

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia e Biofísica

Pedro William Machado de Almeida

Mecanismos envolvidos no efeito cardioprotetor da
Ang-(1-7) em ratos submetidos ao modelo de hipertensão
DOCA-Sal

Belo Horizonte
2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

PEDRO WILLIAM MACHADO DE ALMEIDA

Mecanismos envolvidos no efeito cardioprotetor da
Ang-(1-7) em ratos submetidos ao modelo de hipertensão
DOCA-Sal

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências. Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sílvia Guatimosim

Belo Horizonte
2010

DEDICATÓRIA

A Deus e Nossa Senhora,

Por sempre me abençoar e iluminar meu caminho.

À minha família (Pai, Mãe, Bruno, tia Nega)

Por ser a minha maior alegria e pela dedicação de todos ao longo da vida.

À Mariana,

Pelo amor, paciência e companheirismo nas horas mais difíceis. Obrigado por tudo. Sem você esta conquista não seria possível. (metade dela é sua).

A todos os meus verdadeiros amigos,

Que sempre me ajudaram e torceram por mim.

AGRADECIMENTOS

A Silvia,

Pela oportunidade, pelos ensinamentos transmitidos, confiança depositada, pela amizade e por ser a minha grande referência.

Ao Fabrício,

Meu irmão, sempre me direcionando e me auxiliando em todos os momentos, Muito obrigado!

Ao Ricardo,

Obrigado pela amizade e por todos os ensinamentos passados, sem a sua ajuda nada disso seria possível.

Ao Léo,

Pela lealdade e por me acompanhar nessa difícil trajetória sempre incentivando e auxiliando nos momentos mais difíceis, (essa vitória é nossa).

Ao Rodrigo Resende,

Obrigado pela sua amizade e disponibilidade sempre.

Ao Carlos e ao Clóvis,

Por cuidarem do meu corpo e da minha mente. Obrigado pela torcida.

A toda a família eletrocel, cada um com sua peculiaridade,

Por fazerem do laboratório um ambiente tão agradável de trabalhar.

Aline, Enéas, Felipe, Marcinha, Amanda, Adriano, Sasha, Luciana, Maura, Marina, Diogo, Eder, Rafael, Cibele, Chris, Miguel, Leida, Lígia.

Ao laboratório de hipertensão,

Principalmente ao Marcos, professores Robson e Maria José pela disponibilidade, ensinamentos, discussões e a Nívia e ao Zézé pelos ensinamentos voltados aos procedimentos cirúrgicos.

Ao todos os membros do laboratório da professora Virgínia,

Obrigado!

A Bônia e Leide,

Obrigado pela ajuda.

Aos professores e amigos Ary, Guilherme, Emerson Sllami, Alessandra e Anderson

Pelo incentivo e amizade.

A todos os amigos que fiz no departamento

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- A260 = absorvância no comprimento de onda de 260 nanômetros
- AC= adenilato ciclase
- Akt- Proteína Kinase B
- AMPC = monofosfato cíclico de adenosina
- Ang II= Angiotensina II
- Ang -(1-7) =Angiotensina (1-7)
- ANP = peptídeo natriurético atrial
- BK = bradicinina
- β -MHC = cadeia pesada de miosina
- BSA = albumina de soro bovino (do inglês *Bovine Serum Albumin*)
- Ca^{2+} = íon cálcio
- CaMKII = calmodulina quinase II
- cDNA = DNA complementar
- DMEM = meio de cultura (do inglês *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)
- DNA= ácido desoxirribonucléico
- DNase = deoxirribonuclease
- DOCA= deoxicorticosterona
- ECA = Enzima Conversora de Angiotensina
- ECA2 = Enzima Conversora de Angiotensina 2
- EDTA-2Na = Ethylenediaminetetraacetic acid
- f = fator de diluição
- F/F0 = fluorescência máxima/fluorescência mínima
- %FE= Fração de ejeção
- %FE= Fração de encurtamento
- Fluo-4/AM = Flúor 4 aceto-metil-éster
- Gi/0 = proteína G inibitória
- HSP = Heat Shock Protein
- HRP = do inglês *horseradish peroxidase*
- IgG = imunoglobulina G
- ICa- Canal de cálcio tipo L
- KCl = cloreto de potássio
- MgCl₂ = cloreto de magnésio

M-MLV RT = *Minus Moloney murine leukemia virus-reverse transcriptase*
Na₄P₂O₇ x 10 H₂O = pirofosfato de sódio hidratado.
Na₃VO₄ = ortovanadato de sódio
NaCl = cloreto de sódio
NCX: trocador sódio/cálcio
NaF = fluoreto de sódio
NO= Óxido Nítrico
PA = pressão arterial
PAS=pressão arterial sistólica
PBS = tampão fosfato-salino (do inglês *Phosphate buffered saline*)
PBS-T = tampão fosfato-salino com tween20 (do inglês *Phosphate buffered saline tween-20*)
PCR = reação em cadeia de polimerase (do inglês *polymerase chain reaction*)
PFA = paraformaldeído
PKA = proteína quinase A
PKC= proteína quinase C
PKC α =proteína quinase C α
Pi=fosfato inorgânico
Promoter α -MHC= promotor de cadeia pesada de miosina
PI3K= fosfoinositol 3 quinase
PLN = fosfolamban
P-PLN = fosfolamban fosforilada
PMSF = Phenylmethylsulphonyl fluoride
PVDF = membrana de Polyvinylidene fluoride
PP= proteína fosfatase
PP1=proteína fosfatase 1
PP2A= proteína fosfatase 2^a
RNA = ácido ribonucleico
RNAm = RNA mensageiro
RNase = ribonuclease
RPM = rotações por minuto
RyR= receptor de rianodina
SD= Sprague-Dawley Hannover
SDS = dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE = gel de acrilamida (do inglês *sodium dodecyl (lauryl)*)

SERCA = ATPase- Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático

SR: retículo sarcoplasmático

SRA- Sistema Renina-Angiotensina

TG = transgênico

U.A = unidades arbitrárias

U.I = unidade internacional

VE= Ventrículo esquerdo

RESUMO

Evidências recentes têm sugerido que os benefícios da Ang-(1-7) no coração são mediados por seu receptor, Mas. No entanto, as vias de sinalização envolvidas neste processo são desconhecidas no cardiomiócito. Desse modo, o objetivo do nosso trabalho foi avaliar o mecanismo envolvido no efeito protetor da Ang (1-7) em ratos submetidos a 6 semanas de tratamento DOCA-Sal. No primeiro momento deste estudo avaliamos as respostas cardiovasculares e celulares em animais Sprague Dawley (SD) e transgênicos que superexpressam Ang-(1-7) no testículo com conseqüente aumento na concentração plasmática (TG) submetidos ao modelo DOCA-Sal. Observamos que animais SD quando submetidos ao tratamento DOCA-Sal, apresentaram um aumento na pressão arterial sistólica (PAS) em relação ao seu controle e que animais que superexpressam Ang-(1-7) no testículo apresentam um aumento menos pronunciado da PA em comparação ao seu controle. Constatamos através de ecocardiografia que animais TG DOCA apresentam uma redução da hipertrofia cardíaca, quando comparados aos animais SD DOCA. Esses resultados foram comprovados quando avaliamos os marcadores de estresse cardíaco, onde animais SD DOCA apresentaram re-expressão de genes fetais (ANP e β -MHC). Ao avaliarmos a função cardíaca de animais SD DOCA por ecocardiografia detectamos que estes animais apresentam um hiperdinamismo cardíaco, mas ainda assim eles se encontram na fase compensada da doença. Porém nossos resultados celulares indicaram que a progressão da doença está ocorrendo devido ao desbalanço na sinalização de Ca^{2+} e na expressão de proteínas envolvidas nessa sinalização. Interessante observar que estes parâmetros não estavam alterados nos animais TG DOCA. Depois de observado os benefícios da Ang-(1-7) através da redução da PA e dos efeitos diretos na sinalização de Ca^{2+} , questionamos se o efeito protetor da Ang-(1-7) no rato TG DOCA poderia ser explicado apenas pela redução na pressão desses animais. Para responder essa pergunta, foram criados dois grupos de tratamento DOCA-sal com PA similares ao grupo TG DOCA. Grupo de ratos SD PAC, tratados com uma dose inferior de DOCA e SD HIDRALAZINA, tratados com a mesma dose de DOCA dos animais TG DOCA. Nossos resultados mostraram que animais que receberam uma dose menor de DOCA (SD PAC), apresentaram poucas alterações nos parâmetros avaliados por ecocardiografia (hipertrofia e função) e poucas alterações na sinalização de Ca^{2+} . Já animais que receberam a mesma dose de DOCA e foram tratados com hidralazina (SD HIDRALAZINA), apresentaram resultados similares aos obtidos em ratos SD DOCA, sugerindo assim que o responsável pelas alterações cardiovasculares observadas seja o mineralocorticoide. Podemos concluir,

através dos dados obtidos no presente estudo, que a superexpressão da Ang-(1-7) nos animais transgênicos submetidos ao modelo DOCA-Sal, exerce além de efeitos pressóricos, também um efeito local no coração prevenindo diferentes etapas do remodelamento patológico.

Palavras chaves: DOCA-Sal, Ang-(1-7), cardiomiócitos, sinalização de Ca^{2+}

Abstract

Recently there has been growing evidence suggesting that beneficial effects of angiotensin-(1-7) in the heart are mediated by its receptor Mas. However, the signaling pathways involved in these effects in cardiomyocytes are unknown. The aim of our study was to evaluate the mechanism underlying the protective effect of Ang (1-7) in rats subjected to 6 weeks of DOCA-salt treatment. At first in this study we evaluated the cardiovascular and cellular responses in Sprague Dawley (SD) and transgenic rats that overexpress Ang-(1-7) in the testis (TG) subjected to DOCA-salt model. SD DOCA rats, showed an increase in SBP compared to their controls, however TG DOCA rats presented less pronounced increase in SBP. Echocardiography studies showed that TG DOCA animals present reduced cardiac hypertrophy, when compared to SD DOCA rats. These results were confirmed by real time PCR studies showing the upregulation of cardiac stress markers (ANF and β -MHC) in SD DOCA rats, but not in TG DOCA rats. By echocardiography we also observed that SD DOCA rats present a hyperdynamic heart, yet they are in the offset phase of the disease. However, our results indicate that at the cellular level the progression of the disease is occurring, due to the Ca^{2+} signaling dysfunction observed in cardiac cells from SD DOCA hearts. Interestingly, all these parameters were not altered in TG DOCA rats. Taken together, our data shows that overexpression of Ang-(1-7) in TG rats protects these animals against DOCA-salt pathological remodeling, however a question remains whether the Ang-(1-7) cardioprotective effects were due to the reduced BP in TG DOCA rats. In order to answer this question were developed two groups of DOCA-salt treated rats that with BP maintained at levels similar to TG DOCA rats. SD controlled arterial blood pressure (CABP) rats that received a lower dose of DOCA than TG DOCA rats, and SD hydralazine treated rats. SD HYDRALAZINE group received the same dose of DOCA as TG DOCA rats, in addition to hydralazine. Our results showed that animals that received a lower dose of DOCA (SD CABP) showed fewer changes in all parameters evaluated by echocardiography (hypertrophy and cardiac function), and by confocal studies, when compared to TG DOCA rats. In contrast, rats from Hydralazine treated group present a pattern of responses quiet similar to SD DOCA group, suggesting that the mineralocorticoid is the mainly responsible for cardiovascular changes the observed in the DOCA-salt model. Therefore, we can conclude from the results obtained in this study that overexpression of Ang-(1-7) in transgenic rats subjected to the DOCA-salt model exerts besides a pressor effect, a local effect in the heart at various stages of pathologic remodeling.

1. INTRODUÇÃO

1.1-Sistema Renina-Angiotensina e o sistema cardiovascular

O sistema renina-angiotensina (SRA) tem um papel vital na regulação de processos fisiológicos do sistema cardiovascular, não apenas funcionando como um sistema endócrino, mas também com funções parácrinas e autócrinas nos tecidos e órgãos (MEHTA e cols., 2006).

Este sistema tem mostrado ter participação no surgimento de doenças cardiovasculares como hipertensão, doenças coronarianas, miocardites e insuficiência cardíaca (DOSTAL e cols., 1999). Os dois principais peptídeos ativos deste sistema são a angiotensina II (Ang-II) e a angiotensina 1-7 (Ang-(1-7)), os quais exercem ações, na maioria das vezes, antagônicas sobre a fisiologia cardiovascular (MACHADO e cols, 2000; KOSTENIS e cols., 2005), podendo exercer papel fundamental no surgimento da hipertensão essencial (BENTER e cols., 1995).

Os mecanismos de controle e degradação desses peptídeos são importantes na determinação dos efeitos fisiológicos finais. Na visão clássica, um octapeptídeo, Ang II é formado a partir da clivagem enzimática do angiotensinogênio em angiotensina I (Ang I) pela ação da renina, com subsequente conversão da Ang I em Ang II pela enzima conversora de angiotensina (ECA). Na visão moderna, este sistema possui outras enzimas, que levam a formação de uma via contrarregulatória tendo a Ang-(1-7) como um peptídeo com ações, na maioria das vezes, protetoras e antagônicas à Ang II (SANTOS e cols., 2008) (Figura 1).

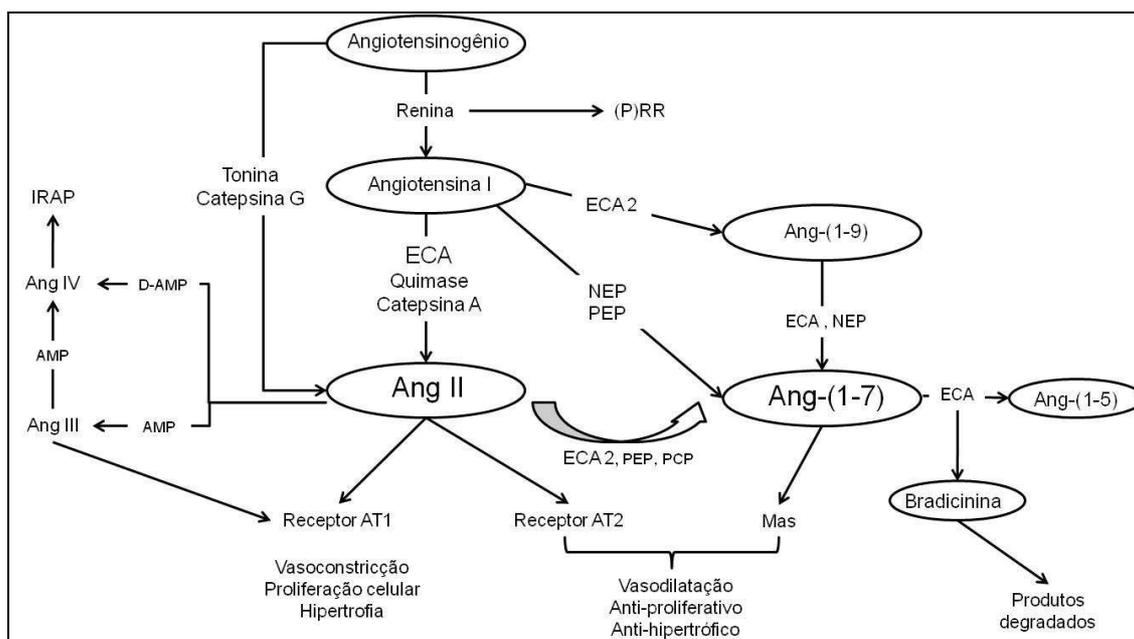


Figura 1 - Visão moderna do Sistema Renina-Angiotensina.. ECA: Enzima Conversora de Angiotensina; Ang: Angiotensina; AMP: Aminopetidase; DAMP: Dipeptidil-Aminopectidase; IRAP: Aminopectidase Insulina-Regulatória; PCP: Prolil-carboxipeptidase; PEP: Prolil-endopectidase; NEP: Endopeptidase Neutra; P(RR): Receptor da Renina/Pró-Renina (Adaptado de SANTOS e cols, 2008).

A Ang II, peptídeo classicamente conhecido deste sistema promove ações hipertensivas nos diferentes sistemas fisiológicos. Nos estudos de Bono e colaboradores (1962), a infusão endovenosa deste peptídeo em indivíduos normotensos sadios promoveu aumento na pressão arterial de repouso, sendo este aumento 50 vezes maior que o mesmo experimento com infusão de noradrenalina. No sistema nervoso central a Ang II estimula a área rostral ventrolateral do bulbo (área pressora) (ANDREATTA e cols., 1988) e facilita a liberação de noradrenalina pelas terminações nervosas simpáticas, exercendo uma comunicação de feedback positivo entre sistema nervoso simpático e o sistema renina-angiotensina (FAGARD e cols., 1984). Outro mecanismo hipertensor utilizado pela Ang II é o aumento do volume sanguíneo que, pode se dar de três formas: 1- estimulando a hipófise posterior à liberar ADH, que atua reabsorvendo água nos túbulos distais via receptor V2, sendo também um potente vasoconstritor via receptor V1; 2- estimulando à liberação de aldosterona na supra-renal e 3- interferindo no comportamento, atuando no órgão subfornical aumentando o apetite por sódio e água (FERRARIO e cols.,

1988). Nos tecidos periféricos a Ang II promove redução da sensibilidade dos barorreceptores, o que reduz a eficácia no controle da variação da pressão arterial a cada ciclo cardíaco (OPARIL e cols., 1988).

1.1.1- Angiotensina-(1-7)

A via de formação da Ang-(1-7) tem sido explorada nos últimos anos e, apesar de várias enzimas formarem a Ang-(1-7), a Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ECA 2) parece ser a principal enzima formadora deste peptídeo (TIPNIS e cols., 2000; DONOGHUE e cols., 2000).

A Ang-(1-7) foi vista por muito tempo como um peptídeo inativo do SRA (GREENE e cols, 1982), entretanto, no final da década de 80 esta visão foi mudada através de alguns estudos. Em 1988, Schiavone e colaboradores mostraram que, a Ang-(1-7) aumenta a liberação de vasopressina pela neuro-hipófise. Em 1989, Campagnole-Santos e colaboradores, verificaram que microinjeções de baixas doses de Ang-(1-7) no núcleo do trato solitário promovem queda da pressão arterial. Desde então, diversos estudos mostraram que, a Ang-(1-7) é um importante peptídeo ativo deste sistema.(FERREIRA e cols., 2004 ; SANTOS e cols., 2004 ; GROBE e cols., 2006).

Dentre as ações cardiovasculares da Ang-(1-7) podemos citar o aumento da sensibilidade do barorreflexo (CAMPAGNOLE-SANTOS e cols., 1992), potencialização do efeito vasodilatador da bradicinina (PAULA e cols., 1995; ABBAS e cols., 1997; FERNANDES e cols., 2005) levando a liberação de NO (PORSTI e cols., 1994; BROSNIHAN e cols., 1996; MACHADO e cols., 2001; HEITSCH e cols., 2001).

Apesar dos mecanismos vasodilatadores da Ang-(1-7) terem sido destacados, é importante ressaltar que, dados da literatura mostram apenas um ligeiro efeito hipotensor da Ang-(1-7) em animais *in vivo* (SAMPAIO e cols., 2003). Estes estudos mostram um possível papel da Ang-(1-7) na elevação do débito cardíaco, promovendo uma alteração mais discreta dos níveis

pressóricos. Estes resultados ainda são controversos, pois, os estudos de Braga e colaboradores (2002) mostram que, a Ang-(1-7) promove bradicardia. Além disso, Santos e colaboradores (2007) mostraram que, animais que superexpressam Ang-(1-7) apresentam aumento do volume de ejeção e do débito cardíaco, além de redução da resistência periférica total.

1.2 Sistema Renina-Angiotensina e o coração

A presença de um SRA tecidual foi primeiramente descrita no rim (KIMBROUGH e cols., 1977) e, posteriormente, nos vasos sanguíneos (DZAU e cols., 1988) e no coração (RE, 1987). Nesse sentido, alguns estudos mostram que, o tecido cardíaco tem alta eficiência em captar da circulação enzimas e componentes do SRA. (MULLER e cols., 1998). Entretanto, diversos estudos mostram que todos componentes do SRA podem ser sintetizados pelo próprio tecido cardíaco (CAMPBELL, 1987; LINDPAINTER e cols., 1990; SCHUNKERT e cols., 1990) e a síntese de enzimas como a renina no coração está aumentada em condições patológicas, como no infarto do miocárdio (CLAUSMEYER e cols., 1998). A descoberta de outras enzimas no coração, como as quimases que, convertem a Ang I diretamente em Ang II, representam uma via alternativa a da ECA presente neste órgão (CAREY & SIRAGY, 2003). Esta via alternativa parece ser importante para indivíduos que utilizam inibidores da ECA, pois, a disponibilidade de Ang II no coração parece ser essencial para formação da Ang-(1-7). Neste sentido, tem-se demonstrado que a ECA 2 parece utilizar principalmente a Ang II como substrato para formação de Ang-(1-7) no coração (DONOGHUE e cols., 2000; TIPNIS e cols., 2000).

As ações da Ang II no coração são mediadas pelos receptores AT₁ e AT₂. Via receptor AT₁, a Ang II contribui diretamente para os efeitos deletérios no remodelamento cardíaco, tendo papel importante no processo de hipertrofia (SENBONMATSU, 2003), arritmias (FERREIRA e cols., 2001) e fibrose (SADOSHIMA e cols., 1993; BRILLA e cols., 1994). Via receptor AT₂, a Ang II promove efeitos antagônicos como vasodilatação (TSUTSUMI e cols., 1999), inibição da proliferação celular e apoptose induzida pela estimulação dos

receptores AT₁ (STOLL e cols., 1995; TANAKA e cols., 1995). Estes efeitos parecem ser mediados pela formação de cininas, NO e cGMP (TSUTSUMI e cols., 1999). Entretanto, os efeitos da Ang II via receptor AT₂ ainda são controversos.

1.2.1 Angiotensina -(1-7)

A síntese local de Ang-(1-7) no coração foi primeiramente detectada em cães após isquemia aguda do miocárdio (SANTOS e cols., 1990). Desta forma, surgiam as primeiras evidências de que o dano tecidual cardíaco é um estímulo para formação local de um sistema contra-regulatório mediado pela Ang-(1-7), sendo a ECA 2, a principal enzima envolvida na formação deste peptídeo no coração (CRACKOWER e cols., 2002). A expressão da ECA 2 apresenta-se aumentada em coração infartado (SANTOS e cols., 2005) e a deleção gênica ou a superexpressão da ECA 2 mostrou que essa enzima tem papel crucial na manutenção da estrutura e função cardíaca (CRACKOWER e cols., 2002; DIEZ-FREIRE e cols., 2006; GURLEY e cols., 2006).

Em 2003 Zisman e colaboradores, mostraram que a Ang-(1-7) está presente no miocárdio, especialmente após o infarto, e sua formação parece ser dependente da presença da Ang II como substrato. Desde então, diversos estudos têm mostrado que, além de inibir o efeito pressor sistêmico, a Ang-(1-7) inibe os efeitos deletérios locais da Ang II (FERRARIO e cols., 1997; GROBE e cols., 2006; GIANI e cols., 2007). Em 2005, Mendes e colaboradores constataram que, a Ang-(1-7) reduz os níveis teciduais de Ang II, o que foi confirmado recentemente com animais que superexpressam Ang-(1-7) (NADU e cols., 2006).

Os mecanismos pelos quais a Ang-(1-7) contrapõe as ações da Ang II ainda não estão estabelecidos. Os poucos estudos da literatura sugerem que, este peptídeo exerce este papel cardioprotetor por diferentes mecanismos que envolvem: (i) potencialização da vasodilatação coronariana via bradicinina e óxido nítrico (BROSNIHAN e cols., 1996), (ii) redução das concentrações de

Ang II no miocárdio (MENDES e cols., 2005), (iii) *down-regulation* do receptor AT_1 e (iv) redução de sua expressão gênica (CLARK e cols., 2001)

A ação local da Ang-(1-7) especificamente no coração tem sido proposta em diversos trabalhos. Dentre estes, recentemente Grobe e colaboradores (2006) mostraram que, a Ang-(1-7) previne o surgimento de fibrose cardíaca sem alteração dos níveis pressóricos sistêmicos de ratos hipertensos. Sendo assim, o coração tem sido considerado um dos principais alvos de estudo das ações da Ang-(1-7).

Em 2001, Ferreira e colaboradores mostraram que, a Ang-(1-7) diminui a duração do período de arritmia durante a reperfusão do miocárdio após o colapamento da coronária esquerda e melhora a contratilidade cardíaca nestas condições. Santos e colaboradores em 2004, utilizando animais transgênicos que superexpressam Ang-(1-7) no testículo com conseqüente aumento de sua concentração no plasma, mostraram melhora significativa de todos os parâmetros da função cardíaca após a isquemia aguda do miocárdio. As principais ações da Ang-(1-7) no coração estão apresentadas na figura 2 de maneira resumida.

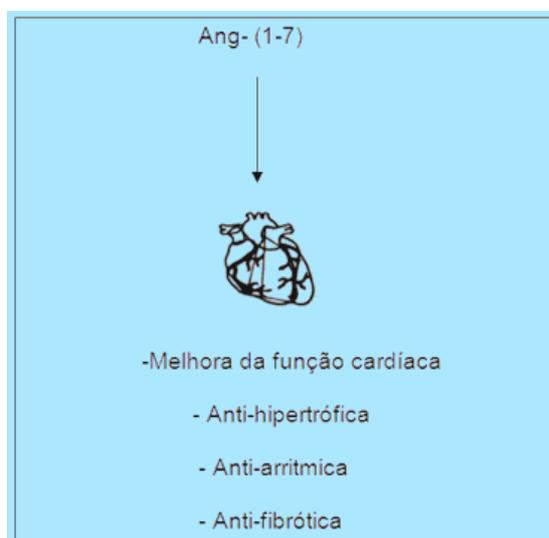


Figura 2- Principais ações da Ang-(1-7) no coração.

Estudos mostraram que os efeitos da Ang-(1-7) não são abolidos pelo bloqueio dos receptores AT_1 e AT_2 , sugerindo a presença de um receptor específico para a Ang-(1-7) (BENTER e cols., 1993; PORSTI e cols., 1994;

BROSNIHAN e cols., 1996). Em concordância com estes achados, uma forma modificada da Ang-(1-7), a [D-Ala7]-Ang-(1-7), na qual a prolina da posição 7 é substituída pela D-Alanina, bloqueia seletivamente os efeitos da Ang-(1-7) (SANTOS e cols, 1994; TALLANT e cols, 1999). A partir destes resultados os pesquisadores sugeriram a presença de um receptor específico para Ang-(1-7). Santos e colaboradores (2003) mostraram evidências funcionais de que o receptor Mas é o ligante da Ang-(1-7). Estudos mostram que, a ação da Ang-(1-7) sobre a função cardíaca está relacionada com sua interação com o receptor Mas. (SANTOS e cols., 2006 ; TALLANT e cols., 1999).

Hoje, é sugerido que a via da Ang II e Ang-(1-7) não agem de forma independente, mas sim, dependem do balanço final entre elas. Ou seja, uma maior atividade do eixo Ang II /receptor AT₁ leva a um predomínio dos efeitos vasoconstritores, proliferativos e hipertróficos. Enquanto uma maior atividade do eixo Ang-(1-7) / receptor Mas será acompanhado de efeitos vasodilatadores, anti-proliferativos e anti-hipertróficos.

1.3 Angiotensina-(1-7) na hipertensão arterial

Um das causas da hipertensão arterial é o aumento da resistência periférica total sendo que, o aumento da reatividade vascular é um dos fatores principais para o aumento do tônus vascular (BENTER e cols., 2006). A Ang II exerce um importante papel na regulação da pressão arterial sistêmica através de sua ação direta nos vasos sanguíneos como um potente vasoconstritor. Esse peptídeo altera a pressão arterial através de seus efeitos em diferentes tecidos, incluindo alterações do tônus vascular, aumento da atividade do sistema nervoso simpático, alterações na estrutura e função de diferentes leitos vasculares e regulação sobre o balanço hidro-eletrolítico (WEIR & DZAU, 1999).

A ação contra-reguladora mais evidente da Ang-(1-7) é o seu efeito vasodilatador, envolvendo uma modulação sobre os efeitos da Ang II na resistência vascular (ROCKS e cols., 1999). Vários estudos demonstram o

efeito vasodilatador da Ang-(1-7) em diferentes tecidos e espécies (BROSNIHAN cols., 1996; MACHADO e cols., 2002).

Alguns estudos mostram que os efeitos vasodilatadores da Ang-(1-7) parecem ser dependentes do endotélio (HEITSCH e cols., 2001; FERNANDES e cols., 2005). Outros estudos demonstram que o endotélio é um importante sítio de formação (SANTOS e cols., 1992) e metabolismo de Ang-(1-7) (CHAPPEL e cols., 1998). Santos e colaboradores (2003) demonstraram que o efeito vasodilatador dependente do endotélio está ausente em camundongos com deleção genética para o receptor Mas. Faria-Silva e colaboradores (2005) mostraram que, a estimulação do receptor Mas promove uma melhora da função endotelial por facilitar a liberação de NO.

Outra resposta vasodilatadora promovida pela Ang-(1-7) é a interação de cininas que promove um aumento da resposta vasodilatadora induzida pela bradicinina (BK), o que demonstra um importante papel deste peptídeo no controle do tônus vascular.

A Ang-(1-7) está envolvida com a regulação da função renal (DELLIPIZZI e cols., 1994) o que pode explicar em parte as suas ações anti-hipertensivas (BENTER e cols., 1993). Estudos recentes mostram que, *in vivo*, a Ang-(1-7) produz um efeito vasodilatador na arteríola aferente do rim de coelho através da liberação de NO (REN e cols., 2002).

Além de seus efeitos diretos sobre os vasos sanguíneos e rins, alguns estudos sugerem que, a Ang-(1-7) está envolvida com o controle tônico e reflexo da pressão arterial. No sistema nervoso central a Ang-(1-7) atua como um neuromodulador.

Diversos trabalhos mostram o efeito vasodilatador da Ang-(1-7) na circulação coronariana. Brosnihan e colaboradores (1996) demonstraram que, a Ang-(1-7) induz um efeito vasodilatador de maneira dose-dependente em artérias de cães pré-contraídas. Este efeito não foi bloqueado pelos antagonistas específicos dos receptores de Ang II, candesartan e PD 123319, evidenciando a existência de um sítio de ligação específico para a Ang-(1-7) nos vasos coronarianos de cães. Porsti e colaboradores (1994) observaram um

efeito vasodilatador da Ang-(1-7) em anéis de artérias coronárias de porcos, mediado pela liberação de NO pelo endotélio.

Ferreira e colaboradores (2007a) mostraram que, a administração oral do análogo não peptídico da Ang-(1-7), AVE 0991, produziu uma redução da pressão de perfusão coronariana após infarto do miocárdio em preparação de coração isolado de rato. O uso do antagonista específico da Ang-(1-7), o A779, reverteu esse efeito sobre a pressão de perfusão, mostrando que o efeito cardioprotetor da Ang-(1-7) ocorre via receptor Mas.

1.4. Angiotensina-(1-7) no remodelamento cardíaco no modelo DOCA-Sal

O remodelamento cardíaco é um processo adaptativo essencial que envolve uma alteração na arquitetura cardíaca em resposta a sobrecargas hemodinâmicas, ativação neuro-humoral, processos inflamatórios, entre outros fatores (CHANCEY e cols., 2002). Tipicamente, o remodelamento cardíaco é acompanhado de alterações na quantidade e organização dos componentes da matriz extracelular (MEC), o que pode alterar os parâmetros fisiológicos do coração. Desta forma, a função cardíaca é determinada pela interação coordenada e dinâmica entre as células contráteis e os componentes da MEC (BANERJEE e cols., 2006).

Estudos têm mostrado o papel da Ang-(1-7) na modulação do remodelamento cardíaco. Averill e colaboradores (2003) observaram um aumento da imunorreatividade para a Ang-(1-7) restrita aos cardiomiócitos e ao redor da área infartada após ligadura da artéria coronária, o que sugere a participação deste peptídeo na recuperação do tecido cardíaco. Ferreira e colaboradores (2007a), mostraram que o tratamento com AVE 0991, análogo não peptídico da Ang-(1-7), durante 7 dias reduziu a área infartada após ligadura da artéria coronária esquerda em ratos.

As ações da Ang-(1-7) sobre o remodelamento cardíaco já foram avaliadas no modelo de hipertensão DOCA-Sal (GROBE e cols., 2006). Neste

estudo, a infusão subcutânea de Ang-(1-7) durante 28 dias preveniu a fibrose cardíaca, sem alterar a hipertrofia cardíaca e os níveis elevados de pressão arterial em ratos submetidos ao modelo de hipertensão DOCA-Sal.

Santiago e colaboradores (2010) mostraram que, animais transgênicos que superexpressam Ang-(1-7) no testículo e conseqüente aumento da concentração plasmática (TGR(A1-7)3292) estão protegidos da disfunção cardíaca e de fibrose, induzidas pelo modelo de hipertensão DOCA-Sal. Além disso, esses animais apresentam uma redução da pressão arterial sistólica (PAS).

1.5. Angiotensina-(1-7) na modulação da contratilidade cardíaca: Possíveis mecanismos

Santos e colaboradores (2006) mostraram que animais *Mas*^{-/-} apresenta redução da contratilidade cardíaca, redução da fração de encurtamento e acentuada redução da função ventricular global.

Estudos utilizando camundongos C57/BL6 *Mas*^{-/-}, mostraram que estes animais apresentaram baixa reatividade da Ang-(1-7) em fatias do ventrículo esquerdo. (SANTOS e cols., 2006). Através da técnica de coração isolado foi mostrado que camundongos *Mas*^{-/-} apresentaram menor tensão sistólica quando comparado aos animais *Mas*^{+/+}. (SANTOS e cols., 2006). De forma contrária, Ferreira e colaboradores (2010), mostraram que animais que superexpressam Ang-(1-7) apenas no coração, melhoraram a dinâmica do Ca²⁺ e aumento da expressão da Ca²⁺ ATPase.

Em 2010, Gomes e colaboradores mostraram que cardiomiócitos ventriculares de ratos transgênicos (TGR(A1-7)3292) apresentaram prevenção na disfunção da sinalização do cálcio induzida pela Ang-II, quando comparado ao cardiomiócitos de animais selvagens. Estes estudos demonstram que a Ang-(1-7) está envolvida na sinalização de cálcio e que, estas respostas cardioprotetoras estão sendo mediadas pelo receptor Mas.

A função contrátil e estrutura do cardiomiócito são moduladas pela ativação de cascatas de sinalizações intracelulares reguladas por estímulos mecânicos e neuro-hormonais tais como, estiramento do cardiomiócito, adrenalina, noradrenalina, angiotensina II e aldosterona (DORN & FORCE, 2005). Atualmente, sabe-se que, a ativação de diferentes isoformas de PKC está relacionada a uma série de processos fisiológicos e patológicos, tais como: diferenciação e proliferação celular, apoptose, ativação de macrófagos, desenvolvimento de resistência à insulina, regulação da contratilidade miocárdica, disfunção ventricular e hipertrofia cardíaca. (PALANIYANDI, SUN, FERREIRA & MOCHLY-ROSEN, 2009).

Braz e colaboradores (2002), utilizando estudo *in vitro*, constataram que, cardiomiócitos transfectados com adenovírus contendo a isoforma constitutiva PKC α , desenvolveram hipertrofia com aumento da expressão de genes marcadores de hipertrofia, como fator natriurético atrial (ANP). Em contraste, o mesmo grupo de pesquisadores dois anos mais tarde observou que camundongos com inativação gênica ou hiper expressão da isoforma PKC α apresentaram hipertrofia cardíaca de magnitude comparável a dos camundongos controle frente ao estímulo de sobrecarga pressórica (BRAZ e cols. 2004). Além disso, a inativação e superexpressão da isoforma PKC α apresentaram efeitos antagônicos no controle da contratilidade cardíaca, resultando em melhora e prejuízo da função contrátil, respectivamente. Este estudo sugere que, a isoforma PKC α não participa ativamente da regulação da hipertrofia cardíaca, entretanto, modula a função contrátil por meio da regulação da atividade da SERCA (cálcio-ATPase do retículo sarcoplasmático) pelo eixo fosfolambam/fosfatase1 (BRAZ e cols, 2004) (Figura 3).

Masafumi Yano e colaboradores (2005) observaram que, alterações estruturais e funcionais nas proteínas reguladoras de Ca²⁺, presentes no retículo sarcoplasmático, estão fortemente relacionadas com o desenvolvimento da patogênese da insuficiência cardíaca. Estimulação crônica tanto do sistema nervoso simpático quanto do SRA, são capazes de induzir anormalidades na função e estrutura dessas proteínas. Essas alterações contribuem para um prejuízo na função contrátil e, conseqüentemente, para a progressão da insuficiência cardíaca (Figura 3).

Neste trabalho utilizamos uma abordagem sistêmica e celular com o intuito de desvendar os mecanismos envolvidos nos efeitos protetores da Ang-(1-7) no coração.

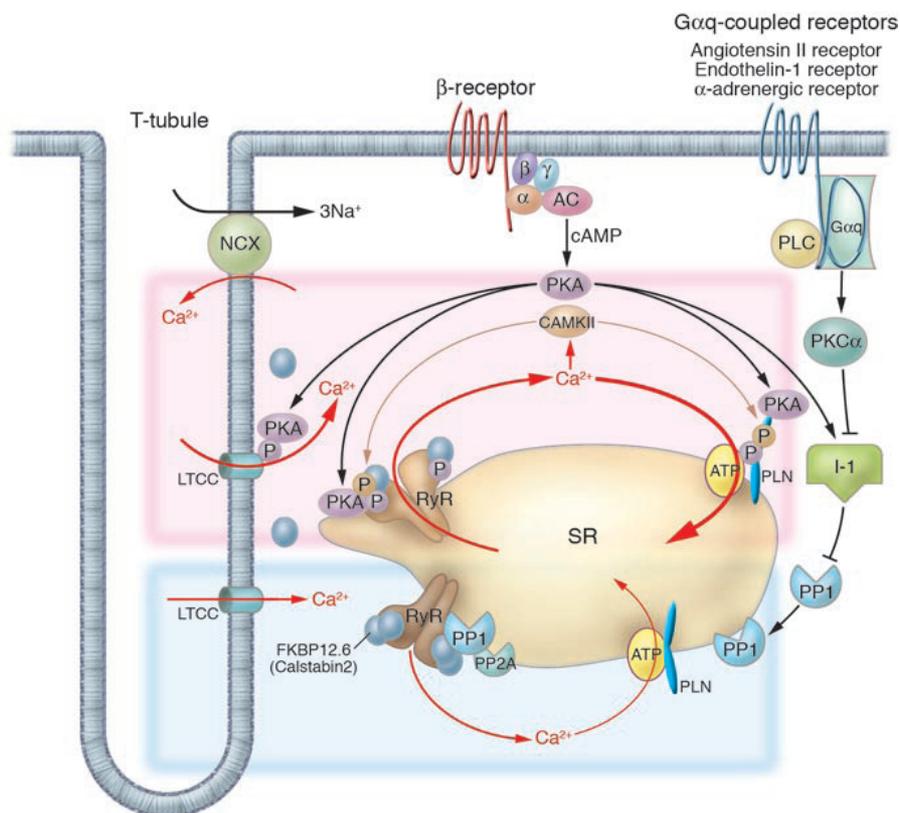


Figura: 3.. Ciclo intracelular de Ca^{2+} associado a diferentes vias de sinalização em cardiomiócitos. O transiente de Ca^{2+} ocorre pelo influxo de Ca^{2+} através de canais de Ca^{2+} tipo L. Esse influxo de Ca^{2+} estimula a liberação de mais Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático através dos RYR, esse processo denomina-se transiente de Ca^{2+} e ocorre durante a sístole cardíaca. Durante a diástole o Ca^{2+} citosólico é recaptado novamente de volta para o RS através da ação da SERCA2a que é regulada diretamente pela fosfolamban (PLN). Algumas vias de sinalização medeiam esse processo. Dentre elas temos: (i) a estimulação do receptor β adrenérgico mediando a PKA que regula o ciclo do Ca^{2+} por promover a fosforilação do canal de Ca^{2+} tipo L, RYR e PLN. A fosforilação da PLN e RYR contribui para um aumento do transiente de Ca^{2+} e aumento da contratilidade celular. Outra via ocorre através da ativação de receptores acoplados a proteína Gq que ativam a fosfolipase C (PLC), que por sua vez ativa a PKC. A PKC atua fosforilando o I-1 (inibidor de PP1) que promove a ativação de PP1 e a PP1 causa hipofosforilação de PLB promovendo a redução na atividade da SERCA, dessa forma reduzindo a recaptação de Ca^{2+} de volta para o RS. O aumento no nível de Ca^{2+} no citosol ativa também a CAMKII, que afeta a função de RYR e PLB. A ativação e desativação dessas cascatas de sinalização afetam o ciclo do Ca^{2+} intracelular. (MASAFUMI YANO, e cols 2005).

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo Geral

Avaliar os efeitos protetores da Angiotensina - (1-7) na função cardíaca, no remodelamento cardíaco e na sinalização de cálcio em cardiomiócitos provenientes do ventrículo esquerdo de ratos submetidos ao modelo de hipertensão DOCA-Sal.

2.2 - Objetivos específicos

1. Verificar os níveis de Pressão Arterial Sistólica (PAS) durante o desenvolvimento da hipertensão DOCA-Sal
2. Avaliar a hipertrofia cardíaca, através da razão peso do coração (g) pelo comprimento da tibia (cm) e através da espessura relativa da parede do VE (Eco Dopler).
3. Avaliar a função ventricular sistólica, diastólica em todos os grupos experimentais.
4. Verificar a expressão de mRNA que codifica os componentes do SRA e o receptor de mineralocorticoide (MMR) em cardiomiócito nos diferentes grupos experimentais
5. Investigar a expressão de mRNA que codifica os marcadores de estresse cardíaco, ANP e β -MHC nos cardiomiócitos de todos os grupos experimentais.
6. Investigar a modulação da superexpressão da Ang-(1-7) na dinâmica do cálcio intracelular em cardiomiócitos.
7. Verificar a expressão de proteínas envolvidas na dinâmica do cálcio intracelular, tais como PKC α , PP1 e SERCA2a nos cardiomiócitos de todos os grupos experimentais.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Os ratos utilizados neste estudo foram provenientes do Biotério de Animais Transgênicos do Laboratório de Hipertensão – Departamento de Fisiologia e Biofísica; ICB-UFMG. Foram utilizados animais transgênicos da linhagem L3292 (TGR(A1-7)3292) e Sprague-Dawley Hannover (SD) como animais controle, com idade entre 10 e 12 semanas. Os animais foram mantidos em sala apropriada com ciclo claro-escuro de 12/12h à temperatura ambiente entre 22-24°C, separados em grupos, em gaiolas plásticas adequadas e alimentados com ração apropriada e água filtrada *ad libitum*.

Todos os procedimentos cirúrgicos e experimentais realizados neste estudo foram aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal da UFMG.

3.1.1. Grupos Experimentais

Para a realização deste estudo, animais foram divididos em quatro grupos: SD-CT, SD-DOCA, TG-CT e TG-DOCA e o tratamento foi realizado no período de 6 semanas

_Grupo **SD-CT** – animais SD, controle, submetidos apenas a uninefrectomia esquerda;

_Grupo **SD-DOCA**: animais SD, submetidos ao modelo de Hipertensão DOCA-Sal e uninefrectomia esquerda;

_Grupo **TG-CT**: animais transgênicos da linhagem L3292, controle, submetidos apenas a uninefrectomia esquerda;

_Grupo **TG-DOCA**: animais transgênicos da linhagem L3292, submetidos ao

modelo de Hipertensão DOCA-Sal.

3.1.2 Animal Transgênico (TGR(A1-7)3292)

Ratos (TGR(A1-7)3292) foram desenvolvidos por Santos e cols., 2004 baseados na tecnologia descrita por Methot e cols., (2001). Sendo assim, o *construct* foi formado pelos seguintes componentes: (1) peptídeo sinal proveniente da proteína renina humana, o qual assegura que a proteína entre no retículo endoplasmático para a futura secreção desta proteína para o meio extracelular; (2) porção da região constante da cadeia pesada da IgG2b de camundongo, que promove massa para a proteína de fusão; (3) porção do prósegmento da prorenina humana, o qual funciona como um espaçador molecular, pois é necessário para expor o sítio de clivagem para a endoprotease furina o que resulta na liberação do peptídeo; (4) sítio de clivagem na porção carboxi terminal do prósegmento da prorenina humana, sendo que neste sítio de clivagem a endoprotease furina atuará liberando a Ang-(1-7) nos tecidos, (5) o peptídeo que será liberado, no caso a Ang-(1-7) e finalmente (6) a seqüência Poly A. Para direcionar a expressão gênica em células de mamíferos foi adicionado na extremidade 5' do *construct* o promotor inespecífico CMV (cytomegalovirus promoter).

Estes animais apresentam a expressão do transgene restrita, praticamente aos testículos, uma vez que não foi encontrado *mRNA* em outros órgãos analisados como átrios, ventrículos, rins, adrenal, cérebro, pulmão e aorta. Os testículos destes animais funcionam como uma bomba produtora de Ang-(1-7), promovendo um aumento de sua concentração local e sistêmica (SANTOS e cols., 2004).

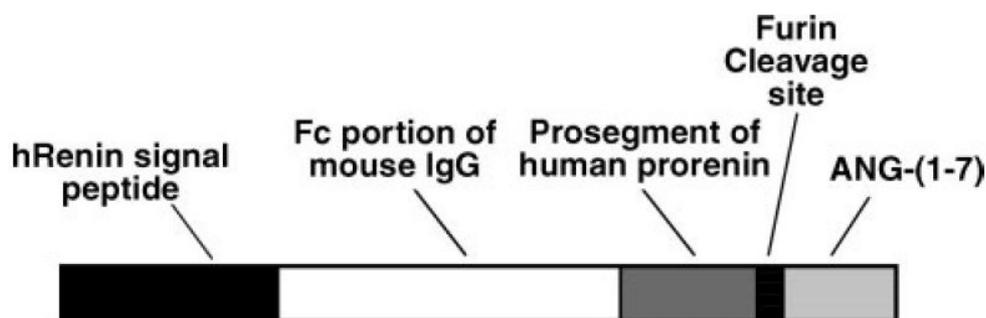


Figura 4 – Representação esquemática da proteína de fusão codificada pelo transgene utilizado para a geração dos ratos [TGR(A1-7)3292]. (SANTOS e cols., 2004).

3.2. Procedimentos cirúrgicos

3.2.1. Uninefrectomia (UNX)

Para a realização dos procedimentos cirúrgicos, os ratos foram anestesiados com tribromoetanol (0,25g/Kg), posicionados em decúbito lateral direito e posteriormente submetidos à tricotomia da região paralombar esquerda. Em seguida foi realizada uma laparotomia mediana (~ 2,0 cm) e os músculos oblíquos e transversais foram divulsionadas para exposição do rim esquerdo, sendo este identificado e isolado. A cápsula renal e adrenal foram preservadas na região abdominal. A artéria e veia renais foram amarradas com um fio de sutura, seguido da retirada do rim esquerdo. O local de incisão foi suturado e os ratos foram removidos para o biotério. Os animais controle (UNX) foram submetidos apenas à UNX esquerda.

3.2.2. Modelo de Hipertensão Arterial DOCA-Sal

O modelo de hipertensão DOCA-Sal consiste na administração crônica de Acetato de Deoxicorticosterona (DOCA) associada a ingestão de solução de NaCl 0,9% e KCl 0,2% em ratos submetidos a uninefrectomia (HAACK e cols., 1977).

O DOCA é preparado à partir da substância pura de Acetato de Deoxicorticosterona (Sigma®, 200 mg/kg) homogeneizado manualmente ao composto de silicone (Dow corning®, 500 mg/kg), com auxílio do catalisador 4 catalyst (Dow corning®, 1 gota). Imediatamente após a realização da uninefrectomia, metade dos animais da linhagem L3292 e SD receberam um implante subcutâneo de silicone no dorso, próximo ao espaço interescapular.

O DOCA mimetiza a ação renal endógena dos mineralocorticóides aumentando a retenção de sódio e, conseqüentemente, de água nos túbulos renais. A associação da ingestão de sódio aumenta a osmolaridade plasmática que, por sua vez, promove alterações hemodinâmicas e neuro-humorais que colaboram para elevar a pressão arterial.

Os animais DOCA-Sal receberam uma solução contendo 0,9% de NaCl e 0,2% de KCl e foram mantidos em caixas individuais durante todo o período experimental. (6 semanas).

3.3. Medida da Pressão Arterial

A pressão arterial sistólica (PAS) foi determinada indiretamente a partir da técnica de Plestimografia de cauda. No dia anterior à cirurgia foi determinada a PAS basal dos animais SD e TGR. Durante 45 dias de tratamento, a PAS foi medida em todos os animais com intervalos de 9 dias, ou seja, no 0, 9, 18, 27, 36 e 45 dias de tratamento.

Para a medida da PAS, os animais eram aquecidos por um período de 2-3 minutos em uma caixa equipada com lâmpada incandescente (200 W). Após este procedimento à cauda do animal era conectada a um sensor pneumático e um esfigmomanômetro para realização da medida da PAS. Os dados eram registrados e analisados à partir de um sistema de transdução *Windaq- Aquisition e Analysis System*. Foram aferidas entre oito e dez medidas da pressão arterial por animal, em cada sessão.

3.4 Ecocardiografia

Ao final do período experimental de seis semanas, todos os animais foram submetidos a exame ecocardiográfico transtorácico sob anestesia com isoflurano. Para análise da morfologia e da função cardíaca in vivo foi utilizada

uma forma não invasiva, de alta frequência, o sistema de ecocardiografia de alta resolução, que consiste de uma máquina de ultra-som Vevo 2100 equipado com 16-40 MHz (Visual Sonics, Toronto, Canadá). Após indução anestésica com isoflurano 3,5%, os ratos foram colocados em posição supina em uma mesa, onde foram submetidos à tricotomia do tórax e abdômen. A mesa está equipada com eletrodos para monitorização com eletrocardiograma e sistema de aquecimento para manutenção da temperatura corporal em 37 °C. A anestesia foi mantida através de cone do focinho com isoflurano entre 2 e 2,5% de concentração. Imagens de alta resolução foram obtidas em posição paraesternal direita e esquerda e foram obtidas imagens do eixo longo, eixo curto e apical. As imagens registradas e os cálculos foram realizados de acordo com as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia. As seguintes medidas foram realizadas em Modo-M: as dimensões internas do VE, em diástole e sístole (LVIDd e LVIDs, respectivamente), espessura da parede posterior do VE (PPVE) e septo interventricular (SIV) na diástole e sístole. (A partir dessas medidas foram calculados os volumes diastólico final e sistólico final (VDF e VSF), fração de encurtamento (FS), fração de ejeção (FE) do VE, o volume de ejeção (SV) e o débito cardíaco (CO). O tempo de relaxamento isovolumétrico e o tempo de ejeção aórtica foram adquiridos a partir do espectro Doppler do fluxo aórtico. Para medida da espessura relativa da parede (ERP) do ventrículo esquerdo, foi utilizada a fórmula ($ERP = \text{duas vezes a espessura da parede posterior (EP)} / \text{diâmetro diastólico}$). A espessura da parede foi considerada aumentada quando maior que 0,42 (U.A)(LANG, RM e cols., 2005) Além disso, foram avaliados utilizando software Vevostain, a partir da imagem longitudinal, parasternal esquerda, velocidade, deslocamento, e taxa de deformação em regiões específicas do miocárdio de acordo com Maja e colaboradores (2010). Para este estudo somente foi avaliado a taxa de deformação radial do ventrículo esquerdo.

3.5. Isolamento dos Cardiomiócitos Ventrículos Esquerdos

Para a obtenção dos cardiomiócitos utilizou-se o procedimento padrão de dissociação enzimática descrito por MITRA E MORAD (1985). Para o

isolamento dos cardiomiócitos, foi utilizada apenas a câmara ventricular esquerda. Após a dissociação dos cardiomiócitos ventriculares, as células foram colocadas em meio de cultura DMEM (Sigma) até a realização dos experimentos.

3.6. Medida do Transiente de Ca^{2+}

Para realização da medida do transiente de Ca^{2+} , os cardiomiócitos foram incubados com uma sonda fluorescente sensível ao Ca^{2+} (flúor 4/AM- $5\mu\text{mol/L}$) (Invitrogen) durante 30 minutos e em seguida as células foram lavadas com Tyrode contendo (NaCl 140 mM, KCl 5mM, Glicose 10mM, MgCl_2 0,5mM, NaH_2PO_4 , HEPES 10mM, CaCl_2 1,8mM). A medida da concentração de Ca^{2+} intracelular foi obtida em células estimuladas eletricamente na freqüência de 1 Hertz, com um pulso quadrado de duração de 5ms e 30v. Após a aplicação de 8 pulsos elétricos foi feita uma varredura repetitiva ao longo de uma linha no eixo longitudinal das células (GUATIMOSIM e cols., 2002) utilizando-se o microscópio confocal Zeiss 510 Meta do CEMEL no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. A liberação global de Ca^{2+} foi analisada pelo software IDL 6,0 (Research System, Inc., Boulder, CO). Os níveis intracelulares de Ca^{2+} foram apresentados como F/F_0 , fluorescência máxima pela fluorescência basal. A figura 5 apresenta um transiente de Ca^{2+} típico obtido através da microscopia confocal em cardiomiócitos de animais controle. Para a análise dos dados do transiente de Ca^{2+} foram utilizados os programas Prism e Excel.

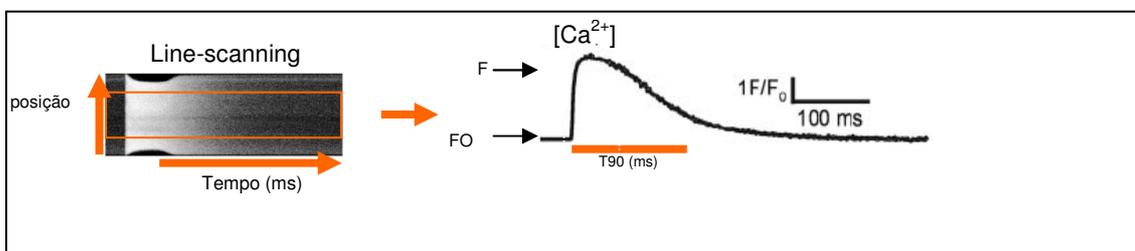


Figura 5. Transiente de cálcio em cardiomiócitos (F/F_0). F representa a fluorescência máxima emitida no momento da contração do miócito ventricular. F_0 representa a fluorescência basal emitida no momento de repouso da célula. T_{90} é o tempo necessário para que 90 % do Ca^{2+} liberado sejam retirados do citosol.

3.7. Western Blot

Os cardiomiócitos ventriculares esquerdos após serem dissociados, foram homogeneizados em tampão de lise (100mM NaCl, 50mM Tris-base, 5mM EDTA–2Na, 50mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 1mM MgCl_2 . pH=8,0) com detergentes (Nonidet P40 1%; Triton x-100 0.3% e Sodium deoxycholate 0,5%), contendo inibidores de protease (PMSF 200mM, benzamidina 15,7mg/mL e pepstatina 10 μ M) e inibidores de fosfatase (20mM NaF e 1mM Na_3VO_4). Ao fim deste processo, o conteúdo foi centrifugado por 12 min, à 4°C e a 8.000 rpm. As proteínas foram quantificadas utilizando o método de Bradford (BRADFORD, 1976). Entre 30 μ g e 50 μ g de proteína foram diluídas em tampão de amostra (5X- 2M Tris pH=6.8, 20% Glicerol, 30% SDS, 25% β -mercaptoetanol, 0,1% Azul de Bromofenol) para separação em gel de SDS-PAGE (sodium dodecyl (lauryl) sulfate-poliacrilamida) em concentração de 10-15%, dependendo da massa molecular da proteína estudada, e 4% o gel de concentração. Para controle do peso molecular das proteínas, foi utilizado um padrão de peso molecular (BIO-RAD).

Após serem separadas em gel, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose ou PVDF. A qualidade da transferência foi monitorada através da coloração da membrana com solução de Ponceau (0,2%). As membranas foram lavadas com PBS- Tween ou TBS-Tween e colocada por 1 hora em solução de bloqueio (PBS-Tween ou TBS-Tween com 5% de leite desnatado) a fim de bloquear ligações não específicas. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas overnight na câmara fria, com temperatura 4°C, com o anticorpo primário específico.

Os seguintes anticorpos primários serão utilizados: anti-gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (1:5000, Santa Cruz), anti-SERCA2a (1:1000) (Affinity Bio Reagents- ABR), anti-PKC (1:1000, Millipore), anti-PP1 (1:1000, Santa Cruz), anti-Mas (1:1000, Alomone). Em seguida, as membranas foram lavadas com PBS ou TBS contendo 0,2% de Tween 20 (5 minutos por 5 vezes) e incubadas com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase (HRP) (Goat anti-mouse IgG-HRP 1:5000 ou Goat anti-rabbit IgG-HRP 1:5000, (Sigma). As

membranas foram novamente lavadas em PBS-T (5 minutos por 5 vezes). As bandas protéicas foram detectadas por reação de quimioluminescência (ECL plus – AmerCT Biotechnology) e a intensidade das mesmas foi avaliada por análise densitométrica através do software ImageQuant™. Nos experimentos os níveis de proteína foram normalizados pelos níveis de expressão da GAPDH.

3.8. PCR em tempo real

O RNA total de cardiomiócitos ventriculares esquerdos adultos foi extraído utilizando o reagente Trizol (Invitrogen) e o método desenvolvido por CHOMCZYNSKI e SACCHI (1987). No homogeneizado formado foi adicionado 200 µl de clorofórmio, esse complexo foi incubado por 5 minutos a 37°C e centrifugados por 15 minutos a 4°C e 13.500 rpm. Após a centrifugação são formadas 3 camadas. A fase superior contendo o RNA foi coletada e o RNA foi precipitado com adição de 500 µl de álcool isopropílico por 15 min a 37°C e uma nova centrifugação foi realizada e o *pellet* de RNA foi então lavado com etanol 70% para posteriormente ser ressuscendido em água tratada com DEPC (dietilpirocarbonato). O RNA foi quantificado por espectrofotometria nos comprimentos de ondas de 260 e 280 nm e armazenado a -80°C. A concentração do RNA foi estimada por absorvância ótica pela fórmula: $[RNA] \mu g/\mu l = (A_{260} \times f \times 75 / 1000)$, onde f é o fator de diluição e 75 é o fator de conversão. Contaminantes de DNA foram removidos com adição de DNase I (Ambion Inc., Austin, TX) e a integridade do RNA total foi verificada através de um gel 1% de agarose corado com SYBR safe DNA gel stain (Invitrogen).

Dois µg de RNA total foram utilizados como moldes para a síntese de cDNA na presença de 50 ng de iniciadores randômicos (*random primers*), 200 U de M-MLV RT (Revert AID TM H *Minus Moloney murine leukemia virus-reverse transcriptase*, Fermentas Inc., Hanover, MD, USA), 200 µl Rnase Out (Fermentas Inc., Hanover, MD, USA), 0,5 mM de dNTPs, 2,5 mM de MgCl₂, 1 X de tampão da M-MLV RT em um volume final de 20 µl. O ciclo usado na

reação foi de: 10 min a 20°C, 45 min a 42°C, 5 min a 95°C e 10 min a 4°C. Foi usado o termociclador PTC-100TM, MJ Research, INC.

A primeira fita de cDNA foi sintetizada usando o High Capacity cDNA Transcription Kit (Applied Biosystems, CA, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. Depois da transcrição reversa, o cDNA foi submetido ao Rotor-Gene 6000 Real-Time Rotary Analyzer (Corbett Robotics Inc., San Francisco, USA) usando *Power SYBR Green Master Mix* (Biosystems, CA, USA). Para a reação foi usado um volume final de 20µl, contendo 0,5 µM de iniciador (*primer*), 10µl of *Power SYBR Green Master Mix 2X* e 1µl de cDNA. As reações passaram por 45 ciclos depois da desnaturação inicial (95°C por 2 minutos) com os seguintes parâmetros: 95°C (desnaturação), 15s; 60°C (anelamento e extensão), 60s (RESENDE e cols., 2007; RESENDE e cols., 2008). Para cada experimento, a reação sem cDNA foi usada como controle negativo. Além disso, a ausência de contaminantes de DNA foi calculada em amostras de RT negativo. As análises da curva de dissociação dos produtos da PCR foram obtidas aquecendo as amostras de 60°C a 95°C a 0,1°C/s, a fim de avaliar a especificidade dos iniciadores. A quantificação relativa da expressão gênica foi feita usando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, como descrito abaixo, os dados foram normalizados pela expressão gênica de β actina. Foram obtidos produtos de PCR com menos de 100 pares de bases de comprimento. Os *primers* foram sintetizados pela DNA Technologies, Coralville, IA. Para a realização de PCRs em cardiomiócitos foram utilizados os *primers* para os genes de interesse listados na tabela 1.

A quantificação da amplificação gênica foi realizada pela determinação do limiar de ciclos (*cycle threshold*, CT) baseado na fluorescência detectada dentro da região geométrica da curva semi-log do perfil de amplificação. Um perfil de amplificação para cada amostra foi gerado demonstrando o aumento na fluorescência do corante indicador (*reporter dye fluorescence*, Rn) para cada ciclo da PCR. De cada perfil de amplificação um valor de limiar do ciclo foi calculado, representando o número do ciclo da PCR em que a fluorescência foi detectada acima de um limiar arbitrário, com base na variabilidade das linhas de base dos quinze primeiros ciclos. A quantificação relativa da expressão do gene alvo foi avaliada usando o método comparativo do CT como descrito

previamente (MEDHURST e cols., 2000). O valor de Δ CT foi determinado pela subtração do CT de cada amostra do valor do CT da Δ -actina, respectiva para cada amostra usada como controle interno. O cálculo do Δ CT envolve o uso da média do Δ CT do grupo controle como uma constante arbitrária para subtrair de todos os outros valores médios de Δ CT. As mudanças na expressão gênica do gene de interesse são equivalentes a $2^{-\Delta$ CT. Os valores foram analisados pela ANOVA seguida pela comparação pareada do teste de Tukey (Tukey's HSD test), com nível de significância de 5%.

Tabela 1: Seqüência dos *primers* utilizados na realização de PCRs em miócitos ventriculares. Foward 5'-3' Reversa 3'-5'

PRIMERS	Foward 5'3'	Reverse 3'5'
ANP	GGATTTCAAGAACCTGCTAGA	CTTCATCGGTCTGCTCGCTCA
β -MHC	CTCCAACATGGAGCAGATCA	GCTCCGGTGCTCATTCA
MMR	GGC AGG CGT CGT CTG AGA	GCT TGA GTG GGT CAG CGT TT
Beta – Actina	CTATCGGCAATGAGCGGTTCC	TGTGTTGGCATAGAGGTCTTTACG
ECA	ACGGAAGCATCACCAAGGAG	TGGCACATTTCGCAGGAACG
AT1	CCTCTACGCCAGTGTGTTCC	GCCAAGCCAGCCATCAGC
Mas	ACT GTC GGG CGG TCA TCA TC	GGT GGA GAA AAG CAA GGA GA
ECA2	CAG GAA GCT GAA GAC CTG TC	GAC TGT TCT TCA TAA AAG GCA

MMR= receptor de mineralocorticoide

3.9. Análise estatística

Para a análise estatística dos resultados da pressão arterial sistólica foi utilizado o teste *Two – way ANOVA* seguido do pós-teste de Bonferroni. Para as análises dos demais resultados foram utilizados o teste t Student ou *Two – Way ANOVA* seguido de Newman-Keuls, quando apropriado com significância estabelecida para valores de $p < 0.05$.

6. CONCLUSÃO

Podemos concluir através dos resultados obtidos no presente estudo que a superexpressão da Ang-(1-7) nos animais transgênicos submetidos ao modelo DOCA-Sal exerce além de efeitos pressóricos, também um efeito local no coração prevenindo diferentes etapas do remodelamento patológico.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas A, Gorelik G, Carhini LA, Scicli AG. Angiotensin-(1-7) induces bradykinin-mediated hypotensive responses in anesthetized rats. *Hypertension* 30: 217-21, 1997. angiotensins on day-night fluctuations and stress-induced changes in blood pressure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 282: R1663–R1671, 2002.

Abraham TP, Nishimura RA. Myocardial strain: can we finally measure contractility? *J Am Coll Cardiol*.; 37:731-4. 2001.

Andreatta SH, Averill DB, Santos RA, Ferrario CM. The ventrolateral medulla. A new site of action of the renin-angiotensin system. *Hypertension*.11:163-6,1988.

Averill DB, Ishiyama Y, Chappell MC & Ferrario CM. Cardiac angiotensin-(1–7) in ischemic cardiomyopathy. *Circulation*. 106: 2141–2146, 2003.

Banerjee I, Yekkala K, Borg TK, Baudino TA. Dynamic interactions between myocytes, fibroblasts, and extracellular matrix. *Ann N Y Acad Sci*. 1080:76-84. 2006.

Benter IF, Diz DI, Ferrario CM. Cardiovascular actions of angiotensin(1-7). *Peptides*. 14(4):679-84, 1993.

Benter IF, Ferrario CM, Morris M, Diz DI. Antihypertensive actions of angiotensin- (1-7) in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol*. 269, 1995.

Benter IF, Yousif MH, Anim JT, Cojocel C & Diz DI. Angiotensin-(1–7) prevents development of severe hypertension and end-organ damage in spontaneously hypertensive rats treated with l-NAME. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290: H684–H691, 2006.

Bers, D.M. Cardiac excitation-contraction coupling. **Nature**, v.415 p. 198-205, 2002

Bers, D.M. Altered cardiac myocyte Ca²⁺ regulation in heart failure. **Physiology** (Bethesda), v.21,p.380-387, 2006.

Bono F, Mapelli A, Stoppani L. The action of synthetic hypertensin on the guinea pig heart under fluothane anesthesia. Experimental study. **Minerva Anesthesiol.** 28:105-10, 1962.

Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

Braga AN, Lemos MS, da Silva JR, Fontes WR, and Santos RAS. Effects of Differential baroreceptor reflex modulation by centrally infused angiotensin peptides. **Am J Physiol** .263: R89-94, 1992.

Braz, J. C.; Bueno, O. F.; De Windt, L. J.; Molckentin, J. D. PKC alpha regulates the hypertrophic growth of cardiomyocytes through extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2). **Journal of Cell Biology**. New York, v.156, n.5, p.905-19, 2002.

Braz, J. C.; Gregory, K.; pathak, A.; Zhao, W.; Sahin, B.; Klevitsky, R.; Kimball, T. F.; Lorenz, J. N.; Nairn, A. C.; Liggett, S. B.; Bodi, I.; Wang, S.; schwartz, a.; lakatta, e. G.; depaoliroach, a. A.; robbins, j.; hewett, t. E.; bibb, j. A.; westfall, m. V.; kranias, e. G.; molckentin, J. D. PKC-alpha regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure. **Nature Medicine**. London, v.10, n.3, p.248-54, 2004.

Braunwald, E., and Bristow, M.R. Congestive heart failure: fifty years of progress. **Circulation**.102:IV14–IV23. 2000.

Brilla CG, Zhou G, Matsubara L, Weber KT. Collagen metabolism in cultured adult rat cardiac fibroblasts: response to angiotensin II and aldosterone. **J Mol Cell Cardiol.** 26:809–820, 1994.

Brilla CG. Renin-angiotensin-aldosterone system and myocardial fibrosis. **Cardiovasc Res.** 47(1): 1-3, 2000.

Brosnihan KB, Li P, Ferrario CM. Angiotensin-(1–7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide. **Hypertension.** 27, 1996.

Campbell DJ. Circulating and tissue angiotensin systems. **J Clin Invest** 79:1–6, 1987.

Campagnole-Santos MJ, Diz DI, Santos RAS, Khosla MC, Brosnihan KB & Ferrario CM. Cardiovascular effects of angiotensin-(1–7) injected into the dorsal medulla of rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 257: H324–H329, 1989.

Campagnole-Santos MJ, Heringer SB, Batista EN, Khosla MC, Santos RA. Differential baroreceptor reflex modulation by centrally infused angiotensin peptides. **Am J Physiol** 263: R89-94, 1992.

Carr, A.N., et al. Type 1 phosphatase, a negative regulator of cardiac function. **Mol Cell Biol.** 22:4124–4135. 2002.

Carey RM & Siragy HM. Newly recognized components of the reninangiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. **Endocr Rev.** 24: 261-271- 2003.

Carretero AO, Romero JC. Production and characteristics of experimental hypertension in animals. In: Genest G, Koiw E, Kuchel O (eds.). **Hypertension.** New York, McGraw, 485-507, 1977.

Chappell MC, Pirro NT, Sykes A, Ferrario CM. Metabolism of angiotensin-(1-7) by Angiotensin-Converting Enzyme. **Hypertension,** 31: 362-367, 1998.

Chancey AL, Brower GL, Peterson JT, Janicki JS. Effects of matrix metalloproteinase inhibition on ventricular remodeling due to volume overload.

Circulation. 23;105(16):1983-8, 2002.

Chomczynski, P.; Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical**

Biochemistry, v.162, p. 156-159, 1987.

Clark MA, Tallant EA, Diz DI. Downregulation of the AT1A receptor by pharmacologic concentrations of Angiotensin-(1-7). **J Cardiovasc Pharmacol.** 37(4), 2001.

Clausmeyer S, Reinecke A, Farrenkopf R, Unger T, Petres J. Tissue-specific expression of a rat renin transcript lacking the coding sequence for the prefragment and its stimulation by myocardial infarction. **Endocrinology.** 141: 2963-2970, 1998.

Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, Yagil C, Kozieradzki I, Scanga SE, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. **Nature.** 417, 2002.

DelliPizzi AM, Hilchey SD, Bell-Quilley CP. Natriuretic action of angiotensin(1-7). **Br J Pharmacol.** 111(1): 1-3, 1994.

Díez-Freire C, Vázquez J, Correa de Adjounian MF, Ferrari MF, Yuan L, Silver X, Torres R, Raizada MK. ACE2 gene transfer attenuates hypertension-linked pathophysiological changes in the SHR. **Physiol Genomics.** 27(1): 12-19, 2006.

Dias-Peixoto MF, Santos RA, Gomes ER, Alves MN, Almeida PWM, Greco L, Rosa M, Fauler B, Bader M, Alenina N, Guatimosim S. Molecular mechanisms involved in angiotensin-(1-7)/Mas signaling pathway in cardiomyocyte. **Hypertension.** 52:542-8,2008.

Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE, Acton S. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1–9. **Circ. Res.** 87, 2000.

Dorn, G. W., Force, T. Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy. **J Clin Invest.** London, v.115, n.3, p.527-37, 2005.

Dostal DE, Kenneth MB. The Cardiac Renin-Angiotensin System Conceptual, or a Regulator of Cardiac Function? **Circ. Res.** 85, 1999.

Dzau VJ. Tissue rennin-angiotensin system: physiologic and pharmacologic implications. Introduction. **Circulation.** 77 (6Pt 2): I1-2, 1988.

Edwardsen T, Gerber BL, Garot J, Bluemke DA, Lima JA, Smiseth OA. Quantitative assessment of intrinsic regional myocardial deformation by Doppler strain rate echocardiography in humans: validation against three-dimensional tagged magnetic resonance imaging. **Circulation.** 106:50-6. 2002.

Eva van Rooij, Pieter A. Doevendans, Harry J.G.M. Crijns, Sylvia Heeneman, Daniel J. Lips, Marc van Bilsen, R. Sanders Williams, Eric N, Olson, Rhonda Bassel-Duby, Beverly A. Rothermel and Leon J. De Windt. MCIP1 Overexpression Suppresses Left Ventricular Remodeling and Sustains Cardiac Function After Myocardial Infarction. **Circ. Res.** 94;18-26. 2004.

Fagard R, Cattaert A, Lijnen P, Staessen J, Vanhees L, Moerman E, Amery A. Responses of the systemic circulation and of the renin-angiotensin-aldosterone system to ketanserin at rest and exercise in normal man. **Clin Sci.** 66(1), 1984.

Faria-Silva R, Duarte FV, Santos RA. Short-term angiotensin(1-7) receptor MAS stimulation improves endothelial function in normotensive rats. Hypertension. 46(4): 948-952, 2005.

Fernandes L, Fortes ZB, Casarini DE, Nigro D, Tostes RC, Santos RA, de Carvalho MH. Role of PGI₂ and effects of ACE inhibition on the bradykinin potentiation by angiotensin-(1-7) in resistance vessels of SHR. **Regul Pept.** 15, 2005.

Ferrario CM, Santos RA, Brosnihan KB, Block CH, Schiavone MT, Khosla MC, Greene LJ. A hypothesis regarding the function of angiotensin peptides in the brain. **Clin Exp Hypertens** 10 Suppl 1:107-21, 1988.

Ferrario CM, Chappel MC, Tallant EA, Brosnihan KB, Diz DI. Counter-regulatory actions of angiotensin-(1-7). **Hypertension.** 27:523-528, 1997.

Ferreira AJ, Santos RAS, Almeida, AP. Angiotensin-(1-7): Cardioprotective Effect in Myocardial Ischemia/Reperfusion. **Hypertension.** 38: 665-668, 2001.

Ferreira AJ, Jacoby BA, Araujo CA, Macedo FA, Silva GAB, Almeida AP. The nonpeptide angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist AVE 0991 attenuates heart failure induced by myocardial infarction. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 292: H1113–H1119, 2007a.

Ferreira AJ, Oliveira TL, Castro MC, Almeida AP, Castro CH, Calviari MV. Isoproterenol-induced impairment of heart function and remodeling are attenuated by the nonpeptide angiotensin-(1-7) analogue AVE 0991. **Life Sci** 81, 916–923, 2007.

Ferreira AJ, Castro CH, Guatimosim S, Almeida PWM, Gomes ER, Dias-Peixoto, Alves MNM, Fagundes-Moura CR, Rentzsch B, Gava E, Almeida AP, Guimarães AM, Kitten GT, Reudelhuber T, Bader M and Santos RAS. Attenuation of isoproterenol-induced cardiac fibrosis in transgenic rats harboring an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein in the heart. **Ther Adv Cardiovasc Dis;** 4; 83, 2010.

Francis, G.S. Pathophysiology of chronic heart failure. **Am. J. Med.** 110:37S–46S. 2001.

Frank, K.F., Bolck, B., Erdmann, E., and Schwinger, R.H. Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase modulates cardiac contraction and relaxation. ***Cardiovasc. Res.*** 57:20–27. 2003.

Frey, N.; Olson, E.N. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. ***Annu.Rev.Physiol***, v.65,p.45–79, 2003.

Gomes ER, Lara AA, Almeida PWM, Guimarães D, Resende RR, Campagnole-Santos MJ, Bader M, Santos RA, Guatimosim S. Angiotensin-(1-7) prevents cardiomyocyte pathological remodeling through a nitric oxide/guanosine 3',5'-cyclic monophosphate dependent pathway. ***Hypertension***. 55:153-60, 2010.

Greene LJ, Spadaro AC, Martins AR, Perussi De Jesus WD & Camargo AC. Brain endo-oligopeptidase B: a post-proline cleaving enzyme that inactivates angiotensin I and II. ***Hypertension*** 178–184, 1982.

Giani JF, Gironacci MM, Munoz MC, Pena C, Turyn D & Dominici FP. Angiotensin-(1–7) stimulates the phosphorylation of JAK2, IRS-1 and Akt in rat heart in vivo: role of the AT1 and Mas receptors. ***Am J Physiol Heart Circ Physiol*** 293: H1154–H1163, 2007.

Grobe JL, Mecca AP, Mao H, Katovich MJ. Chronic angiotensin-(1-7) prevents cardiac fibrosis in the DOCA-salt model of hypertension. ***Am J Physiol***. 2006.

Grobe JL, Mecca AP, Lingis M, Shenoy V, Bolton TA, Machado JM, Speth RC, Raizada MK, Katovich MJ. Prevention of angiotensin II-induced cardiac remodeling by angiotensin-(1-7). ***Am J Physiol Heart Circ Physiol***. 292:H736-H742, 2007.

Guatimosim S, Dilly K, Santana LF, Jafri MS, Sobie EA, Lederer WJ. Local Ca²⁺ Signaling and EC Coupling in Heart: Ca²⁺ Sparks and the Regulation of the [Ca²⁺]_i Transient. ***J Mol Cell Cardiol***. 2002.

Gurley SB, Allred A, Le TH, Griffiths R, Mao L, Philip N, Haystead TA, Donoghue M, Breitbart RE, Acton SL, Rockman HA, Coffman TM. Altered blood pressure responses and normal cardiac phenotype in ACE2-null mice. **J Clin Invest.** 116(8): 2218-2225, 2006.

Gupta, R.C., et al. Cardiac SR-coupled PP1 activity and expression are increased and inhibitor 1 protein expression is decreased in failing hearts. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.** 2003. 285:H2373–H2381.

Heimdal A, Stoylen A, Torp H, Skjaerpe T. Real-time strain rate imaging of the left ventricle by ultrasound. **J Am Soc Echocardiogr.** 11:1013-9. 1998.

Heitsch H, Brovkovych S, Malinski T, Wiemer G. Angiotensin-(1-7)-Stimulated Nitric Oxide and Superoxide Release From Endothelial Cells. **Hypertension.** 37(1), 2001.

Haack D, Möhring J, Möhring B, Petri M, Hackenthal E. Comparative study on development of corticosterone and DOCA hypertension in rats. **American Journal Physiology.** 233 (5): F403 – F411, 1977.

Ichihara S, Senbonmatsu T, Price E Jr, Ichiki T, Gaffney FA, Inagami T. Angiotensin II type 2 receptor is essential for left ventricular hypertrophy and cardiac fibrosis in chronic angiotensin II-induced hypertension. **Circulation.** 104(3): 346-351, 2001.

Kimbrough HM, Jr., Vaughan ED, Jr., Carey RM e Ayers CR. Effect of intrarenal angiotensin II blockade on renal function in conscious dogs. **Circ Res** 40, 174-178, 1977.

Kostenis E, Milligan G, Christopoulos A, Sanchez-Ferrer CF, Heringer-Walther S, Sexton PM, Gembardt F, Pharm M, Kellett E, Phill D, Vanderheyden P, Schultheiss H, Walther T. G-Protein-Coupled Receptor Mas Is a Physiological Antagonist of the Angiotensin II Type 1 Receptor. **Circulation.** 111, 2005.

Lang RM, Bierig M, Devereaux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, et al. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the

Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. *J Am Soc Echocardiogr*. 18: 1440-63. 2005

Lazar G, Pagano M, Agarwal MK. Purification and execution characterization of the activated mineralocorticoid receptor from rat myocardium. *Biochem Biophys Acta* 1033: 41–48, 1990.

Li Y, Saito Y, Kuwahara K, Rong X, Kishimoto I, Harada M, Horiuchi M, Murray M, Nakao K. Vasodilator therapy with hydralazine induces angiotensin AT receptor-mediated cardiomyocyte growth in mice lacking guanylyl cyclase-A. *Br J Pharmacol*. 159(5):1133-42. 2010

Lindpainter K, Jin M, Niederlaier N, Wilhelm M, Ganten D. Cardiac angiotensinogen and its local activation in the isolated perfused beating heart. *Circ Res*. 67:564–573, 1990.

Lombe`s M, Oblin ME, Gasc JM, Baulieu EE, Farman N, Bonvalet JP. Immunohistochemical and bio- chemical evidence for a cardiovascular mineralocorticoid receptor. *Circ Res* 71: 503–510 1992.

Machado RD, Santos RA, Andrade SP. Opposing actions of angiotensins on angiogenesis. *Life Sci*. 66(1), 2000.

Machado RD, Santos RA, Andrade SP. Mechanisms of angiotensin-(1-7)-induced inhibition of angiogenesis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 280(4), 2001.

Machado RD, Ferreira MA, Belo AV, Santos RA, Andrade SP. Vasodilator effect of angiotensin-(1-7) in mature and sponge-induced neovasculature. *Regul Pept*. 15;107(1-3):105-13, 2002.

Maja Cikes, George R. Sutherland, Lisa J. Anderson and Bart H. Bijnens. The role of echocardiographic deformation imaging in hypertrophic myopathies. *Nat. Rev. Cardiol*. 7, 384–396. 2010.

Masafumi Yano, Yasuhiro Ikeda, and Masunori Matsuzaki. Altered intracellular Ca^{2+} handling in heart failure. ***The Journal of Clinical Investigation***. Volume 115 Number 3 March 2005.

Mazzolai L, Nussberger J, Aubert J, Brunner D, Gabbiani G, Brunner H, Pedrazzini T. Blood pressure independent cardiac hypertrophy induced by locally activated reninangiotensin system. ***Hypertension***. 31:1324-1330, 1998.

Medhurst, A.D.; Harrison, D.C.; Read, S.J.; Campbell, C.A.; Robbins, M.J.; Pangalos, M.N. The use of TaqMan RT-PCR assays for semiquantitative analysis of gene expression in CNS tissues and disease models. ***J Neurosci Methods***, v.15, p.9-20, 2000.

Mehta Pk, Griendling Kk. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. ***Am j Physiol Cell Physiol***. 292, 2006.

Mendes AC, Ferreira AJ, Pinheiro SV, Santos RA. Chronic infusion of angiotensin-(1-7) reduces heart angiotensin II levels in rats. ***Regul Pept***. 125, 2005.

Mitra, R.; Morad, M. A uniform enzymatic method for myocytes from hearts and stomachs of vertebrates. ***Am J Physiol Heart Circ Physiol.***, v.249, p. H1056-H1060, 1985.

Muller D, Fischli W, Clozel J, Hilgers K, Bohlender J, Menard J, Busjahn A, Ganten D, Luft F. Local angiotensin II generation in the rat heart: role of renin uptake. ***Circ Res*** 82:13-20, 1998.

Nadu AP, Ferreira AJ, Reudelhuber TL, Bader M, Santos RAS. The isoproterenol induced increase of cardiac Ang II levels associated with heart hypertrophy is blunted in rats harboring an Angiotensin-(1-7)-producing fusion protein [TGR(A1– 7)3292]. ***Hypertension***, 48, e72, 2006.

Oparil S, Chen YF, Meng QC, Yang RH, Jin HK, Wyss JM. The neural basis of salt sensitivity in the rat: altered hypothalamic function. **Am J Med Sci** 295:360-9, 1988.

Palaniyandi , S. S, Sun, L, Ferreira, J. C.; Mochly-Rosen,D. Protein kinase C in heart failure: a therapeutic target? **Cardiovascular Research**. London, v.82, n.2, p.229-39, 2009.

Paula RD, Lima CV, Khosla MC, Santos RA. Angiotensin-(1-7) potentiates the hypotensive effect of bradykinin in conscious rats. **Hypertension**. 26:11 54-9, 1995.

Porsti I, Bara AT, Busse R, Hecker M. Release of nitric oxide by angiotensin-(1-7) from porcine coronary endothelium: implications for a novel angiotensin receptor. **Br J Pharmacols**. 111(3), 1994.

Re R. The myocardial intracellular renin-angiotensin system. **Am J Cardiol** 59: 56A- 58A, 1987.

Ren Y, Garvin JL, Carretero OA. Vasodilator action of angiotensin-(1-7) on isolated rabbit afferent arterioles. **Hypertension**. 1:39(3):799-802, 2002.

Resende, R.R.; Yuahasi, K.K.; Majumder P.; Ulrich, H. Delivery systems of nucleic acids drugs for in vivo use. **Drug Target Insights**, v.2, p.183-196, 2007

Resende, R.R.; Gomes, K.N.; Adhikari, A.; Britto, L.R.; Ulrich, H. Mechanism of acetylcholine-induced calcium signaling during neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells in vitro. **Cell calcium**, v.43, p.107-121, 2008.

Robert V, Heymes C, Silvestre JS, Sabri A, Swynghedauw B, Delcayre C. Angiotensin AT1 receptor subtype as a cardiac target of aldosterone: role in aldosterone-salt-induced fibrosis. **Hypertension**. 33(4): 981-6, 1999.

Sadoshima J, Izumo S. Molecular characterisation of angiotensin II induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. *Circ Res*. 73:413–423, 1993.

Sampaio WO, Nascimento AA, and Santos RAS. Systemic and regional hemodynamics effects of angiotensin-(1–7) in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284: H1985–H1994, 2003.

Sampaio WO, Santos RAS, Faria-Silva R, Machado LT, Schiffrin EL, Touyz RM. Angiotensin-(1-7) through receptor MAS mediates endothelial nitric oxide synthase activation via AKT-dependent pathways. *Hypertension*. 49(1), 2007.

Santiago MN, Guimarães PS, Sirvente RA, Laser A.M, Irigoyen OMC, Santos RAS and Campagnole-Santos, MJ. Lifetime Overproduction of Circulating Angiotensin-(1-7) Attenuates Deoxycorticosterone Acetate-Salt Hypertension-Induced Cardiac Dysfunction and Remodeling. *Hypertension*; 55; 889-896. 2010.

Santos RAS, Brum JM, Brosnihan KB, Ferrario CM: The renin angiotensin system during acute myocardial ischemia in dogs. *Hypertension* 15(Suppl. 2): I121-I127, 1990

Santos RAS, Brosnihan KB, Jacobsen WD, Dicorleto PE, Ferrario CM. Production of angiotensin-(1-7) by human vascular endothelium. *Hypertension*. 19 (Suppl II): II56-II61, 1992.

Santos RAS, Simões e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de Buhr I, Heringer-Walther S, Pinheiro SV, Lopes MT, Bader M, Mendes EP, Lemos VS, Campagnole-Santos MJ, Schultheiss HP, Speth R, Walther T. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G proteincoupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci*. 2003

Santos RAS, Ferreira AJ, Nadu AP, Braga ANG, Almeida AP, Campagnole-Santos MJ, Baltatu O, Iliescu R, Reudelhuber TL and Bader M. Expression of an angiotensin- (1–7) producing fusion protein produces cardioprotective effects in rats. *Physiol Genomics*. 17:292–9, 2004.

Santos RAS, Ferreira AJ, Pinheiro SV, SampaioWO, Touyz R, Campagnole-Santos MJ. Angiotensin-(1–7) and its receptor as a potential targets for new cardiovascular drugs. *Expert Opin Investig Drugs*. 14, 1019–1031, 2005.

Santos, R. A.; Castro, C. H.; Gava, E.; Pinheiro, S. V.; Almeida A. P.; Paula, R. D.; Cruz, J. S.; Ramos, A. S.; Rose, K. T.; Irigoyen, M. C.; Bader, M.; Alenina, N.; Kitten, G. T.; Ferreira, A. J. Impairment of in vitro and in vivo heart function in angiotensin-(1-7) receptor MAS knockout mice. *Hypertension* , New York, v.47, n.5, p.996-1002, 2006.

Santos RAS, Ferreira AJ. Angiotensin- (1–7) and the renin angiotensin system. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 16:122–128, 2007.

Santos RA, Ferreira AJ, Simões e Silva AC. Recent advances in the angiotensin converting enzyme 2-angiotensin (1-7)-Mas axis. *Exp Physiol* 93: 519-527, 2008.

Shapiro BP, Owan TE, Mohammed S, Kruger M, Linke WA, Burnett JC Jr, Redfield MM. Mineralocorticoid signaling in transition to heart failure with normal ejection fraction. *Hypertension*. 51(2):289-95, 2008.

Schiavone MT, Santos RAS, Brosnihan KB, Khosla MC & Ferrario CM. Release of vasopressin from the rat hypothalamo-neurohypophysial system by angiotensin- (1–7) heptapeptide. *Proc Natl Acad Sci* 4095–4098, 1988.

Schunkert H, Dzau VJ, Tang SS, Hirsch AT, Apstein CS, Lorell BH. Increased rat cardiac angiotensin converting enzyme activity and mRNA expression in pressure overload left ventricular hypertrophy: effect on coronary resistance, contractility, and relaxation. *J Clin Invest*. 86: 1913-20, 1990.

Senbonmatsu T, Saito T, Landon EJ, Watanabe O, Price Jr E, Roberts RL. A novel angiotensin II type 2 receptor signaling pathway: possible role in cardiac hypertrophy. *EMBO J*. 22: 6471–82, 2003.

Stoll M, Steckelings UM, Paul M, Bottari SP, Metzger R, Unger T. The angiotensin AT2 receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J Clin Invest*. 95:651–657, 1995.

Takeda M, Tatsumi T, Matsunaga S, Hayashi H, Kimata M, Honsho S, Nishikawa, Akiko A, Suiraiishi J, Yamada H, Takahashi T, Matoba S, Kobara M, Matsubara. Spironolactone modulates expressions of cardiac mineralocorticoid receptor and 11_β-Hydroxysteroid dehydrogenase 2 and prevents ventricular remodeling in postinfarct rat hearts. *Hypertension*. 30: 427-437, 2007.

Tallant EA, Diz DI, and Ferrario CM. State-of-the-art lecture. Antiproliferative actions of angiotensin-(1–7) in vascular smooth muscle. *Hypertension* 34: 950–957, 1999.

Tanaka M, Ohnishi J, Ozawa Y, Sugimoto M, Usuki S, Naruse M, Murakami K, Miyazaki H. Characterization of angiotensin II receptor type 2 during differentiation and apoptosis of rat ovarian cultured granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 207:593–598, 1995.

Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G & Turner AJ. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captoprilinsensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem*. 275, 33238–33243, 2000.

Tsutsumi Y, Matsubara H, Masaki H, Kurihara T, Murasawa S, Takai S, Miyazuki M, Nozawa Y, Ozono R, Nakagawa K, Miwa T, Kawada N, Mori Y, Shibasaki Y, Tanaka Y, Fujiyama S, Koyama Y, Fujiyama A, Takahashi H, Iwasaka T. Vascular smooth muscle-targeted over expression of angiotensin II

type 2 receptor causes endothelium-dependent depressor and vasodilative effects via activation of the vascular kinin system. *J Clin Invest.* 104:855–864, 1999.

Weir MR, Dzau VJ. The Renin-Angiotensin-Aldosterone System: A Specific Target for Hypertension Management. *American Journal of Hypertension.* 12: 189S-194S, 1999.

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.*; 16 (Suppl N): 12-18. 1995.

Zisman LS, Meixell GE, Bristow MR & Canver CC. Angiotensin-(1–7) formation in the intact human heart: in vivo dependence on angiotensin II as substrate. *Circulation.* 108: 1679–1681, 2003.

Zolk O, Flesch M, Schnabel P. Effects of quinapril, losartan and hydralazine on cardiac hypertrophy and β -adrenergic neuroeffector mechanisms in transgenic (mREN2)27 rats. *Br J Pharmacol.* 132:405–412. 1998.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)