados inferiores (65% de homologia se considerada a molécula toda e 96% se considerada a região C-terminal da proteína de mamífero comparada a do peixe zebra). Nenhum gene homólogo a MAGP1 foi encontrado em banco de dados de levedura, mosca ou vermes, sugerindo que MAGP1 é um gene relativamente novo na escala evolutiva. Na verdade, o aparecimento da MAGP1 coincide com o aparecimento do gene da elastina (Sage & Gray,

1981; Segade et al., 2002), sugerindo que estas proteínas estão relacionadas evolutivamente.

Estudos com o peixe zebra mostraram que a MAGP1 desempenha um papel importante na formação de microfibrilas durante a embriogênese e que sua expressão é crítica para o desenvolvimento vascular. Alterações vasculares estão associadas com a diminuição da interação integrina/matriz extracelular (E. Chen et al., 2006), evidenciando a importância da MAGP1 como proteína capaz de mediar a interação das células com o ambiente externo.

Para o entendimento da função da MAGP1 foram desenvolvidos animais com mutação no gene da MAGP1, cuja estratégia foi a substituição dos éxons 3-6 pelo cassete que confere resistência a neomicina (neo) (figura 1.3). Essa modificação resultou em animais denominados deficientes em MAGP1. Eles apresentam um aumento de peso e de tecido adiposo mas não possuem nenhuma patologia, são saudáveis (Weinbaum et al., 2008).

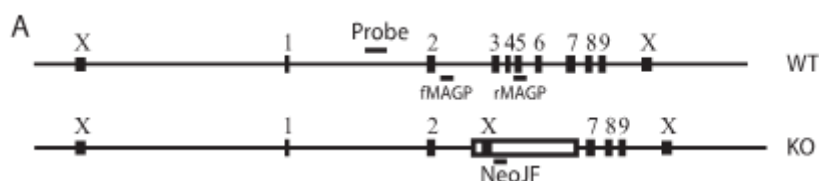


Figura 1.3: Esquema da deleção da MAGP1. WT: animal selvagem; KO: deficiente em MAGP1 (Weinbaum et al., 2008).

Weinbaum e colaboradores (2008) avaliaram a importância biológica da MAGP1 utilizando os camundongos deficientes em MAGP1. Foi observado que, muito embora os tecidos elásticos ricos em microfibrilas fossem normais e funcionais, quando em *background* genético misto, anormalidades ósseas, comprometimento do sistema cardiovascular, alterações no metabolismo energético e problemas de cicatrização estavam presentes. Fenótipos associados com mutações nas proteínas microfibrilares têm

sido atribuídos a uma inabilidade da proteína mutada ligar-se e sequestrar fatores de crescimento, particularmente membros da família TGF- β . Neste trabalho foi visto que essa proteína pode se ligar às formas ativas de BMP-7 (proteína morfogênica do osso) e de TGF- β , sugerindo que as alterações encontradas podem estar relacionadas a esses fatores de crescimento.

Um fenótipo que mostra completa penetrância em camundongos deficientes em MAGP1 é o aumento da adiposidade. Esta característica é particularmente importante em estudos que associam traços de obesidade em humanos com um locus no cromossomo 1p36 que inclui o gene para MAGP1 (*MFAP2*) (Craft et al., 2014).

Além disso, Craft e colaboradores (2014) verificaram que a expressão de MAGP1 estava significativamente alterada em humanos obesos e observaram também que a inativação do gene da MAGP1 em camundongos resulta em hipertrofia dos adipócitos e predisposição a disfunção metabólica, além do fato desses animais apresentarem aumento da atividade de TGF- β no tecido adiposo. O tratamento com anticorpo que neutraliza TGF- β previne o aumento do fenótipo de adiposidade, sugerindo que a regulação do TGF- β pela MAGP1 protege contra o efeito do estresse metabólico e a predisposição a disfunção metabólica.

O fenótipo esquelético encontrado em camundongos mutantes para fibrilina-1 e MAGP1 sugere que ambas proteínas contribuem para um mecanismo comum de regulação de células ósseas. Assim como a fibrilina, a MAGP1 pode interagir com o TGF- β mas difere da fibrilina por se ligar à forma ativa desse fator de crescimento. Dessa forma, o sítio de ligação da MAGP1 na fibrilina tem sido mapeado como sendo a região de ligação de fatores de crescimento à fibrilina e a presença de MAGP1 pode interferir na interação da fibrilina com o TGF- β latente (Massam-Wu et al., 2010). Sendo assim, nas

microfibrilas, a mutação de uma proteína pode afetar as propriedades biológicas da outra (Craft et al., 2012).

Além disso, animais deficientes em MAGP1 apresentaram o dobro do tempo de um animal selvagem para formar um trombo (quando submetidos a um ensaio de trombose arterial). Técnicas bioquímicas demonstraram que a MAGP1 é capaz de se ligar ao fibrinogênio e fator von Willebrand sugerindo um possível mecanismo de ação através da interação com essas moléculas. E, ainda, a injeção de MAGP1 recombinante (nos animais knockouts), antes do ensaio de trombose arterial, recupera o tempo normal de formação de trombo. Por imunolocalização foi demonstrado que a MAGP1 injetada se encontrava na interface do trombo com a parede do vaso e ainda, com menor intensidade, nas outras regiões do trombo, sugerindo que a MAGP1 está sendo incorporada na estrutura do trombo (Werneck et al., 2008).

Dessa forma, considerável atenção tem sido dada para determinar qual o possível domínio da proteína MAGP1 tem importância na trombogênese. Os resultados obtidos por Machado (2010) (dados não publicados) demonstraram que a região C-terminal da MAGP1 possui atividade pró-trombótica. Ensaio de trombose realizados após injeção de MAGP1 recombinante mutada em resíduos de cisteína (CG3 ou CG9) sugerem, mais uma vez, a importância da região C-terminal para a ação trombótica. Provavelmente a ação pró-trombótica da MAGP1 está relacionada com a sua deposição na matriz e sua capacidade de interação com outras moléculas, fator de von Willebrand por exemplo, e essas mutações provavelmente abolem essas interações.

Por outro lado, a injeção de um peptídeo com homologia a uma sequência da trombospondina-1 (peptídeo 4N1K), foi capaz de resgatar o tempo de oclusão normal. Esse peptídeo da trombospondina-1, *in vitro*, tem capacidade de ativar plaquetas

aumentando sua adesão e formando agregados (Chung et al., 1999). Tanto o peptídeo da MAGP1 quanto o da trombospondina-1 foram efetivos em diminuir o tempo de formação de trombo *in vivo*. Considerando esses dados mais a ausência de atividade da forma mutada da MAGP1 em um dos resíduos de cisteína, foi sugerido que esta mutação poderia impedir a deposição da proteína na matriz extracelular, como visto por Segade e colaboradores (acho que Segade et al., 2002) fazendo com que a sequência responsável por esta atividade, o peptídeo trombospondina-*like*, não seja exposta (Machado, 2010).

Além disso, Machado (2010) sugeriu que a cisteína livre, já que a MAGP1 apresenta número ímpar de resíduos (13 resíduos), é importante no processo de deposição da proteína na matriz extracelular, e que ela pode ser o ponto de interação com outra proteína neste processo de hemostasia. Ou ainda que a mutação de uma cisteína faz com que a estrutura terciária da proteína se altere de tal forma impedindo sua deposição na matriz e consequentemente, sua atividade.

TGF- β (Transforming Growth Factor)

O TGF- β é constituído por uma grande família de proteínas e está presente sob três isoformas – TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3 (ten Dijke & Arthur, 2007). Ele promove diferentes respostas biológicas ligando-se a um par de receptores de membrana dos tipos I e II, que juntos ativam uma sinalização intracelular mediada pelas proteínas SMADs, que uma vez fosforiladas, são levadas ao núcleo, onde ativam ou reprimem a transcrição de diferentes genes alvos (Feng & Derynck, 2005; Massagué & Gomis, 2006; Kang et al., 2009).

Esse fator de crescimento, além de se envolver em diferentes respostas biológicas, como o controle da proliferação e diferenciação celular, desempenha um papel importante durante a organogênese do coração, rim, osso, fígado, trato gastrointestinal e vascular.

Além disso, promove a inibição da proliferação de células do tecido conjuntivo, diminuição da degradação de colágeno e mantém a homeostasia no adulto, com funções autócrinas, parácrinas e, em alguns casos, endócrinas. O desbalanceamento do TGF- β está relacionado a muitas patologias, dentre elas o câncer, fibrose, doença auto-imune e vascular (ten Dijke & Arthur, 2007; Zeisberg et al., 2003).

A superfamília TGF- β é composta por várias citocinas multifuncionais, incluindo TGF- β , BMPs, ativinas, inibinas e micostatinas. Essas citocinas participam de uma gama de processos que incluem, dentre outras, diferenciação tecidual durante o desenvolvimento através da regulação da função de células imunes e mesenquimais (Bobik, 2006). TGF- β e BMPs têm sido implicados em desordens vasculares, tais como aterosclerose, hipertensão pulmonar e re-estenose após angioplastia (Fahrenbach et al., 1996). TGF- β 2 e 3, e BMP-4, -5, -6 e -7 são expressos por células na parede dos vasos e são capazes de modular o desenvolvimento e remodelamento vascular por alterarem a diferenciação, proliferação, migração, produção de matriz extracelular e atividade das células imunes (Ramirez & Dietz, 2007; Yamamoto et al., 2000).

O TGF- β inicia sua sinalização por ligação ao receptor de TGF- β , composto por duas subunidades (T β RI e T β RII), que pode transmitir sinal por uma via canônica (dependente de SMAD) ou não canônica MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno) e ERK (quinase reguladora de sinal extracelular) (Doyle et al., 2012).

Uma das vias de modulação do TGF- β ocorre pelo vasoconstritor angiotensina II (AngII), indutor da expressão de trombospondina 1, um potente ativador de TGF- β (Murphy-Ullrich & Poczatek, 2000). Na parede dos vasos, a sinalização via receptor de angiotensina II, AT1, estimula a proliferação de VSMCs (células musculares lisas vasculares) e fibrose da parede vascular.

1.6 Losartan

O losartan é atualmente utilizado no tratamento clínico da hipertensão e prevenção de acidente vascular encefálico em adultos e crianças. Estudos demonstraram a utilização do fármaco losartan como bloqueador do receptor AT₁ de AngII, diminuindo ativação de TGF- β (figura 1.4). (Habashi et al., 2006; Gallo et al., 2014).

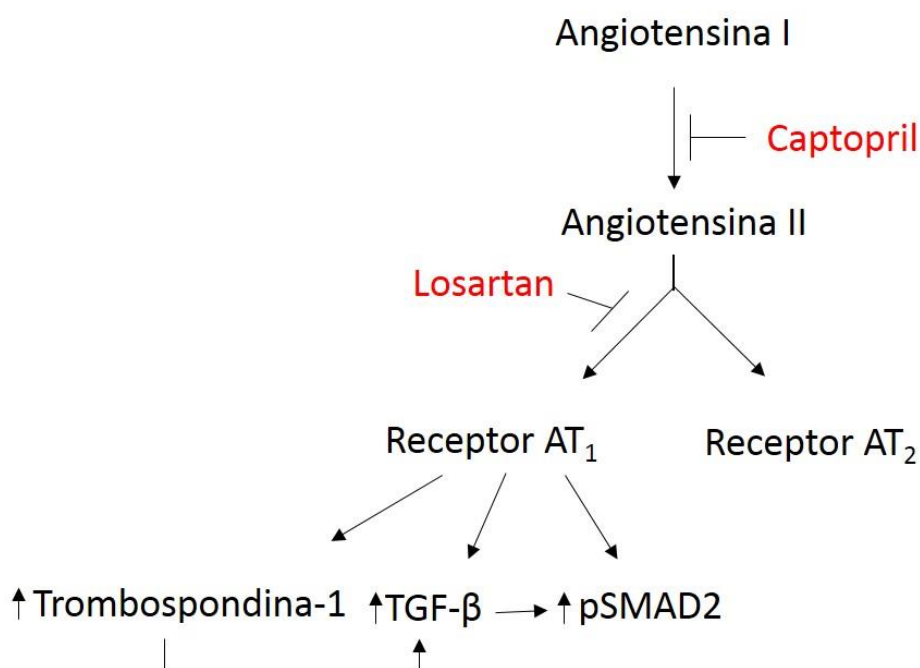


Figura 1.4: Esquema da inibição do receptor AT₁ por losartan (adaptado de Brooke et al., 2008).

Além disso, Habashi et al. (2006) demonstraram uma melhora na arquitetura das fibras elásticas quando trataram camundongos transgênicos, que apresentavam sinais clínicos da Síndrome de Marfan, com anticorpo anti-TGF- β e, conforme aumentaram as doses do anticorpo, a melhora foi ainda mais significativa. Somado a isso, os animais também foram tratados com os fármacos propranolol (β -bloqueador) e losartan, onde foi visto uma melhora significativa nas estruturas das fibras elásticas quando utilizado o losartan.

Em relação aos efeitos do losartan, estudos com portadores da Síndrome de Marfan tratados com esse fármaco mostraram que esses pacientes apresentaram melhora significativa dos sinais e sintomas devido ao fato do losartan ser capaz de diminuir os níveis de TGF- β após bloqueio do receptor AT1 (Robinson et al., 2006; Brooke et al., 2008; Chiu et al., 2013; Groeninck et al., 2013).

1.5 Captopril

Outra classe de fármacos anti-hipertensivos, utilizados no tratamento da Síndrome de Marfan, são os inibidores da enzima conversora de angiotensina II (ACE) - captopril. Eles atuam no sistema renina-angiotensina inibindo a conversão da angiotensina I em angiotensina II. Nos pacientes portadores da Síndrome, esses medicamentos são indicados no tratamento da hipertensão e na prevenção do aneurisma aórtico. O aneurisma aórtico é causado por uma fragmentação e desorganização das fibras elásticas, com consequente enfraquecimento e ruptura da parede da aorta (Ahimastos et al., 2007; Habashi et al., 2011).

Drogas anti-hipertensivas podem reduzir a rigidez arterial por meio da redução da pressão arterial (Wojakowski et al., 2001). Acredita-se que esses resultados poderiam estar relacionados com os níveis de TGF- β e MMPs (Ahimastos et al., 2007).

1.6 Metaloproteinases de Matriz

As MMPs (Metaloproteinases de Matriz) compõem um grupo de 28 endopeptidases dependentes de zinco conhecidas por degradar vários componentes da matriz extracelular (ECM) e são importantes em muitos processos vasculares, sejam eles patológicos ou fisiológicos, por serem capazes de degradarem todos os componentes da ECM (Birkedal-Hansen et al., 1993; Castro & Tanus-Santos, 2013). Essas enzimas são secretadas na sua forma latente (pró-enzima) e precisam ser ativadas para degradarem

ECM. A ativação acontece após clivagem proteolítica de um domínio pró-peptídeo na região N-terminal da molécula, catalisado por enzimas proteolíticas incluindo outras MMPs (Fridman et al., 1995; Khan et al., 2012).

As MMPs são subdivididas de acordo com sua especificidade ao substrato. Sendo assim, as MMP-1, -8 e -13 são conhecidas como collagenases (Austin et al., 2013). Elas são capazes de degradar colágeno tipo fibrilar a partir da clivagem de um sítio de ligação na região N-terminal. Como o colágeno é a proteína mais abundante no corpo humano, as collagenases representam uma classe de enzimas essenciais no desenvolvimento normal e reparo tecidual (Shoulders & Raines, 2009).

As MMP-2 e -9 compõem a classe das gelatinases, capazes de degradar produtos gelatinosos da degradação do colágeno (Newby, 2012). Uma outra subfamília conhecida é das estromelisinases, cujos membros são MMP-3, -7, -10 e -11. Essas MMPs degradam laminina, fibronectina, elastina entre outras (Jones et al., 2003). Já a MMP-12 é conhecida como uma metaloelastase, remotamente relatada. Pode ser encontrada em macrófagos e degrada elastina (Nagase et al., 2006). A última classe das MMPs é composta pelas MMP-14, -15, -16, -17, -24 e -25, classificadas como MMPs trans-membrana (Austin et al., 2013).

As MMPs não somente clivam a matriz para liberar fragmentos bioativos, como também possuem ações adicionais como ativar ou liberar fatores de crescimento sequestrados, ativação de outras MMPs e proteases. A MMP-9, por exemplo, é capaz de liberar fragmentos da matriz que influenciam na angiogênese, crescimento tumoral e liberam os fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF) e TGF- β (Mott & Werb, 2004; Newby, 2005). Esses fatores de crescimento são normalmente estocados na ECM e podem ser liberados após proteólise realizada por MMP (Mott & Werb, 2004). Além

disso, a MMP-9 degrada citocinas inflamatórias (Interleucina-1 β) e promove produção de interleucina-10 além de atuar no aumento da vascularização e ossificação (Thomas & Newby, 2010). Um estudo de modelo de trombose *in vivo* demonstrou que a MMP-2 ativa pode amplificar a agregação plaquetária em resposta a estímulos fracos, sugerindo um risco aumentado de eventos trombóticos (Ketelhuth & Bäck, 2011).

O aumento dos níveis de MMP-1, -2, -3, -7, -9, -10, -11 e -12 tem sido descrito em vasos ateroscleróticos em comparação com vasos humanos saudáveis, e sua distribuição celular está ilustrada na figura 1.5 (Ketelhuth & Bäck, 2011).

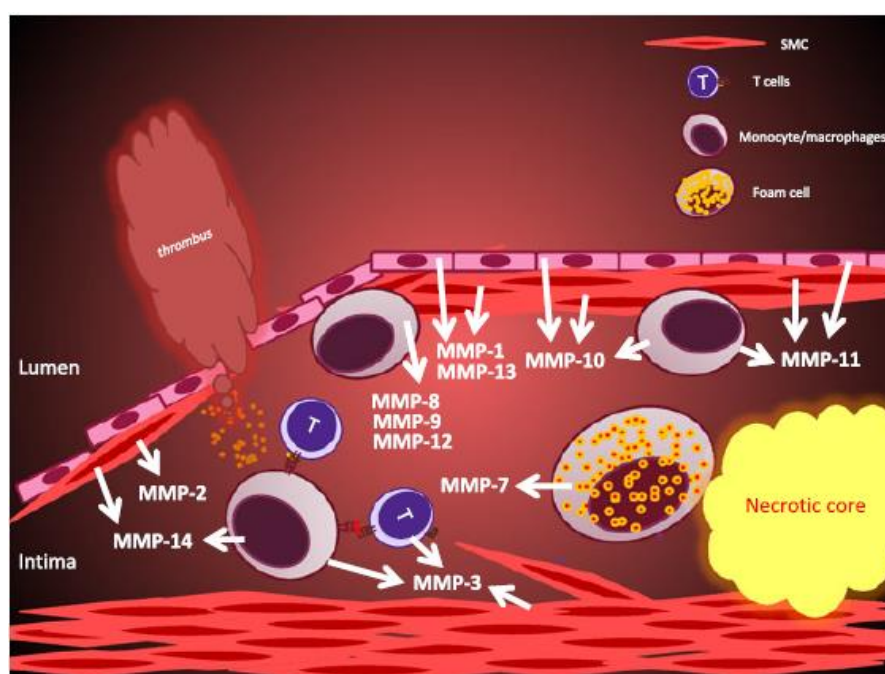


Figura 1.5: Distribuição topológica de MMPs (metaloproteinases) na lesão aterosclerótica humana, com grandes fontes celulares para as respectivas enzimas. SMC: Célula muscular lisa (Ketelhuth & Bäck, 2011).

O VEGF é um fator importante no processo de angiogênese por aumentar a permeabilidade vascular e promover o crescimento de novos vasos. A proteólise da ECM libera VEGF associado a ela, aumentando a sua biodisponibilidade. Alguns estudos sugerem que a MMP-9, e possivelmente outras MMPs, são importantes para a mobilização de VEGF da ECM (Mott & Werb, 2004).

As MMPs também são capazes de mobilizar e ativar TGF- β , que é uma citocina multifuncional importante para a manutenção da homeostase tecidual. O TGF- β é secretado e mantido na ECM na sua forma latente, ligado ao peptídeo associado a latência (LAP). O complexo latente de TGF- β é sequestrado da ECM por ligação covalente entre o LAP e a proteína de ligação ao TGF- β latente (LTBP), um membro da família das fibrilinas. O controle da atividade do TGF- β é regulado por liberação proteolítica do grande complexo latente da ECM e por dissociação entre o LAP e o TGF- β (Annes et al., 2003). As MMP-2, -9, -13 e -14, ativam diretamente o TGF- β via clivagem do LAP, ou indiretamente, a partir da liberação do grande complexo latente da ECM. A liberação do complexo latente pode ocorrer por proteólise do LTBP ou por proteólise de moléculas da ECM ligadas ao LTBP (Mott & Werb, 2004). A desregulação da atividade de TGF- β pode ter consequências severas como por exemplo a Síndrome de Marfan (Neptune et al., 2003).

1.7 Trombose

Além da função estrutural na formação das fibras elásticas e da regulação de fatores de crescimento como o TGF- β , as microfibrilas dão importante suporte para adesão e agregação de plaquetas, demonstrando ter função trombogênica em condições dinâmicas *in vitro*, o que sugere sua participação na hemostase (Ross et al., 1998).

A hemostase é o processo que mantém a integridade de um sistema circulatório fechado após injúria vascular. A lesão na parede do vaso e o extravasamento de sangue da circulação rapidamente iniciam eventos na parede do vaso e no sangue (Furie & Furie, 2008). A formação do coágulo hemostático está localizada na parede do vaso e não prejudica muito o fluxo sanguíneo (Owens & Mackman, 2010). Desse modo, a coagulação sanguínea, iniciada pelo fator tecidual (Tf) culmina na formação de trombina

e fibrina. Hoje sabe-se que esses eventos ocorrem concomitantemente (Furie & Furie, 2008).

Quando os processos patológicos sobrecarregam os mecanismos de regulação da hemostasia formam-se quantidades excessivas de trombina, iniciando a trombose. O que resulta em alterações significativas do fluxo sanguíneo e até mesmo a oclusão completa do vaso (Owens & Mackman, 2010). Sendo assim, a trombose é um evento crítico na doença arterial associada ao infarto do miocárdio e mal súbito e distúrbios tromboembolíticos venosos representam considerável morbidade e mortalidade (Furie & Furie, 2008). Vários fatores de risco podem aumentar a incidência de trombose arterial como o cigarro, a hipertensão, hiperlipidemia e diabetes mellitus (Owens & Mackman, 2010).

A parede do vaso, com seu revestimento interno, é crucial para a manutenção de uma vasculatura potente. O endotélio contém três trombo-reguladores – óxido nítrico (Palmer et al., 1987), prostaciclina (Marcus et al., 2002) e a ectonucleotidase CD39 (Marcus et al., 2005) – que juntos promovem a defesa contra a formação de trombo. O colágeno na matriz subendotelial e o Tf facilitam a manutenção de um sistema circulatório fechado. Quando ocorre ruptura da parede do vaso ou lesão endotelial, colágeno e Tf ficam expostos ao fluxo sanguíneo iniciando então a formação do trombo (Furie & Furie, 2008). (Figura 1.6).

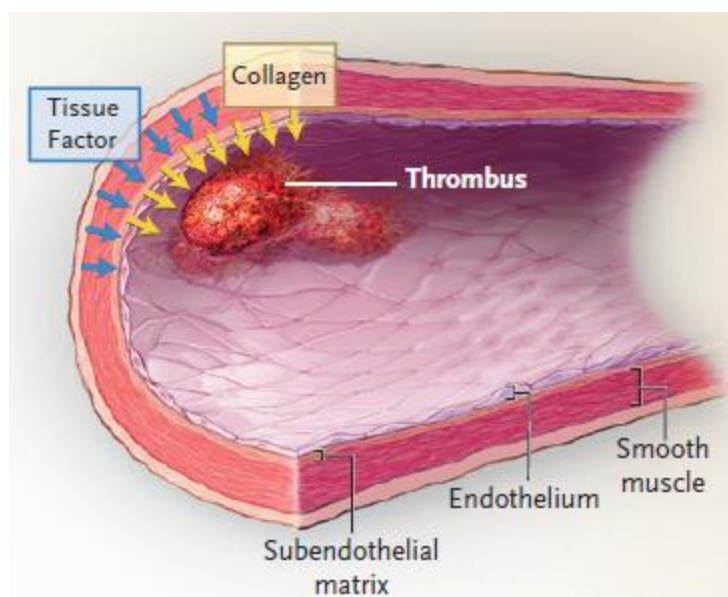


Figura 1.6: Colágeno e Tf associado a parede do vaso promovem uma barreira hemostática. O colágeno (setas amarelas), localizado na matriz subendotelial não é exposto ao fluxo sanguíneo sob condições normais. O fator tecidual (setas azuis), localizado nas camadas média e adventícia da parede do vaso, entra em contato com o fluxo sanguíneo quando o vaso é rompido. Tanto o colágeno quanto a fibrina iniciam a formação de trombo. O colágeno é a primeira linha de defesa e o Tf a segunda (Furie & Furie, 2008).

A trombose arterial é o resultado final de múltiplos e complexos processos integrados iniciados por danos a parede vascular (Mackman, 2008; Wisler & Becker, 2014). A ruptura da integridade vascular, imediatamente reconhecida como uma ameaça à homeostase (e sobrevivência), é caracterizada por exposição de proteínas subendoteliais tais como o colágeno, Tf e colágeno associado ao fator von Willebrand, para a circulação (Furie & Furie, 2008; Hoffman & Monroe, 2001). A exposição de colágeno desencadeia adesão e ativação de plaquetas através da glicoproteína VI (plaquetária) e expõe o colágeno ligado ao fator von Willebrand por interações com outra glicoproteína plaquetária, Ib-V-IX (Dubois et al., 2006; Fahrenbach et al., 1996; Morrissey et al., 1993).

O colágeno medeia a adesão plaquetária quando proteínas da matriz extracelular subendotelial são expostas ao sangue, podendo assim, desempenhar um papel na

aterotrombose (Dubois et al., 2006). A ativação plaquetária iniciada por colágeno é independente de trombina (Wisler & Becker, 2014).

A exposição de Tf (extravascular) facilita a geração de trombina já que o próprio Tf é um potente ativador de trombina (Furie & Furie, 2008). Tf forma um complexo com fator VIIa e esse complexo, por sua vez, ativa os fatores IX e X, iniciando uma cascata proteolítica e geração de trombina (Morrissey et al., 1993). A trombina cliva os receptores ativadores de proteases-1 e -4 (Par1 e 4) na superfície das plaquetas com subsequente ativação de plaquetas e liberação de adenosina difosfato (ADP), serotonina e tromboxano A₂. A liberação desses agonistas recruta e ativa outras plaquetas e amplificam o sinal para a formação de trombo (Furie & Furie, 2008; Vu et al., 1991; Wisler & Becker, 2014).

A compreensão da base molecular e celular da formação de trombo avançou significativamente através da utilização de novas técnicas para o estudo de modelos de trombose em camundongos (Furie & Furie, 2008). Desse modo, o modelo de injúria por laser e rosa de bengala (modelo fotoquímico) foi utilizado ao longo desse trabalho (Owens & Mackman, 2010).

O modelo fotoquímico induz a formação de trombo a partir de geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). Utiliza reação fotoquímica para causar injúria endotelial localizada por formação de EROs. O corante rosa de bengala é injetado no sangue (veia lateral caudal) provocando uma lesão de dentro para fora. A exposição do rosa de bengala ao laser induz a formação de radicais de oxigênio singlete. A formação do trombo é monitorada por uma sonda que mede o fluxo sanguíneo determinando o tempo de oclusão do vaso, quando esse fluxo zera (Ambrosio et al., 1997; Owens & Mackman, 2010).

Os métodos de estudo de modelo de trombose são, naturalmente, artificiais, e só são úteis para o desenvolvimento de trombo experimental. Sua relação com a formação

de trombo de ocorrência natural em seres humanos ainda é desconhecida, mas eles oferecem um modelo para o estudo de trombos que são espacial e temporalmente definidos (Furie & Furie, 2008).

Nosso laboratório tem se dedicado ao estudo da possível participação das moléculas que compõem a rede de microfibrilas na formação de trombo. Para isso temos trabalhado no mapeamento de moléculas, como a MAGP1, com o intuito de verificar qual domínio teria maior atividade na trombose arterial.

Além disso, utilizamos o modelo de injúria arterial por rosa de bengala (He et al., 2002) em camundongos deficientes em MAGP1 (Werneck et al., 2008) e fibrilina-1. Os animais deficientes em fibrilina-1, assim como os deficientes em MAGP1 apresentaram um tempo de formação de trombo aumentado em relação aos animais selvagens (dados não publicados). É sabido que animais deficientes em fibrilina-1 quando tratados com losartan apresentam recuperação dos sinais clínicos da Síndrome de Marfan.

Levando em consideração a importância do TGF- β em processos de cicatrização e manutenção dos tecidos e o fato de a MAGP1 se ligar à forma ativa desse fator de crescimento, o presente trabalho teve como objetivo verificar o papel da MAGP1 na trombose arterial e a relação do TGF- β nesse processo, através do tratamento com losartan e captopril.

OBJETIVOS

2. Objetivos

- Avaliar a importância biológica da MAGP1 na trombogênese arterial a partir de mutações sítio dirigidas na região C-terminal da molécula;
- Avaliar a capacidade de interação da forma mutante da MAGP1 (VG1) com moléculas importantes para coagulação sanguínea, como Fator von Willebrand e fibronectina;
- Verificar a possível influência do TGF- β a partir do tratamento com Losartan e Captopril.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. Materiais e Métodos

3.1 Animais

Para os experimentos, foram utilizados camundongos deficientes em MAGP1 que foram cedidos pelo Dr Robert P. Mecham, Washington University School of Medicine (WUSW), EUA. Já para o controle, foram utilizados camundongos selvagens da linhagem C57BL/6J, com idade entre 7-10 semanas, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB), da Universidade Estadual de Campinas, SP. Os camundongos foram mantidos em temperatura de 22 ± 1 °C em ciclo de claro-escuro de 12h, com livre acesso à água e à ração (Nuvilab CR1[®]). Os protocolos experimentais foram previamente submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEAA/IB/Unicamp).

3.2 Mutagênese Sítio Dirigida

Após seleção dos vetores apropriados para mutação sítio dirigida, os vetores de expressão (Qiagen, Valencia, CA) disponíveis em estoques foram utilizados na transformação de células M15[pREP4]. A partir da colônia selecionada foi realizada a cultura na presença de antibiótico (ampicilina 100 µg/ml e kanamicina 25 µg/ml) e a indução da proteína de interesse através do uso de isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG, concentração final 5 mM). As bactérias foram centrifugadas (3000 xg por 30 minutos) e o precipitado foi lisado com tampão de lise (NaH₂PO₄ 100 mM + Tris-HCl 10 mM + uréia 8M pH 8,0) em agitador durante duas horas em temperatura ambiente. As amostras foram então submetidas à centrifugação por 30 minutos à 15000 xg e o sobrenadante foi reservado para análise.

Foi realizado, então, eletroforese em gel de poliacrilamida 10% e a expressão da proteína em questão avaliada em comparação ao perfil de expressão proteica das bactérias

não induzidas com IPTG. Selecionou-se as amostras com maiores níveis de expressão para que fossem empregadas no processo de mutagênese.

Em posse do DNA plasmidial analisado em gel de agarose 0.7% e isolado das amostras com atividade de expressão mais significativa, procedeu-se com a mutação sítio-dirigida da região C-terminal. O produto do processo de PCR (Polymerase Chain Reaction) foi transformado em células supercompetentes Max Efficiency™ DH5α™ (Invitrogen) e plaqueado em meio sólido; Isolou-se seis colônias para posterior sequenciamento e confirmação da efetividade do procedimento.

As colônias submetidas à reação de sequenciamento cujo resultado mostrou-se positivo para a mutação de interesse foram utilizadas na transformação de células M15[pREP4] (Qiagen), com subsequente cultura em presença de antibióticos seletivos (ampicilina 100 µg/ml e kanamicina 25 µg/ml) e indução de expressão com IPTG (concentração final 5mM). Os produtos desse processo foram analisados em gel de poliacrilamida 10%.

O processo de purificação em coluna utilizando resina de NTA-Níquel (ácido nitrilo tri-acético) foi realizado de acordo com as instruções do fabricante (Qiagen, Valencia, CA).

Dessa forma, foram feitas mutações na molécula de MAGP1 que foram usadas no modelo de trombose arterial. Foram realizados dois processos de mutagênese na MAGP1. O processo de mutagênese inicial consistiu na substituição de um aminoácido alvo (Valina) por outro aminoácido (Glicina), sem que houvesse outras alterações no restante da sequência geral da molécula. O segundo processo baseou-se na alteração da molécula mutante onde houve uma segunda mutação pontual (troca de outra Valina por outra Glicina). A substituição de duas Valinas por duas Glicinas (MAGP1-VG1) foi realizada

em função da grande similaridade entre a sequência C-terminal da MAGP1 e um peptídeo derivado da trombospondina-1 (Chung et al., 1999).

Primers utilizados (IDT – Integrated DNA Technologies, USA):

VG1STF- TCCGCCGCGTCTACGGCGGCAATAAGGAGAT

VG1Rev- ATCTCCTTATTGCCGCCGTAGACGCGGCGGA

VG2STF- GCCGCGTCTACGTCGGCAATAAGGAGATCTG

VG2Rev- CAGATCTCCTTATTGCCGACGTAGACGCGGC

3.3 Ensaio de ligação em fase sólida (Solid Phase Binding Assay)

A proteína fibronectina, tropoelastina ou fator von Willebrand (10 µg/ml em tampão 0.2 M fosfato de sódio, pH 6.5) foi incubada em uma placa de 96 *wells* por 16 h a 4 °C (100 µl/*well*). Sítios de ligação não específicos foram bloqueados com tampão de bloqueio (10% de soro fetal bovino em solução PBS) por 1 hora a temperatura ambiente. Diluições seriadas das proteínas MAGP1 e MAGP1-VG1 (1:3, com concentração inicial de 100 µg/ml) foram preparadas em tampão de ligação (PBS, 10% de SFB, 2 mM de CaCl₂) e incubadas com as proteínas imobilizadas durante 2h, a temperatura ambiente. A ligação entre as proteínas foi detectada por incubação com anticorpo primário policlonal anti-MAGP (proporção 1/500 em tampão de ligação) por 1h a temperatura ambiente seguida de detecção por anticorpo secundário (1/800) por 1h a temperatura ambiente (Peroxidase conjugated goat anti-rabbit – HRP, Dako). Os poços foram lavados 3 vezes com PBS 0.05% Tween-20 após cada etapa de incubação. Solução de ABTS (Component Microwell Peroxidase Substrate, KPL) foi utilizada para o desenvolvimento de cor e a reação interrompida com solução de SDS 1%. A leitura da placa foi realizada a 405 nm (Gen5™ Data Analysis Software – Bio Tek).

3.4 Tratamento com fármaco

Os camundongos selvagens e deficientes em MAGP1, com 4 semanas de idade, foram tratados por quatro semanas com losartan (15 mg/kg/dia), captopril (30 mg/kg/dia), ou placebo (água filtrada/kg/dia), os quais foram administrados via gavagem diária.

3.5 Aferição da pressão arterial dos animais

Ao término da quarta semana de tratamento, os animais foram posicionados (quatro por vez) no aparelho de pletismografia (Kent Scientific), em seguida, suas caudas foram colocadas em um manguito, a fim de aferir a pressão sanguínea durante uma semana, um método não invasivo. Para aferição foram utilizados seis animais por grupo. Além disso, os camundongos também foram anestesiados com os cloretos de ketamina (10% - 100 mg/kg de peso) e de xilazina (2% - 16 mg/kg de peso) e, em seguida, foi novamente aferida a pressão. Para cada grupo foram utilizados seis animais (Krege, Hodgin, Hagaman, & Smithies, 1995).

3.6 Indução fotoquímica do trombo

Este procedimento foi realizado conforme descrito por He et al. (2002), porém com algumas modificações. Os animais (n=8) foram anestesiados com os cloretos de ketamina (10% - 100 mg/kg de peso) e de xilazina (2% - 16 mg/kg de peso) injetado de forma intramuscular e foram colocados na posição supina. Em seguida, foi realizada uma incisão na média cervical do lado direito, a fim de isolar a artéria carótida ou veia jugular, e posicionada a sonda (Transonic Flow probe MAO SPSB). Na veia lateral caudal do animal, foi injetada uma solução de rosa de bengala (Sigma Aldrich, St Louis-USA) com volume de 120 µl e concentração de 50 mg/kg com auxílio de uma agulha de 29-gauge. Após tal procedimento, foi aplicado um laser verde a 1.5 mW com 540 nm (Melles Griot 25LGR), posicionado a uma distância de 6 cm da incisão. O laser permaneceu ligado até

a formação do trombo, onde o fluxo foi monitorado por uma sonda de ultra-som (Transonic System Inc TS420). O processo de trombose após a injeção de rosa de bengala está relacionado com a formação de espécies reativas de oxigênio à partir da estimulação do corante pela luz do laser, que levam à lesão do endotélio (Figura 3.1).

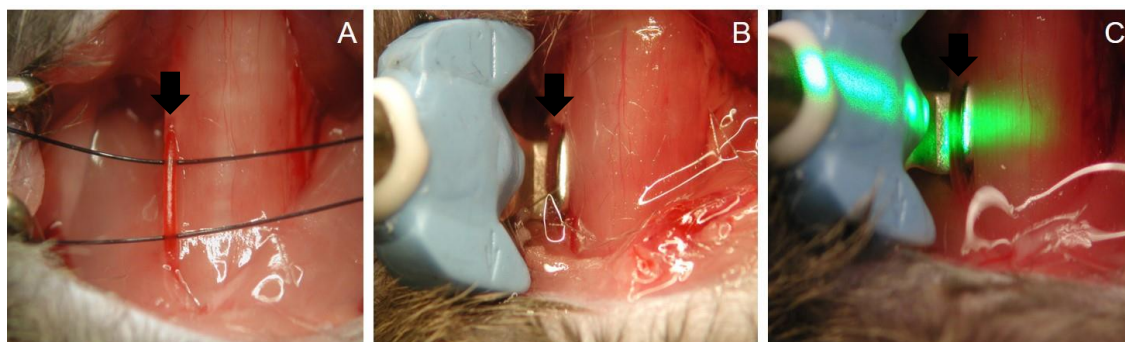


Figura 3.1: *Indução fotoquímica do trombo na artéria carótida direita de camundongo. A) Isolamento do vaso; B) Posicionamento da sonda de ultrassom e C) Aplicação do laser 540nm. As setas indicam a artéria carótida.*

3.7 Análise morfológica da carótida direita após a indução fotoquímica do trombo em animais selvagens e deficientes em MAGP1 por meio de microscopia de luz.

A artéria carótida direita (n=3-4) foi fixada com paraformaldeído 4% e 0,5% de glutaraldeído (Merck, Darmstadt, Alemanha) em PBS 0,1 M (pH 7,4) durante 24 horas a 4°C. Em seguida, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool, embutidas em historesina (Leica Microsystems Heidelberg, Alemanha) e seccionadas transversalmente com uma largura de 2 μ m. Logo, as seções resultantes de série foram montadas em lâminas e coradas com Giemsa. As seções foram examinadas pela Nikon Eclipse E800 microscópio de luz (ampliação original 60x).

3.8 Determinação de TGF- β no plasma

O sangue foi coletado pela veia cava com auxílio de uma seringa com solução de EDTA (10%) com a proporção de 1:9 (volume/volume). Logo após, foi submetido à centrifugação a 1000 xg por 20 minutos, o plasma obtido foi centrifugado à 10000 xg por

10 minutos e congelado a -20 °C. A análise foi realizada a partir do kit Quantikine Immunoassay (R&D Systems, Minneapolis-USA).

Uma alíquota de 40µl do plasma foi ativada com 10 µl de HCl 1N por 10 minutos, em seguida, foi neutralizada com 8µl da solução de NaOH 1,2 N / HEPES 0,5 M, e diluída em diluente de calibração na concentração de 1:60. A placa de ELISA foi sensibilizada com anticorpo primário, na qual foi adicionado 50 µl do diluente RD1-73 e 50 µl do padrão, controle ou amostra ativada, em cada poço. Posteriormente, a placa foi coberta e incubada por 2 horas em temperatura ambiente. Após a incubação, a placa foi lavada com auxílio de um aparelho automático (Multiwash II, Tricontinent scientific - USA) com tampão de lavagem por 4 vezes, e 100 µl do TGF-β conjugado foi adicionado a cada poço e, novamente, incubada por 2 horas. Em seguida, a placa foi lavada por 4 vezes com tampão de lavagem. Foi adicionado 100 µl de solução de substrato, protegida da luz e incubada por 30 minutos. Finalmente, foi adicionado 100 µl de solução *Stop* em cada poço e realizada a leitura no comprimento de onda de 450nm (com correção fixada em 540 nm ou 570 nm) (Synergy 2, Biotek, Winooski - USA).

3.9 Análise morfológica das plaquetas por meio de microscopia eletrônica de transmissão

Esta análise foi realizada conforme descrito por James G. White (White, 2002), porém com algumas modificações. O sangue foi coletado em seringa com citrato (3,2%) por meio da veia cava e centrifugado a 2300 xg por 10 segundos a 25 °C para obter o plasma rico em plaquetas (PRP), em seguida, o PRP foi coletado e centrifugado por 1 minuto a 25 °C a fim de obter o plasma pobre em plaquetas (PPP). O PPP foi fixado com glutaraldeído 0,5% por 10 minutos a 37 °C. Depois, foi centrifugado a 800xg por 1 minuto e o sobrenadante foi descartado, o pellet obtido foi fixado com glutaraldeído 3% por 2 horas em temperatura ambiente. O sobrenadante foi novamente descartado e o pellet foi

lavado com tampão e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1%, por 1 h a 4 °C. Em seguida, foram desidratados com álcool etílico em concentrações crescentes e pré-embebidos em mistura de óxido de propileno e em resina Epon na proporção de 1:1, 3:1, durante 2 h e, depois, embebidos em resina Epon 100% *overnight*. As amostras foram incluídas em resina e mantidas em estufa a 57 °C, durante 72h. Posteriormente, foram feitos cortes semi-finos (1 µm) do material e corados, a quente, com solução de 0,5% de Azul de Toluidina. Além disso, foram feitos cortes ultrafinos (70 nm), a fim de estudar a morfologia da área de interesse. Estes cortes foram fotografados em microscópio eletrônico de transmissão (LEO 906-Zeiss) (ampliação original 27800x), no Laboratório de Microscopia Eletrônica (LME) do Instituto de Biologia – Unicamp.

3.10 Tempo de Protrombina

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

3.11 Tempo de tromboplastina parcial ativada

O tempo de coagulação do plasma citratado (3,2%) foi determinado após o sangue ser retirado da veia cava e centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos a 25 °C. Em seguida, uma alíquota de 50 µl de plasma foi pré aquecida a 37 °C por 2 minutos e, depois foi adicionado 50 µl de reagente TTPA CLOT e incubado a 37°C por 2 minutos. Finalmente, a reação foi disparada assim que foi adicionado 50 µl de cloreto de cálcio. Esta análise foi realizada em duplicata, por meio do Kit TTPA CLOT da BIOS diagnóstico.

3.12 Ensaio de agregação plaquetária

O sangue foi coletado pela veia cava com seringa contendo citrato (3,2%) com a proporção de 1:9 (volume/volume) e centrifugado 100 xg por 15 minutos, a fim de se obter o plasma rico em plaquetas (PRP). Em seguida, o PRP foi coletado e adicionado 1mL de tampão de lavagem (NaCl 140 mM; KCl 0,5 mM; citrato trissódico 12 mM; glicose 10 mM; sacarose 12,5 mM, pH 6) e centrifugado 800 xg por 12 minutos. O sobrenadante foi descartado, o pellet obtido foi ressuspensionado com solução de Krebs (NaCl 118 mM; NaHCO₃ 25 mM; KH₂PO₄ 1,2 mM; MgSO₄ 1,7 mM; glicose 5,6 mM, pH 7,4). O número de plaquetas foi ajustado para $1,2 \times 10^8$ plaquetas/mL na presença de CaCl₂ 1 mM. Em seguida, 400 µL de suspensão de plaquetas foram adicionadas na cubeta e elas foram desafiadas com dois agonistas ADP 50 µmol/mL e trombina 0,1 U/mL. A leitura foi realizada no aparelho Chrono-log, Kordia Life Sciences, Leiden e utilizou o programa Aggrolink Software (Chrono-log).

3.13 Ensaio de adesão de plaquetas não ativadas

O sangue foi coletado pela veia cava com seringa citratada (3,2%) com a proporção de 1:9 (volume/volume) e centrifugado 100 xg por 15 minutos, a fim de se obter o plasma rico em plaquetas (PRP). Em seguida, o PRP foi coletado e adicionado 1mL de tampão de lavagem (NaCl 140 mM; KCl 0,5mM; trisodium citrate 12mM; glicose 10mM; sacarose 12,5 mM, pH 6) e centrifugado 800 xg por 12 minutos. O sobrenadante foi descartado, o pellet obtido foi ressuspensionado com solução de Krebs (NaCl 118 mM; NaHCO₃ 25mM; KH₂PO₄ 1,2 mM; MgSO₄ 1,7 mM; glicose 5,6 mM, pH 7,4). O número de plaquetas foi ajustado para $1,2 \times 10^8$ plaquetas/mL na presença de CaCl₂ 1 mM.

Para o ensaio de adesão plaquetária, uma placa de 96 poços foi incubada com 50 µL de fibrinogênio humano (50 mg/mL) durante 12 horas a 4 °C. Em seguida, a placa foi

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

3.14 Zimografia *in situ*

Artéria aorta foi coletada e embebida em O.C.T. (Tissue-Tek Optimal Cutting temperature Compound) e armazenada no biofreezer à -80 °C. Em seguida, foram feitos cortes longitudinais de 8 µm de espessura em criostato. Foi preparado 1mg/mL de DQ-gelatina com solução tampão de reação de gelatinase (NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM, NaN₃ 0,2 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,6). A concentração final da solução de DQ-gelatina foi ajustada para 20 mg/mL e, 250 µl DQ-gelatina foi adicionado na lâmina e incubada à 37 °C em câmara escura úmida por 3 horas. Posteriormente, os cortes foram lavados 3 vezes com PBS e, em seguida, os cortes foram fixados em solução de 90% de glicerol com PBS que continha 10 mg/mL 3,4,5 – hidroxibenzoato de propilo e agente anti descoloração. Em paralelo foi feito o controle negativo, onde não foi adicionado DQ-gelatina com o tampão de reação de gelatinase. Para quantificação da atividade gelatinolítica foi mensurado mediante a média da intensidade de pixel pelo Software ImageJ.

Análise estatística

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

RESULTADOS

4. Resultados

Para verificar a ação pró-trombótica da MAGP1 e mapear qual região é importante para esta atividade, foi obtida através de mutação sitio dirigida, a MAGP1-mutante, MAGP1-VG1.

Primeiramente, foram realizados dois processos de mutagênese na MAGP1 e na região de homologia à trombospondina-1, conforme demonstrado na figura 4.1. Os processos de mutagênese consistiram na substituição duas Valinas por duas Glicinas, sem que houvesse outras alterações detectáveis no restante da sequência geral da molécula.

A substituição de duas valinas por duas glicinas foi realizada em função da grande similaridade entre uma sequência C-terminal da MAGP1 e um peptídeo derivado da trombospondina-1 com aparente importância na ativação e agregação plaquetária (Chung et al., 1999). As sequências correspondentes às moléculas assim como suas formas mutantes podem ser observadas na Tabela 1.

Tabela 1. Sequência de aminoácidos correspondentes a uma região de homologia compartilhada pela trombospondina-1 e MAGP-1. Em destaque, as formas mutantes do peptídeo 4N1K, com a substituição de duas valinas, e da MAGP-1 com alteração semelhante.

Proteína	Denominações adotadas	Sequência (aminoácidos)
Trombospondina-1	4N1K	KRFY V VMWKK
Trombospondina-1 mutante	4NGG	KRFY G GMWKK
MAGP1	MAGP-1	RRVY V VNK
MAGP1 mutante	VG1	RRVY G GNK

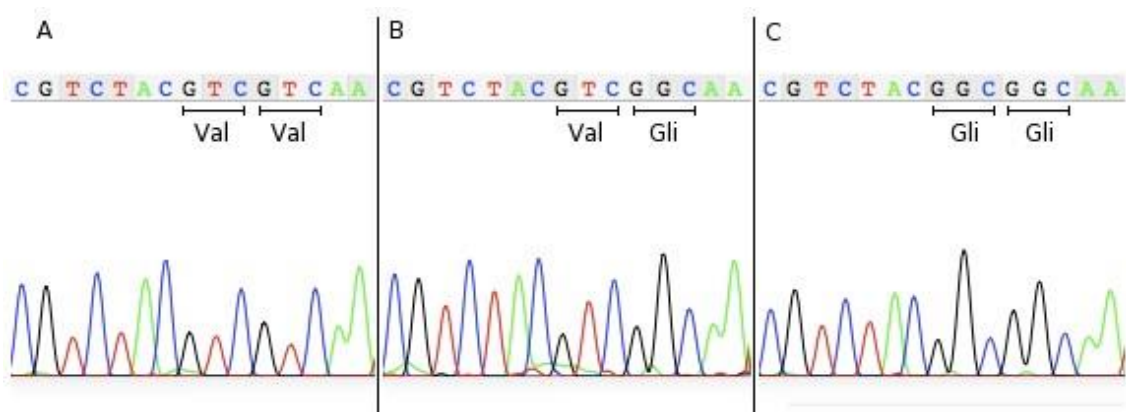


Figura 4.1: Sequenciamento de DNA correspondentes ao vetor MAGP-1 oriundas do animal selvagem. (A) ao vetor MAGP-1 submetido ao primeiro processo de mutagênese sítio dirigida (B) e ao vetor MAGP-1 ostentando a dupla mutação pontual (C). Em destaque, nota-se a alteração dos nucleotídeos alvo resultando na substituição inicial de um aminoácido em VG2 (mutação na segunda valina) (B) seguido de uma dupla substituição em VG1 (mutação na primeira e segunda valina) (C).

A produção de uma proteína mutante, mesmo que por meio de métodos de mutagênese sítio dirigida, pode levar a substituições não desejadas que afetam a formação da molécula de interesse. Portanto, a obtenção de bandas significativas e de peso molecular semelhante ao da proteína MAGP-1 original (oriunda de vetor com sequência selvagem) foi utilizada como parâmetro para confirmar a obtenção de uma mutação pontual.

Em ambos os géis apresentados na figura 4.2, é possível visualizar bandas correspondentes às proteínas de massa molecular aparente de 32kDa. Apesar de distinta dos 20kDa previstos a partir da sequência de aminoácidos da molécula, esse padrão diferenciado de migração eletroforética também é observado na forma selvagem da proteína.

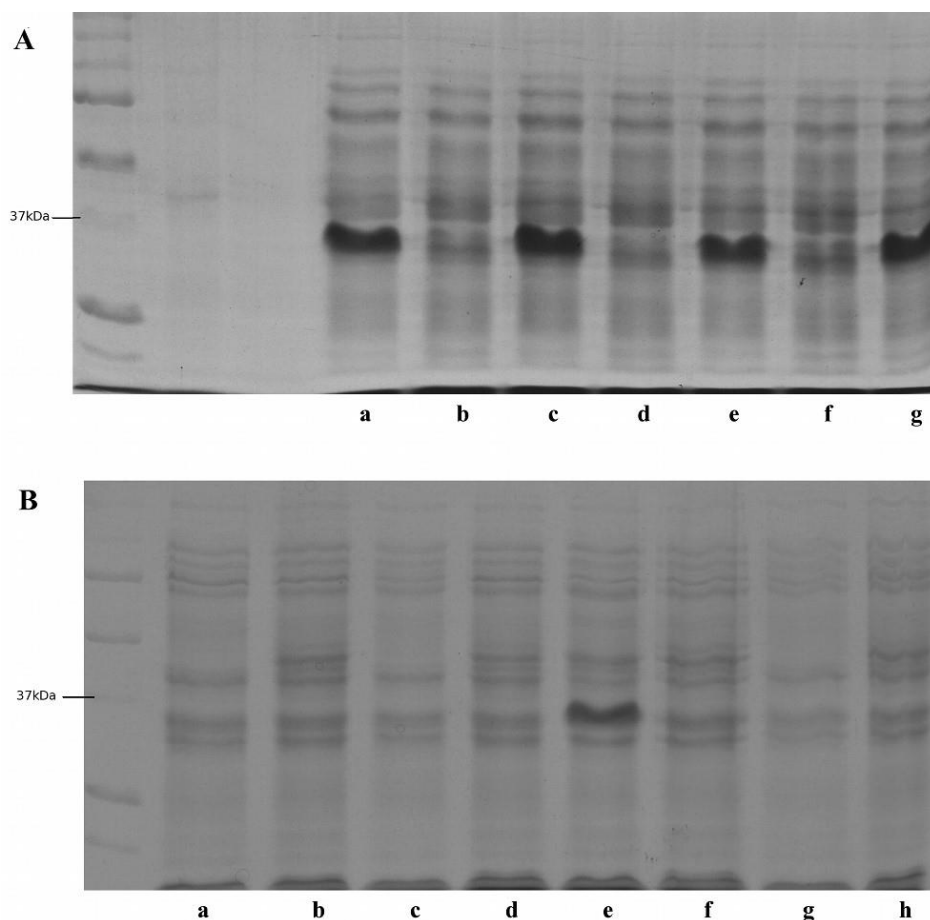


Figura 4.2: Gel de poliacrilamida 10%. A) MAGP bovina com mutação VG2 após transformação em células M15[pREP4] e indução de expressão protéica. Amostras submetidas à indução com IPTG (5mM) evidenciadas por bandas escuras com aproximadamente 37kDa (a, c, e, g), enquanto amostras não induzidas (b, d, f) não apresentam banda significante. (B) MAGP bovina com mutação dupla VG1. Após indução (a, c, e, g) é evidenciada atividade significativa de somente uma colônia, correspondente à banda e.

Após as mutações e com as moléculas devidamente prontas e testadas, elas foram utilizadas no modelo de trombose arterial. Sendo assim, nós utilizamos animais com 8 semanas de idade, fase na qual os camundongos têm aproximadamente 25 ± 2 g de peso corporal, tamanho essencial para o tipo de sonda de ultrassom usada na medição do fluxo sanguíneo, bem como para a quantidade e tipo de anestésico utilizado.

Em seguida, os animais selvagens (MAGP1^{+/+}) e deficientes em MAGP1 (MAGP1^{-/-}) foram submetidos ao ensaio de indução fotoquímica do trombo na presença ou na ausência da proteína mutada (MAGP1-VG1). Logo, verificamos que não houve

nenhuma alteração quando injetado 50µg/mL de MAGP1-VG1 nos animais selvagens (MAGP1^{+/+}PLA = 58±7,2; MAGP1^{+/+}VG1 = 55±11,18 minutos), conforme demonstrado na figura 4.3. Tal efeito, também foi observado com animais deficientes em MAGP1 (MAGP1^{-/-}PLA = 99±16,99; MAGP1^{-/-}VG1 = 130±45,26 minutos), onde não houve uma recuperação no tempo. Enquanto que, quando injetado a proteína MAGP1 selvagem foi possível verificar a recuperação do tempo de formação do trombo (MAGP1^{+/+} MAGP1:72±18,16; MAGP1^{-/-} MAGP1:62±12,85 minutos).

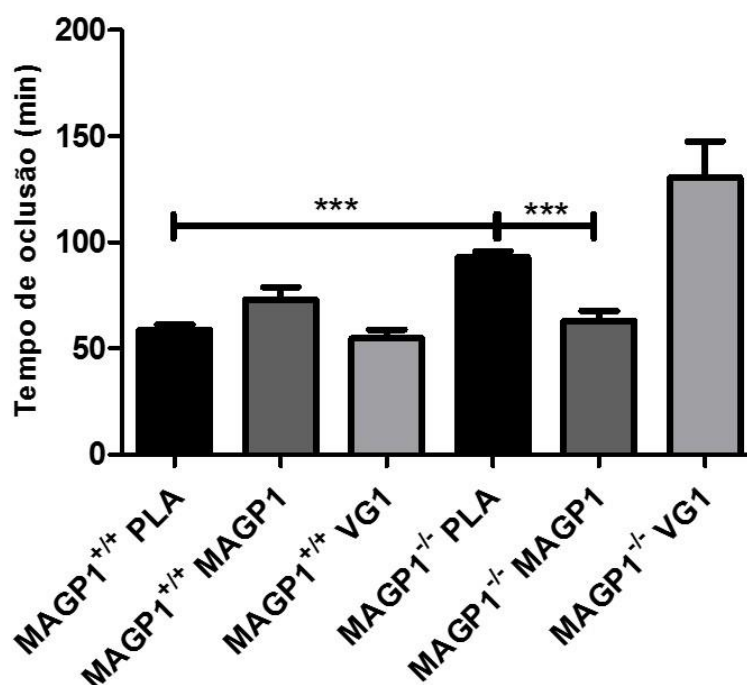


Figura 4.3: Tempo de formação do trombo a partir de indução fotoquímica. MAGP1^{+/+}: Selvagem; MAGP1^{-/-}: knockout para MAGP1; PLA: placebo; MAGP1^{+/+} MAGP1: MAGP1 selvagem injetada em animal selvagem; MAGP1^{-/-} MAGP1: MAGP1 selvagem injetada em animal deficiente em MAGP1; Animal selvagem VG1: MAGP1 mutada.

MAGP1 e MAGP1-VG1 foram testadas a fim de verificar se a mutação induzida na sequência selvagem modifica de alguma forma suas interações com proteínas importantes para o processo de coagulação sanguínea e adesão plaquetária. Realizou-se o teste de ligação com 3 proteínas (fator de Von Willebrand, fibronectina e tropoelastina)

na presença de diferentes concentrações dos ligantes MAGP1 e MAGP1-VG1, como pode-se observar na Figura 4.4.

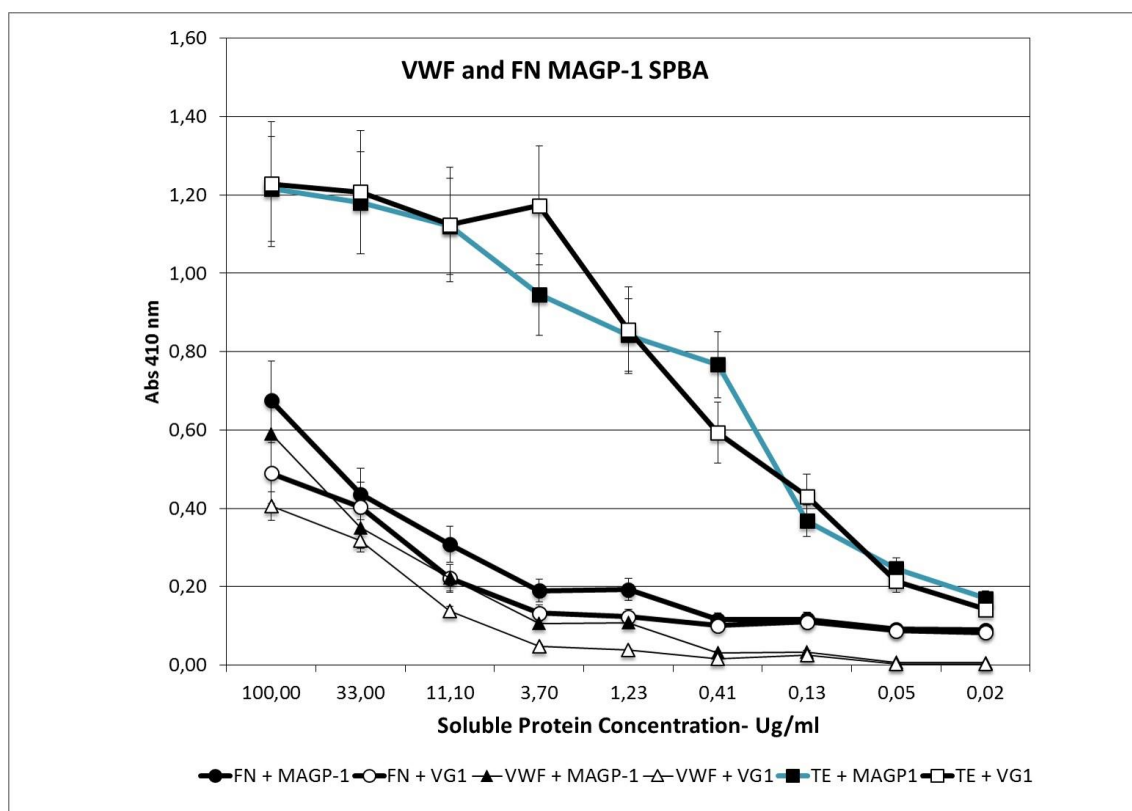


Figura 4.4: Caracterização das interações da MAGP1 (selvagem e mutante) com proteínas importantes para a trombogênese. As proteínas fator de Von Willebrand (vWF), fibronectina (FN) e TE (tropoelastina) foram imobilizadas em placa de 96 wells (2µg/well) e incubadas com concentrações variáveis de MAGP1 e VG1 durante 2h. Como controle, realizou-se a incubação na ausência de cobertura das placas. Os dados representam a média de duplicatas.

Foi possível verificar que a proteína MAGP1-VG1 continua interagindo com o fator von Willebrand e a fibronectina assim como com o controle positivo (tropoelastina), semelhante ao encontrado para proteína MAGP1.

Uma vez descrito na literatura que a MAGP1 é capaz de interagir com forma ativa de TGF- β , foi de nosso interesse verificar se estes dados estavam relacionados com a diminuição dos níveis de TGF- β nestes animais e se essa atividade também poderia estar influenciando o maior tempo de oclusão nos camundongos deficientes em MAGP1. Sendo assim, animais selvagens e deficientes em MAGP1 foram tratados com losartan, a

fim de caracterizar o papel da MAGP1 e deste fator de crescimento na trombogênese arterial.

Para isso, os camundongos selvagens e deficientes em MAGP1 foram divididos em grupos e tratados por 4 semanas com losartan por meio de diferentes doses diárias de 3, 15 e 30 mg/kg/dia via gavagem e, em seguida, foram submetidos ao ensaio de indução fotoquímica do trombo, com o intuito de verificar qual seria a melhor dose para esses animais. Conforme visto na figura 4.5, a dose de 15mg/kg/dia foi a dose que conseguiu resgatar o tempo de oclusão a valores semelhantes ao encontrado nos animais selvagens. Além disso, foi possível verificar que a ação do losartan é dose dependente para estes animais.

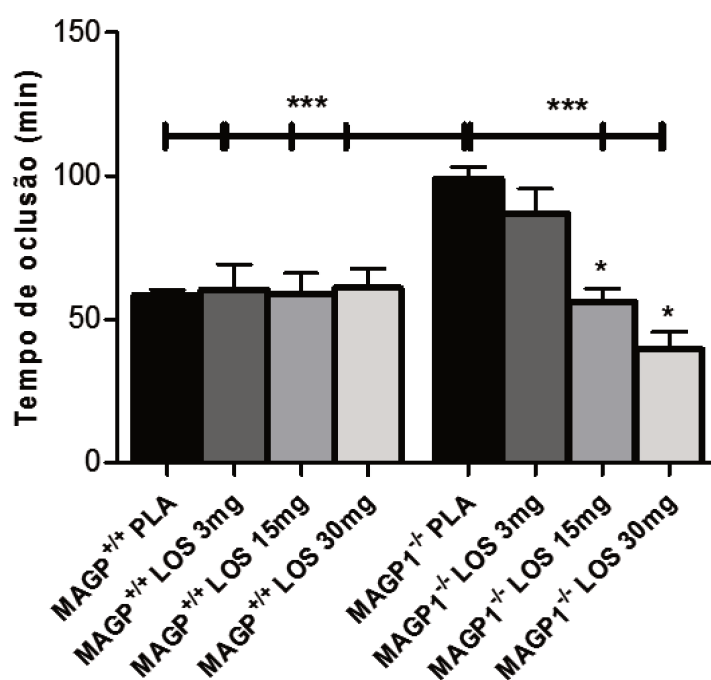


Figura 4.5: Tratamento com losartan resgata o tempo normal de formação do trombo. MAGP^{+/+}: Selvagem; MAGP^{1-/-}: knockout para MAGP1; PLA: placebo; LOS: losartan 3, 15 ou 30mg/kg/dia.

A partir dos resultados obtidos, todos os experimentos foram realizados com losartan 15mg/kg/dia. A atividade farmacológica conhecida do losartan é a de inibir os

receptores AT1 de angiotensina II. Uma das consequências desta inibição é a diminuição da expressão de TGF- β e de trombospondina 1, molécula responsável por ativar TGF- β dos complexos latentes (Cohn et al., 2007; Habashi et al., 2006; Uchida et al., 2008).

Para verificar se uma diminuição nos níveis de angiotensina II levaria aos mesmos resultados em relação à formação de trombos, os animais foram tratados com captopril na dose de 30mg/kg/dia, inibidor da enzima conversora de angiotensina (ACE). Como pode ser observado na figura 4.6, a diminuição do tempo de formação de trombos também foi obtida com este tratamento, onde novamente, o efeito foi mais evidente nos animais deficientes em MAGP1 ($\text{MAGP1}^{+/+}\text{CAP} = 51 \pm 15,6$ minutos; $\text{MAGP1}^{-/-}\text{CAP} = 59 \pm 18,94$ minutos), sugerindo que uma diminuição nos níveis de angiotensina II promove o mesmo resultado que a inibição dos receptores AT1, ocasionada pelo losartan.

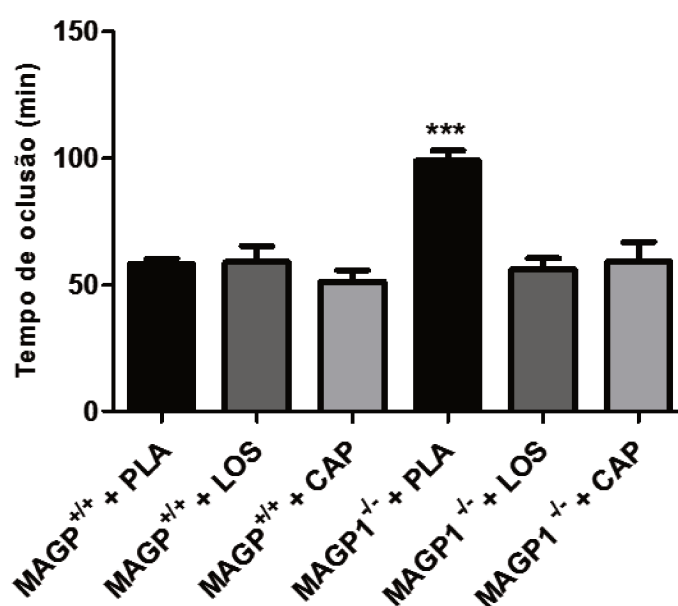


Figura 4.6: O tratamento com captopril diminui o tempo de formação do trombo. $\text{MAGP1}^{+/+}$: Selvagem; $\text{MAGP1}^{-/-}$: knockout para MAGP1; PLA: placebo; LOS: Losartan 15mg/kg/dia; CAP: Captopril 30mg/kg/dia.

Uma outra possibilidade levada em consideração foi a de que, em função do tratamento com as drogas anti-hipertensivas, a pressão arterial destes animais poderia ser

alterada e, conseqüentemente, temos uma resposta a esta alteração, pois tais medicamentos estão relacionados a um efeito hipotensor. Para verificar isto, os animais tiveram a pressão arterial aferida e os dados obtidos foram apresentados na figura 4.7. Como pode ser observado, todos os camundongos são normotensos, descartando esta possibilidade, o que sugere que os resultados obtidos são independentes da ação anti-hipertensiva desses fármacos.

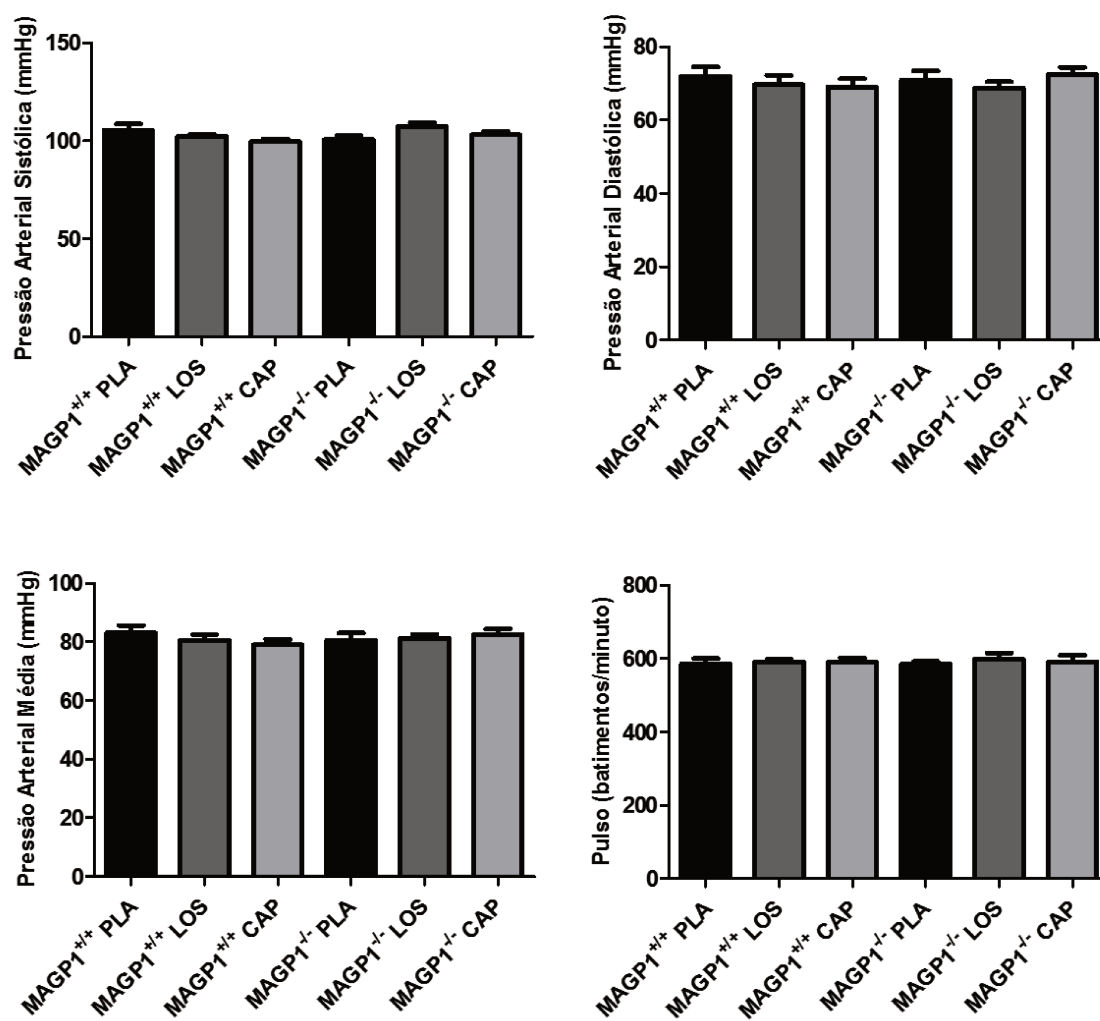


Figura 4.7: Aferição da pressão arterial dos camundongos por pletismografia. $MAGP1^{+/+}$: Selvagem; $MAGP1^{-/-}$: knockout para MAGP1; PLA: placebo; LOS: Losartan 15mg/kg/dia; CAP: Captopril 30mg/kg/dia.

Além disso, para descartar qualquer dúvida que possa existir entre o fato de o losartan e o captopril serem medicamentos anti-hipertensivos, avaliamos os mesmos parâmetros hemodinâmicos dos animais dos grupos estudados, sob anestesia, uma vez

que a cirurgia de indução fotoquímica é realizada com os animais sob anestesia. Logo, observou-se que todos os animais são normotensos, embora tenha havido bradicardia em todos os grupos, conforme figura 4.8. Tal experimento foi realizado com os animais anestesiados, pois a literatura relata que uma hipotensão pode acarretar a ativação da cascata de coagulação, mas este fato só foi constatado em vasos venosos (Kakar & Lip, 2007a).

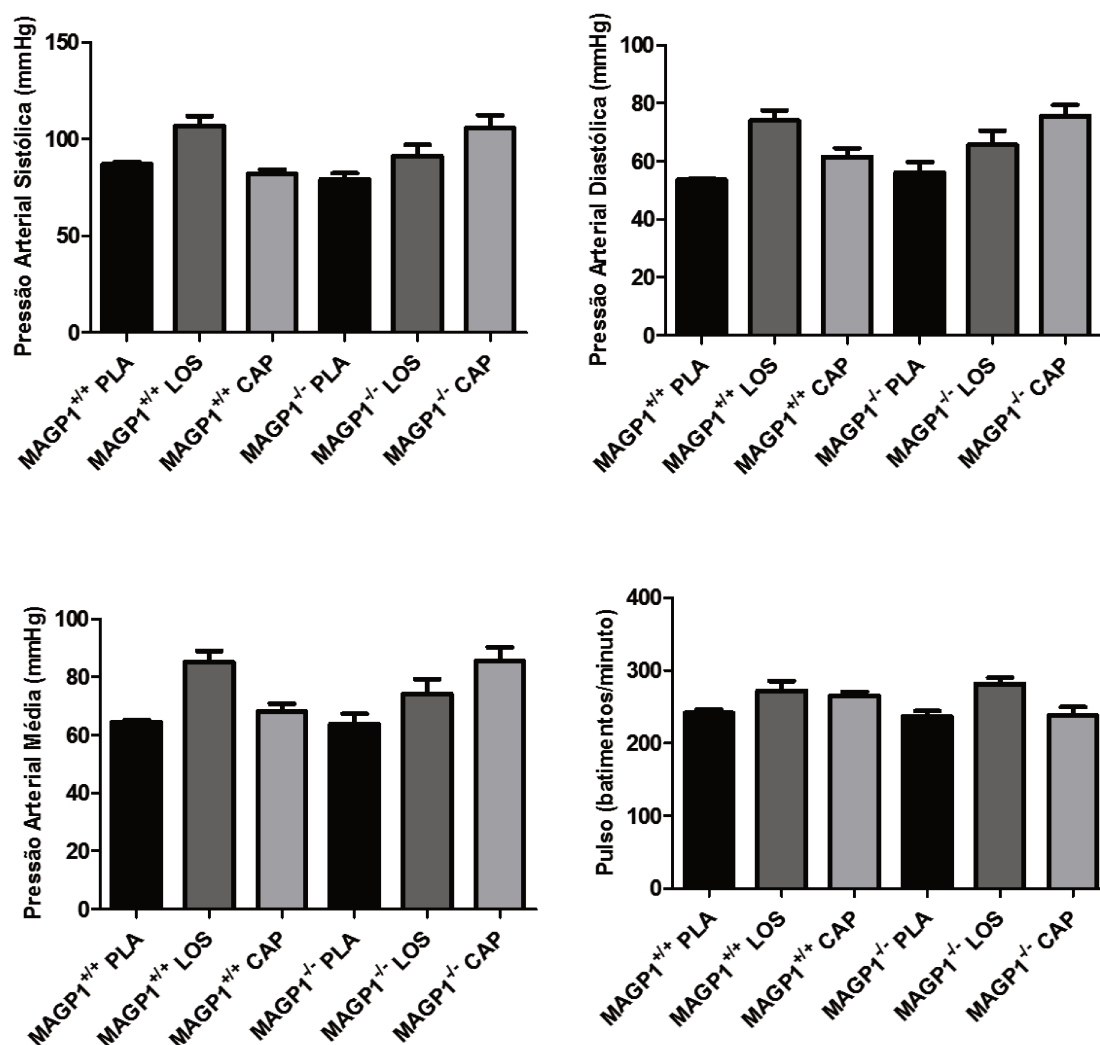


Figura 4.8: Aferição da pressão arterial dos camundongos, sob anestesia, por pletismografia. MAGP1^{+/+}: Selvagem; MAGP1^{-/-}: knockout para MAGP1; PLA: placebo; LOS: Losartan 15mg/kg/dia; CAP: Captopril 30mg/kg/dia.

Para verificar se os componentes da cascata de coagulação estão funcionando de forma apropriada, foram considerados os testes de tempo de tromboplastina parcial (TTPa), que avalia a via intrínseca e comum, o tempo de protrombina (TP), que avalia a via extrínseca e comum. Com relação ao tempo de protrombina (tabela 2), foi possível verificar que muito embora o tratamento com os fármacos tende a reduzir o tempo de protrombina, esses valores continuam dentro da normalidade. O mesmo pode ser visto em relação ao tempo de tromboplastina parcial ativada (tabela 2).

Tabela 2: Ensaio de coagulação sanguínea (TP e TTPa). Os valores se referem a média dos grupos \pm desvio padrão. * $p < 0,5$. MAGP1^{+/+}: Selvagem; MAGP1^{-/-}: knockout para MAGP1; PLA: placebo; LOS: losartan 15mg/kg/dia; CAP: captopril 30mg/kg/dia.

Grupos	Tempo de Protrombina (TP)	Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (TTPa)
MAGP1 ^{+/+} PLA	19,87 \pm 1,54	39,11 \pm 2,59
MAGP1 ^{+/+} LOS	21,58 \pm 1,76	41,53 \pm 2,51
MAGP1 ^{+/+} CAP	16,05 \pm 0,98*	32,72 \pm 2,67*
MAGP1 ^{-/-} PLA	20,28 \pm 0,74	40,73 \pm 4,56
MAGP1 ^{-/-} LOS	15,99 \pm 3,27*	35,91 \pm 3,32
MAGP1 ^{-/-} CAP	18,27 \pm 2,83	37,66 \pm 6,74

Uma vez que as vias da cascata de coagulação se encontram inalteradas (comparando os grupos selvagem e deficiente em MAGP1), decidimos avaliar a função das plaquetas. Ensaio de agregação plaquetária induzida por agonistas como trombina e ADP (figura 4.9) e adesão de plaquetas não ativadas foram realizados. Em relação ao teste de agregação foi observado que quando estimuladas pelo agonista trombina, não houve diferença entre os grupos de animais deficientes em MAGP1 e selvagens, nem mesmo após tratamento com losartan. Em contrapartida, o tratamento com captopril reduziu a

agregação plaquetária dos animais deficientes em MAGP1 (figura 4.9). Quando estimuladas pelo agonista ADP foi possível verificar que os animais deficientes em MAGP1 apresentam uma agregação reduzida em relação aos animais selvagens e que o tratamento com losartan e captopril são capazes de resgatar essa agregação a valores próximos dos selvagens.

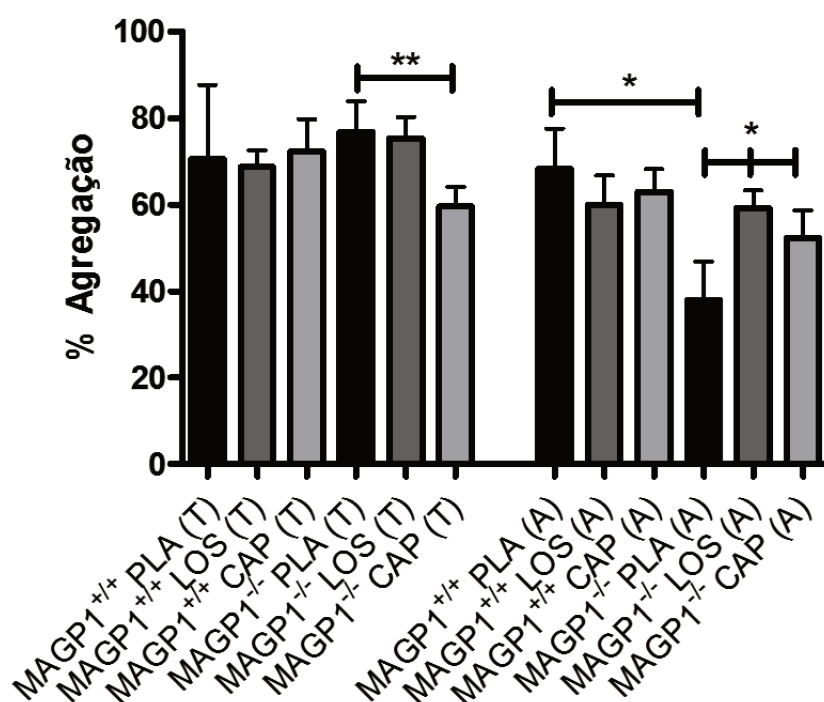


Figura 4.9: Agregação plaquetária induzida por agonistas. MAGP1^{+/+}: Selvagem; MAGP1^{-/-}: knockout para MAGP1; PLA: placebo; LOS: losartan 15mg/kg/dia; CAP: captopril 30mg/kg/dia; T: trombina 100mU; A: ADP 50mU.

No ensaio de adesão de plaquetas não ativadas foi possível verificar que não há diferença significativa entre os grupos selvagens ($4,21 \pm 2,76 \times 10^5$ plaquetas) e deficientes em MAGP1 ($7,13 \pm 1,24 \times 10^5$ plaquetas), sem tratamento. Como a adesão das plaquetas desses grupos de animais estavam inalteradas não foi necessário realizar o experimento com os outros grupos estudados.

Outro ponto analisado foi a morfologia das fibras elásticas presentes na estrutura da parede da carótida (Figura 4.11), nas plaquetas (Figura 4.10) e nos trombos (Figura

4.11), a fim de analisar se estes fatores interferem na dinâmica da formação de trombo nos animais deficientes em MAGP1. Mas, de acordo com análises iniciais das imagens obtidas, não houve diferença na morfologia plaquetária nem na estrutura das fibras elásticas na parede da carótida e nos trombos dos grupos estudados. No ensaio da carótida pode-se verificar a integridade da parede e o trombo propriamente dito. Aparentemente, os trombos dos diferentes grupos apresentam-se semelhantes e a parede da carótida não apresenta nenhum tipo de fragmentação ou alteração.

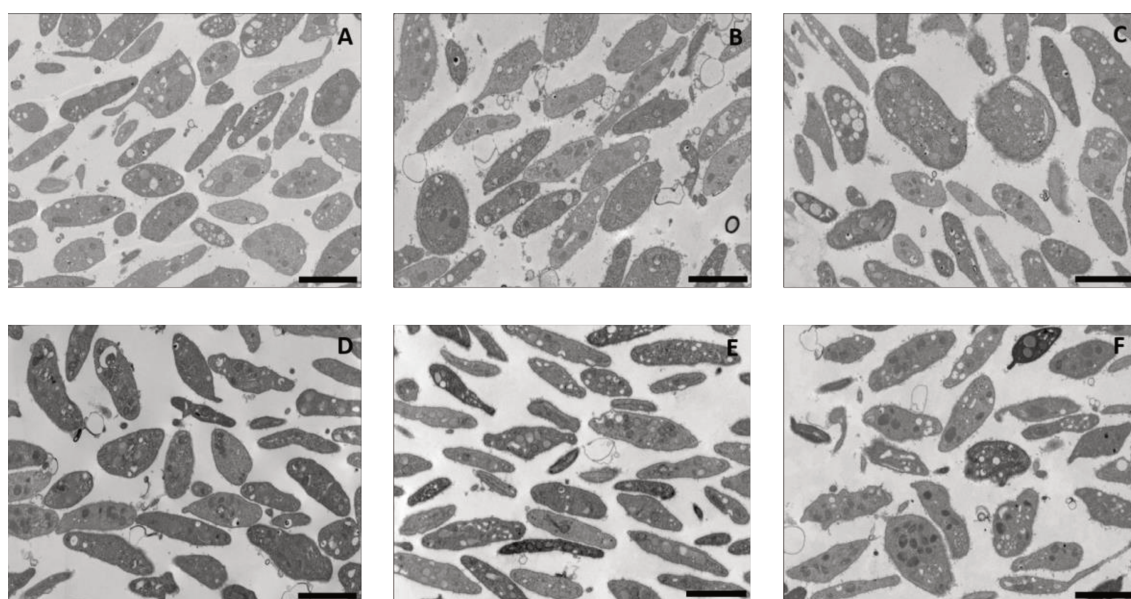


Figura 4.10: Análise morfológica das plaquetas por meio de microscopia eletrônica de transmissão. A: MAGP1^{+/+} Placebo; B: MAGP1^{+/+} LOS; C: MAGP1^{+/+} CAP; D: MAGP1^{-/-} Placebo; E: MAGP1^{-/-} LOS; F: MAGP1^{-/-} CAP; MAGP1^{+/+}: Selvagem; MAGP1^{-/-}: knockout para MAGP1; PLA: placebo; LOS: losartan 15mg/kg/dia; CAP: captopril 30mg/kg/dia.

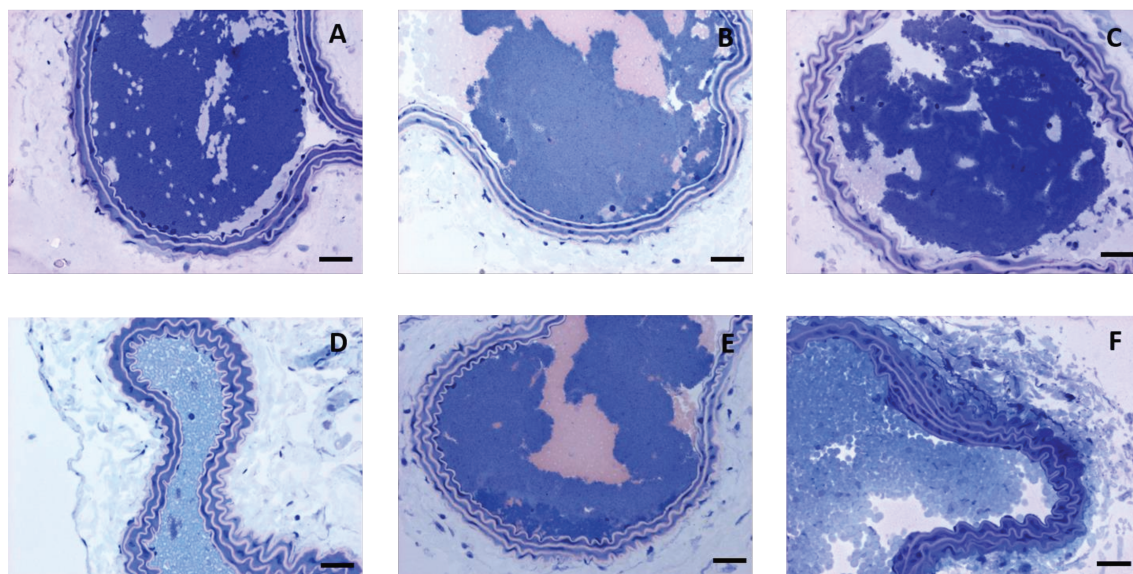


Figura 4.11: Análise morfológica de trombos na artéria carótida direita por meio de microscopia de luz. A: MAGP1^{+/+} Placebo; B: MAGP1^{+/+} LOS; C: MAGP1^{+/+} CAP; D: MAGP1^{-/-} Placebo; E: MAGP1^{-/-} LOS; F: MAGP1^{-/-} CAP; MAGP1^{+/+}: Selvagem; MAGP1^{-/-}: knockout para MAGP1; PLA: placebo; LOS: losartan 15mg/kg/dia; CAP: captopril 30mg/kg/dia.

Considerando que o tratamento com o losartan diminui os níveis de TGF- β ativo, foi de nosso interesse analisar e quantificar os níveis de TGF- β totais e ativos (figura 4.12 e 4.13) nos plasmas dos camundongos tratados com placebo ou com as drogas.

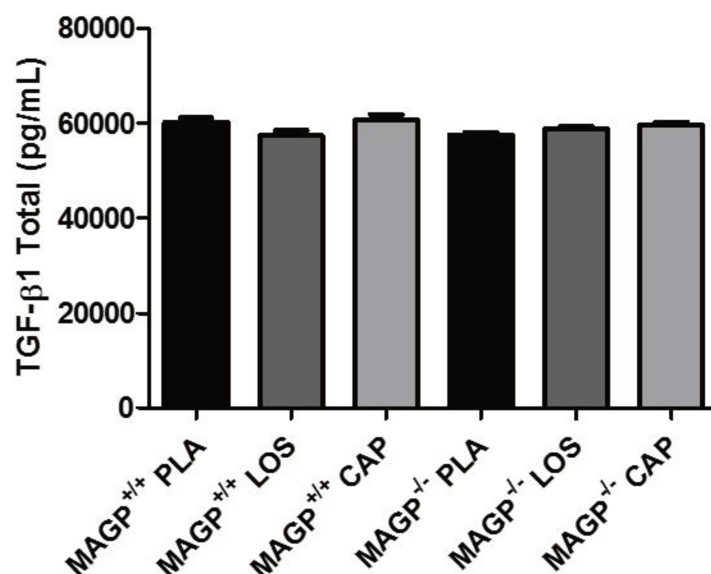


Figura 4.12: Análise TGF- β 1 total, no plasma sanguíneo. MAGP1^{+/+}: Selvagem; MAGP1^{-/-}: knockout para MAGP1; PLA: placebo; LOS: losartan 15mg/kg/dia; CAP: captopril 30mg/kg/dia.

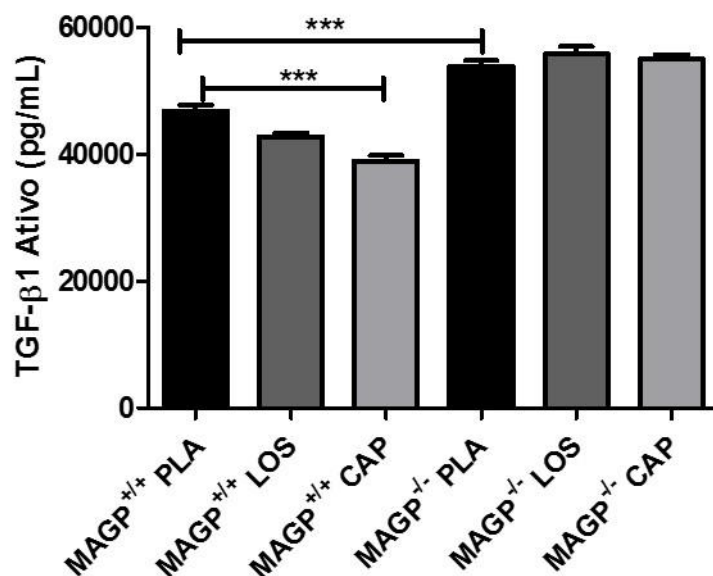


Figura 4.13: Análise *TGF-β1* ativo, no plasma sanguíneo. MAGP^{+/+}: Selvagem; MAGP^{-/-}: knockout para MAGP1; PLA: placebo; LOS: losartan 15mg/kg/dia; CAP: captopril 30mg/kg/dia.

Em relação aos níveis séricos de TGF-β total (figura 4.12), foi observado que não houve alteração nos grupos estudados. Em relação aos níveis séricos de TGF-β ativo, é possível verificar que há um aumento no grupo dos animais deficientes em MAGP1, entretanto, o tratamento com os fármacos não reduz esses níveis no grupo citado. Já no grupo dos animais selvagens, é possível verificar que o tratamento com o captopril é capaz de reduzir os níveis desse fator de crescimento.

Os níveis aumentados de TGF-β ativo (figura 4.13) nos levou a investigar qual via de sinalização poderia estar envolvida. Sendo assim, através da zimografia *in situ*, foi possível verificarmos a atividade de gelatinases, mais especificamente das gelatinases MMP-2 e -9 (figura 4.14 e 4.15). Uma vez que o aumento da atividade dessas gelatinases tem sido relacionado a um aumento da sinalização de TGF-β (Xiong et al., 2012).

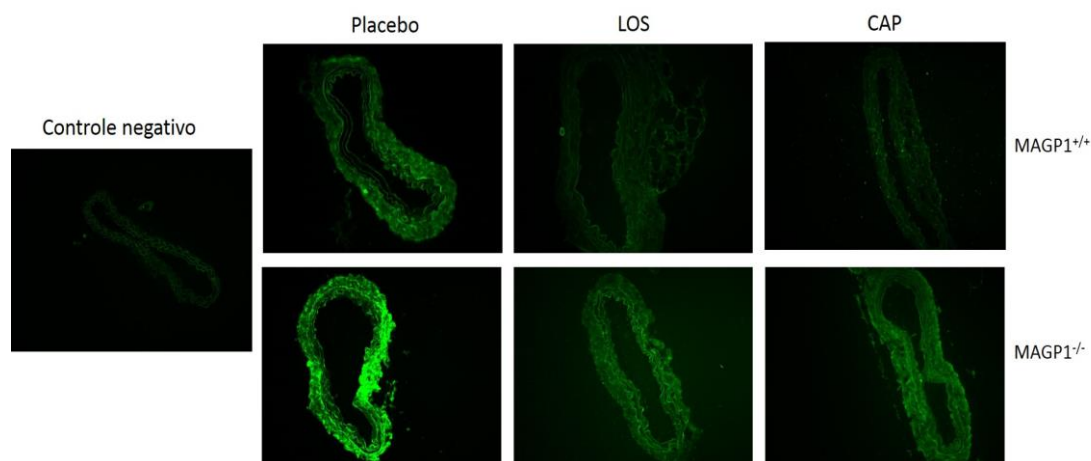


Figura 4.14: Zimografia *in situ* da artéria carótida direita de animais selvagens e deficientes em MAGP1. MAGP1^{+/+}: Selvagem; MAGP1^{-/-}: deficiente em MAGP1; PLA: placebo; LOS: losartan 15mg/kg/dia; CAP: captopril 30mg/kg/dia.

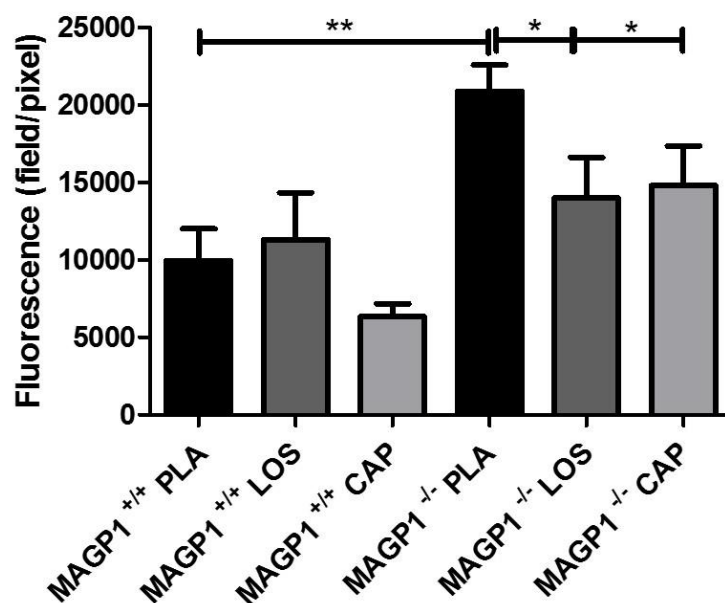


Figura 4.15: Análise semiquantitativa da atividade gelatinolítica na artéria carótida direita de animais selvagens e knockouts para MAGP1. PLA: placebo; LOS: losartan 15mg/kg/dia; CAP: captopril 30mg/kg/dia; MAGP1^{+/+}: Animais selvagens; MAGP1^{-/-}: knockout para MAGP1.

Conforme visto no ensaio de zimografia *in situ*, é possível verificar a atividade gelatinolítica (figura 4.14). E a partir da análise semiquantitativa (figura 4.15) é possível avaliar o nível de atividade dessas MMPs nos diferentes grupos estudados. Dessa forma, verificamos que há um aumento significativo da atividade dessas MMPs nos animais

deficientes em MAGP1 tratados com placebo, em relação aos animais selvagens e, que o tratamento com losartan é capaz de reduzir essa atividade.

DISCUSSÃO

5. Discussão

Após a lesão na parede dos vasos sanguíneos as plaquetas e os componentes da via de coagulação interagem com a matriz extracelular subendotelial e formam a rede hemostática, que estanca o sangramento. As plaquetas desempenham importante papel na formação do trombo, sua ativação se dá quando a região subendotelial é exposta, o que ocasiona um rearranjo do seu citoesqueleto e, em seguida, ocorre a liberação de várias substâncias de seus grânulos. Dentre essas substâncias destacam-se o fator de von Willebrand, trombospondina-1 e ADP, sendo que o colágeno e fator de von Willebrand são responsáveis por mediar a adesão e agregação plaquetária (de Groot et al., 1988; Wagner et al., 1984).

Werneck e colaboradores (2008) demonstraram que uma outra proteína denominada MAGP1, pertencente a parede dos vasos, é capaz de interagir com fator de von Willebrand. A MAGP1 é uma glicoproteína associada as fibrilinas na rede de microfibrilas da matriz extracelular (Mecham & Davis, 1994). A principal função das microfibrilas é servir como um arcabouço para a deposição de tropoelastina na montagem das fibras elásticas (Segade et al., 2002).

A MAGP1 interage também com proteínas como a tropoelastina (Brown-Augsburger et al., 1994), fibrilinas 1 e 2 (Trask et al., 2000; Werneck et al., 2004), colágeno IV (Finnis & Gibson, 1997), decorina (Trask et al., 2000), entre outras.

Para melhor entender o funcionamento da MAGP1, Weinbaum e colaboradores (2008) inativaram o gene alvo da MAGP1 (*Mfap2*) em camundongo. Como dito anteriormente, estes camundongos necessitam de um tempo de formação de trombo maior do que um animal selvagem, apesar de apresentarem coagulação sanguínea *in vitro* normal. Sugerindo que as microfibrilas formadas por MAGP1 possuem importante

função na hemostasia e trombogênese. Outro ponto relevante neste estudo foi verificar que a injeção prévia com MAGP1 recombinante bovina, nestes animais, resultou na diminuição do tempo de oclusão a valores próximos ao encontrado nos animais selvagens (Werneck et al., 2008).

A fim de determinar o domínio da MAGP1 que tem importância na trombogênese foi visto que a região C-terminal da MAGP1 possui atividade pró-trombótica e que essa atividade pode estar relacionada com a sua deposição na matriz e sua capacidade de interação com outras moléculas, fator de von Willebrand por exemplo, e essas mutações provavelmente abolem essas interações (Machado, 2010). Além desses achados, existe o fato de a MAGP1 ser semelhante a trombospondina (TSP) na habilidade de se ligar a proteínas e modular interações células-matriz, como é o caso dos animais *knockouts* para TSP-1 e MAGP1 apresentarem embolização do trombo causada por um defeito na aderência do trombo a parede do vaso injuriado (Kyriakides et al., 1998; Werneck et al., 2008).

Dessa forma, a identificação do domínio responsável por promover a associação da MAGP1 com a matriz extracelular foi possibilitada pela análise e modificação da sequência codante original da molécula. A expressão de proteínas a partir de sequências truncadas nos éxons 7 e 8 resultou na formação de moléculas incapazes de se ligar efetivamente à matriz extracelular, o que indicou que a região C-terminal da molécula de MAGP1 é crítica para direcionar a deposição dessa proteína (Segade et al., 2002).

A importância funcional da porção C-terminal da MAGP1 na determinação de sua estrutura terciária e na interação com outras moléculas das fibras elásticas, possivelmente, indica que pode haver alguma relação determinante entre essa região e os papéis que a proteína MAGP1 parece realizar na trombose, de acordo com os resultados preliminares

anteriormente descritos. Logo, a indução de mutações pontuais na região permite a produção de uma molécula modificada que pode, mediante testes adequados, ser avaliada em comparação com sua forma selvagem.

O mecanismo associado à oclusão trombótica anormal presente em animais deficientes em MAGP1 ainda não é claro. Estudos anteriores (Werneck et al., 2008) sugerem que esse efeito se relaciona ao papel estabilizador que essa molécula desempenha por meio de interações entre componentes do trombo e da matriz da parede vascular.

Sabendo que a MAGP1 se liga ao fator von Willebrand, nos propusemos a avaliar a interação da sua forma mutada (tabela 1) com esse fator importante para o processo de coagulação. Desta forma, a remoção de porções aparentemente importantes para as funções desempenhadas pela MAGP1 permite identificar as sequências mínimas necessárias para suas funções biológicas.

Sendo assim, a troca de duas Valinas por duas glicinas (tabela 1) fez com que a MAGP1 mutada perdesse sua capacidade de recuperar o tempo de formação de trombo como visto para MAGP1 selvagem (figura 4.3), sugerindo que esses aminoácidos são importantes para que a molécula possa desenvolver sua atividade normal.

A interação da MAGP1 com proteínas importantes para esse processo realmente existe (figura 4.4), contudo, sua forma mutante (MAGP1-VG1) não aparenta possuir redução de sua capacidade de ligação com as proteínas fibronectina, fator de Von Willebrand e tropoelastina. Somente no ensaio com fibronectina a proteína VG1 aparenta possuir menor capacidade de interação que a MAGP1. Isso sugere que o processo pelo qual a MAGP1 medeia a interação do trombo com a parede do vaso injuriado não depende

somente da sua interação com tropoelastina, vWF ou fibronectina e que estudos mais aprofundados são necessários para elucidar esse processo.

Além disso, buscando entender melhor como a MAGP1 pode contribuir para o processo de trombose arterial, foi de nosso interesse tratar animais selvagens e deficientes em MAGP1 com bloqueador do receptor AT1 da angiotensina II (Losartan) e o inibidor da enzima conversora de angiotensina (captopril) para avaliar possíveis mecanismos pelos quais a MAGP1 possa estar envolvida na formação do trombo, uma vez que a MAGP1 interage com TGF- β ativo (Weinbaum et al., 2008).

A trombose arterial é um processo dinâmico e muito complexo no qual participam múltiplos fatores tais como: endotélio, plaquetas, coagulação plasmática e sistema fibrinolítico (Kamińska et al., 2005). O mecanismo pelo qual a MAGP1 pode estar envolvida na trombose arterial é igualmente complicado. Há uma variedade de fatores que podem estar envolvidos.

Conforme figura 4.5, é possível verificar que os dados apresentados neste trabalho estão em conformidade com os dados obtidos por Werneck e colaboradores (2008). A resposta do losartan na recuperação do trombo é dose dependente. Além disso, foi verificado durante os experimentos que os animais deficientes em MAGP1 (tratados com placebo) apresentam inúmeras embolizações durante o ensaio, assim como Werneck e colaboradores (2008).

Foi verificado também, que o tratamento com losartan e captopril foram eficazes na recuperação da formação do trombo em animais deficientes em MAGP1 a valores próximo ao encontrado no grupo selvagem (figura 4.6).

Muito embora esses dados sejam divergentes dos encontrados na literatura, onde o losartan é classificado como uma droga antitrombótica, o modelo utilizado por eles é o

de hipertensão. A hipertensão arterial é um estado conhecidamente trombogênico. Por isso, quando esses animais são tratados com drogas anti-hipertensivas eles passam a apresentar um menor risco de desenvolver trombose, embora o mecanismo pelo qual isso aconteça ainda não esteja muito esclarecido (Leu et al., 2004; Schwieler et al., 2013).

Além disso, Kaminska e colaboradores (2005) verificaram atividade pró-trombótica de angiotensina II após infusão em ratos com hipertensão induzida e verificaram ainda que o losartan é capaz de reverter essa atividade da Ang II, confirmando o papel do receptor AT₁ no efeito pró-trombótico desse peptídeo. Vale ressaltar que o efeito antitrombótico do losartan nesse estudo, é verificado apenas quando avaliado o peso do trombo, uma vez que os autores não encontraram alteração significativa no que diz respeito ao tempo de formação de trombo nos grupos que receberam infusão de Ang II e/ou tratamento com losartan.

Um outro estudo que também relaciona antagonista de receptor AT₁, losartan, com atividade antitrombótica em ratos após infusão de Ang II (Kramkowski et al., 2010), avalia apenas o peso do trombo e não o tempo de formação de trombo como foi realizado no presente trabalho.

Estes estudos diferem do presente trabalho pelo fato de utilizarem ratos com hipertensão induzida (Kamińska et al., 2005), avaliarem a trombose arterial por uma forma diferente (por peso e não por tempo de formação de trombo), além de realizarem infusão de Ang II provocando efeitos pró-trombóticos. Dessa forma, o presente trabalho é pioneiro no estudo de camundongos normotensos, naturalmente antitrombóticos, o uso de drogas anti-hipertensivas como losartan e captopril e sua relação com o processo de trombose arterial.

Bavry e colaboradores (Bavry et al., 2000) compararam a eficácia de um inibidor da ACE (quinapril) e um bloqueador de receptor AT₁ (losartan) na formação de trombo

arterial em ratos e verificaram que houve aumento do tempo de formação de trombo apenas no grupo tratado com quinapril. Esses dados sugerem que a inibição da ACE, e não o bloqueio do receptor AT₁, apresentou um modesto efeito antitrombótico.

Sendo o losartan e o captopril medicamentos comumente comercializados para o tratamento da hipertensão, foi de nosso interesse avaliar se os resultados obtidos no ensaio de indução fotoquímica do trombo estão relacionados com seu efeito hipotensor. Para isso, os animais foram submetidos a um ensaio de aferição da pressão sanguínea por pletismografia, um ensaio não invasivo (figura 4.7) onde foram avaliados os parâmetros hemodinâmicos como a pressão sanguínea sistólica, diastólica, a média entre elas e o pulso dos animais.

Foi verificado, então, que o tratamento com losartan e captopril não altera a pressão sanguínea dos animais estudados, sugerindo que os resultados obtidos são independentes da ação anti-hipertensiva desses fármacos.

Além disso, para descartar qualquer dúvida que possa existir entre o fato de o losartan e o captopril serem medicamentos anti-hipertensivos, avaliamos os mesmos parâmetros hemodinâmicos dos animais dos grupos estudados, sob anestesia (figura 4.8), uma vez que a cirurgia de indução fotoquímica é realizada com os animais anestesiados.

Como visto na literatura, dados sugerem que uma hipotensão possa acarretar em ativação da cascata de coagulação. Entretanto, este fato se dá em trombose venosa (Kakar & Lip, 2007b).

Sendo assim, como na análise anterior, os animais apresentaram-se normotensos em todos os grupos, sugerindo que não há interação entre a anestesia e o tratamento com os medicamentos utilizados nesse estudo.

No que se refere a pressão sanguínea de ratos tratados com fármacos, Oliveira e colaboradores (Oliveira, Sasaki, Cerêncio, Baraúna, & Krieger, 2009), compararam o

efeito do tratamento com os fármacos enalapril (60mg/kg/dia) e losartan (20mg/kg/dia). O enalapril pertence à classe dos inibidores da ACE, assim como o captopril. Nesse estudo foram utilizados ratos sedentários em comparação com animais que apresentavam hipertrofia ventricular esquerda, induzida por treinamento de natação. Assim como os resultados apresentados nessa tese, embora tenham utilizado uma dose maior dos fármacos, os pesquisadores não encontraram redução da pressão sanguínea nos grupos tratados em relação aos não tratados.

Além disso, foi de nosso interesse avaliar as vias intrínseca e extrínseca da coagulação, a fim de verificar se o tratamento com os fármacos altera de alguma forma os fatores de coagulação. Sendo assim, o tempo de protrombina e de tromboplastina parcial ativada (tabela 2) foram avaliados.

Com relação ao tempo de protrombina, foi possível verificar que muito embora o tratamento com os fármacos tenda a reduzir o tempo de protrombina, esses valores continuam dentro da normalidade (10-15 segundos para humanos). O mesmo pode ser visto em relação ao tempo de tromboplastina parcial ativada (Valores de referência: 30-45 segundos para humanos).

Uma vez que as vias da cascata de coagulação aparentemente se encontram inalteradas, avaliamos então a função das plaquetas. Ensaio de agregação plaquetária induzida por agonistas como trombina e ADP (figura 4.9) foram realizados.

Com relação à agregação plaquetária, foi visto que quando estimuladas pelo agonista trombina, não houve diferença entre os grupos de animais deficientes em MAGP1 e selvagens, nem mesmo após tratamento com losartan. Em contrapartida, o tratamento com captopril reduziu a agregação plaquetária dos animais deficientes em MAGP1 (figura 4.9). Quando estimuladas pelo agonista ADP foi possível verificar que os animais deficientes em MAGP1 apresentam uma agregação reduzida em relação aos

animais selvagens e que o tratamento com losartan e captopril são capazes de resgatar essa agregação a valores próximos dos selvagens.

No ensaio de adesão de plaquetas lavadas foi possível verificar que as plaquetas de ambos os grupos (selvagens e deficientes em MAGP1) aderem de forma semelhante.

Estudos relacionados à função plaquetária, onde o sistema renina-angiotensina foi bloqueado, são bastante conflitantes. Inibidores da ACE podem diminuir (Islim, Bareford, & Beevers, 2001), aumentar (Hernández-Hernández et al., 1999) ou não ter influência (Gupta et al., 2002; Remková et al., 2008) em vários índices de atividade plaquetária, bem como agregação e adesão. Da mesma forma, estudos com bloqueadores do receptor AT1 podem diminuir função das plaquetas (Guerra-Cuesta et al., 1999; Levy et al., 2000; Murad et al. 2012; Yamada et al., 2007) ou permanecer inalterada (Li-Saw-Hee et al., 2001; Pathansali et al., 2001; Remková et al., 2008). Além disso, Schwieler e colaboradores (Schwieler et al., 2013) não encontraram nenhum efeito antiplaquetário após 8 semanas de tratamento com enalapril (inibidor da ACE) e losartan em humanos.

As plaquetas são células anucleares derivadas de megacariócitos maduros e são responsáveis pela manutenção da hemostasia. A hemostasia é descrita como a habilidade de um vaso sanguíneo injuriado em sanar o dano sofrido utilizando a agregação de plaquetas e mobilização de uma rede de fibrinogênio para selar o local da lesão e evitar hemorragia desnecessária (Borissoff et al. 2011) .

Sabendo dessa importante função que as plaquetas desempenham na formação do trombo, foi de nosso interesse avaliar a morfologia das plaquetas dos animais dos diferentes grupos (figura 4.10). Mais uma vez, não houve diferença, após análise inicial, na morfologia, forma ou conteúdo das plaquetas.

Uma vez que o losartan e o captopril são capazes de recuperar o tempo de formação de trombo nos grupos estudados, foi de nosso interesse verificar se esses

fármacos alteram, de alguma forma, o trombo. Para isso, foi realizada uma análise morfológica inicial dos trombos obtidos pelo ensaio de indução fotoquímica (figura 4.11).

Nesse ensaio é possível verificar a integridade da parede da carótida e o trombo propriamente dito. Aparentemente, os trombos dos diferentes grupos apresentam-se semelhantes e a parede da carótida não apresenta nenhum tipo de fragmentação ou alteração.

Esses dados, somados aos dados da cascata de coagulação e ainda aos dados de adesão plaquetária, sugerem que a capacidade de formar trombo dos animais deficientes em MAGP1 permanece inalterada. Entretanto, o fato de sofrerem embolizações repetidas vezes conduz ao aumento do tempo de formação de trombo oclusivo, o que pode estar relacionado a uma redução dos sítios de ligação do trombo com a parede do vaso ocasionada pela deficiência em MAGP1.

Conforme descrito por Weinbaum et al. (2008), a MAGP1 assim como a fibrilina-1 é capaz de se ligar ao TGF- β . Sendo assim, foi de nosso interesse verificar se o fato do camundongo deficiente em MAGP1 necessitar de quase o dobro do tempo de um animal selvagem para formar um trombo que leve à oclusão da artéria carótida, somado ao fato do losartan, um antagonista de TGF- β conseguir recuperar o tempo de formação do trombo nesses animais, está relacionado com uma hiperativação desse fator de crescimento, conforme relatado na literatura para os sinais clínicos da síndrome de Marfan.

Para isso, os níveis séricos de TGF- β , total e ativo, foram dosados utilizando um kit de dosagem por ELISA, seguindo instruções do fabricante (figura 4.12 e 4.13 respectivamente).

Analizando os resultados obtidos é possível verificar que, em relação aos níveis séricos de TGF- β total (figura 4.12), não houve alteração nos grupos estudados. Em

relação aos níveis séricos de TGF- β ativo (figura 4.13) é possível verificar que há um aumento no grupo dos animais deficientes em MAGP1. Entretanto, o tratamento com os fármacos não reduz esses níveis no grupo citado. Já no grupo dos animais selvagens, é possível verificar que o tratamento com os fármacos, mais especificamente o captopril, é capaz de reduzir os níveis desse fator de crescimento.

Os níveis aumentados de TGF- β ativo nos levou a investigar qual via de sinalização poderia estar envolvida. Sendo assim, através da zimografia *in situ*, foi possível verificarmos a atividade das gelatinases MMP-2 e -9 (figura 4.14 e 4.15). Uma vez que o aumento da atividade dessas gelatinases tem sido relacionado a um aumento da sinalização de TGF- β (Xiong et al., 2012).

Conforme visto no ensaio de zimografia *in situ*, é possível verificar a atividade gelatinolítica (figura 4.14). E a partir da análise semiquantitativa (figura 4.15), é possível avaliar o nível de atividade dessas enzimas nos diferentes grupos estudados (Wang et al., 2006). Dessa forma, verificamos que há um aumento significativo da atividade dessas gelatinases nos animais deficientes em MAGP1 tratados com placebo, em relação aos animais selvagens e, que o tratamento com losartan é capaz de reduzir essa atividade.

O envolvimento da MMP-2 na ativação de TGF- β tem sido descrito em vários tipos celulares *in vitro* (Wang et al., 2006). Em osteoclastos, LAP é clivado por MMP-2 para liberar TGF- β 1 ativo (Karsdal et al., 2002). Similarmente, MMP-2 ativa TGF- β 1 em células de carcinoma mamário murino (Yu & Stamenkovic, 2000).

Conforme visto por Zhang e colaboradores (2013), as células musculares lisas vasculares aumentam a expressão de MMP-9 sob estimulação de TGF- β . Além disso, foi verificado que o TGF- β 1 sozinho é capaz de induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) como parte de sua via de transdução de sinal, o que sugere a participação de EROs no processo pelo qual TGF- β 1 induz a expressão de MMP-9. Em adição, foi

visto que o TGF- β 1 induz diretamente a expressão de MMP-9 via ativação de ERK1/2, dependente de EROs e do fator de transcrição NF- κ B nas células musculares lisas vasculares.

Similar ao descrito por Zhang e colaboradores (2013), Braga (2015) descreveu para fibroblastos de derme deficientes em Fibrilina-1 (figura 4.16). Onde é possível verificar que a hiperativação de TGF- β pode ativar tanto a via canônica quanto não canônica, culminando no aumento da produção de EROs e aumento da atividade das gelatinases MMP-2 e -9. Além disso, foi visto que o tratamento dessas células com losartan faz o caminho inverso inibindo ambas as vias de sinalização e consequentemente a atividade das gelatinases.

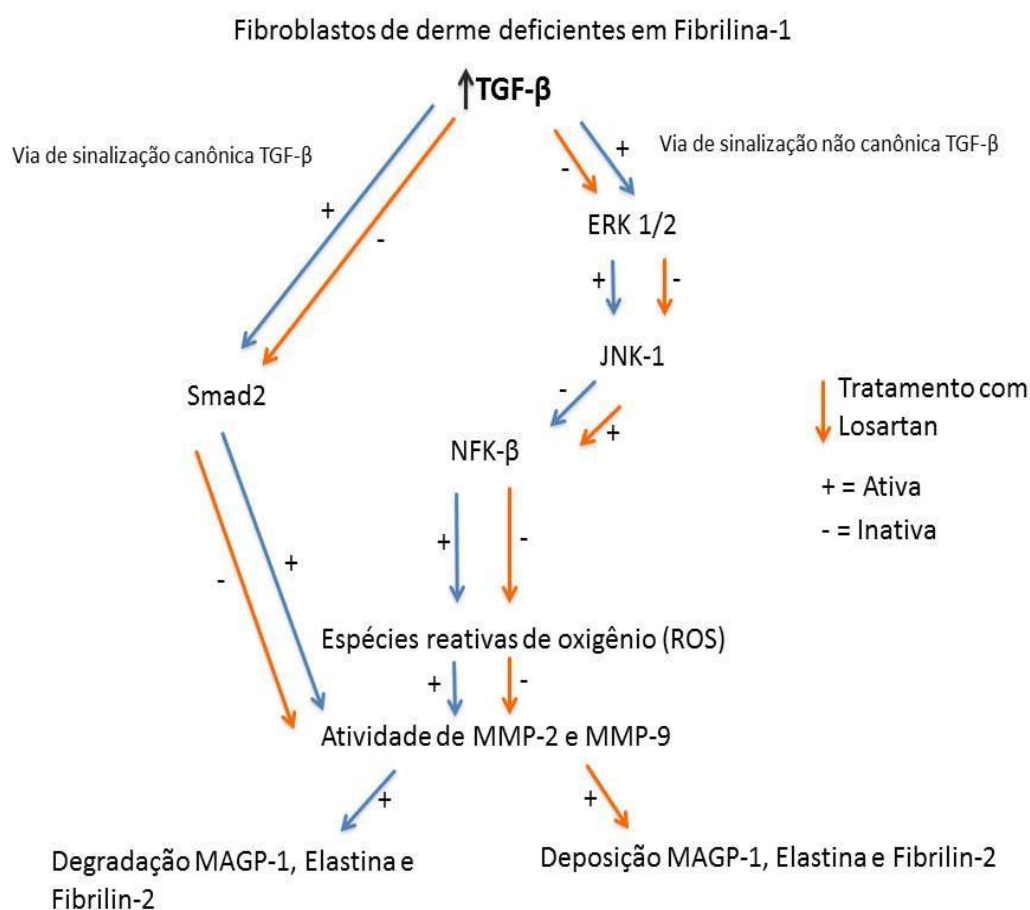


Figura 4.16. Via de sinalização envolvendo as vias canônica e não canônica do TGF- β , NF- κ B, EROs e gelatinases.

Dessa forma, Como a MAGP1 é uma proteína das microfibrilas e interage com TGF- β , assim como a Fibrilina-1, as vias de sinalização desse fator de crescimento precisam ser estudadas mais detalhadamente nos animais deficientes em MAGP1.

CONCLUSÃO

6. Conclusão

- A proteína MAGP1 mutada (MAGP1-VG1) continua interagindo com moléculas importantes para formação do trombo, como visto para vWF e FN.
- A proteína MAGP1 mutada (MAGP1-VG1) não é capaz de resgatar o tempo de formação de trombo em animais deficientes em MAGP1.
- Tratamento com losartan 15mg/kg/dia, assim como o captopril 30mg/kg/dia são capazes de resgatar o tempo de oclusão dos animais deficientes em MAGP1 a valores próximos dos animais selvagens;
- Animais deficientes em MAGP1 são normotensos e o tratamento com os fármacos Captopril e losartan não alteram a pressão arterial dos animais;
- A deficiência em MAGP1 não altera a integridade da parede da artéria carótida nem a morfologia das plaquetas;
- Em relação a cascata de coagulação, animais deficientes em MAGP1 não apresentam qualquer tipo de alteração nas vias intrínseca nem extrínseca;
- A capacidade de agregação induzida por ADP está reduzida nos animais deficientes em MAGP1 e é recuperada pós tratamento com losartan e captopril.
- Com relação aos níveis séricos de TGF- β 1, animais deficientes em MAGP1 apresentam um aumento dos níveis do TGF- β 1 ativo e o tratamento com losartan e captopril não alteram esse estado. Já os níveis de TGF- β 1 total estão inalterados em ambos os grupos estudados;
- A atividade de gelatinases estão aumentadas nas aortas dos animais deficientes em MAGP1 e o tratamento com o losartan e captopril são capazes de reverter esse quadro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. Referências Bibliográficas

- Ahimastos, A. A., Aggarwal, A., D'Orsa, K. M., Formosa, M. F., White, A. J., Savarirayan, R., et al. (2007). Effect of perindopril on large artery stiffness and aortic root diameter in patients with Marfan syndrome: a randomized controlled trial. *JAMA*, 298(13), 1539-1547.
- Ambrosio, G., Tritto, I., & Golino, P. (1997). Reactive oxygen metabolites and arterial thrombosis. *Cardiovasc Res*, 34(3), 445-452.
- Annes, J. P., Munger, J. S., & Rifkin, D. B. (2003). Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci*, 116(Pt 2), 217-224.
- Austin, K. M., Covic, L., & Kuliopulos, A. (2013). Matrix metalloproteases and PAR1 activation. *Blood*, 121(3), 431-439.
- Bavry, A. A., Li, D., Zander, D. S., Phillips, M. I., & Mehta, J. L. (2000). Inhibition of arterial thrombogenesis by quinapril but not losartan. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 5(2), 121-127.
- Birkedal-Hansen, H., Moore, W. G., Bodden, M. K., Windsor, L. J., Birkedal-Hansen, B., DeCarlo, A., et al. (1993). Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med*, 4(2), 197-250.
- Bobik, A. (2006). Transforming growth factor-betas and vascular disorders. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26(8), 1712-1720.
- Bonnefoy, A., Daenens, K., Feys, H. B., De Vos, R., Vandervoort, P., Vermyn, J., et al. (2006). Thrombospondin-1 controls vascular platelet recruitment and thrombus adherence in mice by protecting (sub)endothelial VWF from cleavage by ADAMTS13. *Blood*, 107(3), 955-964.
- Borisssoff, J. I., Spronk, H. M., & ten Cate, H. (2011). The hemostatic system as a modulator of atherosclerosis. *N Engl J Med*, 364(18), 1746-1760.
- Braga, G.G. (2015). Avaliação dos mecanismos de ação do losartan em cultura de fibroblastos de derme deficientes em Fibrilina-1. Universidade Estadual de campinas.
- Brooke, B. S., Habashi, J. P., Judge, D. P., Patel, N., Loeys, B., & Dietz, H. C. (2008). Angiotensin II blockade and aortic-root dilation in Marfan's syndrome. *N Engl J Med*, 358(26), 2787-2795.

- Brown-Augsburger, P., Broekelmann, T., Mecham, L., Mercer, R., Gibson, M. A., Cleary, E. G., et al. (1994). Microfibril-associated glycoprotein binds to the carboxyl-terminal domain of tropoelastin and is a substrate for transglutaminase. *J Biol Chem*, 269(45), 28443-28449.
- Carta, L., Pereira, L., Arteaga-Solis, E., Lee-Arteaga, S. Y., Lenart, B., Starcher, B., Merkel, C. A., Sukoyan, M., Kerkis, A., Hazeki, N., Keene, D.R., Sakai, L.Y., Ramirez, F. (2006). Fibrillins 1 and 2 perform partially overlapping functions during aortic development. *J Biol Chem*, 281, 8016-8023.
- Castro, M. M., & Tanus-Santos, J. E. (2013). Inhibition of matrix metalloproteinases (MMPs) as a potential strategy to ameliorate hypertension-induced cardiovascular alterations. *Curr Drug Targets*, 14(3), 335-343.
- Charbonneau, N. L., Dzamba, B. J., Ono, R. N., Keene, D. R., Corson, G. M., Reinhardt, D. P., et al. (2003). Fibrillins can co-assemble in fibrils, but fibrillin fibril composition displays cell-specific differences. *J Biol Chem*, 278(4), 2740-2749.
- Chen, E., Larson, J. D., & Ekker, S. C. (2006). Functional analysis of zebrafish Microfibril-Associated Glycoprotein-1 (MAGP-1) in vivo reveals roles for microfibrils in both vascular development and function. *Blood*.
- Chen, Y., Faraco, J., Yin, W., Germiller, J., Francke, U., & Bonadio, J. (1993). Structure, chromosomal localization, and expression pattern of the murine Magp gene. *J Biol Chem*, 268(36), 27381-27389.
- Chiu, H. H., Wu, M. H., Wang, J. K., Lu, C. W., Chiu, S. N., Chen, C. A., Lin, M. T., Hu, F. C. (2013). Losartan added to beta-blockade therapy for aortic root dilation in Marfan Syndrome: A randomized, open-label pilot estudy. *Mayo Clin Proc*, 88(3), 271-276.
- Chung, J., Wang, X. Q., Lindberg, F. P., & Frazier, W. A. (1999). Thrombospondin-1 acts via IAP/CD47 to synergize with collagen in alpha2beta1-mediated platelet activation. *Blood*, 94(2), 642-648.
- Cohn, R. D., van Erp, C., Habashi, J. P., Soleimani, A. A., Klein, E. C., Lisi, M. T., et al. (2007). Angiotensin II type 1 receptor blockade attenuates TGF-beta-induced failure of muscle regeneration in multiple myopathic states. *Nat Med*, 13(2), 204-210.
- Craft, C. S., Broekelmann, T. J., Zou, W., Chappel, J. C., Teitelbaum, S. L., & Mecham, R. P. (2012). Oophorectomy-induced bone loss is attenuated in MAGP1-deficient mice. *J Cell Biochem*, 113(1), 93-99.

- Craft, C. S., Pietka, T. A., Schappe, T., Coleman, T., Combs, M. D., Klein, S., et al. (2014). The extracellular matrix protein MAGP1 supports thermogenesis and protects against obesity and diabetes through regulation of TGF- β . *Diabetes*, 63(6), 1920-1932.
- Davis, E. C. (1994). Immunolocalization of microfibril and microfibril-associated proteins in the subendothelial matrix of the developing mouse aorta. *J Cell Sci*, 107 (Pt 3), 727-736.
- de Groot, P. G., Ottenhof-Rovers, M., van Mourik, J. A., & Sixma, J. J. (1988). Evidence that the primary binding site of von Willebrand factor that mediates platelet adhesion on subendothelium is not collagen. *J Clin Invest*, 82(1), 65-73.
- Doyle, A.J., Doyle, J.J., Bessling, S.L., Maragh, S., Lindsay, M.E., Schepers, D., Gillis, E., Mortier, G., Homfray, T., Sauls, K., Norris, R.A., Huso, N.D., Leahy, D., Mhor, D.W., Caulfield, M.J., Scott, A.F., Destrée, A., Hennekam, R.C., Arn, P.H., Curry, C.J., Laer, L.V., McCallion, A.S., Loeys, B.L., Dietz, H.C. (2012) Mutations in the TGF- β repressor SKI cause Shprintzen-Goldeberg Syndrome with aortic aneurysm. *Nat Genet*, 44(11):1249-1254.
- Dubois, C., Panicot-Dubois, L., Merrill-Skoloff, G., Furie, B., & Furie, B. C. (2006). Glycoprotein VI-dependent and -independent pathways of thrombus formation in vivo. *Blood*, 107(10), 3902-3906.
- Fahrenbach, W. H., Sandberg, L. B., & Cleary, E. G. (1996). Ultrastructural studies on early elastogenesis. *Anat. Rec.*, 155(563-576).
- Feng, X. H., & Derynck, R. (2005). Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 21, 659-693.
- Finnis, M. L., & Gibson, M. A. (1997). Microfibril-associated glycoprotein-1 (MAGP-1) binds to the pepsin-resistant domain of the alpha3(VI) chain of type VI collagen. *J Biol Chem*, 272(36), 22817-22823.
- Fridman, R., Toth, M., Peña, D., & Mobashery, S. (1995). Activation of progelatinase B (MMP-9) by gelatinase A (MMP-2). *Cancer Res*, 55(12), 2548-2555.
- Furie, B., & Furie, B. C. (2008). Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med*, 359(9), 938-949.
- Gallo, E. M., Loch, D. C., Habashi, J. P., Calderon, J. F., Chen, Y., Bedja, D., van Erp, C., Gerber, E. E., Parker, S. J., Sauls, K., Judge, D. P., Cooke, S. K., Lindsay, M. E., Rouf, R., Myers, L., ap Rhys, C. M., Kent, K. C., Norris, R. A., Huso, D. L.,

- Dietz, H. C. (2014). AngiotensinII-dependent TGF- β signaling contributes to Loya-Dietz syndrome vascular pathogenesis. *J Clin Invest* 124(1), 448-460.
- Gibson, M. A., Sandberg, L. B., Grosso, L. E., & Cleary, E. G. (1991). Complementary DNA cloning establishes microfibril-associated glycoprotein (MAGP) to be a discrete component of the elastin-associated microfibrils. *J Biol Chem*, 266(12), 7596-7601.
- Guerra-Cuesta, J. I., Montón, M., Rodríguez-Feo, J. A., Jiménez, A. M., González-Fernandez, F., Rico, L. A., et al. (1999). Effect of losartan on human platelet activation. *J Hypertens*, 17(3), 447-452.
- Gupta, P. A., Putnam, E. A., Carmical, S. G., Kaitila, I., Steinmann, B., Child, A., et al. (2002). Ten novel FBN2 mutations in congenital contractural arachnodactyly: delineation of the molecular pathogenesis and clinical phenotype. *Hum Mutat*, 19(1), 39-48.
- Groenink, M., den Hartog, A. W., Franken, R., Radonic, T., de Waard, V., Timmermans, J., Scholte, A. J., van den Berg, M. P., Spijkerboer, A. M., Marquering, H. A., Zwinderman, A. H., Mulder, B. J. (2013). Losartan reduces aortic dilatation rate in adults with Marfan syndrome: A randomized controlled trial. *Eu Hart J* 34(45), 3491-500.
- Habashi, J. P., Doyle, J. J., Holm, T. M., Aziz, H., Schoenhoff, F., Bedja, D., et al. (2011). Angiotensin II type 2 receptor signaling attenuates aortic aneurysm in mice through ERK antagonism. *Science*, 332(6027), 361-365.
- Habashi, J. P., Judge, D. P., Holm, T. M., Cohn, R. D., Loeys, B. L., Cooper, T. K., et al. (2006). Losartan, an AT1 antagonist, prevents aortic aneurysm in a mouse model of Marfan syndrome. *Science*, 312(5770), 117-121.
- He, L., Vicente, C. P., Westrick, R. J., Eitzman, D. T., & Tollefsen, D. M. (2002). Heparin cofactor II inhibits arterial thrombosis after endothelial injury. *J Clin Invest*, 109(2), 213-219.
- Hernández-Hernández, R., Armas-Padilla, M. C., Velasco, M., Carvajal, A. R., Armas de Hernández, M. J., Guerrero-Pajuelo, J., et al. (1999). Effects of amlodipine and enalapril on platelet function in patients with mild to moderate hypertension. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 37(7), 323-331.
- Holm, T.M., Habashi, J.P., Doyle, J.J., Bedja, D., Chen, Y., van Erp, C., Lindsay, M.E., Kim, D., Schoenhoff, F., Cohn, R.D., Loeys, B.L., Thomas, C.J., Patnaik, S., Marugan, J.J., Judge, D.P., Dietz, H.C. (2011). Noncanonical TGF- β signaling

- contributes to aortic aneurysm progression in Marfan syndrome mice. *Science* 332(6027), 358-361.
- Hoffman, M., & Monroe, D. M. (2001). A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost*, 85(6), 958-965.
- Islim, I. F., Bareford, D., & Beevers, D. G. (2001). A single (investigator)-blind randomised control trial comparing the effects of quinapril and nifedipine on platelet function in patients with mild to moderate hypertension. *Platelets*, 12(5), 274-278.
- J.P., R., D.P., J., T.M., H., R.D., C., B.L., L., T.K., C., et al. (2006). Losartan, an AT1 Antagonist, Prevents Aortic Aneurysm in a Mouse Model of Marfan Syndrome. *Science*, 312, 117-121.
- Jensen, S. A., Reinhardt, D. P., Gibson, M. A., & Weiss, A. S. (2001). Protein interaction studies of MAGP-1 with tropoelastin and fibrillin-1. *J Biol Chem*, 276(43), 39661-39666.
- Jones, C. B., Sane, D. C., & Herrington, D. M. (2003). Matrix metalloproteinases: a review of their structure and role in acute coronary syndrome. *Cardiovasc Res*, 59(4), 812-823.
- Kakar, P., & Lip, G. Y. (2007a). Hypertension: endothelial dysfunction, the prothrombotic state and antithrombotic therapy. *Expert review of cardiovascular therapy*, 5(3), 441-450.
- Kakar, P., & Lip, G. Y. (2007b). Hypertension: endothelial dysfunction, the prothrombotic state and antithrombotic therapy. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 5(3), 441-450.
- Kamińska, M., Mogielnicki, A., Stankiewicz, A., Kramkowski, K., Domaniewski, T., Buczek, W., et al. (2005). Angiotensin II via AT1 receptor accelerates arterial thrombosis in renovascular hypertensive rats. *J Physiol Pharmacol*, 56(4), 571-585.
- Kang, J.S., Liu, C. & Derynck, R. (2009). New regulatory mechanisms of TGF- β receptor. *Trends Cell Biol* 19(8), 385-394.
- Karsdal, M. A., Larsen, L., Engsig, M. T., Lou, H., Ferreras, M., Lochter, A., et al. (2002). Matrix metalloproteinase-dependent activation of latent transforming growth factor-beta controls the conversion of osteoblasts into osteocytes by blocking osteoblast apoptosis. *J Biol Chem*, 277(46), 44061-44067.

- Ketelhuth, D. F., & Bäck, M. (2011). The role of matrix metalloproteinases in atherothrombosis. *Curr Atheroscler Rep*, 13(2), 162-169.
- Khan, J. A., Abdul Rahman, M. N., Mazari, F. A., Shahin, Y., Smith, G., Madden, L., et al. (2012). Intraluminal thrombus has a selective influence on matrix metalloproteinases and their inhibitors (tissue inhibitors of matrix metalloproteinases) in the wall of abdominal aortic aneurysms. *Ann Vasc Surg*, 26(3), 322-329.
- Kielty, C. M., Sherratt, M. J., Marson, A., & Baldock, C. (2005). Fibrillin microfibrils. *Adv Protein Chem*, 70, 405-436.
- Kielty, C. M., Sherratt, M. J., & Shuttleworth, C. A. (2002). Elastic fibres. *J Cell Sci*, 115(Pt 14), 2817-2828.
- Kramkowski, K., Mogielnicki, A., Leszczynska, A., & Buczek, W. (2010). Angiotensin-(1-9), the product of angiotensin I conversion in platelets, enhances arterial thrombosis in rats. *J Physiol Pharmacol*, 61(3), 317-324.
- Krege, J. H., Hodgin, J. B., Hagaman, J. R., & Smithies, O. (1995). A noninvasive computerized tail-cuff system for measuring blood pressure in mice. *Hypertension*, 25(5), 1111-1115.
- Kyriakides, T. R., Y.H., Z., L.T., S., S.D., B., Z., Y., M.T., L., et al. (1998). Mice that like thrombospondin 2 display connective tissue abnormalities that are associated with disordered collagen fibrillogenesis, an increased vascular density, and a bleeding diathesis. *J Cell Biol*, 140(2), 419-430.
- Kyriakides, T. R., Zhu, Y. H., Smith, L. T., Bain, S. D., Yang, Z., Lin, M. T., et al. (1998). Mice that like thrombospondin 2 display connective tissue abnormalities that are associated with disordered collagen fibrillogenesis, an increased vascular density, and a bleeding diathesis. *J Cell Biol*, 140(2), 419-430.
- Lee, B., Godfrey, M., Vitale, E., Hori, H., Mattei, M. G., Sarfarazi, M., et al. (1991). Linkage of Marfan syndrome and a phenotypically related disorder to two different fibrillin genes. *Nature*, 352(6333), 330-334.
- Leu, H. B., Charng, M. J., & Ding, P. Y. (2004). A double blind randomized trial to compare the effects of eprosartan and enalapril on blood pressure, platelets, and endothelium function in patients with essential hypertension. *Jpn Heart J*, 45(4), 623-635.

- Levy, P. J., Yunis, C., Owen, J., Brosnihan, K. B., Smith, R., & Ferrario, C. M. (2000). Inhibition of platelet aggregability by losartan in essential hypertension. *Am J Cardiol*, 86, 1188-1192.
- Li-Saw-Hee, F. L., Beevers, D. G., & Lip, G. Y. (2001). Effect of antihypertensive therapy using enalapril or losartan on haemostatic markers in essential hypertension: a pilot prospective randomised double-blind parallel group trial. *Int J Cardiol*, 78(3), 241-246.
- Machado, D. (2010). *Caracterização do domínio da glicoproteína associada a microfibrila-1 (MAGP1) com atividade pró-trombótica.*, Universidade Estadual de Campinas.
- Mackman, N. (2008). Triggers, targets and treatments for thrombosis. *Nature*, 451(7181), 914-918.
- Marcus, A. J., Broekman, M. J., Drosopoulos, J. H., Olson, K. E., Islam, N., Pinsky, D. J., et al. (2005). Role of CD39 (NTPDase-1) in thromboregulation, cerebroprotection, and cardioprotection. *Semin Thromb Hemost*, 31(2), 234-246.
- Marcus, A. J., Broekman, M. J., & Pinsky, D. J. (2002). COX inhibitors and thromboregulation. *N Engl J Med*, 347(13), 1025-1026.
- Massagué, J., & Gomis, R. R. (2006). The logic of TGFbeta signaling. *FEBS Lett*, 580(12), 2811-2820.
- Massam-Wu, T., Chiu, M., Choudhury, R., Chaudhry, S. S., Baldwin, A. K., McGovern, A., et al. (2010). Assembly of fibrillin microfibrils governs extracellular deposition of latent TGF beta. *J Cell Sci*, 123(Pt 17), 3006-3018.
- Mecham, R. P., & Davis, E. C. (1994). Elastic fiber structure and assembly. *Extracellular Matrix Assembly and Structure*, 281-314.
- Mecham, R. P., & E.C., D. (1994). Elastic fiber structure and assembly. *Extracellular Matrix Assembly and Structure*, 281-314.
- Morrissey, J. H., B.G., M., P.F., N., & P.C., C. (1993). Quantification of activated factor VII levels in plasma using a tissue factor mutante selectively deficiente in promoting factor VII activation. (Vol. 81, pp. 734-744): *Blood*.
- Morrissey, J. H., Macik, B. G., Neuenschwander, P. F., & Comp, P. C. (1993). Quantification of activated factor VII levels in plasma using a tissue factor mutante selectively deficiente in promoting factor VII activation. (Vol. 81, pp. 734-744): *Blood*.

- Mott, J. D., & Werb, Z. (2004). Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol*, 16(5), 558-564.
- Murad, J. P., Espinosa, E. V., Ting, H. J., & Khasawneh, F. T. (2012). Characterization of the in vivo antiplatelet activity of the antihypertensive agent losartan. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 17(3), 308-314.
- Murphy-Ullrich, J. E., & Poczatek, M. (2000). Activation of latent TGF-beta by thrombospondin-1: mechanisms and physiology. *Cytokine Growth Factor Rev*, 11(1-2), 59-69.
- Nagase, H., Visse, R., & Murphy, G. (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res*, 69(3), 562-573.
- Neptune, E. R., Frischmeyer, P. A., Arking, D. E., Myers, L., Bunton, T. E., Gayraud, B., et al. (2003). Dysregulation of TGF-beta activation contributes to pathogenesis in Marfan syndrome. *Nat Genet*, 33(3), 407-411.
- Newby, A. C. (2005). Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiol Rev*, 85(1), 1-31.
- Newby, A. C. (2012). Matrix metalloproteinase inhibition therapy for vascular diseases. *Vascul Pharmacol*, 56(5-6), 232-244.
- Oliveira, E. M., Sasaki, M. S., Cerêncio, M., Baraúna, V. G., & Krieger, J. E. (2009). Local renin-angiotensin system regulates left ventricular hypertrophy induced by swimming training independent of circulating renin: a pharmacological study. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 10(1), 15-23.
- Owens, A. P., & Mackman, N. (2010). Tissue factor and thrombosis: The clot starts here. *Thromb Haemost*, 104(3), 432-439.
- Palmer, R. M., Ferrige, A. G., & Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327(6122), 524-526.
- Pathansali, R., Smith, N. M., & Bath, P. M. (2001). Prothrombotic megakaryocyte and platelet changes in hypertension are reversed following treatment: a pilot study. *Platelets*, 12(3), 144-149.
- Penner, A. S., Rock, M. J., Kielty, C. M., & Shipley, J. M. (2002). Microfibril-associated glycoprotein-2 interacts with fibrillin-1 and fibrillin-2 suggesting a role for MAGP-2 in elastic fiber assembly. *J Biol Chem*, 277(38), 35044-35049.
- Ramirez, F., & Dietz, H. C. (2007). Fibrillin-rich microfibrils: Structural determinants of morphogenetic and homeostatic events. *J Cell Physiol*, 213(2), 326-330.

- Reinhardt, D. P., Keene, D. R., Corson, G. M., Pöschl, E., Bächinger, H. P., Gammee, J. E., et al. (1996). Fibrillin-1: organization in microfibrils and structural properties. *J Mol Biol*, 258(1), 104-116.
- Remková, A., Kratochvílová, H., & Durina, J. (2008). Impact of the therapy by renin-angiotensin system targeting antihypertensive agents perindopril versus telmisartan on prothrombotic state in essential hypertension. *J Hum Hypertens*, 22(5), 338-345.
- Remková, A., Kratochvílová, H., & Durina, J. (2008). Impact of the therapy of renin-angiotensin system targeting antihypertensive agents perindopril versus telmisartan on prothrombotic state in essential hypertension. *J Hum Hypertens*, 5, 338-345.
- Robinson PN, Arteaga-Solis E, Baldock C, Collod-Beroud G, Booms P, De Paepe A, Dietz HC, Guo G, Handford PA, Judge et al. (2006). The molecular genetics of Marfan syndrome and related disorders. *J Med Genet* 43(10):769-787.
- Ross, J. M., McIntire, L. V., Moake, J. L., Kuo, H. J., Qian, R. Q., Glanville, R. W., et al. (1998). Fibrillin containing elastic microfibrils support platelet adhesion under dynamic shear conditions. *Thromb Haemost*, 79(1), 155-161.
- Sage, H., & Gray, W. R. (1981). Studies on the evolution of elastin-III. The ancestral protein. *Comp. Biochem. Physiol.*, 68B, 473-480.
- Schwieler, J. H., Kahan, T., Wallén, N. H., Nussberger, J., & Hjerdahl, P. (2013). Inhibition of the renin-angiotensin system does not reduce platelet activity at rest or during stress in hypertension. *J Hypertens*, 31(8), 1676-1682.
- Segade, F., Trask, B. C., Broekelmann, T. J., Pierce, R. A., & Mecham, R. P. (2002). Identification of a matrix-binding domain in MAGP1 and MAGP2 and intracellular localization of alternative splice forms. *J Biol Chem*, 277(13), 11050-11057.
- Shoulders, M. D., & Raines, R. T. (2009). Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem*, 78, 929-958.
- Sturgeon, S. A., Jones, C., Angus, J. A., & Wright, C. E. (2006). Adaptation of the Folts and electrolytic methods of arterial thrombosis for the study of anti-thrombotic molecules in small animals. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 53(1), 20-29.
- T.R., K., Y.H., Z., L.T., S., S.D., B., Z., Y., M.T., L., et al. (1998). Mice that lack thrombospondin 2 display connective tissue abnormalities that are associated with

- disordered collagen fibrillogenesis, an increased vascular density, and a bleeding diathesis. *J Cell Biol.* 140, 419-430.
- ten Dijke, P., & Arthur, H. M. (2007). Extracellular control of TGF β signalling in vascular development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(11), 857-869.
- Thomas, A. C., & Newby, A. C. (2010). Effect of matrix metalloproteinase-9 knockout on vein graft remodelling in mice. *J Vasc Res*, 47(4), 299-308.
- Trask, B. C., Trask, T. M., Broekelmann, T., & Mecham, R. P. (2000). The microfibrillar proteins MAGP-1 and fibrillin-1 form a ternary complex with the chondroitin sulfate proteoglycan decorin. *Mol Biol Cell*, 11(5), 1499-1507.
- Tseng, M. T., Dozier, A., Haribabu, B., & Graham, U. M. (2006). Transendothelial migration of ferric ion in FeCl₃ injured murine common carotid artery. *Thromb Res*, 118(2), 275-280.
- Uchida, H., Kuroki, M., Shitama, T., & Hayashi, H. (2008). Activation of TGF- β 1 through up-regulation of TSP-1 by retinoic acid in retinal pigment epithelial cells. *Curr Eye Res*, 33(2), 199-203.
- Vu, T. K., Hung, D. T., Wheaton, V. I., & Coughlin, S. R. (1991). Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell*, 64(6), 1057-1068.
- Wagner, D. D., Urban-Pickering, M., & Marder, V. J. (1984). Von Willebrand protein binds to extracellular matrices independently of collagen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(2), 471-475.
- Wang, M., Zhao, D., Spinetti, G., Zhang, J., Jiang, L. Q., Pintus, G., et al. (2006). Matrix metalloproteinase 2 activation of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and TGF- β 1-type II receptor signaling within the aged arterial wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26(7), 1503-1509.
- Weinbaum, J. S., Broekelmann, T. J., Pierce, R. A., Werneck, C. C., Segade, F., Craft, C. S., et al. (2008). Deficiency in microfibril-associated glycoprotein-1 leads to complex phenotypes in multiple organ systems. *J Biol Chem*, 283(37), 25533-25543.
- Werneck, C. C., Trask, B. C., Broekelmann, T. J., Trask, T. M., Ritty, T. M., Segade, F., et al. (2004). Identification of a major microfibril-associated glycoprotein-1-binding domain in fibrillin-2. *J Biol Chem*, 279(22), 23045-23051.

- Werneck, C. C., Vicente, C. P., Weinberg, J. S., Shifren, A., Pierce, R. A., Broekelmann, T. J., et al. (2008). Mice lacking the extracellular matrix protein MAGP1 display delayed thrombotic occlusion following vessel injury. *Blood*, *111*(8), 4137-4144.
- White, J. G. (2002). Electron microscopy methods for studying platelets structure and function. In (Vol. 272, pp. 47-63).
- Wisler, J. W., & Becker, R. C. (2014). Emerging paradigms in arterial thrombosis. *J Thromb Thrombolysis*, *37*(1), 4-11.
- Wojakowski, W., Gminski, J., Siemianowicz, K., Goss, M., & Machalski, M. (2001). The influence of angiotensin-converting enzyme inhibitors on the aorta elastin metabolism in diet-induced hypercholesterolaemia in rabbits. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, *2*(1), 37-42.
- Xiong, W., Meisinger, T., Knispel, R., Worth, J. M., & Baxter, B. T. (2012). MMP-2 regulates Erk1/2 phosphorylation and aortic dilatation in Marfan syndrome. *Circ Res*, *110*(12), e92-e101.
- Yamada, K., Hirayama, T., & Hasegawa, Y. (2007). Antiplatelet effect of losartan and telmisartan in patients with ischemic stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, *16*, 225-231.
- Yamamoto, K., Morishita, R., Tomita, N., Shimozaoto, T., Nakagami, H., Kikuchi, A., et al. (2000). Ribozyme oligonucleotides against transforming growth factor-beta inhibited neointimal formation after vascular injury in rat model: potential application of ribozyme strategy to treat cardiovascular disease. *Circulation*, *102*(11), 1308-1314.
- Yu, Q., & Stamenkovic, I. (2000). Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev*, *14*(2), 163-176.
- Zeisberg, M., Hanai, J., Sugimoto, H., Mammoto, T., Charytan, D., Strutz, F., et al. (2003). BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat Med*, *9*(7), 964-968.

ANEXOS

8. Anexos

1. Comitê de ética



Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 2303-1, sobre "Avaliação da função da MAGP1 na trombogênese arterial", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Cláudio C. Werneck / Tallita Vassequi da Silva, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em 06 de dezembro de 2010.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 2303-1, entitled "Evaluation of MAGP1 function on the arterial thrombogenesis", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on December 6, 2010.



Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Campinas, 06 de dezembro de 2010.



Fátima Alonso
Secretária Executiva

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

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

2. Declaração de direito autoral

Profa. Dra. Rachel Meneguello
Presidente
Comissão Central de Pós-Graduação
Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Avaliação da função da MAGP1 na trombogênese arterial**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas,

Assinatura: Tallita Vassequi da Silva
Nome do(a) autor(a): Tallita Vassequi da Silva
RG n.º 208923409

Assinatura: Claudio C. Werneck
Nome do(a) orientador(a): Claudio C. Werneck
RG n.º 16582314