

MARIA LUIZA CHRISTOVÃO RAMOS

**ANGIOTENSINOGENO E RECEPTORES
DE ANGIOTENSINA II, AT1 E AT2, EM
MODELO PORCINO DE CICATRIZAÇÃO
HIPERTRÓFICA**

**Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – UNIFESP,
para Obtenção do Título de Doutor
em Ciências**

São Paulo

2009

MARIA LUIZA CHRISTOVÃO RAMOS

**ANGIOTENSINOGENÍO E RECEPTORES
DE ANGIOTENSINA II, AT1 E AT2, EM
MODELO PORCINO DE CICATRIZAÇÃO
HIPERTRÓFICA**

**Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – UNIFESP,
para Obtenção do Título de Doutor
em Ciências**

ORIENTADOR: Prof. Dr. FABIO XERFAN NAHAS

CO-ORIENTADOR: Prof. ALFREDO GRAGNANI FILHO

CO-ORIENTADOR NOS EUA: Prof. LOREN ENGRAV

São Paulo

2009

Ramos , Maria Luiza Christovão

Angiotensinogênio e receptores de angiotensina II, AT1 e AT2, em modelo porcino de cicatrização hipertrófica./Maria Luiza Christovão Ramos -- São Paulo, 2009.

XXVII, 114f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica.

Título em Inglês: Angiotensinogen and angiotensin receptors, AT1 and AT2, in a porcine model of hypertrophic scar

1.cicatriz hipertrófica. 2.angiotensinogênio. 3.modelos animais. 4.receptor tipo 1 de angiotensina II.5.receptor tipo2 da angiotensina II.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIRURGIA PLÁSTICA**

TITULAR: PROFa. Dra. LYDIA MASAKO FERREIRA

COORDENADOR: PROF. Dr. MIGUEL SABINO NETO

DEDICATÓRIA

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Maria do Rocio, que moldou o meu caráter.

À minha filha Rafaella, que há 9 anos me traz uma imensa vontade de ser uma pessoa melhor.

Às minhas pacientes que deram e dão sentido a esta minha existência.

Aos animais de experimentação em laboratório, meu respeito e minha gratidão, por contribuírem para que o Conhecimento se amplie e o sofrimento humano seja atenuado.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço à **Profª. Dra. LYDIA MASAKO FERREIRA**, Professora Titular da Disciplina de Cirurgia Plástica do Departamento de Cirurgia da UNIFESP e Chefe do Departamento de Cirurgia da UNIFESP, pelo exemplo de liderança e pela oportunidade que me ofereceu nesta casa - iniciativa que me permitiu experienciar a gratidão por cada um dos que agora também agradeço publicamente :

Ao **Prof. Dr. FABIO XERFAN NAHAS** , Livre-Docente da Disciplina de Cirurgia Plástica do Departamento de Cirurgia da UNIFESP pela orientação deste trabalho, pela confiança na minha capacidade - o que aumentou meu grau de responsabilidade na execução deste estudo, assumida com honra e prazer. Pelo apoio incondicional em todos os momentos desta grande viagem.

Ao **Prof. ALFREDO GRAGNANI**, Professor Adjunto da Disciplina de Cirurgia Plástica do Departamento de Cirurgia da UNIFESP, pelo apoio moral quando estive longe, por compartilhar seu Conhecimento e pelo incentivo constante no desenvolver deste trabalho.

Ao **Prof. LOREN ENGRAV**, Professor Titular da Disciplina de Cirurgia Plástica da Universidade de Washington, orientador deste trabalho em Seattle, nos Estados Unidos, por ensinar-me com seu exemplo o maior valor que aprendi durante este estudo: a aplicação do rigor ético à pesquisa científica.

À minha amiga **Dra. KATHY ZHU**, minha mentora em Seattle, por ter compartilhado com humildade todo o conhecimento que desenvolvi

AGRADECIMENTOS

neste trabalho, por ter sido incansável na solução dos problemas técnicos surgidos no decorrer deste estudo.

Ao meu amigo **Dr. SURAJEJ NUMHOM**, meu companheiro de trabalho na Universidade de Washington, por obsessivamente rever cada detalhe técnico deste estudo e pelo seu exemplo de paciência.

À **Dra. NICOLE GIBRAN**, Chefe do Serviço de Queimaduras do *Harborview Medical Center*, por ter me acolhido como igual e por ter estimulado constantemente meu crescimento como pesquisadora na Universidade de Washington.

À **LARA MUFFLEY**, cientista e gerente do Laboratório de Pesquisas da Dra. Nicole Gibran, que foi amiga, irmã e minha mestra-iniciadora em laboratório de pesquisa e no aprendizado da imunohistoquímica.

Aos membros da equipe do Laboratório de Pesquisa da Dra. Nicole Gibran, que sem vínculo obrigatório em meu aprendizado, dispenderam muito tempo e paciência comigo: **Profa. Dra. ANNE HOCKING**, bióloga, que me ensinou a aceitar a lógica cartesiana da experimentação científica “*It is what it is.*”; **ANDRIA SMITH**, cientista, que exaustivamente me treinou em normas de segurança e técnicas de laboratório, **LEIGH MARTIN**, cientista, também responsável pelo meu aprendizado em técnicas básicas de laboratório e **AUSTIN BELL**, estudante e estagiária, por me ensinar a limpar e organizar uma bancada de experimentos, antes e depois deles...

À **JANE LANGE**, aluna de doutorado do Departamento de Bioestatística da Universidade de Washington e ao **Prof. Dr. SCOTT EMERSON**, Professor Titular deste Departamento, pela ajuda na análise estatística deste experimento.

AGRADECIMENTOS

Às amigas e doutorandas **SILVANA GAIBA** e **VANINA VIEGAS**, alunas deste programa de Pós-Graduação por me acolherem como companheira na minha volta e incansavelmente corrigirem meus erros na apresentação deste estudo.

Aos amigos da equipe do Laboratório da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP, que me relembraram o prazer do trabalho em equipe e do compartilhar Conhecimento: **ANTONIO ALOISE**, **GABRIELA BRITO**, **CELESTINO PRÓSPERO** e **JORGE MANUEL**.

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** – **CAPES** - pela concessão da bolsa de estudos nos primeiros doze meses em que estive nos EUA.

Ao **Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América** – **NIH** (National Institute of Health – USA), e ao **Instituto Nacional de Pesquisa em Deficiência e Reabilitação** – **NIDRR** (National Institute on Disability and Rehabilitation Research - USA) pelo financiamento desta pesquisa.

Aos **bombeiros da FIREFIGHTERS FOUNDATION**, que em seu tempo livre, fazem e divulgam um calendário anual com suas próprias fotos e doam o dinheiro da venda para instituições que dão atendimento a pacientes queimados. A doação no ano de 2008 à pesquisa do Professor Loren Engrav no *Harborview Medical Center*, permitiu minha contratação na Universidade de Washington por um período de seis meses além da minha bolsa de estudos fornecida pelo governo brasileiro.

À **UNIVERSIDADE DE WASHINGTON** por me convidar e me titular como Professora Visitante desta instituição no período de 18 meses que estive em Seattle.

Às secretárias da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP, **SANDRA DA SILVA**, **MARTA REJANE DOS REIS SILVA** e

AGRADECIMENTOS

SILVANA APARECIDA COSTA DE ASSIS, pela dedicação, respeito e ajuda.

Aos **colegas desse Programa de Pós-Graduaçãoe do Curso de Aperfeiçoamento**, pela colaboração e críticas realizadas durante o período que passamos juntos.

A todos os **Professores Orientadores e Colaboradores do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica da UNIFESP** pelas críticas e sugestões que engrandeceram este trabalho.

ΕΠΙΓΡΑΦΕ

E um homem disse: "**Fala-nos do conhecimento de si próprio**".

E ele respondeu, dizendo:

"Vosso coração conhece em silêncio os segredos dos dias e das noites;

Mas vossos ouvidos anseiam por ouvir o que vosso coração sabe.

Desejais conhecer em palavras aquilo que sempre conhecestes em pensamento.

Quereis tocar com os dedos o corpo nu de vossos sonhos. E é bom que o desejeis.

A nascente secreta de vossa alma precisa brotar e correr, murmurando para o mar;

E o tesouro de vossas profundezas ilimitadas precisa revelar-se a vossos olhos.

Mas não useis balanças para pesar vossos tesouros desconhecidos;

E não procureis explorar as profundidades de vosso conhecimento com uma vara ou uma sonda,

Porque o Eu é um mar sem limites e sem medidas.

Não digais: '*Encontrei a verdade.*' Dizei de preferência '*Encontrei uma verdade.*'

Não digais: '*Encontrei o caminho da alma.*' Dizei de preferência:

'Encontrei a alma andando em meu caminho.'

Porque a alma anda por todos os caminhos.

A alma não marcha em linha reta nem cresce como um junco.

A alma desabrocha, qual um lótus de inúmeras pétalas".

Então, um professor disse: "Fala-nos do ensino".

E ele respondeu, dizendo:

"Homem algum poderá revelar-vos senão o que já está meio adormecido na aurora do vosso entendimento.

O mestre que caminha à sombra do templo, rodeado de discípulos, não dá de sua sabedoria, mas sim de sua fé e de sua ternura.

Se ele for verdadeiramente sábio, não vos convidará a entrar na mansão de seu saber, mas vos conduzirá antes ao limiar de vossa própria mente.

O astrônomo poderá falar-vos de sua compreensão do espaço, mas não vos poderá dar a sua compreensão.

O músico poderá cantar para vós o ritmo que existe em todo o universo, mas não vos poderá dar o ouvido que capta a melodia, nem a voz que a repete.

E o versado na ciência dos números poderá falar-vos do mundo dos pesos e das medidas, mas não vos poderá levar até lá”.

Extraído do livro “O Profeta”, **Gibran**

SUMÁRIO

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	V
AGRADECIMENTOS.....	VII
EPÍGRAFE.....	XII
SUMÁRIO	XV
LISTA DE FIGURAS	XVII
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	XXII
RESUMO	XXVI
1. INTRODUÇÃO	2
2. OBJETIVOS	7
3. LITERATURA.....	9
4. MÉTODOS	23
5. RESULTADOS.....	38
6. DISCUSSÃO	50
7. CONCLUSÕES	63
8. REFERÊNCIAS	65
NORMAS ADOTADAS.....	73
ABSTRACT.....	74
APÊNDICES	75
ANEXOS	86
FONTES CONSULTADAS	89

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da localização das feridas, espessura, e momento das biópsias.....	24
Figura 2. A - Detalhe do aspecto macroscópico de ferida rasa mostrando um pontilhado delicado. B - Ferida profunda mostra orifícios mais largos	26
Figura 4. A, B, C, D e E: evolução do aspecto de uma ferida profunda após 1, 2, 3 12 e 20 semanas após sua criação, respectivamente. F, G, H, I e J: evolução do aspecto de uma ferida rasa após 1, 2, 3 12 e 20 semanas após sua criação, respectivamente. Todas feridas são do mesmo animal.	27
Figura 3 Visão geral das feridas no dorso de porca Yorkshire no pós-operatório imediato.	26
Figura 5. A - Demarcação prévia de biópsia realizada em ferida rasa em porca Duroc 3 semanas após a sua criação. B - Pós-operatório imediato. .	28
Figura 6. Foto de eletroforese em gel de agarose onde a primeira coluna da esquerda mostra marcador de peso molecular, a seguir banda de AT1 e na sequência banda de GAPDH. As colunas restantes são duplicatas dos mesmos produtos de amplificação, dispostos alternadamente.....	32
Figura 7. Localização e intensidade de coloração por imuno-histoquímica para AT1 em modelo porcino de cicatrização hipertrófica no decorrer do tempo. Marrom = coloração intensa, bege = coloração fraca, branco = sem coloração, vermelho = ausência da estrutura	39

LISTA DE FIGURAS

- Figura 8. Imuno-histoquímica marcando receptores AT1 em feridas de porcas Duroc e Yorkshire. A – Duroc: ferida profunda, 3 semanas (20x) seta evidenciando queratinócitos. B – Yorkshire: ferida profunda, 3 semanas (20x). seta evidenciando queratinócitos C – Duroc: microvasos em feridas rasas, 2 semanas (20x). D – Duroc: ferida profunda, 3 semanas, mostrando porção inferior do folículo piloso e marcação positiva na região do músculo eretor do pelo 40
- Figura 9. Localização e intensidade de coloração por imuno-histoquímica para AT2 em modelo porcino de cicatrização hipertrófica no decorrer do tempo. Preto = coloração intensa, cinza = coloração fraca, branco = sem coloração, vermelho = ausência da estrutura. A distribuição celular e o nível de coloração não apresentou variação entre feridas rasas ou profundas ou entre porcas Duroc e Yorkshire. 41
- Figura 10. Imuno-histoquímica marcando receptores AT2 em feridas de porcas Duroc e Yorkshire. A – Duroc: ferida profunda, 3 semanas (10x).seta evidenciando queratinócitos B – Yorkshire: ferida profunda, 3 semanas (10x). seta evidenciando queratinócitos C – Duroc: glândulas sebáceas em feridas rasas, 20 semanas (20x). D – Yorkshire: microvasos em feridas rasas, 2 semanas (20x). Note-se marcação negativa das células endoteliais.42
- Figura 11. Expressão gênica relativa de AGTN em biópsias de feridas de porcas Duroc e Yorkshire no decorrer do tempo (expressão relativa dada por $\log \Delta\Delta CT$). mARN foi normalizado pela expressão de GAPDH na mesma ferida (ΔCT). O controle endógeno foi AGTN ΔCT na ferida rasa da mesma porca ($\Delta\Delta CT$). 43
- Figura 12. Expressão gênica relativa de AT1 em biópsias de feridas de porcas Duroc e Yorkshire no decorrer do tempo (expressão relativa dada

LISTA DE FIGURAS

por $\log \Delta\Delta\text{CT}$). mARN foi normalizado pela expressão de GAPDH na mesma ferida (ΔCT). O controle endógeno foi AT1 ΔCT na ferida rasa da mesma porca ($\Delta\Delta\text{CT}$).....	44
Figura 13. Expressão gênica relativa de AT2 em biópsias de feridas de porcas Duroc e Yorkshire no decorrer do tempo (expressão relativa dada por $\log \Delta\Delta\text{CT}$). mARN foi normalizado pela expressão de GAPDH na mesma ferida (ΔCT) . O controle endógeno foi AT2 ΔCT na ferida rasa da mesma porca ($\Delta\Delta\text{CT}$).....	45
Figura 14. Tendência da expressão relativa de AGTN por porcas Duroc e Yorkshire no decorrer do tempo	46
Figura 15. Tendência da expressão relativa de AT1 por porcas Duroc e Yorkshire no decorrer do tempo.	46
Figura 16. Tendência da expressão relativa de AT2 por porcas Duroc e Yorkshire no decorrer do tempo.	47
Figura 17. Razão dos níveis de expressão relativa de AT1 e AT2 plotados individualmente por porcas.....	48
Figura 18. Aspecto macroscópico de feridas de porca Duroc 10 após 20 semanas da criação das feridas.....	48
Figura 19. Aspecto macroscópico de feridas de porca Duroc 11 após 20 semanas da criação das feridas.....	82
Figura 20. Aspecto macroscópico de feridas de porca Duroc 12 após 20 semanas da criação das feridas.....	83
Figura 21. A - Curva de amplificação de AT1e GAPDH. B - Curvas de dissociação para AT1 e GAPDH.	84

LISTA DE FIGURAS

Figura 22. A - Curva de amplificação de AT2.e GAPDH B - Curva de dissociação para AT2 e GAPDH.	84
Figura 23. A - Curva de amplificação para AGTN e GAPDH. B – Curva de dissociação para AGTN e GAPDH.....	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- μm	Micrômetro
- mm	Milímetro
- cm	Centímetro
- cm^2	Centímetro Quadrado
- pol	Polegada
- $^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
- μl	Microlitro
- ml	Mililitro
- μM	Micromolar
- ng	Nanograma
- mg	Miligrama
- kg	Kilograma
- g	Gravidade
- h	Horas
- min	Minutos
- s	Segundos
- log	logarítmo
- ADN	Ácido Desoxirribonucléico

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- ARN Ácido Ribonucléico
- mARN Ácido Ribonucléico Mensageiro
- ARNase Rinonuclease
- cADN Ácido Desoxirribonucléico Complementar
- ADNase Desoxirribonuclease
- AII Angiotensina II
- AT1 Receptor Tipo I da Angiotensina II
- AT2 Receptor Tipo II da Angiotensina II
- AT3 Receptor Tipo III da Angiotensina II
- AT4 Receptor Tipo IV da Angiotensina II
- ECA Enzima Conversora da Angiotensina
- ES Esclerose Sistêmica
- AGTN Angiotensinogênio
- RT-PCR Reação em Cadeia da Polimerase Via Transcriptase Reversa
- TGF- β 1 Fator Transformador de Crescimento β 1
- IGF-1 Fator de Crescimento *Insulina-like 1*
- qRT-PCR reação de polimerase em cadeia via transcriptase reversa em tempo real
- BMP-1 Proteína Morfogenética Óssea 1
- TIMP 1-3 Inibidores Tissulares de Metaloproteinases 1-3
- VEGF Fator de Crescimento Endotelial Vascular
- NO Óxido Nítrico

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- MAPK proteína quinase ativada por mitógeno
- ELISA ensaio imuno-enzimático ELISA
- F1 Cruzamentos de Primeira Geração
- TBS Solução Salina Tris Tamponada
- DO Densidade Ótica
- GAPDH Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase
- CT ciclos de leitura ou ciclos de detecção

RESUMO

RESUMO

Introdução: A cicatrização hipertrófica resulta de um complexo conjunto de interações entre as células do sangue e da pele, intermediada por moléculas pró e anti-inflamatórias, citocinas, fatores de crescimento, hormônios e vitaminas. Dentre estas moléculas, o sistema angiotensina, relacionado em processos fibróticos de vários outros órgãos, parece ter participação na fisiopatologia da cicatrização hipertrófica. **Objetivo:** Avaliar a presença de moléculas constituintes do sistema angiotensina - angiotensinogênio e receptores tipo I (AT1) e tipo II (AT2) da angiotensina II - em porcas Duroc e Yorkshire. **Métodos:** Foram criadas cinco feridas rasas e cinco feridas profundas no dorso de três porcas Duroc (grupo em estudo que apresenta cicatrizes fibroproliferativas) e três porcas Yorkshire (grupo controle com cicatrização não proliferativa). As feridas foram biopsiadas após 1, 2, 3, 12 e 20 semanas e foi realizada imunohistoquímica e qRT-PCR. A expressão destes genes nas feridas profundas foi normalizada pela expressão das feridas rasas, a fim de se evidenciar os genes diferentemente expressos na cicatrização hipertrófica quando comparada a cicatrização normal. **Resultados:** Observou-se a coloração positiva de receptores AT1 e AT2 na epiderme, derme, anexos e capilares no decorrer do tempo. A expressão relativa de AT2 estava significativamente hiperexpressa nas porcas Yorkshire duas e três semanas após a criação das feridas. Não houve diferença de expressão de AGTN ou AT1 neste modelo animal. **Conclusão:** AT1 e AT2 estão expressos nas células constituintes da pele neste modelo de cicatrização hipertrófica. A hiperexpressão de AT2 no grupo controle (Yorkshire) poderia ser interpretada como uma das possíveis causas para a não formação de cicatrizes fibroproliferativas nestes animais.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Fibrose é uma resposta à lesão quando não há possibilidade de regeneração dos tecidos ou órgãos. O estudo da fisiopatologia da fibrose cicatricial no coração, pulmão, fígado e rins colabora para uma melhor compreensão dos processos cicatriciais em todo organismo, mas a despeito do vasto conhecimento adquirido, uma vez instalada em qualquer órgão ou tecido, a fibrose será geralmente irreversível e disfuncional.

Assim acontece também na pele, onde após lesões da derme profunda ou queimaduras, a cicatrização hipertrófica se instala numa frequência não conhecida nem na população brasileira ou americana, mas estimada como um evento freqüente nos EUA, após cerca de 1 milhão de pacientes queimados, 2 milhões de acidentes motociclísticos e 34 milhões de cirurgias anualmente (AARABI, LONGAKER, GURTNER, 2007). Por razões ainda desconhecidas, indivíduos de origem negra e asiática, são vítimas mais frequentes de cicatrização hipertrófica do que outras populações.

A cicatrização hipertrófica resulta de um complexo conjunto de interações entre as células do sangue e da pele, intermediada por moléculas pró e anti-inflamatórias, citocinas, fatores de crescimento, hormônios e vitaminas (BROUGHTON, JANIS, ATTINGER, 2006). Embora se saiba, como em todo processo que resulta em fibrose, que há uma deposição excessiva de colágeno no tecido cicatricial, a fisiopatologia da cicatriz

hipertrófica da pele não é compreendida completamente, (CAMPANER *et al.*, 2006) em grande parte pela ausência de modelo animal para estudo.

Modelos animais com ratos, camundongos, coelhos e cachorros, incluindo implantes de quelóides em sítio de privilégio imunológico como no modelo descrito por HOCHMAN *et al.* (2005), permitiram ampliar o conhecimento, mas falharam em produzir cicatrizes hipertróficas análogas a humanas. Os modelos conhecidos agrupados por RAMOS, GRAGNANI e FERREIRA (2008), tem limitações que foram superadas pela descrição do modelo de porcas Duroc, descrito inicialmente por Silverstein *et al.* (1976), publicado em livro e esquecido por mais de 30 anos. Este modelo foi redescrito por ZHU *et al.* (2003) usando as porcas Yorkshire como grupo controle e estudos consecutivos do grupo da Universidade de Washington (LIANG *et al.*, 2004; ZHU *et al.*, 2004; ZHU *et al.*, 2005; HARUNARI *et al.*, 2006, XIE *et al.*, 2007; ZHU *et al.*, 2007; ZHU *et al.*, 2008), depois seguidos pelo grupo da Universidade de Calgary no Canadá, (GALLANT, OLSON e HART, 2004; GALLANT-BEHM, OLSON e HART, 2005; GALLANT-BEHM E HART, 2006; GALLANT-BEHM *et al.*, 2006, GALLANT-BEHM *et al.*, 2007) demonstraram analogias clínicas, histológicas, imuno-histoquímicas, celulares e moleculares entre a cicatrização hipertrófica humana e as feridas no nível da derme profunda das porcas Duroc, tendo as porcas Yorkshire como grupo controle.

O estudo da expressão genética durante o evento da cicatrização hipertrófica pode aumentar a compreensão dos processos biológicos que levam à fibrose (GURTNER *et al.*, 2008; RAMOS, GRAGNANI e FERREIRA, 2009). Citoquinas, quemoquinas, fatores angiogênicos, fatores de crescimento, receptores proliferadores ativados do peroxisoma, proteínas da fase aguda, caspases e componentes do sistema renina-angiotensina foram identificados como importantes reguladores da fibrose

e estão sendo investigados como potenciais alvos para drogas anti-fibróticas (WYNN, 2008).

A angiotensina II (AII) é o hormônio efetor do sistema renina-angiotensina e tem quatro receptores descritos: o receptor tipo I da angiotensina II (AT1), tipo II (AT2), tipo III (AT3) e tipo IV (AT4) sendo pouco conhecidas as funções destes dois últimos. A maioria dos efeitos conhecidos da AII na pressão arterial é mediada por seu receptor AT1 e é ele que está relacionado aos efeitos autócrino e parácrino da AII na proliferação celular e na formação da matriz extracelular (DE GASPARO *et al.*, 2000). O receptor AT2, por sua vez, é descrito como capaz de contrabalancear os efeitos de AT1, pelo seu efeito antiproliferativo, por promover a apoptose e a diferenciação e regeneração celular (NAKAJIMA *et al.*, 1995). O receptor AT2 está presente nestes processos na vida fetal e sua re-expressão em algumas doenças, sugere que ele participe na fisiopatologia dessas alterações (DE GASPARO *et al.*, 2000).

O sistema angiotensina está relacionado em processos fibróticos de vários órgãos como coração, associado à hipertrofia de ventrículo esquerdo (TAKAMI *et al.*, 1998; MATSUSAKA *et al.*, 1999); rim, associado à fibrose renal e glomérulo esclerose (MEZZANO, RUIZ-ORTEGA e EGIDO, 2001; ORTH *et al.*, 1995); pulmão, (OTSUKA *et al.*, 2004); fígado (PAIZIS *et al.*, 2001) e pâncreas (YAMADA *et al.*, 2003). Ratos transgênicos hiper-expressando AT1 desenvolvem fibrose cardíaca espontânea e expressão aumentada de colágeno intersticial (PARADIS *et al.*, 2000).

STECKELINGS *et al.* (2004) descreveram a produção de componentes do sistema angiotensina por células constituintes da pele humana pela primeira vez.

A hipótese deste estudo foi de que possa existir participação do sistema angiotensina no processo fibrótico da pele, uma vez que o conhecimento acumulado no estudo da sua fisiopatologia ainda não permite intervenção terapêutica eficiente em sua prevenção ou tratamento.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

1 – Avaliar a localização celular dos receptores tipo I e tipo II (AT2) da angiotensina II (AT1) na pele em modelo porcino (porcas Duroc e Yorshire) de cicatrização hipertrófica .

2 - Avaliar e comparar o nível de expressão genética de angiotensinogênio, AT1 e AT2 em modelo porcino (porcas Duroc e Yorkshire) de cicatrização hipertrófica.

LITERATURA

3. LITERATURA

3.1. SISTEMA ANGIOTENSINA E CICATRIZAÇÃO

STECKELINGS *et al.* (2004) examinaram biópsias de pele humana obtidas em postectomias de crianças e avaliaram a expressão dos receptores de angiotensina II (AII). Receptores tipo I da angiotensina II (AT1) e tipo II (AT2) foram encontrados na epiderme e dentro das paredes dos vasos na derme. O mesmo padrão de expressão foi encontrado para angiotensinogênio, renina e enzima conversora da angiotensina (ECA). Foi possível também demonstrar a expressão de mARN para todos esses componentes em cultivo primário de queratinócitos, melanócitos, fibroblastos dérmicos e células endoteliais microvasculares dérmicas, com exceção dos receptores de AT2 em melanócitos. A habilidade das células cutâneas em sintetizar AII foi comprovada por sua identificação em queratinócitos cultivados. Além disso, em monocamadas de queratinócitos artificialmente lesadas, a expressão de mARN para ECA aumentou rapidamente, e uma expressão aumentada de ECA ainda foi encontrada em cicatrizes cutâneas humanas três meses após a lesão. Os autores concluíram que um sistema completo renina-angiotensina está presente na pele humana e desempenha um papel na homeostase cutânea normal, assim como no reparo de lesão cutânea humana.

KAWAKUGHI *et al.* (2004) avaliaram a expressão de AII, AT1 e AT2 em pele afetada e em fibroblastos dérmicos de 27 pacientes com esclerose sistêmica (ES) limitada, 36 pacientes com ES difusa e 20 pacientes normais. Os autores estudaram o papel da AII na produção de colágeno por fibroblastos dérmicos ES. Os níveis de AII no soro de pacientes com ES e normais foram medidos por imunoenensaio e a expressão de angiotensinogênio (AGTN) na pele foi avaliada por imunohistoquímica. A expressão de AGTN, AT1 e AT2 em fibroblastos dérmicos cultivados foi analisada por reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR) e imunohistoquímica. As análises imunohistoquímicas mostraram a presença de AGTN na pele de pacientes ES, mas não na pele normal. Os fibroblastos de pacientes com ES cutânea difusa que apresentaram altos níveis de AII sérica, expressaram mARN para AGTN, enquanto fibroblastos normais não expressaram. A expressão de mARN para AT1 foi verificada tanto em fibroblastos ES quanto em fibroblastos normais, enquanto a expressão de mARN para AT2 foi verificada apenas em fibroblastos ES. Os autores demonstraram, ainda, que a adição de AII exógena aos fibroblastos em cultura provocou aumento na produção de procolágeno tipo I e de Fator Transformador de Crescimento β 1, via ativação de AT1. Os autores concluíram que uma produção aberrante de AII pode estar relacionada à fibrose tissular através da produção excessiva de componentes da matriz extracelular em fibroblastos dérmicos ES. Isso sugere que a utilização de antagonistas de receptores AT1 poderia ser uma nova estratégia para o tratamento da fibrose tissular em pacientes ES.

TAKEDA *et al.* (2004) estudaram o mecanismo de sinalização do receptor de AII utilizando bloqueadores seletivos dos receptores AT1 e AT2 para estimar os efeitos da sinalização do receptor de AII durante o reparo de lesões na pele, em ratos Sprague-Dawley machos jovens. Os autores demonstraram que a administração oral de bloqueador seletivo de receptor AT1 suprimiu a re-epitelização queratinocítica e a angiogênese durante o reparo de lesões cutâneas. Análises de imunoprecipitação e *Western Blot* indicaram a existência de receptores AT1 e AT2 em queratinócitos e miofibroblastos cultivados. Testes de migração em reparo de lesão revelaram que a indução da sinalização de AT1 acelerou a re-epitelização queratinocítica e a migração de miofibroblastos. Nesses experimentos, a indução da sinalização de AT2 agiu de modo inverso. Os autores sugerem que o reparo de lesões da pele é regulado pelo balanço de sinais opostos entre AT1 e AT2.

STECKELINGS *et al.* (2005) investigaram alterações na expressão do receptor para AII durante o reparo de lesões em pele humana. Examinaram tecido cicatricial derivado de ampliação de margens de melanoma de 16 pacientes, e pele normal de 4 pacientes como controles. Para o cultivo celular, utilizaram biópsias de pele humana obtidas em postectomias de crianças. Os autores empregaram três modelos para suas investigações. (a) alterações na expressão do mRNA para o receptor de angiotensina II determinadas por RT-PCR em cultivo primário de queratinócitos humanos. (b) reparo de lesões precoce avaliado em biópsias retiradas com *punch* de pele humana *ex vivo* por meio de imunohistoquímica utilizando anticorpos policlonais contra os receptores AT1 ou AT2. (c) reparo de lesões *in vivo* estudado em secções de cicatrizes

humanas cutâneas por imuno-histoquímica para determinar a expressão de receptores precoce (dois dias) e tardia (duas semanas e três meses) após a cirurgia. Os autores constataram que em todos os modelos experimentais, houve uma regulação para cima (*up-regulation*) de ambos os subtipos de receptores após a lesão. As secções de pele marcadas por imuno-histoquímica mostraram uma coloração mais intensa de receptores AT2 do que de AT1 dentro da área cicatricial após 14 dias. Uma expressão de receptores aumentada foi detectada 24 h após a lesão e permaneceu por até três meses. Os autores concluíram que os receptores AT1 e AT2 estão regulados para cima (*up-regulated*) em lesões cutâneas humanas, reforçando o conceito de que AII desempenha um papel inclusive nos estágios iniciais durante o reparo de lesões cutâneas.

MORIHARA *et al.* (2006) investigaram a ECA em pele normal, cicatriz normal e cicatrizes patológicas. As atividades tissulares cutâneas da ECA foram medidas por cromatografia líquida de alta-pressão e a localização da ECA foi determinada por imuno-histoquímica. Os autores verificaram uma atividade significativamente maior da ECA no tecido cicatricial patológico do que em pele ou cicatriz normal. Os estudos imuno-histoquímicos demonstraram a marcação de miofibroblastos com anticorpos anti-ECA. Os autores ressaltam que o estudo foi pequeno, e concluem que seus resultados sugerem que a ECA regulada para cima (*up-regulated*) provavelmente participa na formação da cicatriz patológica cutânea.

3.2. MODELO ANIMAL DUROC/YORKSHIRE

ZHU *et al.* (2003) investigaram o reparo de lesões em porcas Duroc buscando similaridades com a cicatrização hipertrófica humana, estudando a espessura da ferida, aparência, status do reparo após três semanas, histologia e localização imuno-histoquímica das proteínas decorim, versicam, TGF- β 1 e Fator de Crescimento *Insulina-like1* (IGF-1), consideradas envolvidas na cicatrização hipertrófica, e comparando os resultados obtidos com os descritos na literatura para cicatrizes hipertróficas humanas. Além disso, investigaram a pele das porcas Duroc em busca de cones que, na pele humana, possuem uma distribuição anatômica similar à distribuição das cicatrizes hipertróficas. Os autores relataram que o reparo de feridas profundas em Duroc é similar, mas não idêntico, à cicatrização hipertrófica humana, e que a pele de porcas Duroc contém cones. Concluíram que o reparo nas porcas Duroc é similar à cicatrização hipertrófica humana para garantir futuros estudos que possam aceitá-lo como modelo. Além disso, a relação dos cones com a cicatrização hipertrófica necessita maior detalhamento e pode ser estudada nesse modelo.

LIANG *et al.* (2004) quantificaram os nervos no tecido de porcas Duroc e em cicatrizes hipertróficas humanas de pacientes queimados por imuno-histoquímica. Feridas de profundidades variáveis foram criadas no dorso de duas porcas Duroc e amostras de tecidos foram coletadas dez dias, um mês e cinco meses após a realização das lesões. Análises de imagem

por subtração de cor, assistidas por computador, foram utilizadas para quantificar número e fração de área dos nervos nas cicatrizes dos porcos e humanas. Os resultados demonstraram que o tecido nervoso está aumentado no tecido cicatricial das porcas Duroc, e é bastante similar tanto ao das cicatrizes hipertróficas humanas de pacientes queimados, quanto aos descritos na literatura. Os autores concluem que esses dados fornecem evidências adicionais de que as porcas Duroc possam ser úteis para o estudo da cicatrização hipertrófica.

ZHU *et al.* (2004) avaliaram a expressão do TGF- β 1, IGF-1, decorim e de versicam em feridas de porcas Duroc ao longo do tempo por hibridização *in situ* e reação de polimerase em cadeia via transcriptase reversa em tempo real (qRT-PCR), segundo a profundidade das feridas, a fim de comparar os resultados com dados publicados acerca de cicatrizes hipertróficas humanas. Para tal, feridas rasas e profundas no dorso de duas porcas Duroc foram estudadas por cinco meses. Os autores demonstraram que, bioquimicamente, as proteínas decorim, versicam, IGF-1 e TGF- β 1 apresentam, em cicatrizes de feridas profundas de porcas Duroc, mudanças similares às das cicatrizes hipertróficas humanas, validando as porcas Duroc como modelo para a cicatrização hipertrófica.

GALLANT, OLSON, HART (2004) investigaram o reparo de feridas cutâneas em três porcas Duroc jovens e compararam com resultados anteriormente obtidos em porcas Yorkshire. Feridas de espessura total e profundas foram criadas no dorso de porcas Duroc e o processo de reparo foi acompanhado por dez semanas após a lesão. As feridas foram avaliadas micro e macroscopicamente revelando que tanto as feridas de espessura

total quanto as feridas profundas (1,8 mm de profundidade) formavam cicatrizes hipercontraídas e hiperpigmentadas. Análises por RT-PCR demonstraram que o colágeno tipo I e tipo III, proteína de choque térmico 47, proteína morfogenética óssea 1 (BMP-1), diversas proteoglicanas e inibidores tissulares de metaloproteinases 1-3 (TIMP 1-3) apresentam um padrão único, bifásico, de expressão de mRNA, quando comparados com resultados anteriores em porcas Yorkshire. Esses resultados indicaram que o reparo de feridas cutâneas em porcos Duroc é diferente do reparo em porcos Yorkshire, certamente devido a diferenças genéticas entre essas linhagens, e único em comparação com outros modelos animais, visto que apenas porcas Duroc formam cicatrizes fibróticas hipercontraídas e hiperpigmentadas. Segundo os autores, esses achados sugerem que esse modelo é apropriado para o estudo dos fatores moleculares e genéticos associados à formação de cicatrizes, e assim, deve servir como modelo ideal para se testar intervenções terapêuticas que visem melhorar o reparo de feridas dérmicas e diminuir a cicatrização excessiva.

GALLANT-BEHM, OLSON, HART (2005) estudaram os padrões de expressão de mRNA para um subgrupo relevante de citocinas, fatores de crescimento, receptores e fatores de transcrição possivelmente envolvidos no fenótipo de cicatrização hipercontrátil e hiperpigmentada de porcas Duroc. Para isso, foram feitas feridas de espessura total e profundas no dorso de porcas Duroc jovens. Foram coletadas amostras a cada duas semanas após a lesão, e foram feitas a extração e quantificação de ARN total e ADN. Quinze moléculas relevantes foram analisadas por RT-PCR utilizando iniciadores gene-específicos porcinos, e os resultados sugeriram

que o perfil de cicatrização de porcas Duroc é diferente do perfil de cicatrização de porcas Yorkshire.

ZHU *et al.* (2005) avaliaram os níveis de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e óxido nítrico (NO) em feridas de porcas Duroc. Feridas rasas e profundas foram criadas em quatro porcas Duroc. Os níveis de VEGF foram medidos por ensaio imuno-enzimático ELISA e os níveis de NO, utilizando-se o reagente Griess. Os níveis de VEGF e NO estavam aumentados nas feridas profundas após dez dias, quando comparados aos das feridas rasas. Após 15 semanas, os níveis de VEGF e NO já se assemelhavam aos das feridas rasas. Após 21 semanas, os níveis de VEGF e NO estavam abaixo dos níveis basais para feridas profundas, sendo que os níveis de NO estavam significativamente mais baixos. Os autores concluíram que os níveis de VEGF e NO variaram de acordo com a profundidade das feridas em porcas Duroc, além de exibirem dois padrões temporais diferentes em feridas rasas e profundas. Além disso, os níveis de NO encontravam-se diminuídos em porcas Duroc após 21 semanas, assim como nas feridas hipertróficas humanas, validando a utilidade desse modelo.

GALLANT-BEHM *et al.* (2006) avaliaram o processo de reparo tecidual em cruzamentos de primeira geração (F1) de porcos Duroc e Yorkshire. Análises macroscópicas, medidas do tamanho das feridas e análises histológicas revelaram que os animais F1 exibem um fenótipo de reparo intermediário, com alguns aspectos de cada linhagem parental. As feridas de espessura total encontravam-se significativamente hipercontraídas e fibróticas, mas apigmentadas. Análises dos padrões de

expressão do mARN para uma série de moléculas relevantes nos animais F1 revelaram algumas similaridades a cada linhagem parental, assim como padrões únicos para outras moléculas. Além disso, a resposta ao reparo apresentou uma dependência da profundidade nos níveis macroscópico, histológico e molecular, com feridas dérmicas profundas cicatrizando de maneira similar às feridas do Yorkshire. Segundo os autores, esses achados sugerem que a contribuição genética ao fenótipo da cicatriz nesse modelo animal é complexa, mas que uma maior compreensão desse modelo pode fornecer esclarecimentos acerca de fatores de riscos para cicatrização hipertrófica em pacientes humanos queimados.

GALLANT-BEHM & HART (2006) investigaram o grau e a cinética da contração de feridas em modelo porcino de reparo tecidual buscando elucidar as bases genéticas e moleculares para o reparo anormal de lesões cutâneas e formação de cicatriz. O reparo de feridas cutâneas excisionais em porcas Yorkshire jovens se assemelha ao reparo normal de feridas em humanos. Em contraste, feridas idênticas em porcas Duroc apresentaram contração significativamente maior, formando cicatrizes hipercontraídas e hiperpigmentadas. Porcas oriundas do cruzamento Yorkshire x Duroc F1 apresentaram reparo sem hiperpigmentação, mas com contração da ferida significativamente maior do que a observada em cada linhagem parental. Para examinar a transmissão genética do fenótipo hipercontrátil, todos os animais F1 foram cruzados com um único reprodutor Yorkshire, gerando 20 animais resultantes do retrocruzamento. Em todos esses, o reparo ocorreu com contração significativamente menor do que a dos animais Yorkshire normais. Esses achados sugerem que a contribuição genética para o fenótipo cicatricial nesse modelo animal é complexa, com um

número limitado de genes principais controlando a contração de feridas, e com uma quantidade desconhecida de genes minoritários que parecem modular o efeito dos genes principais.

HARUNARI *et al.* (2006) descreveram número aumentado de miofibroblastos, mastócitos e nódulos de colágeno na cicatriz espessa de porcas Duroc, similarmente ao que observaram em cicatrizes hipertróficas humanas, validando esse modelo animal neste aspecto.

XIE *et al.* (2007) estudaram a densidade microvascular em cicatrizes hipertróficas humanas e as cicatrizes de quatro porcas Duroc e três Yorkshire. As células endoteliais foram marcadas com o antígeno relacionado ao antifator VIII e a densidade microvascular foi quantificada por análise de imagem em computador. Nas cicatrizes hipertróficas humanas, a densidade microvascular estava significativamente elevada quando comparada à pele normal. Em tecidos das porcas Duroc provenientes de feridas profundas, após cinco meses, também houve aumento significativo quando comparado às feridas rasas e à pele normal, o que qualificaria as porcas Duroc como modelo animal para o estudo da cicatrização hipertrófica.

GALLANT-BEHM *et al.* (2007), com base no fato de que porcos Yorkshire, Duroc, e F1 apresentavam reparo com níveis de cicatrização normal, fibroproliferativa/hipercontrátil e intermediária, respectivamente, avaliaram o fenótipo do reparo de feridas de animais resultantes do retrocruzamento Yorkshire x F1 para elucidar as bases moleculares da

transmissão genética do fenótipo de cicatrização de porcos Duroc. Macroscopicamente e histologicamente, feridas de espessura total em animais resultantes do retrocruzamento seguiram o fenótipo Yorkshire, com ausência de pigmentação da pele ou fibrose, características do fenótipo Duroc, com uma exceção: embora a contração das feridas na fase inicial tenha ocorrido de forma significativa, como ocorre na fase inicial em porcos Yorkshire, as feridas continuaram a exibir contração após a re-epitelização, um aspecto do fenótipo de cicatrização Duroc e F1. Segundo os autores, é provável que as fases da contração pré-epitelização e pós-epitelização sejam controladas por diferentes mecanismos e por diferentes marcadores gênicos, segregados independentemente, com a contribuição genética do Duroc para a fase pré-epitelização tendo sido perdida nos animais resultantes do retrocruzamento, e a fase da contração pós-epitelização do Duroc tendo permanecido dominante nos animais resultantes do retrocruzamento. Os padrões de expressão de mRNA nos animais resultantes do retrocruzamento geralmente se correlacionaram com o fenótipo de cicatrização e com os achados macroscópicos e histológicos. Comparadas às feridas dos porcos Yorkshire, Duroc e F1, as feridas dos animais resultantes do retrocruzamento demonstraram uma fase inicial inflamatória diminuída, seguida por uma expressão prolongada de diversos fatores de crescimento relevantes. Adicionalmente, a expressão do colágeno foi prolongada, a expressão de metaloproteinases de matriz foi aumentada, e foram detectadas alterações no tecido inibindo a expressão de metaloproteinases. Além disso, uma série de moléculas ainda seguiram o padrão de expressão de mRNA de porcos Duroc, um achado que permite que correlações entre o fenótipo de cicatrização e os padrões de expressão molecular sejam feitas nesse modelo. Os resultados indicam que uma série de genes está provavelmente envolvida no fenótipo de cicatrização de

porcas Duroc, e que a identificação dos genes específicos envolvidos requer uma análise genômica mais detalhada.

RAMOS, GRAGNANI, FERREIRA (2008) revisaram modelos animais utilizados para o estudo da cicatrização hipertrófica no reparo tecidual nos últimos cinco anos. Foram descritos os animais e artifícios científicos utilizados para causar a cicatrização hipertrófica. Os modelos foram divididos em 1) cicatrização hipertrófica heteróloga ou implantes de quelóide em animais imunodeficientes como camundongos atímicos e ratos; 2) sítio de privilégio imunológico como bolsa jugal do hamster; 3) cicatrização hipertrófica ou indução de quelóide via lesão mediada quimicamente como nos porquinhos-da-índia; 4) cicatrização hipertrófica ou indução de quelóide em sítio anatômico específico como na orelha do coelho e 5) modelo porcino. O modelo ideal deveria permitir pesquisar a fisiopatologia, histologia e eventos moleculares ao longo do tempo, e testar tratamentos profiláticos e terapêuticos para humanos. Alguns desses animais foram úteis para o estudo de etapas específicas do processo de cicatrização e melhor compreensão do reparo tecidual anormal, mas nenhum deles tem uma aplicação ampla. Mais recentemente, as porcas Duroc vermelhas foram validadas como um novo modelo, tendo demonstrado sua similaridade às condições humanas de diferentes formas. Enxertos de pele humana de espessura total em camundongos *nude* também representam um avanço na busca de um modelo animal ideal para a cicatrização hipertrófica.

ZHU *et al.* (2008) conduziram um estudo comparativo da expressão gênica do colágeno no reparo fibroproliferativo observado em porcas

Duroc com a do reparo não-fibroproliferativo em porcas Yorkshire. Para tal, fizeram feridas dorsais rasas e profundas em três porcas de cada linhagem. As feridas foram biopsiadas após 1, 2, 3, 12 e 20 semanas. Os cones dérmicos foram microdissecados por captura a *laser*. Também foram obtidas três amostras de cicatriz hipertrófica humana com cerca de 20 semanas. Os genes para análises posteriores foram restritos a quatro critérios biológicos, incluindo o fato de que a expressão das amostras de “Duroc, 20 semanas, ferida profunda” correspondesse à expressão das amostras humanas. Os colágenos I, III, IV, V, VI, XIV, e XV1 foram diferencialmente hiperexpressos (*over expressed*) em feridas profundas em Duroc. Os autores pretendem, a partir daí, construir as vias regulatórias do reparo fibroproliferativo.

MÉTODOS

4. MÉTODOS

4.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Este estudo obteve aprovação do IACUC (Institutional Animal Care and Use Committee) na Universidade de Washington, Seattle, EUA, número 2322-04 e do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, número 1390/09.

Em cada uma das três porcas Duroc do grupo de estudo, que formam cicatrizes chamadas fibroproliferativas, e das três porcas Yorkshire do grupo controle, que não formam cicatrizes fibroproliferativas, foram criadas dez feridas tangenciais, com o uso de um dermatômetro, com cerca de 6 x 6 cm na região do dorso. Cinco dessas feridas atingiam até a derme superficial e foram chamadas rasas. Cinco dessas feridas atingiam até a derme profunda e foram chamadas profundas. As feridas foram realizadas alternadamente conforme diagrama na figura 1, para evitar feridas com a mesma profundidade no mesmo sítio anatômico.

Foram coletadas dez biópsias elípticas de 5 x 1 cm em cada animal, sendo cinco provenientes de feridas rasas e cinco provenientes de ferida profunda, num total de 30 exemplares para o grupo em estudo (Duroc, n=3) e 30 exemplares para o grupo controle (Yorkshire, n=3). As biópsias foram coletadas após 1, 2, 3, 12 e 20 semanas após a realização das feridas no intuito de se estudar os fenômenos envolvidos no processo de cicatrização hipertrófica no decorrer do tempo. Em cada momento também foi coletada biópsia de pele íntegra. Cada ferida foi biopsiada uma única

vez e em sua localização central. O material proveniente das biópsias foi utilizado para análise quantitativa de reação de polimerase em cadeia via transcriptase reversa em tempo real (*real time reverse transcription-polymerase reaction* – qRT-PCR) e para estudo imuno-histoquímico.

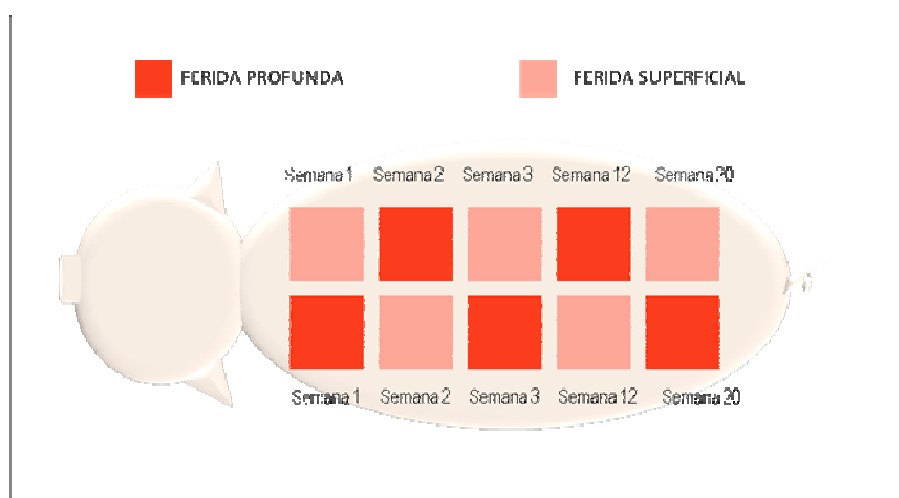


Figura 1. Esquema da localização das feridas, espessura, e momento das biópsias.

4.2. AMOSTRA

Para a realização do estudo foram utilizadas três porcas Duroc vermelhas e três porcas Yorkshire (*Sus scrofa: Suidae, Artiodactyla, Mammalia*), com seis semanas de idade no início do projeto. O peso dos animais foi de 16 a 18 kg. Os animais foram comprados na fazenda Q-Bar, Dayton, Oregon, EUA e mantidos no *Harborview Medical Center Research and Training Vivarium*, com ciclos de 12 h de claro/escuro por 20 semanas. Os animais foram observados por uma semana com controle de temperatura e qualidade do ar e foram alimentados com dieta de

crescimento para porcos em laboratório e água *ad libitum* até o final do experimento. Após 20 semanas, foram enviados para *Washington State University, Pullmann, WA, EUA* onde permaneceram até completarem onze meses de idade para coleta de material para outros estudos. Após esta data foram doados para uma fazenda em que se treinam adolescentes para o manuseio de animais domésticos e permanecem vivos até o presente momento.

4.3. PROCEDIMENTOS

4.3.1. TÉCNICA CIRÚRGICA

Com sete semanas de idade os animais foram submetidos à anestesia geral por um médico veterinário da equipe do *Harborview Medical Center Research and Training Vivarium*. Foi utilizada oximorfona (0,1 mg/kg) intramuscular 30 min antes do procedimento anestésico, realizado com o uso de Telazol® (cloridrato de tiletamina e cloridrato de tilazepan), reconstituído com 5 ml de xilazina (100 mg/ml), na dosagem 1 ml/18 kg de peso (*Phoenix Pharmaceuticals, Inc., St. Joseph, MO, EUA*) e isoflurano. Os pelos do dorso foram retirados com depilador elétrico e a pele foi limpa com solução de gluconato de clorexidina degermante e após, clorexidina alcoólica.

Foram criadas feridas tangenciais com um dermatômetro elétrico Padgett™ (*Integra LifeSciences Corporation, Plainsboro, NJ, EUA*) no dorso de cada animal, com o dermatômetro calibrado em 0,020 pol (0,05 cm). Uma passagem do dermatômetro foi suficiente para as feridas rasas e duas passagens ou mais foram necessárias para as profundas, conforme metodologia previamente estabelecida por ZHU *et al.* (2003). O aspecto

detalhado de ferida rasa e profunda no pós-operat'rio imediato pode ser observado na figura 2 e o aspecto geral na figura 3. Os animais receberam adesivos de fentanil para controle de dor pós-operatória. A buprenorfina foi utilizada na dose 0,002–0,005 mg/kg intramuscular ou intravenoso até que o adesivo de fentanil fizesse efeito dentro de 24 h.

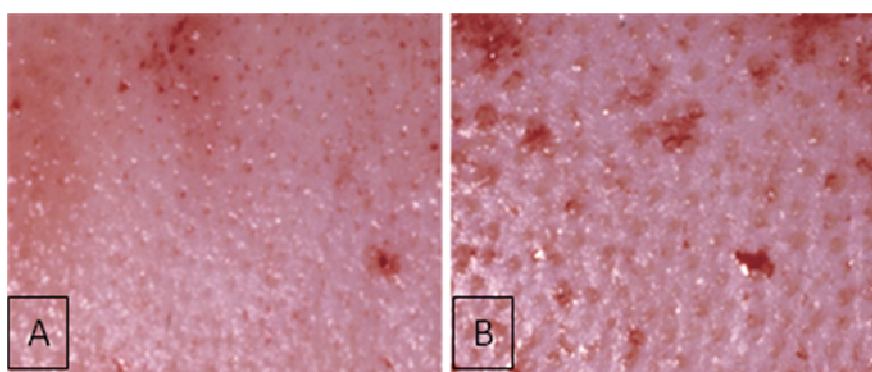


Figura 2. A - Detalhe do aspecto macroscópico de ferida rasa mostrando um pontilhado delicado. B - Ferida profunda mostra orifícios mais largos.



Figura 3 Visão geral das feridas no dorso de porca Yorkshire no pós-operatório imediato.

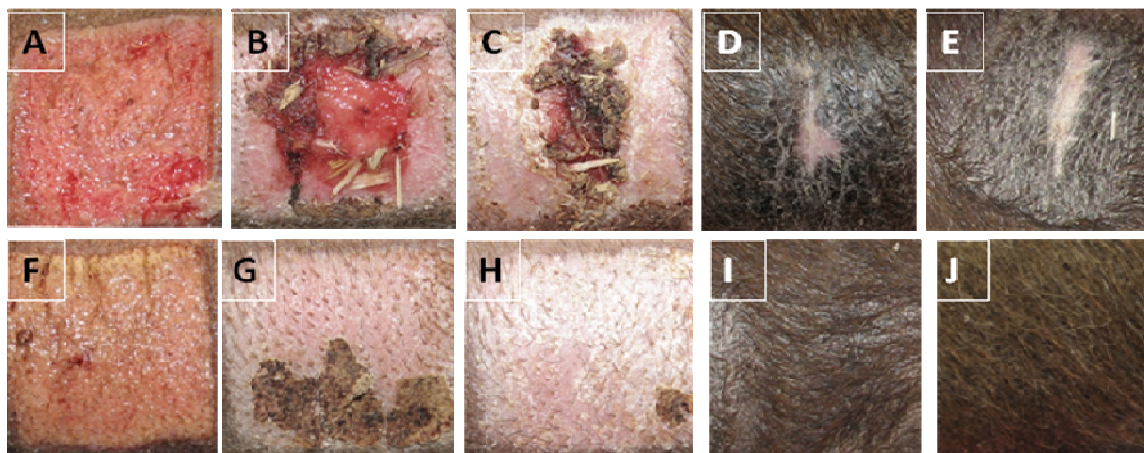


Figura 4. A, B, C, D e E: evolução do aspecto de uma ferida profunda após 1, 2, 3 12 e 20 semanas após sua criação, respectivamente. F, G, H, I e J: evolução do aspecto de uma ferida rasa após 1, 2, 3 12 e 20 semanas após sua criação, respectivamente. Todas feridas são do mesmo animal.

Não foram administrados anti-inflamatórios. As feridas cicatrizaram espontaneamente sem agentes tópicos ou curativos. A figura 4 mostra a evolução do aspecto macroscópico das feridas no decorrer do tempo. O aspecto macroscópico das feridas após 20 semanas em cada uma das porcas Duroc encontra-se no apêndice (página 84).

Sob o mesmo procedimento anestésico descrito acima, as feridas e a pele íntegra de todas as porcas foram biopsiadas após 1, 2, 3, 12 e 20 semanas, conforme figura 5.

O tecido da biópsia foi seccionado em três fragmentos e imediatamente uma porção foi disposta em formaldeído a 4% para posterior parafinização, a segunda porção foi imediatamente congelada a -196°C em nitrogênio líquido e uma terceira porção foi imersa em OCT (*Optimal Cutting Temperature*) a -80°C para estudos posteriores.

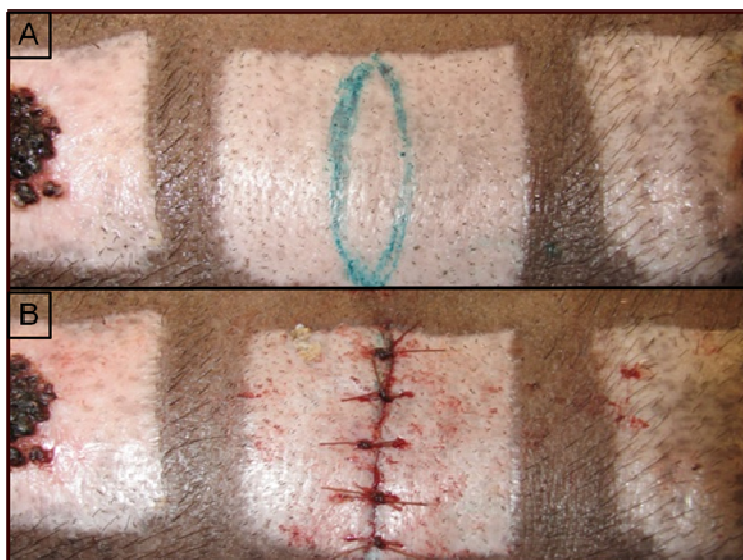


Figura 5. A - Demarcação prévia de biópsia realizada em ferida rasa em porca Duroc 3 semanas após a sua criação. B - Pós-operatório imediato.

4.3.2. IMUNO-HISTOQUÍMICA

Foram analisadas amostras de todas as cicatrizes do grupo em estudo (Duroc) e do grupo controle (Yorkshire) e de pele íntegra para determinar a presença dos receptores AT1 e AT2 a nível protéico nas diferentes células constituintes da pele porcina. O estudo imuno-histoquímico foi realizado em cortes de 5 mm. Os anticorpos para receptores de angiotensina II tipo 1 (AT1), (N-10, sc-1173, 200 $\mu\text{g/ml}$) e tipo II (AT2), (H-143, sc-9040, 200 $\mu\text{g/ml}$) são policlonais IgG anti-coelho (*Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA*). Os anticorpos AT1 e AT2 são específicos para camundongo, rato e humano. Foi necessário procedimento de recuperação antigênica para AT2 colocando-se as lâminas em frasco

refratário na estufa a 120°C por 20 min. Foi realizado controle positivo destes anticorpos em rim de rato, tecido sabidamente rico em receptores de angiotensina II. Detalhes do protocolo de imuno-histoquímica no apêndice Os detalhes deste procedimento encontram-se no apêndice (página 75).

Os cortes foram observados em microscópio ótico *Nikon Labophot-2* (*Nikon Inc, Melville, NY, EUA*) e o pesquisador principal mais dois pesquisadores independentes descreveram o nível de coloração usando sistema de cruzes para cada população celular corada. O resultado foi expresso pela média dos três pesquisadores.

4.3.3. EXTRAÇÃO DE ARN

Com o intuito de se avaliar a expressão genética relativa dos receptores AT1 e AT2 nas feridas das porcas Duroc e Yorkshire, foi inicialmente extraído ARN total de todas as amostras segundo o método baseado em CHOMCZYNSKI & SACCHI (1987)

A quantidade e a pureza de ARN foram estimadas usando-se um espectrofotômetro no ultravioleta visível *SmartSpec™ 3000* (*BioRad, Hercules, CA, EUA*). A absorbância das amostras foi medida nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm, sendo que a densidade ótica (DO) $260=1$ corresponde a 40 ng/μl de concentração. Foi considerado ARN satisfatório A_{260}/A_{280} entre 1,8 a 2,2. Os detalhes do processo de extração e purificação de ARN, assim como tabela com peso das biópsias, leitura da densidade ótica, A_{260}/A_{280} , concentração de ARN extraído em μg/ml para cada amostra encontram-se no apêndice (página 76, tabelas 2 e 3).

4.3.4. SÍNTESE DE ADN COMPLEMENTAR POR REAÇÃO DE TRANSCRIPTASE REVERSA

Foram utilizados 0,5µg de ARN total de cada amostra para a síntese da primeira fita de cADN. O kit utilizado foi *SuperScriptTM III First-Strand Synthesis SuperMix* para qRT-PCR (*Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA*). Oito µl de ARN purificado foram adicionados a 2 µl de *RT Enzyme mix* e 10 µl *2X RT Reaction Mix*. Esta solução de 20 µl no total foi incubada por 10 min a 25°C, e em seguida por 30 min a 50°C e finalmente por 5 min a 85°C e então resfriada a 4°C. Após este processo realizado no termociclador *GeneAmp (Applied Biosystems, Scottsdale, AZ, EUA)*, essa solução foi tratada com 1 µl de *E. coli* ARNase H a 37°C por 20 min. O cADN resultante foi imediatamente congelado a -20°C para uso posterior.

4.3.5. DESENHO E TESTE DOS INICIADORES (PRIMERS)

Para o desenho dos iniciadores foram selecionadas as seqüências de cada um dos três genes estudados no *National Center of Biotechnology Information – NCBI*, (www.ncbi.nlm.nih.gov) na base de dados *EntrezGene*, onde há links para a seqüência de ARN mensageiro de cada gene. Essa seqüência foi alinhada com o gene humano correspondente e priorizada a junção exon-exon quando possível para a área de desenho dos iniciadores. Foi utilizado o *website Primer 3* (<http://frodo.wi.mit.edu>) para o desenho dos iniciadores, tendo como parâmetros que cada iniciador tivesse 20 a 22 nucleotídeos e cujo tamanho do produto era de 50 a 150 pares de bases. A porcentagem de GC deveria ser de 50% e a temperatura de anelamento entre 58 e 62°C, com diferença máxima desta temperatura

entre o iniciador senso e o anti-senso de 1 a 2°C. *Operon Biotechnologies* (Huntsville, AL, EUA) sintetizou todos os iniciadores, conforme quadro 1.

Quadro 1 – Sequência dos iniciadores para reação de polimerase em cadeia em tempo real, tamanho esperado do produto em pares de bases e sequência de mARN encontrada no site do NCBI onde se baseou o desenho dos iniciadores.

Gene	Sequência	Produto (PB ¹)	NCBI
AGTN	(F) ctacgtgcacttccaaggtaa (R) tacagacggagaaccactgc	80 pb	AK232926
AT1	(f) tctgttgctcctctcaagg (r) taaatgccatcctcccagtc	95 pb	CF368623
AT2	(F) ttctcctgggattcaccaac (R) aaacacactgaggagcttct	89 pb	DQ250387
GAPDH	(F) ctcaacgaccacttcgtcaa (R) tccaggggcttactcctt	113 pb	AF017079

(1) PB – pares de bases

Foram testados três pares de iniciadores para cada gene estudado em duas diferentes concentrações (0,2 a 0,4 µM) e selecionado aquele que apresentou pico único na curva de dissociação, sem amplificação de produto no controle negativo (sem cADN) , e que em eletroforese em gel de agarose a 1,5% demonstrou o produto amplificado no tamanho esperado, conforme exemplificado na figura 6.

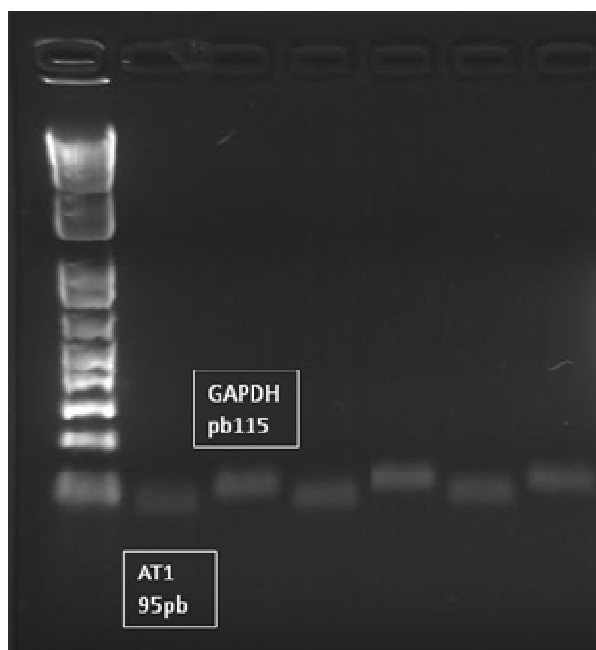


Figura 6. Foto de eletroforese em gel de agarose onde a primeira coluna da esquerda mostra marcador de peso molecular, a seguir banda de AT1 e na sequência banda de GAPDH. As colunas restantes são duplicatas dos mesmos produtos de amplificação, dispostos alternadamente.

Com a finalidade de se testar a eficiência de cada par de iniciadores foi realizado experimento conforme sugerido por PFAFFL (2001). Foram utilizadas diluições seriadas de amostras de cDNA e realizado experimento de qRT-PCR nas mesmas condições e concentrações de iniciadores descritas abaixo na reação de qRT-PCR. Para cada par de iniciadores o software da ABI *Prism 7900H* (*Applied Biosystems, Scottsdale, AZ, EUA*) construiu gráfico com base no valor logarítmico das diluições testadas e pelos valores da média de CT. O valor de inclinação da curva (*slope*) foi utilizado para determinar a eficiência dos iniciadores, conforme tabela 1. Valores de $-3,92 < slope < -2,92$ e $R^2 > = 0.99$, significam exatidão na

cinética de amplificação, onde a eficiência (E) é calculada por $E = (10^{-1/\text{slope}})$ e deve estar entre 1,8 e 2,2.

Tabela 1 – Valores da eficiência da amplificação para cada par de iniciadores estudados.

GENES	SLOPE	R ² =slope x+y	E
AGT	-3,30	0,993	2,00
AT1	-3,26	0,988	2,02
AT2	-3,32	0,991	2,00
GAPDH	-3,34	0,999	1,99

4.3.6. QUANTIFICAÇÃO RELATIVA COM REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA VIA TRANSCRIPATSE REVERSA EM TEMPO REAL

Com o intuito de amplificar e mensurara e xpressão relativa dos genes de interesse foi realizada qRT-PCR utilizando-se o sistema de detecção ABI Prism 7900H (*Applied Biosystems, Scottsdale, AZ, EUA*) em placas de 384 poços, em triplicata. A reação foi padronizada com concentração de iniciadores de 0,2 µM para todos os genes estudados; concentração presumida em cADN de 0,5 µg para AGTN e AT1 e 1 µg para AT2 e temperatura de anelamento de 60°C para os três genes estudados.

Foi utilizado o kit SYBR[®]Greener[™] qRT-PCR *SuperMix* para ABI PRISM[®] (*Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA*), onde 3 µl cADN diluído em água livre de nucleases, 1 µl de iniciador senso (0,2 µM) e 1 µl de iniciador

anti-senso (0,2 μ M) num volume total de 10 μ l em cada poço. As condições de amplificação foram as seguintes: estágio 1 - 95°C por 10 min; estágio 2 - 50 ciclos a 95°C por 15 s; anelamento a 60°C por 30 s; extensão a 72°C por 30 s. O ciclo final, estágio 3, foi realizado para verificar a especificidade da reação de PCR analisando-se a curva de denaturação.

Um único pico de dissociação na curva de denaturação demonstrou a presença de um único produto na mistura da reação. Os resultados foram expressos em ciclos de leitura ou ciclos de detecção (*threshold cycle, CT*), determinado automaticamente pelo aparelho para cada gene em estudo (*threshold*). Neste caso o *threshold* correspondeu ao ponto da curva onde a amplificação do gene em estudo deixa de ser linear e passa a ser exponencial.

Quando a média do valor do CT das triplicatas comparada a cada uma das réplicas técnicas foi maior que um ciclo, o experimento foi repetido. A média das triplicatas técnicas foi o valor utilizado para cada amostra. Controles negativos foram incluídos em todas as placa com reações contendo 5 μ l SYBR[®]Greener[™] e 1 μ l de iniciador senso e 1 μ l de iniciador anti-senso do gene em estudo e 3 μ l de água livre de nucleases, sem cADN.

O controle endógeno para a quantidade e integridade de mARN para cada amostra foi dado pela expressão do gene GAPDH (Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase).

Para cálculo da expressão relativa dos níveis de mARN dos genes AGTN, AT1 e AT2, o CT de cada ferida profunda foi normalizada para o CT da ferida rasa no mesmo intervalo de tempo da mesma porca, assim calculando-se $\Delta\Delta$ CT. Esta normalização teve por objetivo evidenciar os genes diferentemente expressos na ferida profunda da porca Duroc, grupo

em estudo, -depois de normalizada com a ferida rasa - e comparada com este mesmo índice das porcas Yorkshire, grupo controle.

O nível de expressão relativo da expressão genética calculada foi dado por $2^{-\Delta\Delta CT}$, conforme previamente descrito e dado em razão de expressão - *fold change* (LIVAK and SCHMITTGEN, 2001). Portanto para cada dupla de ferida rasa e profunda em cada momento após a criação das feridas em cada porca foi calculado:

$$\Delta CT = CT \text{ gene alvo} - CT \text{ calibrador interno (GAPDH)}$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ ferida profunda} - \Delta CT \text{ ferida rasa}$$

$$\text{Expressão relativa entre Duroc e Yorkshire} = \text{Log}2^{-\Delta\Delta CT}$$

Após o teste de eficiência foi assumido 100% de eficiência de amplificação para cada gene em todas as reações, conforme preconiza o método de $\Delta\Delta CT$. As curvas de dissociação demonstram uma representação gráfica do produto do RT-PCR após o processo de amplificação. Um único pico em amostras positivas sugere um único produto e ausência de *primer dimer*, assim como a ausência de pico na amostra sem cADN. As curvas de amplificação e dissociação dos genes estudados encontram-se no apêndice (página 84).

4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Realizada em conjunto com o Departamento de Bioestatística da Universidade de Washington, Foi realizada análise descritiva dos

resultados, devido à esperada variabilidade da expressão genética individual e pelo número da amostra (n=3).

Para avaliar pontualmente a diferença entre a expressão relativa de cada gene estudado pelo RT-PCR, foi utilizado teste t de *Student*, não pareado, com nível de significância de 5%, bi-caudal.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. IMUNO-HISTOQUÍMICA

5.1.1. *Imuno-histoquímica para AT1*

O receptor tipo I da angiotensina II (AT1) foi detectado na epiderme, derme, anexos cutâneos, células inflamatórias e capilares variando com o tempo de acordo com a figura 7. Na epiderme notou-se um padrão de “tela de galinheiro”, sugerindo presença da proteína na membrana citoplasmática ou no espaço intercelular. Na derme foram corados fibroblastos, células epiteliais de folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas (raras em porcos) acompanhando o padrão da epiderme. Pode-se observar coloração das células das paredes dos capilares e vasos, poupando-se as células endoteliais (figura 8). Houve variação do nível de coloração entre feridas rasas e profundas e entre porcas Duroc e Yorkshire conforme figura 7. A coloração para AT1 após 20 semanas da criação das feridas foi a mesma observada na pele íntegra. Houve variação individual do nível de coloração entre porcas da mesma espécie.

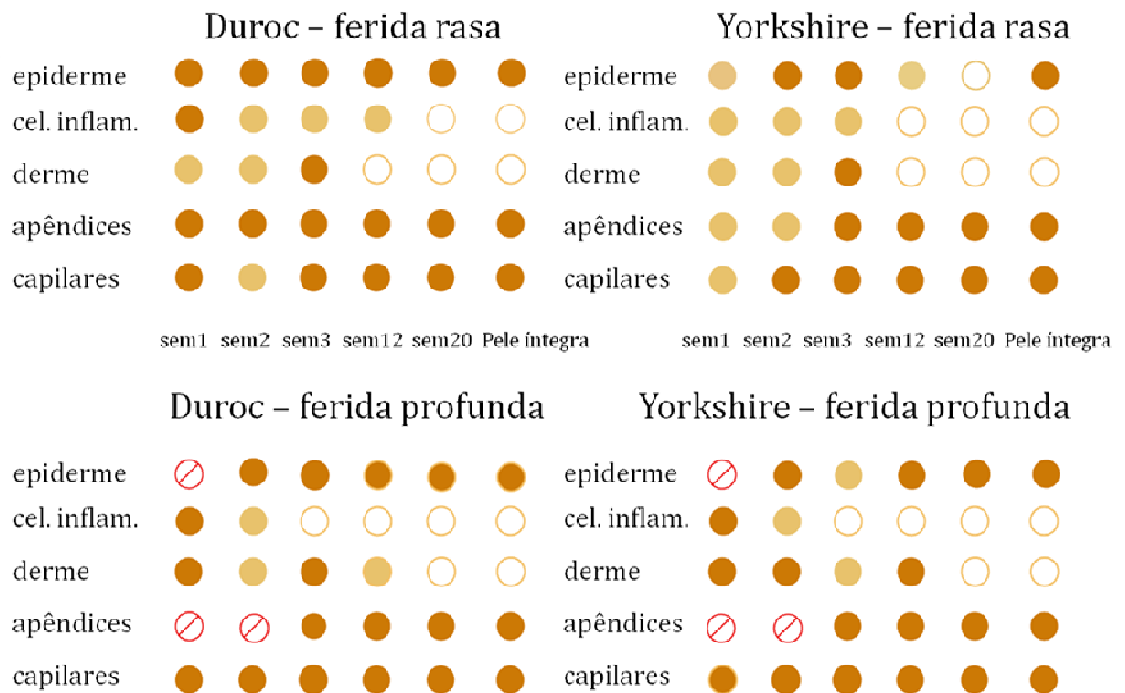


Figura 7. Localização e intensidade de coloração por imunohistoquímica para AT1 em modelo porcino de cicatrização hipertrófica no decorrer do tempo. Marrom = coloração intensa, bege = coloração fraca, branco = sem coloração, vermelho = ausência da estrutura.

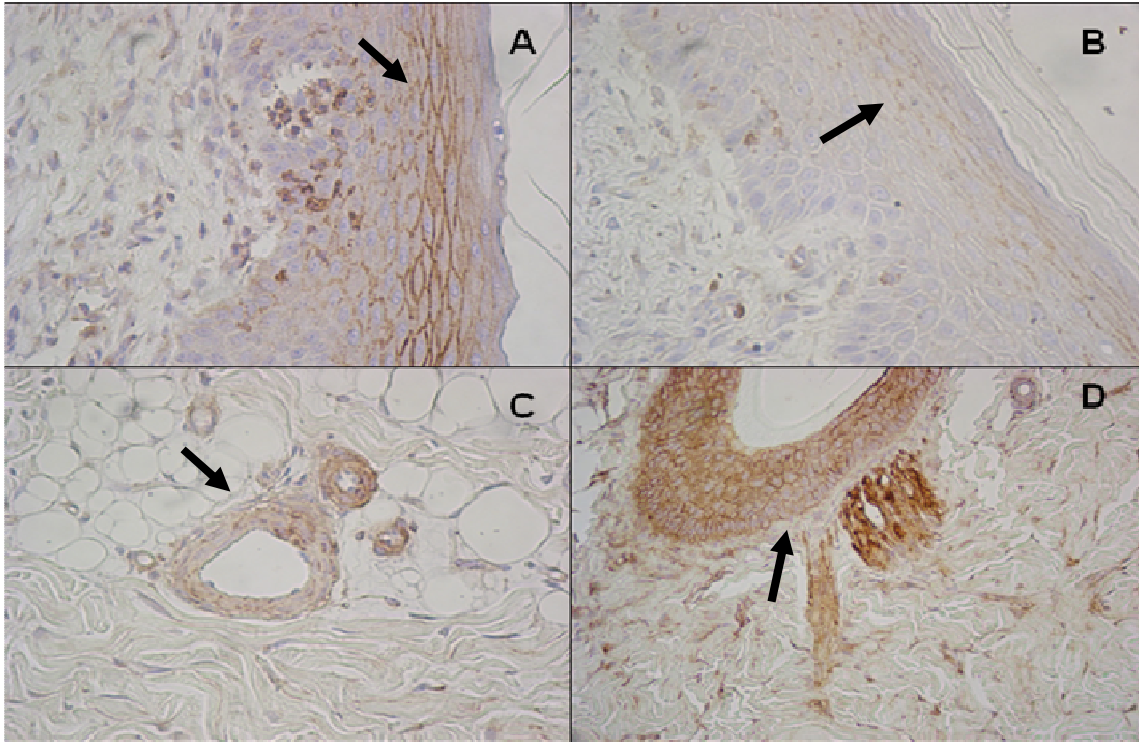


Figura 8. Imuno-histoquímica marcando receptores AT1 em feridas de porcas Duroc e Yorkshire. A – Duroc: ferida profunda, 3 semanas (20x) seta evidenciando queratinócitos. B – Yorkshire: ferida profunda, 3 semanas (20x). seta evidenciando queratinócitos C – Duroc: microvasos em feridas rasas, 2 semanas (20x). D – Duroc: ferida profunda, 3 semanas, mostrando porção inferior do folículo piloso e marcação positiva na região do músculo eretor do pelo (20x).

5.1.2. Imuno-histoquímica para AT2

O receptor tipo II da angiotensina II (AT2) pode ser detectado por imuno-histoquímica nos mesmos constituintes da pele corados para AT1, embora o nível de coloração fosse mais uniforme durante a evolução do processo cicatricial e sem diferença aparente entre feridas rasas ou profundas e entre porcas Duroc e Yorkshire, conforme exposto na figura 9.

O padrão de coloração de AT2 nos queratinócitos sugere que esta proteína está predominantemente presente no seu citoplasma. Na derme

foram corados fibroblastos, células epiteliais de folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas (raras em porcos) acompanhando o padrão da epiderme. Pode-se observar coloração das células das paredes dos capilares e vasos, mas não de células endoteliais (figura 10). A coloração para AT2 após 20 semanas da criação das feridas foi a mesma observada na pele íntegra.

	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 12	Semana 20	Pele íntegra
Epiderme	○	●	●	●	●	●
Derme	●	●	●	●	○	○
Céls. Infl.	○	○	○	○	○	○
Apêndices	●	●	●	●	●	●
Capilares	●	●	●	●	●	●

Figura 9. Localização e intensidade de coloração por imunohistoquímica para AT2 em modelo porcino de cicatrização hipertrófica no decorrer do tempo. Preto = coloração intensa, cinza = coloração fraca, branco = sem coloração, vermelho = ausência da estrutura. A distribuição celular e o nível de coloração não apresentou variação entre feridas rasas ou profundas ou entre porcas Duroc e Yorkshire.

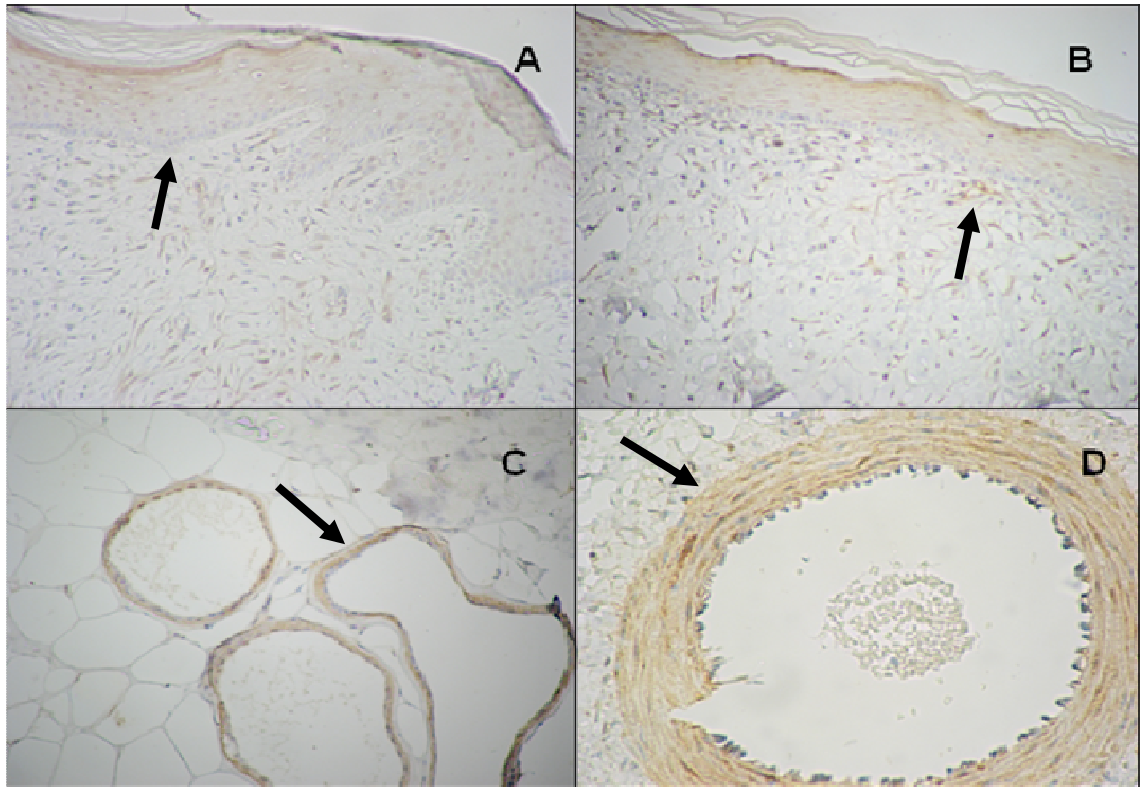


Figura 10. Imuno-histoquímica marcando receptores AT2 em feridas de porcas Duroc e Yorkshire. A – Duroc: ferida profunda, 3 semanas (10x). seta evidenciando queratinócitos B – Yorkshire: ferida profunda, 3 semanas (10x). seta evidenciando queratinócitos C – Duroc: glândulas sebáceas em feridas rasas, 20 semanas (20x). D – Yorkshire: microvasos em feridas rasas, 2 semanas (20x). Note-se marcação negativa das células endoteliais.

5.2. REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA EM TEMPO REAL – QUANTIFICAÇÃO RELATIVA

5.2.1. Expressão gênica de angiotensinogênio

Após a normalização dos valores de CT entre feridas rasas e profundas em cada intervalo de tempo após a ferida, o estudo da expressão genética semi-quantitativa de AGTN em biópsias de feridas de porcas Duroc e Yorkshire não apresentou diferença estatística entre o grupo em

estudo e o grupo controle. Também não houve diferença estatística no decorrer do tempo após 20 semanas da criação das feridas (figura 11).

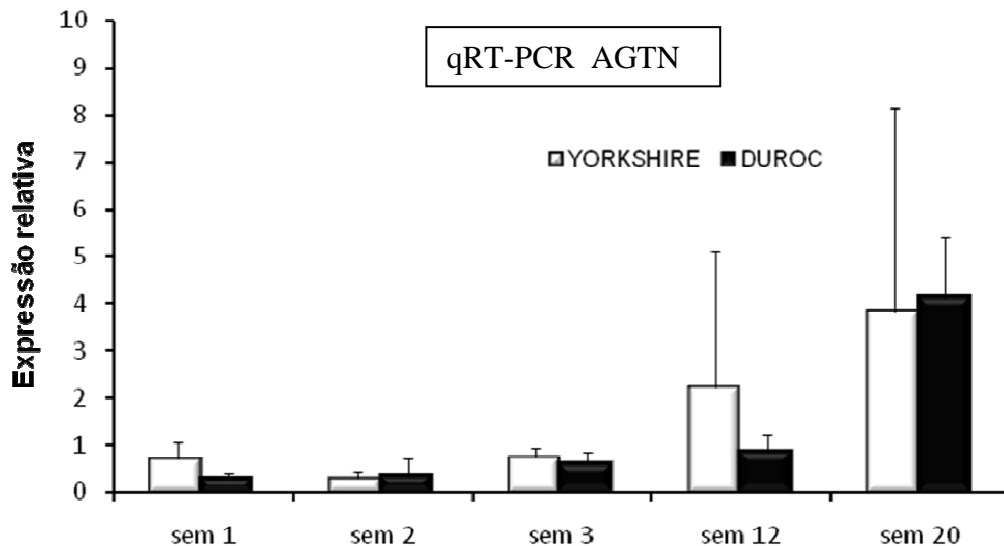


Figura 11. Expressão gênica relativa de AGTN em biópsias de feridas de porcas Duroc e Yorkshire no decorrer do tempo (expressão relativa dada por $\log \Delta\Delta CT$). mRNA foi normalizado pela expressão de GAPDH na mesma ferida (ΔCT). O controle endógeno foi AGTN ΔCT na ferida rasa da mesma porca ($\Delta\Delta CT$).

5.2.2. Expressão gênica de AT1

Após a normalização dos valores de CT entre feridas rasas e profundas em cada intervalo de tempo após a ferida, o estudo da expressão genética semi-quantitativa de AT1 em biópsias de feridas de porcas Duroc e Yorkshire não apresentou diferença estatística entre o grupo em estudo e o grupo controle. Também não houve diferença estatística no decorrer do tempo após 20 semanas da criação das feridas (figura 12).

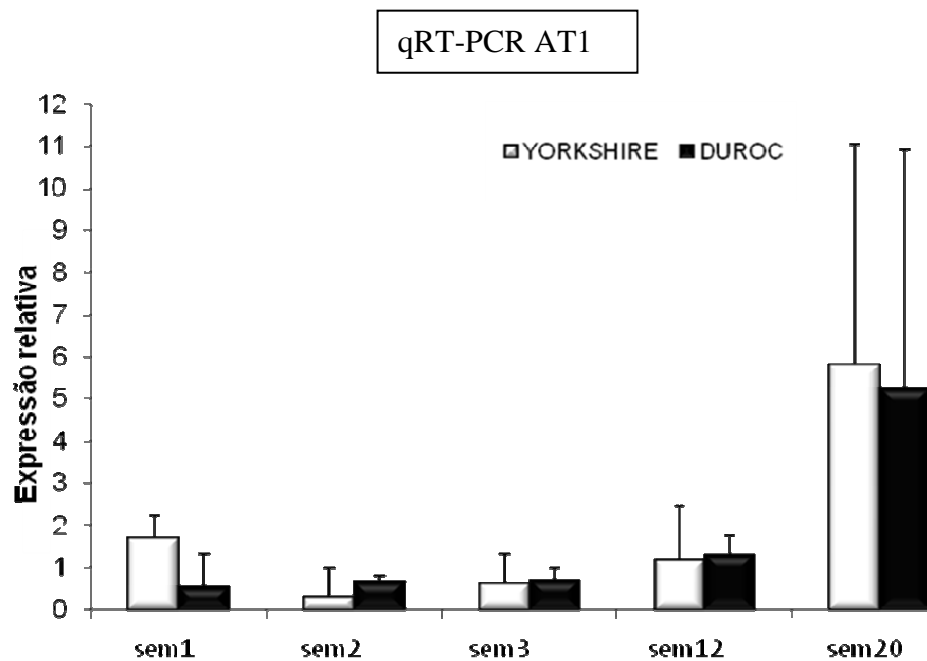


Figura 12. Expressão gênica relativa de AT1 em biópsias de feridas de porcas Duroc e Yorkshire no decorrer do tempo (expressão relativa dada por $\log \Delta\Delta CT$). mARN foi normalizado pela expressão de GAPDH na mesma ferida (ΔCT). O controle endógeno foi AT1 ΔCT na ferida rasa da mesma porca ($\Delta\Delta CT$).

5.2.3. Expressão gênica de AT2

Após a normalização dos valores de CT entre feridas rasas e profundas em cada intervalo de tempo após a ferida, o estudo da expressão genética semi-quantitativa de AT2 em biópsias de feridas de porcas Duroc e Yorkshire apresentou diferença estatística entre o grupo em estudo e o grupo controle em cicatrizes com duas e três semanas após a criação das feridas ($p=0,038$ e $p=0,046$ respectivamente). Notadamente há uma hiperexpressão de AT2 pelas porcas Yorkshire. Também não houve diferença estatística no decorrer do tempo após 20 semanas da criação das feridas (figura 13).

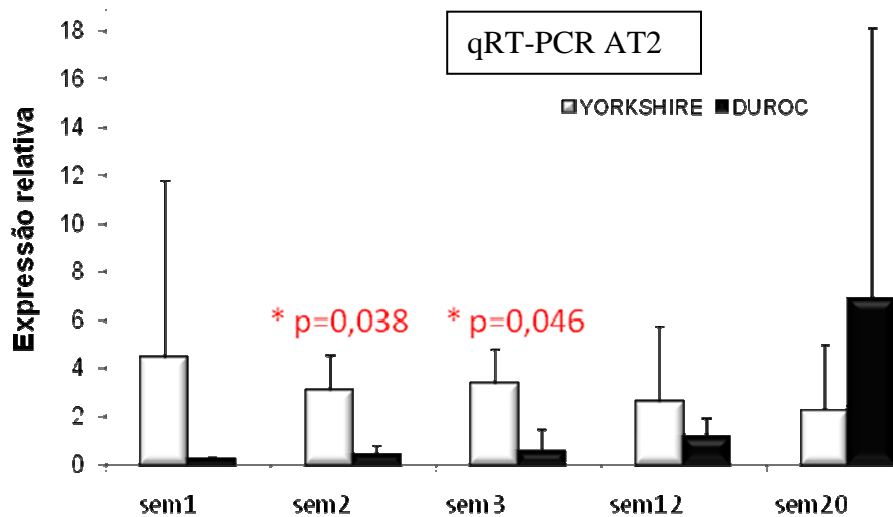


Figura 13. Expressão gênica relativa de AT2 em biópsias de feridas de porcas Duroc e Yorkshire no decorrer do tempo (expressão relativa dada por $\log \Delta\Delta CT$). mARN foi normalizado pela expressão de GAPDH na mesma ferida (ΔCT). O controle endógeno foi AT2 ΔCT na ferida rasa da mesma porca ($\Delta\Delta CT$).

5.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA DESCRITIVA

Foi realizada análise descritiva dos resultados, devido à esperada variabilidade da expressão genética individual e pelo número da amostra (n=3).

Em relação a expressão relativa de AGTN, plotada a razão entre feridas rasas e profundas por porcas no decorrer no tempo, não há diferença na tendência de expressão após 20 semanas da criação das feridas em porcas Duroc e Yorkshire. Nota-se uma tendência ao aumento de expressão na porca Yorkshire 5 (figura 14)

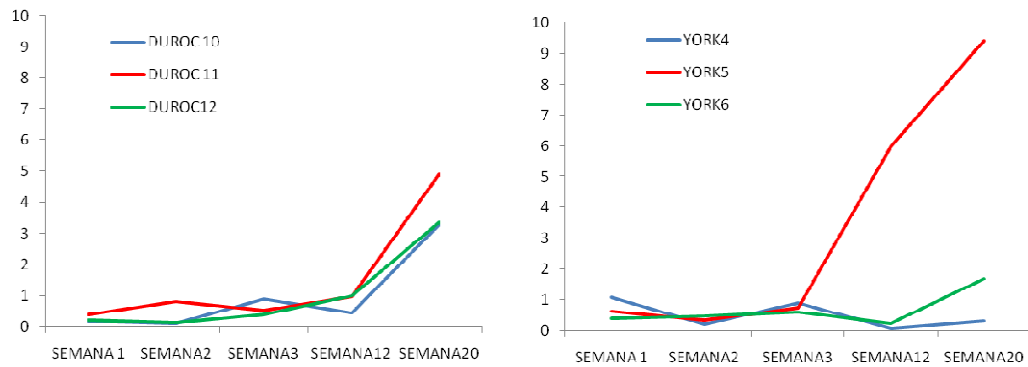


Figura 14. Tendência da expressão relativa de AGTN por porcas Duroc e Yorkshire no decorrer do tempo. Eixo y = expressão relativa

Em relação a expressão relativa de AT1 plotada a razão entre feridas rasas e fundas por porcas no decorrer no tempo, não há diferença na tendência de expressão após 20 semanas da criação das feridas em porcas Duroc e Yorkshire. Nota-se uma tendência de aumento de expressão na porca Yorkshire 4 (figura 16).

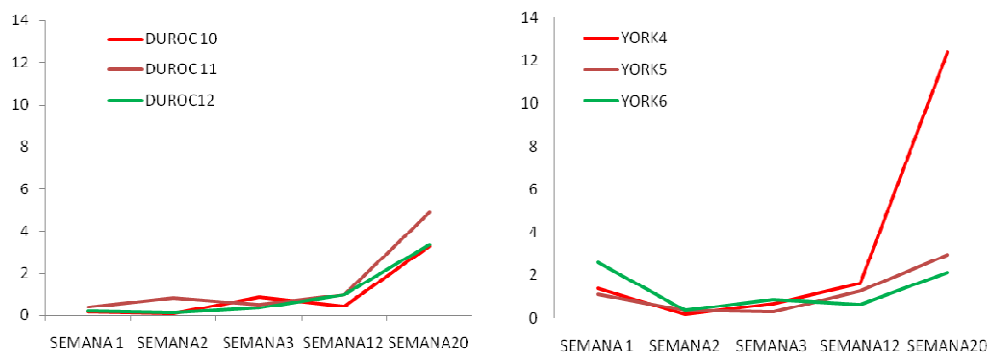


Figura 15. Tendência da expressão relativa de AT1 por porcas Duroc e Yorkshire no decorrer do tempo. Eixo y = expressão relativa

Em relação a expressão relativa de AT2 plotada a razão entre feridas rasas e fundas por porcas no decorrer no tempo, não há variação para duas das porcas Duroc, porém uma delas apresenta aumento significativa da sua expressão após 20 semanas. A tendência de expressão foi considerada diferente quando comparadas porcas Duroc e porcas Yorkshire.

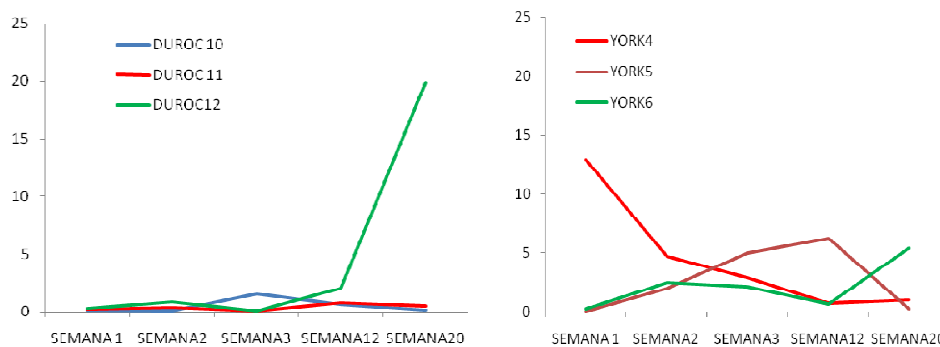


Figura 16. Tendência da expressão relativa de AT2 por porcas Duroc e Yorkshire no decorrer do tempo. Eixo y= expressão relativa

Quando analisada individualmente a razão do nível de expressão entre AT1 e AT2 para cada animal, observa-se um padrão de apresentação que sugere separação entre as porcas Duroc das porcas Yorkshire (figura 17)

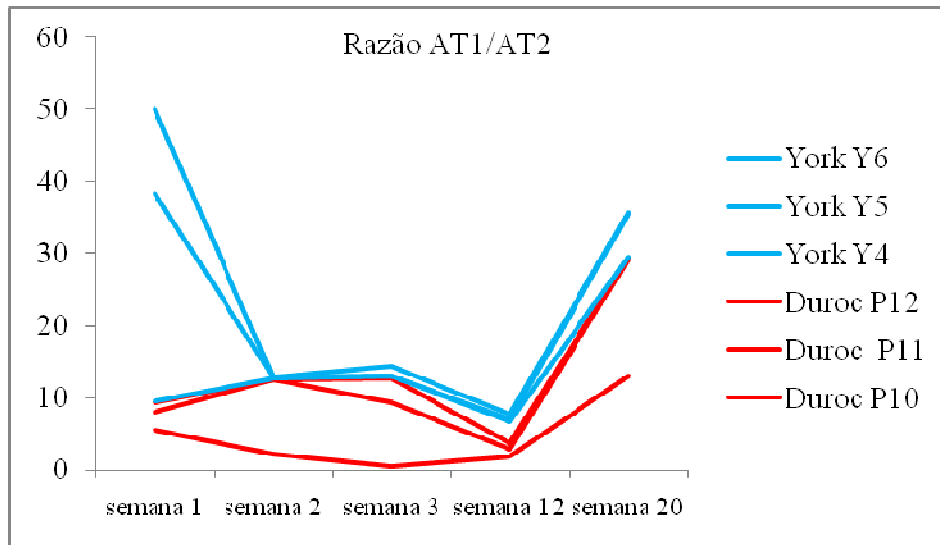


Figura 17. Razão dos níveis de expressão relativa de AT1 e AT2 plotados individualmente por porcas.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Angiotensina II (AII) foi inicialmente descrita em 1940 por BRAUN-MENENDEZ *et al.* na Argentina e no mesmo ano por PAGE & HELMER nos EUA. Desde então, é considerada o principal peptídeo vasoconstritor e o hormônio efetor do sistema renina-angiotensina, decisivo na regulação da pressão arterial. Na década de 80 e 90, estudos evidenciavam que a AII também era produzida por outros órgãos além do fígado, como cérebro, rim, coração e vasos sanguíneos, observando-se que este hormônio induzia a proliferação celular e controlava a formação da matriz extra-celular, atuando em nível sistêmico e tissular (DZAU & GIBBONS, 1987; GRIFFIN *et al.*, 1991; WEBER, SUN, CAMPBELL, 1995).

Angiotensinogênio (AGTN) é uma α -2 globulina produzida no fígado e que sob a ação da renina forma angiotensina I. Por sua vez a angiotensina I pela ação da enzima conversora forma angiotensina II. A ação da AII é mediada por seus receptores: receptor tipo I da angiotensina II (AT1), tipo II (AT2), tipo III (AT3) e tipo IV (AT4). A maioria dos efeitos conhecidos e anteriormente descritos da AII são mediados pelo AT1 uma proteína pertencente a super-família de receptores acoplados à proteína G. (DE GASPARO, 2002)

A AII parece exercer este efeito por induzir diretamente atividade da NADPH oxidase, estimulando produção de TGF β 1 e induzindo à proliferação e diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos secretores de colágeno. Além deste efeito de secreção e ativação de TGF β 1, a AII também eleva a via de sinalização do TGF β , elevando os níveis de SMAD2

e aumentando translocação nuclear de SMAD3 fosforilada. Adicionalmente, foi demonstrado que a AII pode ativar a sinalização das proteínas SMAD por uma via independente do TGF β , levando à fibrose vascular (RODRIGUEZ-VITA *et al.*, 2005) e renal (CARVAJAL *et al.*, 2008).

Por outro lado, o receptor tipo II da angiotensina II (AT2), parece ter efeito de contrabalancear a ação fibrótica de AT1: inativa a MAPK, (proteína quinase ativadas por mitógeno) promove apoptose, diferenciação e regeneração celular. A expressão do AT2 é alta em vários tecidos no feto, porém, decresce na maioria deles logo após o nascimento, permanecendo em níveis indetectáveis na pele. A re-expressão de AT2 na pele, assim como em outros tecidos em processos patológicos, inclusive na derme superficial durante a cicatrização normal, (KIMURA, SUMNERS, PHILLIPS, 1992; VISWANATHAN & SAAVEDRA, 1992) indica a participação deste receptor no processo cicatricial, embora apenas recentemente tenha sido descrito como participante do processo de cicatrização hipertrófica na pele (LIU *et al.*, 2006).

A hipótese deste estudo foi a de que há uma possível participação do sistema angiotensina na cicatrização hipertrófica, haja vista este sistema estar envolvido em processos de fibrose em outros órgãos conforme citado anteriormente. Além disso, o conhecimento acumulado da fisiopatologia da cicatrização hipertrófica ainda não permite intervenção terapêutica eficiente em sua prevenção ou tratamento.

A escolha dos genes estudados AGTN, AT1, AT2 se deu ao fato dos *probes* AGTN e AT1 terem sido diferentemente expressos e estarem regulados para cima (*up-regulated*) em experimento com *microarray* na Universidade de Washington (dados não publicados). Neste experimento

que seguiu o mesmo modelo desta pesquisa, além de terem sido estudadas as três porcas Duroc e três porcas Yorkshire, também estudou-se três cicatrizes hipertróficas humanas em *cDNAchips* com o genoma humano completo. Foram considerados diferentemente expressos genes nas porcas que eram também diferentemente expressos nas cicatrizes hipertóficas humanas estudadas. Acrescentou-se AT2 no presente estudo por ser uma oportunidade de se avaliar a hipótese que AT1 e AT2 teriam atuações opostas na formação da cicatriz hipertrófica. Portanto a escolha do angiotensinogênio e não de outra molécula do sistema angiotensina para se demonstrar a participação deste sistema na cicatrização hipertrófica, deve-se a busca de coerência entre dados ainda não publicados realizados por este grupo, neste mesmo modelo animal.

O modelo animal das porcas Duroc como modelo de cicatrização fibroproliferativa tendo as porcas Yorkshire como grupo controle e modelo de cicatrização não proliferativa foi validado previamente e por isso foi o modelo adotado neste estudo. (ZHU *et al.*, 2003; LIANG *et al.*, 2004; ZHU *et al.*, 2004; GALLANT, OLSON e HART, 2004; ZHU *et al.*, 2005; GALLANT-BEHM, OLSON e HART, 2005; HARUNARI *et al.*, 2006, GALLANT-BEHM E HART, 2006; GALLANT-BEHM *et al.*, 2006, XIE *et al.*, 2007; ZHU *et al.*, 2007; GALLANT-BEHM *et al.*, 2007; ZHU *et al.*, 2008). A realização de feridas profundas em cada um dos grupos e a adoção das feridas rasas como controle interno de cada animal normalizou os resultados de tal forma que os eventos biológicos da cicatrização hipertrófica pudessem ser evidenciados. Se não houvesse tal normalização, os eventos observados não poderiam ser discriminados como relativos a cicatrização hipertrófica, pois não haveria critério para saber se tal evento seria decorrente da cicatrização normal ou patológica. Convém lembrar que

embora o modelo Duroc/Yorkshire seja similar à cicatriz hipertrófica humana, satisfazendo o requisito fundamental, onde a cicatriz da ferida profunda é mais espessa que a ferida rasa, a aparência não é completamente similar: a cicatriz das feridas profundas das porcas Duroc não é avermelhada como a humana e também tem uma margem mais sutil, considerando-se que uma das características da cicatrização hipertrófica humana é a margem elevada e abrupta (ZHU *et al.*, 2003).

A escolha pelas feridas profundas, e não por feridas que incluiriam a espessura total da derme, se deve ao fato de que há uma hipótese neste modelo baseada nos cones de pele. Cones de pele são estruturas anatômicas encontradas no corpo humano nas regiões onde se pode desenvolver cicatrização hipertrófica. Cones são compostos pelo folículo piloso e apêndices cutâneos e são caracterizados por um domo de tecido subcutâneo que invade a derme. Portanto feridas que incluem a derme total eliminariam a possibilidade de se estudar o comportamento desta camada de células, a base dos cones da pele, que poderiam ser responsáveis pelo fato de apenas feridas na derme profunda levarem a cicatrizes hipertróficas, o que não ocorre em feridas rasas (MATSUMURA *et al.*, 2001).

A técnica de transcrição reversa seguida de reação de polimerase em cadeia em tempo real conjugada com a emissão de fluorescência em tempo real, também conhecido com as siglas qRT-PCR ou qPCR é uma tecnologia disponível que quantifica relativamente níveis de expressão de mARN (BUSTIN, 2005). A normalização desta reação depende de fatores como quantidade e qualidade do mARN em cada mostra, gene de referência e o modelo da análise dos dados. Neste experimento a etapa de purificação do ARN, a análise de concentração com o espectrofotômetro e a utilização de gene de referência GAPDH, normalizaram a qualidade e a

quantidade de mARN entre as amostras. Os iniciadores (*primers*) que amplificaram GAPDH neste estudo foram previamente utilizados neste modelo por ZHU *et al.*, (2008) e não foram diferentemente expressos em nenhuma ferida ou intervalo de tempo. O valor da eficiência, a amplificação das amostras e a curva de dissociação dos 4 pares de iniciadores (*primers*) utilizados neste estudo, preencheram os critérios de validação para qRT-PCR de eficiência e especificidade. Convém notar a confusão na nomenclatura de duas técnicas diferentes de quantificação de mARN: o acrônimo RT-PCR tem sido utilizada como “reação de polimerase em cadeia via transcriptase reversa”, método considerado não quantitativo, ou semi quantitativo, pois o resultado se expressa em intensidade da banda em gel de agarose e brometo de etídeo. A sigla RT-PCR também tem sido usada para “reação de polimerase em cadeia em tempo real”, e no presente estudo foi substituída por qRT-PCR, por designar reação que quantifica a expressão de mARN de forma objetiva e principalmente por medir a expressão gênica na fase de amplificação e não na fase de platô, trazendo mais sensibilidade à mensuração (KUBISTA *et al.*, 2006, BUSTIN *et al.*, 2005)

A expressão relativa dos genes em feridas profundas de interesse neste estudo foi normalizada para a expressão do mesmo gene em ferida rasa, da mesma porca, no mesmo momento, para evidenciar genes diferentemente expressos na cicatrização hipertrófica e não aqueles apenas relacionados ao processo cicatricial normal, conforme citado anteriormente.

Este estudo possibilitou a pesquisa de eventos celulares e moleculares relacionados a AII e seus receptores envolvidos na cicatrização hipertrófica no decorrer do tempo, por tratar-se de evento biológico de longa duração, em modelo animal conhecido e eficaz, as porcas Duroc e

Yorkshire. Aqui evidencia-se a relevância de se estudar estes fenômenos biológicos no modelo animal, haja vista a impossibilidade ética de se realizarem biópsias seriadas em pacientes já portadores de cicatrizes hipertróficas e que traz um viés ao estudo dos eventos celulares e moleculares deste processo *in anima nobile*.

No que se refere à imuno-histoquímica, no presente estudo os receptores AT1 e AT2 foram detectados de forma inédita no processo da cicatrização hipertrófica em modelo animal porcino, com biópsias seriadas no mesmo indivíduo, variando com o tempo. Os receptores AT1 e AT2 foram identificados na epiderme, derme, anexos cutâneos, células inflamatórias e capilares.

Em outra doença fibrótica da pele, a esclerose sistêmica, KAWAGUCHI *et al.* (2004) demonstraram utilizando o mesmo método, a presença de AT1 e AT2 em fibroblastos cultivados extraídos da pele de pacientes com doença difusa, sendo que em fibroblastos extraídos de pele normal, houve coloração mais leve para AT1 e não houve coloração para AT2. Quando usaram antagonistas seletivos de AT1 e AT2, notou-se que o efeito da AII mediado por este receptor inibiu produção de pró-colágeno. No presente estudo o grau de coloração de AT2 foi globalmente menos intenso que AT1 em todas as feridas. Convém ressaltar que neste estudo o grupo controle se constitui de feridas de porcas Yorkshire e não de pele sem ferida, porque o foco está em evidenciar quais fenômenos explicariam a participação do sistema angiotensina na cicatrização hipertrófica comparada a cicatrização normal e não com a pele íntegra.

TAKEDA *et al.* (2004) utilizando-se de metodologia diversa, análises de imunoprecipitação e *Western Blot*, indicaram a existência de receptores AT1 e AT2 em queratinócitos e miofibroblastos cultivados de

lesões de peles de ratos, numa analogia aos achados da cicatrização da porca Yorkshire, que é modelo de cicatrização normal.

STECKELINGS *et al.* (2004) examinaram biópsias de pele humana normal também com imuno-histoquímica, e receptores AT1 e AT2 foram encontrados dentro das paredes dos vasos na derme e epiderme, sem coloração para fibroblastos dérmicos o que foi observado nas feridas das porcas após 20 semanas, e em pele íntegra no presente estudo.

Para conhecer a evolução da presença da proteína AT1 e AT2 no decorrer do processo cicatricial STECKELINGS *et al.* (2004) examinaram tecido cicatricial pelo mesmo método descrito no parágrafo anterior para determinar a expressão de receptores precoce (dois dias) e tardia (duas semanas e 3 meses) após a cirurgia e mostraram uma expressão mais forte de receptores AT2 do que de AT1 dentro da área cicatricial após 14 dias. O mesmo ocorreu no modelo porcino do presente estudo, no qual houve expressão de AT1 na derme de feridas rasas de porcas Duroc e Yorkshire, até 3 semanas, sendo que nas feridas profundas a expressão estendeu-se até 12 semanas. No que se refere à AT2, todas as feridas apresentaram expressão ligeiramente mais intensa nas primeiras duas semanas e menos intensa até 12 semanas. Nenhuma das feridas deste estudo apresentava coloração positiva nos fibroblastos da derme para AT1 ou AT2 após 20 semanas e o grau de coloração neste momento se repetiu na pele íntegra, inferindo-se aqui uma atividade deste sistema semelhante nestes dois eventos.

MORIHARA *et al.* (2006) verificaram uma atividade significativamente maior da ECA no tecido cicatricial patológico do que em pele ou cicatriz normal utilizando imuno-histoquímica, observando a marcação de miofibroblastos com anticorpos anti-ECA. Os autores

ressaltaram que o estudo foi pequeno, e concluem que seus resultados sugeriram que a ECA regulada para cima (*up-regulated*) provavelmente participa na formação da cicatriz patológica cutânea, assim como no sistema cardiovascular, reforçando a hipótese deste estudo do que o sistema renina angiotensina está envolvido na fibrose de pele.

Em 2007, LIU *et al.* descreveram coloração positiva para AT1 e AT2 em fibroblastos cultivados provenientes de cicatrizes hipertróficas humanas, o que, baseado no presente estudo, sugere que as porcas Duroc/Yorkshire possam servir de modelo ao estudo do comportamento do sistema angiotensina em humanos.

No que se refere ao q RT-PCR, houve hiperexpressão significativa de AT2 no grupo controle (Yorkshire) duas e três semanas após a criação das feridas quando comparado ao grupo em estudo (Duroc), o que sugere que o efeito anti-proliferativo deste receptor possa estar colaborando para a cicatrização não proliferativa observada no grupo controle.

KAWAGUCHI *et al.* (2004) verificaram a expressão de mARN para AT1 e AT2 em fibroblastos dérmicos cultivados por reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR). A expressão de mARN para AT1 foi verificada tanto em fibroblastos cultivados da pele de pacientes com esclerose sistêmica quanto em fibroblastos normais, enquanto a expressão de mARN para AT2 não foi verificada neste último grupo. As análises imuno-histoquímicas mostraram a presença de AGTN na pele de pacientes ES, mas não na pele normal. Os fibroblastos de pacientes com ES cutânea difusa que apresentaram altos níveis de AII sérica, expressaram mARN para AGTN, enquanto fibroblastos normais não expressaram. A expressão de mARN para AT1 foi verificada tanto em fibroblastos ES quanto em fibroblastos normais, enquanto a expressão de

mARN para AT2 foi verificada apenas em fibroblastos ES. Os autores inferem que tal discrepância poderia ser explicada pelas propriedades biológicas destes receptores (número por célula, afinidade por AII) e que a hiperexpressão de AT2 poderia ser uma consequência de um feedback contra o efeito pró-fibrótico mediado pela ativação espontânea de AT1 em fibroblastos cultivados de pacientes com esclerose sistêmica difusa. No presente estudo a hiperexpressão de AT2 nas porcas Yorkshire após duas e três semanas após a criação das feridas poderia ser um fator que favorecesse a cicatrização não proliferativa deste grupo. Porém pode-se especular que é a razão da expressão entre esses dois receptores que determina a ação final da AII na fisiopatologia da fibrose, sem desconsiderar a provável causa multi-fatorial deste evento biológico. No presente estudo quando analisada individualmente a razão do nível de expressão entre AT1 e AT2 para cada animal, observa-se um padrão de apresentação que ligeiramente separa as porcas Duroc das porcas Yorkshire.

STECKELINGS *et al.* (2004) demonstraram a expressão de mARN com RT-PCR para os componentes sistema angiotensina em cultivo primário de queratinócitos, melanócitos, fibroblastos dérmicos e células endoteliais microvasculares dérmicas, com exceção dos receptores de AT2 em melanócitos. Além disso, em monocamadas de queratinócitos artificialmente lesadas, a expressão de mARN para ECA aumentou rapidamente, e uma expressão aumentada de ECA ainda foi encontrada em cicatrizes cutâneas humanas três meses após a lesão. Esses resultados sugerem que um sistema completo renina-angiotensina está presente na pele humana e desempenha um papel na homeostase cutânea normal, assim como no reparo de lesão cutânea humana. Assim ficou comprovada a

existência do sistema angiotensina originário das células que compõem a pele normal. No entanto, ainda não havia estudo que associasse este sistema com a cicatrização normal ou hipertrófica. O presente estudo originalmente quantificou a expressão relativa da AGTN, AT1, e AT2 em pele total no modelo porcino sugerindo a participação deste sistema na fisiopatologia da cicatrização hipertrófica.

STECKELINGS *et al.* (2005) constataram regulação para cima (*up-regulation*) de AT1 e AT2 após a lesão de pele, utilizando-se de RT-PCR. Uma expressão de receptores aumentada foi detectada 24h após a lesão e permaneceu por até três meses, reforçando o conceito de que AII desempenha um papel mesmo nos estágios iniciais durante o reparo de lesões cutâneas. No presente estudo, houve expressão de AGTN, AT1 e AT2 até 20 semanas após a criação das feridas, apesar de não haver variação significativa da expressão relativa durante o tempo para AGTN e AT1.

LIU *et al.* (2007) usaram ensaio de radioligantes para os receptores AT1 e AT2 em fibroblastos humanos cultivados provenientes de cicatrizes hipertróficas e encontraram nível de expressão de $(10.69 \pm 2.15) \text{ fmol}/10^6 \text{ cel}$ e $(4.9 \pm 1.05) \text{ fmol}/10^6 \text{ cel}$, respectivamente. Relatam resultado similar com RT-PCR. Estudando proliferação celular, a estimulação com AII aumentou a síntese de ADN, que foi inibida por valsartan (bloqueador AT1) e diminuída com PD123319 (antagonista de AT2). Concluem que ANGII regula a síntese de ADN em fibroblastos humanos cultivados provenientes de cicatriz hipertrófica humana pelo *cross-talk* negativo entre AT1 e AT2 e inferem que isto pode contribuir ao menos parcialmente para formação e maturação de cicatrizes hipertróficas. Infere-se a partir deste estudo que o sistema angiotensina está presente na fisiopatologia da cicatriz

hipertrófica humana e que pelo presente estudo também envolvido na cicatrização fibroproliferativa porcina.

Finalmente em 2008, ZHU *et al.* conduziram um estudo comparativo da expressão gênica do colágeno no reparo fibroproliferativo da linhagem porcina Duroc com a do reparo não-fibroproliferativo da linhagem Yorkshire, usando o mesmo modelo do presente estudo, porém microdissecando as células dos cones dérmicos a *laser*. Também foram obtidas três amostras aleatórias de banco de cicatriz hipertrófica humana de aproximadamente 20 semanas de evolução. Os genes para análises posteriores foram restritos a quatro critérios biológicos, incluindo o fato de que a expressão das amostras de “Duroc, 20 semanas, ferida profunda” correspondesse à expressão das amostras humanas. Foi utilizada a técnica de qRT-PCR, com os mesmos parâmetros do presente estudo, incluindo par de iniciadores do gene de referência, GAPDH. Onze genes do colágeno e sete tipos de colágeno foram diferencialmente hiperexpressos (*over expressed*) em feridas profundas em Duroc. Os resultados sugeriram que os colágenos I, III, IV, V, VI, VII, XIV, e XV1 estão envolvidos no processo da cicatrização fibroproliferativa neste modelo em concordância com a conhecida hiperexpressão de colágeno em processos fibróticos humanos. Este experimento valida o método de qRT-PCR usado no presente estudo haja vista as reações terem sido realizadas com os mesmos parâmetros e utilizando mesmo gene de referência.

KAWAGUCHI *et al.* (2004) sugeriram a utilização de antagonistas de receptores AT1 como uma nova estratégia para o tratamento da fibrose tissular em pacientes ES. IANELLO *et al.* (2006) estudaram os efeitos da administração de enalapril , um inibidor da ECA, em baixas doses no

tratamento de cicatrizes hipertróficas cutâneas e quelóides pós-cirúrgicos em dois pacientes e relataram melhora. ARDEKANI *et al.* (2009) reportaram um caso de cicatriz hipertrófica por sequela de queimadura em mão há 5 meses. Após seis semanas do uso tópico de captopril a 5%, um inibidor da ECA, referem melhora do quadro. Tais estudos demonstram a necessidade de se estabelecer bases fisiopatológicas para a compreensão da participação do sistema angiotensina na formação da cicatriz hipertrófica no modelo animal em estudo com finalidade terapêutica, a fim de evitar-se experimentação *in anima nobile*.

Como perspectivas para este estudo são necessários estudos funcionais *in vitro*, comparando o comportamento protéico e genético do sistema angiotensina em fibroblastos derivados da derme profunda de cicatrizes hipertróficas humanas e de porcas Duroc, analisando-se a expressão das moléculas constituintes deste sistema, a expressão de colágenos, mediadores anti e pró-fibróticos e a atuação dos bloqueadores dos receptores AT1, AT2 e da ECA sobre a síntese final de colágenos. Caso seja devidamente estabelecida a participação do sistema angiotensina no processo de cicatrização hipertrófica em humanos, agentes terapêuticos novos ou já conhecidos poderiam ser testados no modelo porcino. Finalmente, se pesquisas terapêuticas no modelo apresentarem resultados significativos, vem o desafio final dos testes clínicos em seres humanos, com a possibilidade de testar agentes capazes de prevenir ou tratar os processos fibróticos da pele.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

1 – O receptor tipo I da angiotensina II (AT1) e receptor tipo II da angiotensina II (AT2) mostrou-se presente na epiderme, fibroblastos dérmicos, células inflamatórias, apêndices cutâneos e capilares durante processo de cicatrização hipertrófica tanto na linhagem Duroc como na Yorkshire.

2 – Houve hiperexpressão significativa de AT2 no grupo controle (Yorkshire) duas e três semanas após a criação das feridas, quando comparada ao grupo em estudo (Duroc), o que poderia ser um fator que favorece a cicatrização não proliferativa deste grupo. Não houve diferença na expressão de AGTN e AT1 entre os grupos.

REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

Aarabi S, Longaker MT, Gurtner GC. Hypertrophic scar formation following burns and trauma: new approaches to treatment. *PLoS Med.* 2007;4(9):e234.

Ardekani GS, Aghaei S, Nemati MH, Handjani F, Kasraee B. Treatment of a postburn keloid scar with topical captopril: report of the first case. *Plast Reconstr Surg.* 2009;123(3):112e-3e.

Braun-Menendez E, Fasciolo JC, Leloir LF, Munoz JM. The substance causing renal hypertension. *J Physiol.* 1940;98(3):283-98.

Broughton G 2nd, Janis JE, Attinger CE. The basic science of wound healing. *Plast Reconstr Surg.* 2006;117(7 Suppl):12S-34S.

Bustin SA. Real-time, fluorescence-based quantitative PCR: a snapshot of current procedures and preferences. *Expert Rev Mol Diagn* 2005 Jul;5(4):493-8.

Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. Quantitative real-time RT-PCR -a perspective. *J Mol Endocrinol.* 2005;34(3):597-601.

Campaner AB, Ferreira LM, Gragnani A, Bruder JM, Cusick JL, Morgan JR. Upregulation of TGF-beta1 expression may be necessary but is not sufficient for excessive scarring. *J Invest Dermatol* 2006 May;126(5):1168-76.

Carvajal G, Rodríguez-Vita J, Rodrigues-Díez R, Sánchez-López E, Rupérez M, Cartier C, Esteban V, Ortiz A, Egido J, Mezzano SA, Ruiz-

Ortega M. Angiotensin II activates the Smad pathway during epithelial mesenchymal transdifferentiation. *Kidney Int.* 2008;74(5):585-95.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162(1):156-9.

De Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev.* 2000;52(3):415-72.

De Gasparo M. AT(1) and AT(2) angiotensin II receptors: key features. *Drugs.* 2002;62 Spec No 1:1-10.

Dzau VJ, Gibbons GH. Autocrine-paracrine mechanisms of vascular myocytes in systemic hypertension. *Am J Cardiol.* 1987;60(17):99I-103I.

Gallant CL, Olson ME, Hart DA. Molecular, histologic, and gross phenotype of skin wound healing in red Duroc pigs reveals an abnormal healing phenotype of hypercontracted, hyperpigmented scarring. *Wound Repair Regen.* 2004;12(3):305-19.

Gallant-Behm CL, Hart DA. Genetic analysis of skin wound healing and scarring in a porcine model. *Wound Repair Regen.* 2006;14(1):46-54.

Gallant-Behm CL, Olson ME, Hart DA. Cytokine and growth factor mRNA expression patterns associated with the hypercontracted, hyperpigmented healing phenotype of red duroc pigs: a model of abnormal human scar development? *J Cutan Med Surg.* 2005;9(4):165-77.

Gallant-Behm CL, Reno C, Tsao H, Hart DA. Genetic involvement in skin wound healing and scarring in domestic pigs: assessment of molecular expression patterns in (Yorkshire x Red Duroc) x Yorkshire backcross animals. *J Invest Dermatol.* 2007;127(1):233-44.

Gallant-Behm CL, Tsao H, Reno C, Olson ME, Hart DA. Skin wound healing in the first generation (F1) offspring of Yorkshire and red Duroc pigs: evidence for genetic inheritance of wound phenotype. *Burns*. 2006;32(2):180-93.

Griffin SA, Brown WC, MacPherson F, McGrath JC, Wilson VG, Korsgaard N, Mulvany MJ, Lever AF. Angiotensin II causes vascular hypertrophy in part by a non-pressor mechanism. *Hypertension*. 1991;17(5):626-35.

Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008;453(7193):314-21.

Harunari N, Zhu KQ, Armendariz RT, Deubner H, Muangman P, Carrougher GJ, Isik FF, Gibran NS, Engrav LH. Histology of the thick scar on the female, red Duroc pig: final similarities to human hypertrophic scar. *Burns*. 2006;32(6):669-77.

Iannello S, Milazzo P, Bordonaro F, Belfiore F. Low-dose enalapril in the treatment of surgical cutaneous hypertrophic scar and keloid--two case reports and literature review. *MedGenMed*. 2006;8(4):60.

Kawaguchi Y, Takagi K, Hara M, Fukasawa C, Sugiura T, Nishimagi E, Harigai M, Kamatani N. Angiotensin II in the lesional skin of systemic sclerosis patients contributes to tissue fibrosis via angiotensin II type 1 receptors. *Arthritis Rheum*. 2004;50(1):216-26.

Kimura B, Sumners C, Phillips MI. Changes in skin angiotensin II receptors in rats during wound healing. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992;187(2):1083-90.

Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N.

The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.* 2006;27(2-3):95-125.

Liang Z, Engrav LH, Muangman P, Muffley LA, Zhu KQ, Carrougher GJ, Underwood RA, Gibran NS. Nerve quantification in female red Duroc pig (FRDP) scar compared to human hypertrophic scar. *Burns.* 2004;30(1):57-64.

Hochman B, Vilas Boas FC, Mariano M, Ferreiras LM. Keloid heterograft in the hamster (*Mesocricetus auratus*) cheek pouch, Brazil. *Acta Cir Bras* 2005 May-Jun;20(3):200-12.

Liu HW, Cheng B, Yu WL, Sun RX, Tang JB, Fu XB. Role of angiotensin II receptors in proliferation of fibroblast derived from human hypertrophic scars. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi.* 2007;23(1):36-9.

Liu HW, Cheng B, Yu WL, Sun RX, Zeng D, Wang J, Liao YX, Fu XB. Angiotensin II regulates phosphoinositide 3 kinase/Akt cascade via a negative crosstalk between AT1 and AT2 receptors in skin fibroblasts of human hypertrophic scars. *Life Sci.* 2006;79(5):475-83.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.

Matsumura H, Engrav LH, Gibran NS, Yang TM, Grant JH, Yunusov MY, Fang P, Reichenbach DD, Heimbach DM, Isik FF. Cones of skin occur where hypertrophic scar occurs. *Wound Repair Regen.* 2001;9(4):269-77.

Matsusaka T, Katori H, Homma T, Ichikawa I. Mechanism of cardiac fibrosis by angiotensin. New insight revealed by genetic engineering. *Trends Cardiovasc Med.* 1999;9(7):180-4.

Mezzano SA, Ruiz-Ortega M, Egido J. Angiotensin II and renal fibrosis. *Hypertension*. 2001;38(3 Pt 2):635-8.

Morihara K, Takai S, Takenaka H, Sakaguchi M, Okamoto Y, Morihara T, Miyazaki M, Kishimoto S. Cutaneous tissue angiotensin-converting enzyme may participate in pathologic scar formation in human skin. *J Am Acad Dermatol*. 2006;54(2):251-7.

Nakajima M, Hutchinson HG, Fujinaga M, Hayashida W, Morishita R, Zhang L, Horiuchi M, Pratt RE, Dzau VJ. The angiotensin II type 2 (AT2) receptor antagonizes the growth effects of the AT1 receptor: gain-of-function study using gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(23):10663-7.

Orth SR, Weinreich T, Bonisch S, Weih M, Ritz E. Angiotensin II induces hypertrophy and hyperplasia in adult human mesangial cells. *Exp Nephrol*. 1995;3(1):23-33.

Otsuka M, Takahashi H, Shiratori M, Chiba H, Abe S. Reduction of bleomycin induced lung fibrosis by candesartan cilexetil, an angiotensin II type 1 receptor antagonist. *Thorax*. 2004;59(1):31-8.

Page IH, Helmer OM. A crystalline pressor substance (angiotonin) resulting from the reaction between renin and renin-activator. *J Exp Med*. 1940;71:29-42.

Paizis G, Gilbert RE, Cooper ME, Murthi P, Schembri JM, Wu LL, Rumble JR, Kelly DJ, Tikellis C, Cox A, Smallwood RA, Angus PW. Effect of angiotensin II type 1 receptor blockade on experimental hepatic fibrogenesis. *J Hepatol*. 2001;35(3):376-85.

Paradis P, Dali-Youcef N, Paradis FW, Thibault G, Nemer M. Overexpression of angiotensin II type I receptor in cardiomyocytes induces

- cardiac hypertrophy and remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(2):931-6.
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(9):e45.
- Ramos ML, Gragnani A, Ferreira LM. Is there an ideal animal model to study hypertrophic scarring? *J Burn Care Res*. 2008;29(2):363-8.
- Ramos, MLC ; Gragnani A ; Ferreira, LM. Microarray as a new tool to study hypertrophic and keloid scarring. *Wounds. A Compendium of Clinical Research and Practice*, 2009.v. 21, p. 57-63,
- Rodriguez-Vita J, Sanchez-Lopez E, Esteban V, Ruperez M, Egado J, Ruiz-Ortega M. Angiotensin II activates the Smad pathway in vascular smooth muscle cells by a transforming growth factor-beta-independent mechanism. *Circulation*. 2005;111(19):2509-17.
- Silverstein P, Goodwin MN, Raulston GL, Pruitt B. Hypertrophic scar in the experimental animal. In: Longacre JJ - *The ultrastructure of collagen*. Springfield, IL: Thomas; 1976.
- Steckelings UM, Henz BM, Wiehstutz S, Unger T, Artuc M. Differential expression of angiotensin receptors in human cutaneous wound healing. *Br J Dermatol*. 2005;153(5):887-93.
- Steckelings UM, Wollschlager T, Peters J, Henz BM, Hermes B, Artuc M. Human skin: source of and target organ for angiotensin II. *Exp Dermatol*. 2004;13(3):148-54.
- Takami S, Katsuya T, Rakugi H, Sato N, Nakata Y, Kamitani A, Miki T, Higaki J, Ogihara T. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism is associated with increase of left ventricular mass but not with hypertension. *Am J Hypertens*. 1998;11(3 Pt 1):316-21.

Takeda H, Katagata Y, Hozumi Y, Kondo S. Effects of angiotensin II receptor signaling during skin wound healing. *Am J Pathol.* 2004;165(5):1653-62.

Viswanathan M, Saavedra JM. Expression of angiotensin II AT2 receptors in the rat skin during experimental wound healing. *Peptides.* 1992;13(4):783-6.

Weber KT, Sun Y, Campbell SE. Structural remodelling of the heart by fibrous tissue: role of circulating hormones and locally produced peptides. *Eur Heart J.* 1995;16 Suppl N:12-8.

Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol.* 2008;214(2):199-210.

Xie Y, Zhu KQ, Deubner H, Emerson DA, Carrougher GJ, Gibran NS, Engrav LH. The microvasculature in cutaneous wound healing in the female red Duroc pig is similar to that in human hypertrophic scars and different from that in the female Yorkshire pig. *J Burn Care Res.* 2007;28(3):500-6.

Yamada T, Kuno A, Masuda K, Ogawa K, Sogawa M, Nakamura S, Ando T, Sano H, Nakazawa T, Ohara H, Nomura T, Joh T, Itoh M. Candesartan, an angiotensin II receptor antagonist, suppresses pancreatic inflammation and fibrosis in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;307(1):17-23.

Zhu KQ, Carrougher GJ, Couture OP, Tuggle CK, Gibran NS, Engrav LH. Expression of collagen genes in the cones of skin in the Duroc/Yorkshire porcine model of fibroproliferative scarring. *J Burn Care Res.* 2008;29(5):815-27.

Zhu KQ, Carrougher GJ, Gibran NS, Isik FF, Engrav LH. Review of the female Duroc/Yorkshire pig model of human fibroproliferative scarring. *Wound Repair Regen.* 2007;15 Suppl 1:S32-9.

Zhu KQ, Engrav LH, Armendariz R, Muangman P, Klein MB, Carrougher GJ, Deubner H, Gibran NS. Changes in VEGF and nitric oxide after deep dermal injury in the female, red Duroc pig-further similarities between female, Duroc scar and human hypertrophic scar. *Burns.* 2005;31(1):5-10.

Zhu KQ, Engrav LH, Gibran NS, Cole JK, Matsumura H, Piepkorn M, Isik FF, Carrougher GJ, Muangman PM, Yunusov MY, Yang TM. The female, red Duroc pig as an animal model of hypertrophic scarring and the potential role of the cones of skin. *Burns.* 2003;29(7):649-64.

Zhu KQ, Engrav LH, Tamura RN, Cole JA, Muangman P, Carrougher GJ, Gibran NS. Further similarities between cutaneous scarring in the female, red Duroc pig and human hypertrophic scarring. *Burns.* 2004;30(6):518-30.

NORMAS ADOTADAS

- ICMJE – International Committee of Medical Journals Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journal. Disponível no endereço eletrônico: <http://www.icmje.org>.
- Goldenberg S. Orientação Normativa para Elaboração e Difusão de Trabalhos Científicos. São Paulo: 2001. Disponível em: <http://www.metodologia.org>

ABSTRACT

Introduction: Hypertrophic scar is a result of a complex interaction between blood and skin cells that is mediated by anti and pro inflammatory molecules, cytokines, growth factors, hormones and vitamins. It seems that angiotensin system, related to fibrosis in other organs, is one group of molecules related to hypertrophic scar pathophysiology. **Purpose:** To determine participation of angiotensin system and some of its molecules – angiotensinogen (AGTN), angiotensin II receptor type 1 (AT1) and type II (AT2) – in animal model of hypertrophic scarring. **Methods:** Five shallow and five deep wounds were created on the back of three Duroc (study group with fibroproliferative scars) and three Yorkshire pigs (control group with nonproliferative scars) Wounds were biopsied at 1, 2, 3, 12 e 20 weeks and immunohistochemistry and qRT-PCR were performed. Gene expression of AGTN, AT1 and AT2 in deep wounds were normalized to shallow wounds, to put in evidenced differentially expressed genes in hypertrophic scar when compared to normal healing. **Results:** Epidermis, dermis, skin appendages and capillary vessels were positive stained for AT1 and AT2 during time. Relative expression of AT2 was significantly overexpressed at 2 and 3 week after wounds creation Yorkshire pigs. There was not significant different expression for AGTN or AT1 in this animal model during time. **Conclusion:** AT1 and AT2 are expressed in skin cells in this hypertrophic scar animal model. Overexpression of AT2 in Yorkshire pigs could be interpreted as a possible cause of nonfibroproliferative scar formation in these pigs.

APÊNDICES

IMUNO-HISTOQUÍMICA

As lâminas foram deparafinizadas com *Histo-Clear*®, um substituto do xilol, (*National Diagnostics, Atlanta, GA, EUA*) e rehidratadas imersas por 5 min em banhos de etanol em concentrações decrescentes (100%, 95% e 70%). Em seguida foram incubadas por 30 min numa solução de 0,3% de peróxido de hidrogênio para bloqueio da atividade da peroxidase. As lâminas foram lavadas gentilmente com tampão de solução salina tris (TBS: 0,5M solução tris - pH 7,6 e 0,9% NaCl) e incubadas em soro de cabra a 1% (*SigmaAldrich, St. Louis, MO, EUA*) e albumina bovina a 1% (*SigmaAldrich, St. Louis, MO, EUA*) por 30 min. O excesso foi eliminado secando-se as bordas das lâminas uma a uma com lenço de papel. Anticorpos primários foram incubados por 60 min em temperatura ambiente numa câmara úmida. Os anticorpos para receptores de angiotensina II tipo 1 (AT1), (N-10, sc-1173, 200 µg/ml) e tipo II (AT2), (H-143, sc-9040, 200 µg/ml) são policlonais IgG anti-coelho (*Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA*). Os anticorpos AT1 e AT2 são específicos para camundongo, rato e humano. Foi necessário procedimento de recuperação antigênica para AT2 colocando-se as lâminas em frasco refratário na estufa a 120°C por 20 min. Foi realizado controle positivo destes anticorpos em rim de rato, tecido sabidamente rico em receptores de angiotensina II.

O anticorpo secundário foi de cabra anti-coelho biotilado (*Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA*) e foi usado na diluição 1:400 durante 30 min, seguido pelo complexo estreptavidina/biotina (*SABC Kit, Zymed Laboratories, San Francisco, CA, EUA*) por 30 min. As lâminas foram marcadas para imuno-reatividade usando como cromógeno 3,3'diaminobenzidine a 0,06% (*SigmaAldrich, St. Louis, MO, EUA*) por 20 min. Foi usada uma lâmina para cada anticorpo. Havia dois cortes de tecido em cada lâmina, uma delas para controle negativo com IgG de soro de coelho (*SigmaAldrich, Saint Lois, MO, EUA*). Depois de lavar as lâminas com TBS a 1%, elas foram mergulhadas em hematoxilina por 2 s e abundantemente lavadas em água deionizada. As lâminas foram desidratadas por banhos sucessivos de etanol graduado (70%, 95% e 100%) e *Histo-Clear*®, e montadas com *Histomount*®, um meio de montagem de lâminas, (*National Diagnostics, Atlanta, GA, EUA*).

EXTRAÇÃO DE ARN

Utilizando-se uma vasilha congelada sobre um leito de nitrogênio líquido, cerca de 100 mg de tecido cicatricial proveniente de cada biópsia, previamente armazenado a -196°C, foi triturada com um pilão de porcelana também congelado a -80°C. Este triturado foi transferido para um tubo de polipropileno de 5 ml e homogeneizado com 1 ml de TRIzol® (solução monofásica de fenol e isocianato de guanidina - *Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA*) para cada 50 a 100 mg de amostra, conforme protocolo do fabricante, seguindo método baseado em CHOMCZYNSKI & SACCHI (1987). O TRIzol® rompe a célula mantendo a integridade do ARN. O material resultante foi transferido para um tubo tipo *Eppendorf* de 2 ml

mantido em temperatura ambiente (15°C a 30°C) por 5 min para permitir dissociação completa dos complexos núcleo-protéicos. A este homogeneizado foram adicionados 200 µl de clorofórmio para cada 1 ml de TRIzol®. Os tubos foram agitados vigorosamente por 15 s e incubados por 2 a 3 min em temperatura ambiente. Os tubos foram levados para a centrífuga refrigerada numa rotação de 11600 g por 15 min a 4°C. Após a centrifugação a mistura se separou em três fases: uma fase no fundo do tubo, vermelho clara, mistura de fenol e clorofórmio contendo ADN total, uma fase intermediária, fina esbranquiçada, contendo proteína total e uma fase aquosa na superfície, onde se encontra o ARN. O volume da fase aquosa foi cerca de 60% do volume de TRIzol® usado para a homogeneização da amostra.

A fase aquosa, cerca de 600 µl, foi transferida para um novo tubo livre de ARNase de 1,5 ml e a ela foi adicionado 0,5 x do volume total da amostra de isopropanol a 100%, cerca de 300 µl, para precipitação do ARN. O tubo foi então misturado gentilmente, invertendo-o dez vezes. As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 10 min e posteriormente centrifugadas a 11600 g por 10 min. a 4°C. O sobrenadante foi removido e um *pellet* detectado no fundo de cada tubo. O *pellet* foi lavado com 1 ml de etanol a 75%, diluído em água livre de ARNase (*Qiagen, Valencia, CA, EUA*) para cada ml de TRIzol® usado na homogeneização inicial e a mistura foi centrifugada a 7500 g por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o tubo foi seco em ar ambiente por 5 min. O *pellet* foi então dissolvido em 100 µl de água livre de ARNase e a amostra foi aquecida a 60°C por 10 min e posteriormente congelada a -80°C até sua utilização subsequente.

PURIFICAÇÃO DE ARN

Uma vez obtido ARN das amostras o mesmo foi purificado e quantificado, para remoção das ARN polimerases, ligases e nucleotídeos livres. Para purificação do ARN extraído das amostras foi utilizado o *RNeasy Mini Kit*®, (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). As amostras que estavam estocadas a -80°C foram resfriadas em gelo. Foi adicionado 350 µl do tampão RLT, e misturado com a pipeta. Adicionou-se 250 µl de etanol a 100% ao ARN diluído no tampão RLT, e novamente misturado com a pipeta. A amostra, agora com cerca de 700 µl, foi colocada numa mini-coluna do kit *Rneasy* sobre um tubo coletor de 2 ml. Este conjunto de mini-coluna e tubo coletor foi levado fechado à centrífuga a 8000 g por 15 s. O fluxo e o tubo coletor foram descartados. O tratamento com ADNase foi o seguinte: foi pipetado 350 µl de tampão RW1 na mini-coluna e centrifugado a 8000 g por 15 s e após centrifugação o fluxo foi descartado. Na membrana de sílica gel da mini-coluna foram cuidadosamente aplicados 80 µl de uma solução estoque de 10 µl ADNase (previamente diluída em tampão livre de ARNase), acrescida de 70 µl de tampão RDD, e incubado por 15 min em temperatura ambiente. Depois deste período foram adicionados 350 µl de tampão RW1 à mini-coluna e o tubo foi centrifugado a 8000 g por 15 s e o fluxo foi descartado. A mini-coluna foi transferida para um novo tubo coletor de 2 ml e foram adicionados 500 µl de tampão RPE. O tubo foi gentilmente fechado e centrifugado a 8000 g por 15 s para lavar a coluna. O fluxo foi descartado e o tubo reutilizado adicionando-se mais 500 µl de tampão RPE à mini-coluna e centrifugado a 8000 g por 2 min. Esta etapa garante que não haverá etanol carregado durante a eluição do ARN. A mini-coluna foi colocada num novo tubo coletor de 2 ml e centrifugada em velocidade máxima por 1 min, com a tampa do tubo

coletor aberta. Para eluição do ARN, a mini-coluna foi transferida para um novo tubo coletor de 1,5 ml e adicionados 30 μ l de água livre de ARNase diretamente na membrana de sílica gel da mini-coluna. O tubo foi fechado e centrifugado a 8000 g por 1 min.

Tabela 2 – Quantificação de mARN por amostra nas porcas Yorkshire. (Y4, Y5, Y6 são as identificações das porcas Yorkshire; S = semana; M = Meses; R = ferida rasa e P = ferida profunda)

	Peso biópsia mg	OD 260	razão 260/280	Concentração ug/ml	Diluição
Y4.1SR	124	0,218	2,12	610,4	70
Y5.1SR	116	0,148	2,12	414,4	70
Y6.1SR	127	0,043	1,89	120,4	70
Y4.1SP	114	0,057	2,18	150,48	66
Y5.1SP	134	0,424	2,03	1187,2	70
Y6.1SP	93	0,313	2,06	876,4	70
Y4.2SR	104	0,085	2,12	238	70
Y5.2SR	102	0,082	2,178	229,6	70
Y6.2SR	125	0,053	1,96	139,92	66
Y4.2SP	120	0,094	2,11	248,16	66
Y5.2SP	91	0,034	2,9	89,76	66
Y6.2SP	116	0,042	3,1	110,88	66
Y4.3SR	117	0,055	2,07	145,2	66
Y5.3SR	127	0,031	2,09	81,84	66
Y6.3SR	127	0,096	2,29	253,44	66
Y4.3SP	128	0,117	2,19	308,88	66
Y5.3SP	119	0,554	1,98	731,28	33
Y6.3SP	114	0,079	2,07	104,28	33
Y4.3MR	132	0,082	2,11	229,6	70
Y5.3MR	113	0,136	2,1	380,8	70
Y6.3MR	133	0,148	2,06	414,4	70
Y4.3MP	127	0,139	2,02	389,2	70
Y5.3MP	191	0,146	1,98	192,72	33
Y6.3MP	102	0,41	1,91	541,2	33
Y4.5MR	128	0,098	1,98	274,4	70
Y5.5MR	126	0,134	1,95	375,2	70
Y6.5MR	120	0,037	1,95	103,6	70
Y4.5MP	195	0,35	2,05	980	70
Y5.5MP	184	0,102	1,9	134,64	33
Y6.5MP	195	0,222	2,07	621,6	70

Tabela 3 – Quantificação de mRNA por amostras de porcas Duroc. . (P10, P11 e P12 são as identificações das porcas Duroc; S = semana; M = Meses; R = ferida rasa e P = ferida profunda)

	Peso biópsia mg	OD 260	260/280	Concentração ug/ml	Diluição
P10.1SR	100	0,207	1,927	828	100
P11.1SR	90	0,202	1,9651	808	100
P12.1SR	85	0,215	2,04	860	100
P10.1SP	120	0,33	2,05	1188	90
P11.1SP	120	0,256	2,03	921,6	90
P12.1SP	100	0,258	2,05	928,8	90
P10.2SR	85	0,175	1,969	700	100
P11.2SR	111	0,23	2,0052	920	100
P12.2SR	115	0,115	2,0636	460	100
P10.2SP	95	0,42	2,01	1512	90
P11.2SP	92	0,25	2,01	900	90
P12.2SP	120	0,224	2,05	806,4	90
P10.3SR	109	0,198	1,9451	792	100
P11.3SR	112	0,163	2,06	652	100
P12.3SR	102	0,074	1,8822	296	100
P10.3SP	198	0,609	2,04	1705,2	70
P11.3SP	206	0,338	2,02	946,4	70
P12.3SP	126	0,149	2,12	417,2	70
P10.3MR	114	0,04	2,1968	160	100
P11.3MR	120	0,222	2,07	621,6	70
P12.3MR	118	0,067	2,2085	268	100
P10.3MP	210	0,038	2,202	152	100
P11.3MP	200	0,028	1,88	56	50
P12.3MP	200	0,113	2,1	226	50
P10.5MR	121	0,089	2,1993	356	100
P11.5MR	120	0,09	2,1127	360	100
P12.5MR	125	0,04	1,84	160	100
P10.5MP	230	0,259	2,04	725,2	70
P11.5MP	200	0,299	2	837,2	70
P12.5MP	143	0,399	2,04	1117,2	70



Figura 18. Aspecto macroscópico de feridas de porca Duroc 10 após 20 semanas da criação das feridas.



Figura 19. Aspecto macroscópico de feridas de porca Duroc 11 após 20 semanas da criação das feridas.



Figura 20. Aspecto macroscópico de feridas de porca Duroc 12 após 20 semanas da criação das feridas.

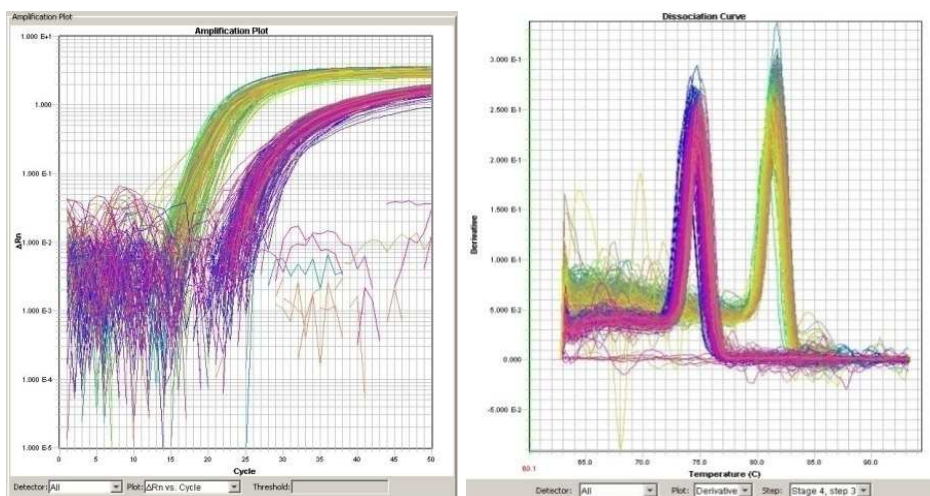


Figura 21. A - Curva de amplificação de AT1e GAPDH. B - Curvas de dissociação para AT1 e GAPDH.

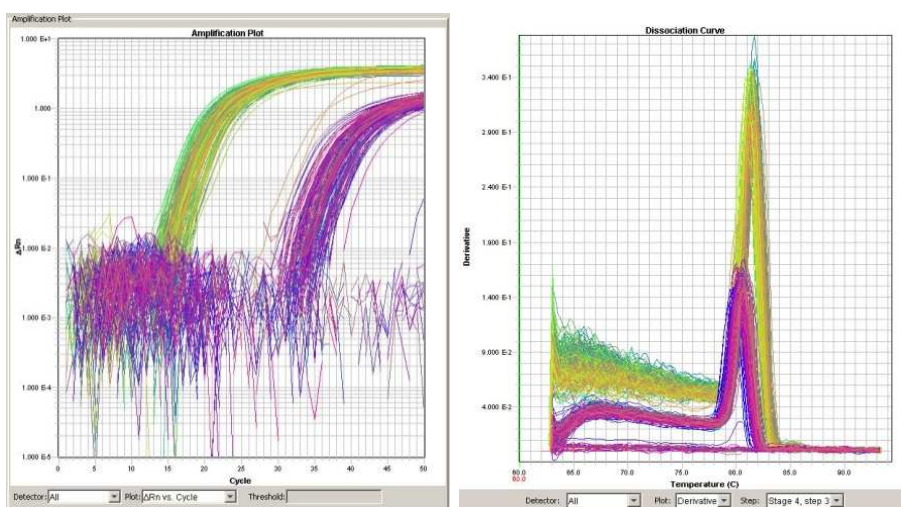


Figura 22. A - Curva de amplificação de AT2.e GAPDH B - Curva de dissociação para AT2 e GAPDH.

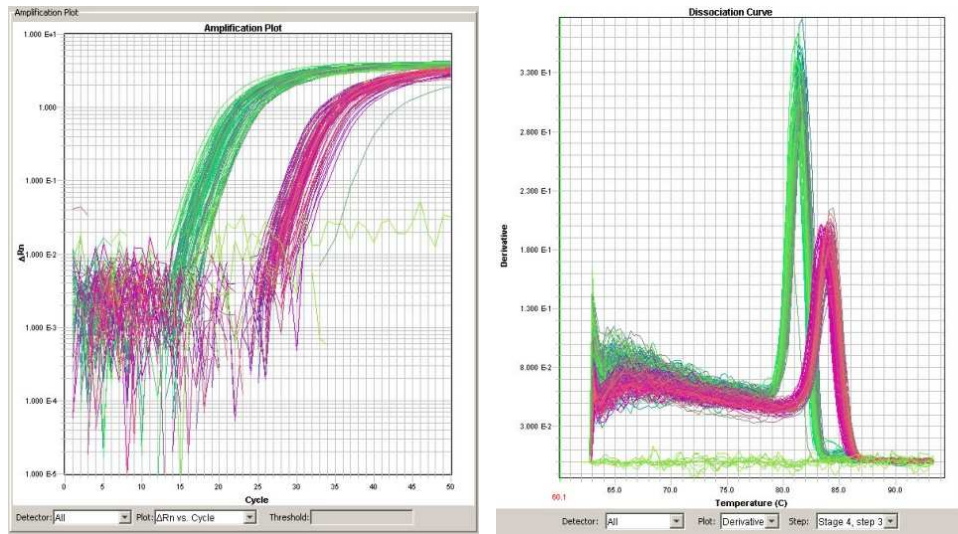


Figura 23. A - Curva de amplificação para AGTN e GAPDH. B – Curva de dissociação para AGTN e GAPDH.

ANEXOS



UNIVERSITY OF WASHINGTON
INSTITUTIONAL ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE

NOTE: THIS LETTER IS NOT TO BE SENT TO ANY FUNDING AGENCY OR UW OSP. This letter only applies to the IACUC Protocol listed below and does not constitute evidence that the work in a particular grant or contract application has been reviewed and approved by the IACUC.

April 27, 2009

To: Loren Engrav
Surgery
BOX 359796

From: Adrienne Buesa, IACUC Program Coordinator

SUBJECT: **Notice of Institutional Animal Care and Use Committee Approval of Annual Renewal**

Please Note: You are the only recipient of this notice. Please forward copies to any other individuals who may need this information.

The protocol description attached and this letter serves as written notice of animal use approval by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC).

Please note the approval and expiration date listed. All animal use protocols must be renewed annually from the date of IACUC approval, independent of project or funding dates. Please refer to the assigned protocol number for all animal orders and future correspondence with the IACUC.

As you review your protocol description summaries, please advise us of any necessary corrections or revisions by noting the changes in red and returning the summary to Adrienne Buesa, at Box 357160.

If you have any questions, feel free to contact me at: 685-7363.

Protocol Number: 2322-04
Protocol Title: Thick Scarring in the Duroc Pig
Protocol Approval Date: 04-27-2009
Protocol Expiration Date: 05-08-2010

FONTES CONSULTADAS

DeCS Descritores em Ciências da Saúde [base de dados na Internet]. São Paulo: BIREME; [citado 2005 Nov 17]. Disponível em: <http://decs.bvs.br/>

Ferreira LM, Goldenberg S, Nahas FX, Barbosa MVJ, Ely PB, Blanes L, Bretos JLG. Orientação Normativa para Elaboração e Apresentação de Teses. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica – UNIFESP. 2008

Houaiss A. Dicionário eletrônico Houaiss da língua portuguesa 1.0 [CD-ROM]. Rio de Janeiro: Objetiva; 2001.