



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**INFLUÊNCIA DA ANGIOTENSINA-(1-7) NA SENSIBILIDADE
COLINÉRGICA CARDÍACA DE RATOS NORMOTENSOS E
HIPERTENSOS**

CAROLINA NOBRE RIBEIRO PONTES

GOIÂNIA-GO

2018

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: Carolina Nobre Ribeiro Pontes

Título do trabalho: INFLUÊNCIA DA ANGIOTENSINA-(1-7) NA SENSIBILIDADE COLINÉRGICA CARDÍACA DE RATOS NORMOTENSOS E HIPERTENSOS

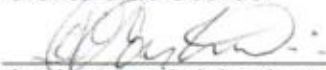
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ **SIM** ☐ **NÃO**¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)²

Prof. Dr. Carlos Henrique de Castro
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

Data: 28 / 09 / 18

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² A assinatura deve ser escaneada.

CAROLINA NOBRE RIBEIRO PONTES

**INFLUÊNCIA DA ANGIOTENSINA-(1-7) NA SENSIBILIDADE
COLINÉRGICA CARDÍACA DE RATOS NORMOTENSOS E
HIPERTENSOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Fisiologia e Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique Castro
Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique Xavier Custódio

GOIÂNIA-GO

2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Nobre Ribeiro Pontes, Carolina
INFLUÊNCIA DA ANGIOTENSINA-(1-7) NA SENSIBILIDADE
COLINÉRGICA CARDÍACA DE RATOS NORMOTENSOS E
HIPERTENSOS [manuscrito] / Carolina Nobre Ribeiro Pontes. - 2018.
Ixxii, 62 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique de Castro; co-orientador Dr.
Carlos Henrique Xavier Custódio.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto
de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Biologia,
Goiânia, 2018.
Bibliografia. Anexos.
Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de
figuras, lista de tabelas.

1. Sistema Renina-Angiotensina. 2. Receptor Mas. 3. Receptor
Muscarínico. 4. Acetilcolina. 5. Atividade parassimpática. I. de Castro,
Carlos Henrique, orient. II. Título.

CDU 612.1



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

1 **ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Nº 472**

2 Aos dois dias do mês de março do ano de dois mil e dezoito, às catorze horas,
3 no Anfiteatro do Instituto de Ciências Biológicas I da Universidade Federal de
4 Goiás, reuniram-se os componentes da banca examinadora: Prof. Dr. Carlos
5 Henrique de Castro, Prof. Dr. Carlos Henrique Xavier Custódio, Profa. Dra.
6 Aline Priscila Pansani e Prof. Dr. Gustavo Rodrigues Pedrino para, em sessão
7 pública presidida pelo primeiro examinador citado, procederem à avaliação da
8 defesa de dissertação intitulada "INFLUÊNCIA DA ANGIOTENSINA-(1-7) NA
9 SENSIBILIDADE COLINÉRGICA CARDÍACA DE RATOS NORMOTENSOS E
10 HIPERTENSOS", em nível de mestrado, área de concentração em Farmacologia
11 e Fisiologia, de autoria de **Carolina Nobre Ribeiro Pontes**, discente do
12 Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de
13 Goiás. A sessão foi aberta pelo presidente, que fez a apresentação formal dos
14 membros da banca. A palavra, a seguir, foi concedida à autora da dissertação
15 que em cerca de 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho.
16 Terminada a apresentação, cada membro da banca arguiu a examinada,
17 tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de
18 arguição, procedeu-se à avaliação da dissertação. Tendo-se em vista o que
19 consta na Resolução nº1491 de 2017 do Conselho de Ensino, Pesquisa,
20 Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação
21 em Ciências Biológicas, a dissertação foi aprovada considerando-se
22 integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de
23 Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Goiás. A conclusão
24 do curso dar-se-á quando da entrega da versão definitiva da dissertação na
25 Secretaria do programa, com as devidas correções sugeridas pela banca
26 examinadora, no prazo de trinta dias a contar da data da defesa. Cumpridas as



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

27 formalidades de pauta, às 16 horas e 21 minutos, encerrou-
28 se a sessão de defesa de dissertação e, para constar, eu, Renato César
29 Rodrigues, Assistente em Administração da Secretaria de Pós-graduação do
30 Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, lavrei a
31 presente ata que, após lida e aprovada, será assinada pelos membros da
32 banca examinadora em três vias de igual teor.

33

34

35

36



Prof. Dr. Carlos Henrique de Castro

37

Presidente da Banca

38

Universidade Federal de Goiás

39

40

41



Prof. Dr. Carlos Henrique Xavier Custódio

42

Universidade Federal de Goiás

43

44

45



Prof. Dra. Aline Priscila Pansani

46

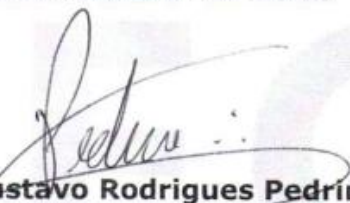
Universidade Federal de Goiás

47

48

49

50



Prof. Dr. Gustavo Rodrigues Pedrino

51

Universidade Federal de Goiás

Dedicatória

Dedico este trabalho a Deus, por sempre guiar meus caminhos, e à minha família por todos os esforços para que eu chegasse até aqui

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por iluminar sempre os meus caminhos e me dar toda a força, paciência e coragem para lutar pelos meus sonhos.

À minha família, principalmente meus pais Waldiney e Solange, por todos os sacrifícios que fizeram para me proporcionar uma educação de qualidade, por me incentivar e acreditar em mim mesma nos momentos de fraqueza. Agradeço também à minha irmã Juliana e minha avó Nadir por todo o carinho.

Ao meu noivo e grande amor Brunno, por toda a paciência, carinho, compreensão e ajuda em tudo. Você é um grande exemplo profissional para mim, e a cada dia me torna uma pessoa e uma biomédica melhor.

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Castro por todos os ensinamentos ao longo destes dois anos, por toda a paciência, compreensão, oportunidades e conselhos. Você é um grande orientador e me incentiva a cada dia a ser uma profissional melhor.

Ao Prof. Dr. Carlos Henrique Xavier por toda a ajuda e ensinamentos desde que bati na sua porta em 2013, à procura de um laboratório para fazer iniciação científica, e desde então me apaixonei pela fisiologia.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório Integrado de Fisiopatologia Cardiovascular e Neurológica e dos outros laboratórios pela ajuda diária.

Ao governo brasileiro e às seguintes agências de fomento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) e principalmente à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa para que eu realizasse meus estudos.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas pela oportunidade de crescimento profissional

À população brasileira por possibilitar que eu me tornasse mestre. Espero usar os conhecimentos adquiridos para retribuir a oportunidade.

A todos que de alguma forma me ajudaram e possibilitaram que este trabalho fosse realizado.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	15
1.1. O Coração como uma Bomba Contrátil.....	15
1.2. Controle Autonômico da Função Cardiovascular	17
1.3. Sistema Renina-Angiotensina	18
1.4. Angiotensina-(1-7).....	20
1.5. Interação entre Sistema Nervoso Autônomo e Sistema Renina-Angiotensina 21	
2. OBJETIVOS	24
2.1. Objetivos Gerais.....	24
2.2. Objetivos Específicos	24
3. METODOLOGIA.....	25
3.1. Animais	25
3.2. Avaliação dos parâmetros cardiovasculares (<i>in vivo</i>)	25
3.2.1. Protocolo	26
3.3. Coração Isolado	27
3.3.1. Protocolo	28
3.4. Anéis Isolados de Aorta	30
3.4.1. Protocolo	30
3.5. Análise Estatística.....	31
4. RESULTADOS	32
4.2. Resumo dos Resultados	44
5. DISCUSSÃO	46
6. CONCLUSÃO.....	51
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
8. ANEXOS	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A-779, D-Alanina-Ang-(1-7) (antagonista do receptor Mas)

ACh, Acetilcolina

Akt, Proteína Quinase B

AMP, Aminopeptidase

AMP A, Aminopeptidase A

AMPC, Monofosfato Cíclico de Adenosina

Ang A, Angiotensina A

Ang I, Angiotensina I

Ang II, Angiotensina II

Ang III, Angiotensina III

Ang IV, Angiotensina IV

Ang-(1-7), Angiotensina-(1-7)

Ang-(1-9), Angiotensina-(1-9)

AT1, Receptor de Ang II Tipo 1

AT2, receptor de Ang II Tipo 2

ATP, Trifosfato de Adenosina

CVLM, Bulbo Ventrolateral Caudal

DC, Descarboxilase

D-PRO, D-Pro7- Ang-(1-7) (antagonista do receptor MrgD)

ECA, Enzima Conversora de Angiotensina

ECA2, Enzima Conversora de Angiotensina 2

eNOS, Óxido Nítrico Sintase Endotelial

FC, Frequência Cardíaca

Gi, Proteína G Inibitória

GMPc, Monofosfato Cíclico de Guanina

Gs, Proteína G Estimulatória

$I_{Ca,L}$, Corrente de Cálcio do Tipo L

M2, Receptor muscarínico subtipo 2

NCX, Trocador de Sódio e Cálcio

NEP, Endopeptidase Neutra

NO, Óxido Nítrico

PA, Pressão Arterial

PAD, Pressão Arterial Diastólica
PAM, Pressão Arterial Média
PAS, Pressão Arterial Sistólica
PEP, Prolil Endopeptidase
PI3K, Fosfatidilinositol-3-Quinase
PIVD, Pressão Intraventricular Diastólica
PIVS, Pressão Intraventricular Sistólica
PKA Proteína Quinase A
PLB, Fosfolambam
RS, Retículo Rarcoplasmático
RVLM, Bulbo Ventrolateral Rostral
RyR2, Receptor de Rianodina do Tipo 2
SERCA2, Bomba Ca^{2+} ATPase do Retículo Sarcoplasmático
SHR, Ratos Espontaneamente Hipertensos
SNA, Sistema Nervoso Autônomo
SNC, Sistema Nervoso Central
SNP, Sistema Nervoso Parassimpático
SNS, Sistema Nervoso Simpático
SRA, Sistema Renina-Angiotensina
TnC, troponina C

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Acoplamento excitação-contração e transporte de cálcio em cardiomiócito.	16
Figura 2. Visão simplificada da cascata do Sistema Renina-Angiotensina	19
Figura 3. Registro de pressão exemplificando o momento em que o ventrículo esquerdo cardíaco foi acessado.....	26
Figura 4. Esquema representativo do protocolo experimental in vivo.	27
Figura 5. Esquema representativo do protocolo experimental de corações isolados.	29
Figura 6. Esquema representativo do protocolo experimental de vaso isolado.....	31
Figura 7: Influência da Ang-(1-7) nos efeitos da ACh na Pressão Intraventricular Sistólica em ratos anestesiados (A) Wistar e (B) SHR.	33
Figura 8: Influência da Ang-(1-7) nos efeitos da ACh na dP/dt máx em ratos anestesiados (A) Wistar e (B) SHR	34
Figura 9: Influência da Ang-(1-7) nos efeitos da ACh na dP/dt mín em ratos anestesiados (A) Wistar e (B) SHR.	35
Figura 10: Influência da Ang-(1-7) nos efeitos da ACh na Pressão Arterial Sistólica em ratos anestesiados (A) Wistar e (B) SHR	36
Figura 11: Influência da Ang-(1-7) nos efeitos da ACh na Pressão Arterial Diastólica em ratos anestesiados (A) Wistar e (B) SHR	37
Figura 12: Influência da Ang-(1-7) nos efeitos da ACh na Pressão Arterial Média em ratos anestesiados (A) Wistar e (B) SHR.	38
Figura 13: Influência da Ang-(1-7) nos efeitos da ACh na Pressão Intraventricular Sistólica em corações isolados de (A) Wistar e (B) SHR.....	40

Figura 14: Influência da Ang-(1-7) nos efeitos da ACh na dP/dt máx em corações isolados de (A) Wistar e (B) SHR	41
Figura 15: Influência da Ang-(1-7) nos efeitos da ACh na dP/dt mín em corações isolados de (A) Wistar e (B) SHR	42
Figura 16: Influência da Ang-(1-7) nos efeitos da ACh no vasorrelaxamento de anéis isolados de aorta em ratos (A) Wistar e (B) SHR.	43
Figura 17: Valores de Pressão Intraventricular Sistólica de (A) Wistar e (B) SHR antes e após a infusão de veículo e peptídeos.....	58
Figura 18: Valores de dP/dt máx de (A) Wistar e (B) SHR antes e após a infusão de veículo e peptídeos.	58
Figura 19: Valores de dP/dt mín de (A) Wistar e (B) SHR antes e após a infusão de veículo e peptídeos.	59
Figura 20: Valores de Pressão Arterial Sistólica de (A) Wistar e (B) SHR antes e após a infusão de veículo e peptídeos	59
Figura 21: Valores de Pressão Arterial Diastólica de (A) Wistar e (B) SHR antes e após a infusão de veículo e peptídeos	60
Figura 22: Valores de Pressão Arterial Média de (A) Wistar e (B) SHR antes e após a infusão de veículo e peptídeos.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição da solução de Krebs-Ringer	28
Tabela 2. Composição da solução de Krebs-Henseleit.....	30
Tabela 3. Resumo esquemático mostrando os resultados dos experimentos <i>in vivo</i> com Wistar	44
Tabela 4. Resumo esquemático mostrando os resultados dos experimentos <i>in vivo</i> com SHR	44
Tabela 5. Resumo esquemático mostrando os resultados dos experimentos de coração isolado com Wistar	45
Tabela 6. Resumo esquemático mostrando os resultados dos experimentos de coração isolado com SHR.....	45
Tabela 7. Resumo esquemático mostrando os resultados dos experimentos de vaso isolado com Wistar.....	45
Tabela 8. Resumo esquemático mostrando os resultados dos experimentos de vaso isolado com SHR	45

RESUMO

Estudos prévios sugerem que a Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] é capaz de modular o controle simpático cardíaco e sensibilidade beta-adrenérgica. Entretanto, ainda não se sabe se a Ang-(1-7) consegue modular a atividade colinérgica no coração. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da Ang-(1-7) na sensibilidade colinérgica cardíaca de ratos normotensos e hipertensos. Wistar e Ratos Espontaneamente Hipertensos (SHR) foram anestesiados com uretano e submetidos à canulação de artéria femoral e ventrículo esquerdo cardíaco para registro de pressão arterial e intraventricular, respectivamente. Em seguida, foi realizada uma curva dose-resposta de acetilcolina (ACh, 10, 20, 40 e 80 ng/Kg, i.v.) por infusão pela veia femoral. A infusão ocorreu na presença e ausência de Ang-(1-7) (7×10^{-12} mol/min), do antagonista do receptor Mas, A-779 (7×10^{-11} mol/min) ou de Ang-(1-7)+A-779. Os corações isolados foram perfundidos de acordo com a técnica de Langendorff e concentrações crescentes de ACh (10^{-7} a 10^{-5} mol/L) foram adicionadas aos corações na presença ou ausência de Ang-(1-7), (2×10^{-11} mol/L), A-779, (2×10^{-10} mol/L), Ang-(1-7)+A-779, antagonista do receptor MrgD, D-PRO (2×10^{-10} mol/L) ou D-PRO+Ang-(1-7). O vasorrelaxamento induzido pela ACh foi mensurado na presença ou ausência da Ang-(1-7) (2×10^{-11} mol/L ou 2×10^{-10} mol/L). Em Wistar e SHR anestesiados, a Ang-(1-7) atenuou o efeito da ACh na queda da pressão intraventricular sistólica, dP/dt máx, e dP/dt mín. Estes efeitos foram bloqueados pelo A-779. A Ang-(1-7) não alterou a resposta hipotensora da ACh em Wistar ou SHR. Nos corações isolados, a Ang-(1-7) também atenuou a redução na pressão intraventricular sistólica, dP/dt máx e dP/dt mín evocados pela ACh. O A-779 bloqueou os efeitos da Ang-(1-7) em corações de Wistar. O A-779 ou D-PRO, *per se*, não modificaram os efeitos da Ang-(1-7) em corações de SHR, mas na presença do D-PRO, a Ang-(1-7) apresentou efeitos similares. O vasorrelaxamento da aorta induzido pela ACh foi atenuado pela Ang-(1-7) apenas nos SHR. Estes dados sugerem que a Ang-(1-7) modula o sistema colinérgico cardíaco de forma diferente no modelo de hipertensão primária experimental e de maneira independente de ajustes na pressão arterial.

Palavras-chave: Sistema Renina-Angiotensina; Receptor Mas; Receptor Muscarínico; Acetilcolina; Atividade parassimpática.

ABSTRACT

Previous studies suggested that the Angiotensin-(1-7) [(Ang-(1-7))] is able to modulate the cardiac sympathetic control and beta-adrenergic sensitivity. However, whether or not Ang-(1-7) modulates the cholinergic activity in the heart remains unknown. The aim of this study was to evaluate the influence of Ang-(1-7) upon cholinergic sensitivity of hearts from normotensive and hypertensive rats. Wistar and Spontaneously Hypertensive Rats (SHR) were anesthetized with urethane and underwent catheterization of femoral artery and left ventricle to record the arterial and intraventricular pressure, respectively. Following, a dose-response curve of acetylcholine (ACh, 10, 20, 40 and 80 ng/Kg, i.v. into femoral vein) was performed in the absence or presence of Ang-(1-7) (7×10^{-12} mol/min), Mas receptor antagonist A-779 (7×10^{-11} mol/min) or Ang-(1-7)+A-779. Isolated hearts were perfused according to the Langendorff technique. Increasing concentrations of ACh (10^{-7} to 10^{-5} mol/L) were added to the hearts in absence or presence of Ang-(1-7), (2×10^{-11} mol/L), A-779, (2×10^{-10} mol/L), Ang-(1-7)+A-779, MrgD receptor antagonist, D-PRO (2×10^{-10} mol/L) or D-PRO+Ang-(1-7). ACh-induced vasorelaxation was assessed in absence or presence of Ang-(1-7) (2×10^{-11} mol/L or 2×10^{-10} mol/L). Ang-(1-7) attenuated the effect of ACh in decreasing the intraventricular systolic, dP/dt max and dP/dt min in anesthetized Wistar and SHR. These effects were blocked by A-779. Ang-(1-7) did not change the amplitude of the hypotensive effect evoked by ACh in Wistar or SHRs. In isolated hearts, Ang-(1-7) also attenuated the reduction of the intraventricular systolic pressure, dP/dt max and dP/dt min evoked by ACh. A-779 blocked the Ang-(1-7) effects in hearts from Wistar. A-779 or D-PRO did not modify the effects of Ang-(1-7) in hearts from SHR, but in presence of D-PRO, Ang-(1-7) effects were equipotent. Ang-(1-7) attenuated the vasorelaxation induced by ACh in aorta from SHR by only in SHR group. These data suggest that Ang-(1-7) exerts differential modulation of cardiac cholinergic sensitivity during experimental primary hypertension, which is independent on blood pressure.

Keywords: Renin-Angiotensin System; Mas Receptor; Muscarinic Receptor; Acetylcholine; Parasympathetic Activity.

1. INTRODUÇÃO

1.1. O Coração como uma Bomba Contrátil

O coração é um dos órgãos mais importantes para o funcionamento do corpo humano. Em mamíferos, este órgão é dividido em dois átrios e dois ventrículos, em que o lado esquerdo é responsável pela circulação sistêmica e o direito pela pulmonar. O miocárdio é responsável pelo processo de contração e é composto por células musculares estriadas cardíacas que se dispõem em feixes de diferentes espessuras e direções (1,2).

Juntamente às células cardíacas, há algumas estruturas de tecido muscular modificado que são especializadas na criação e condução da atividade elétrica, chamadas de nodos. O potencial de ação se inicia no átrio direito, onde está localizado o nodo sino-atrial, mais conhecido como marca-passo cardíaco. O estímulo elétrico gerado por ele propaga-se para o septo interatrial, chegando ao nodo atrioventricular. Assim, o potencial de ação segue para os ventrículos via feixe de His, que posteriormente ramifica-se em uma grande rede de condução, as fibras de Purkinje (1).

Para que o estímulo elétrico gerado pelo potencial de ação seja traduzido em uma ação mecânica, é necessária a participação do acoplamento excitação-contracção (Figura 1). Com a deflagração do potencial de ação, ocorre a entrada de sódio (Na^+) para o meio intracelular, levando a uma despolarização da membrana. Como os canais de cálcio (Ca^{2+}) do tipo L são dependentes de voltagem, quando ocorre a despolarização, estes se abrem, permitindo um influxo de Ca^{2+} (3,4). Com o aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} , os receptores de rianodina do tipo 2 (RyR2) liberam mais deste íon que estava armazenado no retículo sarcoplasmático (RS), aumentando ainda mais seus níveis. Isso favorece a ligação do Ca^{2+} à troponina C (TnC), uma proteína que está presente nos miofilamentos de actina. Com essa ligação, a tropomiosina é deslocada e os sítios de ligação da actina ficam expostos, permitindo a formação de pontes cruzadas com a miosina e consequente contração da célula muscular cardíaca (3,4).

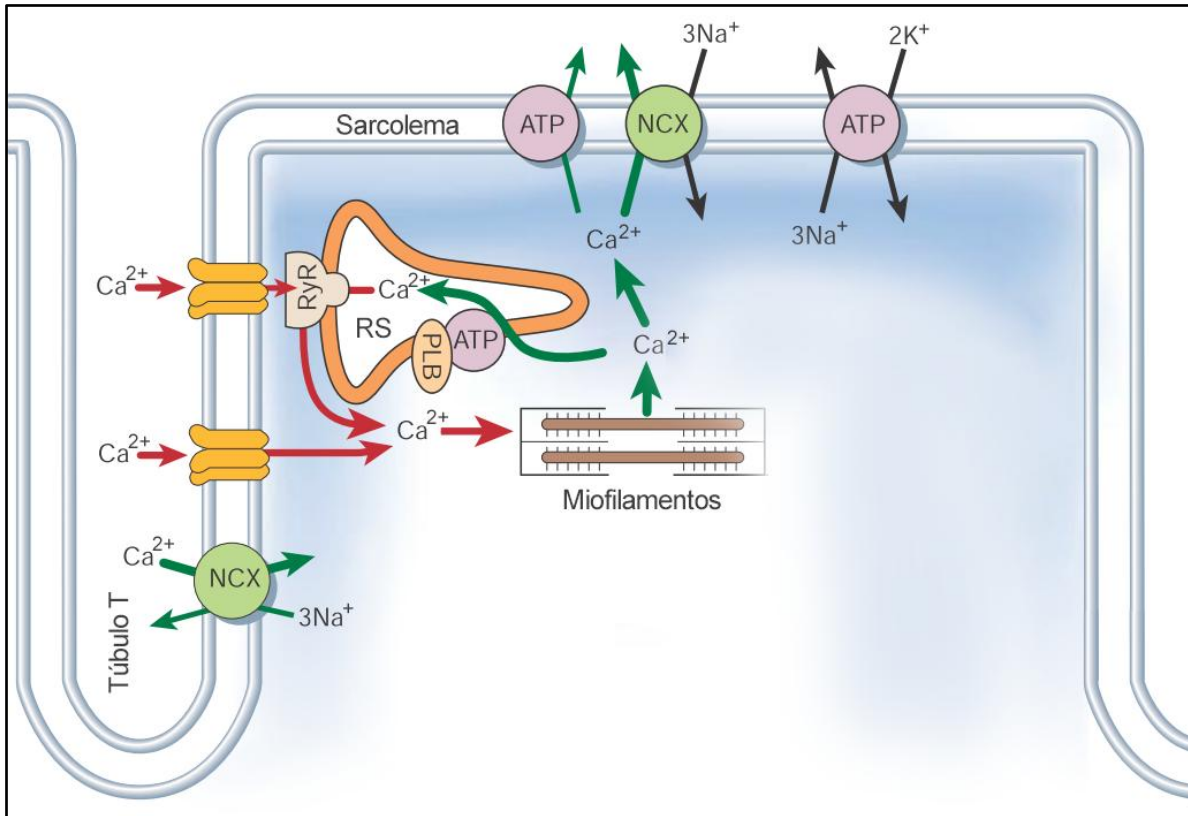


Figura 1. Acoplamento excitação-contracção e transporte de cálcio em cardiomiócito. Ca^{2+} , cálcio; NCX, trocador de sódio e cálcio; RyR, receptor de ryanodina; SR, retículo sarcoplasmático; PLB, fosfolambam; ATP, trifosfato de adenosina; Na^+ , sódio; H, hidrogênio. Adaptado de Bers, 2002 (5).

Para que o relaxamento ocorra, os níveis intracelulares de Ca^{2+} precisam ser restaurados. Para isso, a proteína fosfolambam (PLB) é fosforilada e deixa de inibir a bomba Ca^{2+} ATPase (SERCA2), que atua bombeando Ca^{2+} novamente para o SR, onde é armazenado. A SERCA2 atua juntamente com o trocador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), que leva um íon de Ca^{2+} para o meio extracelular em troca de três de Na^+ , fazendo com que haja uma diminuição dos níveis de Ca^{2+} no citosol. Assim, a afinidade da TnC pelo Ca^{2+} diminui e ocorre uma dissociação entre eles, o que faz com que o complexo troponina e tropomiosina se movimente, bloqueando novamente os sítios de ligação da actina (3,6).

Como visto, o Ca^{2+} é um importante regulador do processo de contracção. Quando ocorrem alterações na função cardíaca, são necessários ajustes na sua dinâmica intracelular, seja alterando sua concentração citosólica ou interferindo na sensibilidade dos canais em que ele se liga (3). Como exemplo, o sistema nervoso simpático (SNS) estimula os receptores β adrenérgicos, localizados no coração, levando à ativação da proteína G estimulatória (G_s) à qual estão acoplados. Isto irá

aumentar os níveis de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) que consequentemente ativa a proteína quinase A (PKA), que pode fosforilar os canais do tipo L, RyR2, SERCA2 e NCX, alterando a dinâmica do Ca^{2+} (4,6).

A função cardíaca também pode ser controlada por diferentes mecanismos neuro-humorais. Dentre estes, pode-se destacar o sistema nervoso autônomo (SNA) e o sistema renina-angiotensina (SRA).

1.2. Controle Autônomo da Função Cardiovascular

O SNA é responsável, dentre outras funções, pelo controle da contração do miocárdio. No coração, seus braços simpático e parassimpático exercem efeitos sinérgicos (1).

O SNS é responsável pelo controle das reações estressoras e emergenciais por meio da liberação de norepinefrina. Existem dois tipos de receptores adrenérgicos: α e β . No coração são expressos os subtipos β_1 , β_2 , β_3 , α_{1a} e α_{1b} , sendo que os receptores β_1 estão presentes em maior quantidade que os demais (7,8). A estimulação destes receptores provoca um aumento na frequência e contratilidade cardíaca (efeitos cronotrópico e inotrópico positivos), por meio do aumento dos níveis intracelulares de Ca^{2+} e da velocidade de condução elétrica no nodo atrioventricular (efeito dromotrópico positivo) (1).

Já o sistema nervoso parassimpático (SNP) evoca efeitos diferentes ao do simpático, como o estímulo de atividades relaxantes (digestão e liberação de secreções glandulares, por exemplo), e age como depressor da função cardíaca por meio da liberação de acetilcolina (ACh). A ACh pode se ligar em dois tipos de receptores: os nicotínicos – expressos na musculatura esquelética e no sistema nervoso – e os muscarínicos (1,7). Os receptores muscarínicos são subdivididos em M1, M2, M3, M4 e M5 e suas respostas são relativamente mais lentas, uma vez que são receptores metabotrópicos, ou seja, precisam ativar a proteína G e vias intracelulares para exercer suas funções. Enquanto os receptores muscarínicos subtipo 2 (M2) são expressos no coração, nos tecido nodal e atrial e ventrículos, os M3 são expressos principalmente no endotélio de alguns leitos vasculares. Embora a ACh seja excitatória no músculo estriado esquelético (através da sua ligação aos receptores nicotínicos que ativam canais de sódio dependentes de voltagem), no coração, a ACh reduz a atividade dos cardiomiócitos (1,9).

De forma oposta ao SNS, os efeitos parassimpáticos no coração por meio das ações da ACh sobre receptores M2 provocam efeitos negativos sobre o cronotropismo, inotropismo e dromotropismo (7). A estimulação parassimpática induz efeitos cardíacos resultantes da ativação dos receptores M2, em que a ACh se liga, ativando a proteína G inibitória (Gi). Assim, a subunidade α_i liga-se e inibe a adenilato ciclase, reduzindo a formação de AMPc e inibindo a atividade da proteína PKA, a fim de exercer efeitos opostos nos canais iônicos, nas proteínas ligadoras ao Ca^{2+} e na maquinaria contrátil, quando comparados à estimulação simpática (1,10).

Vários estudos já mostraram o papel essencial do SNA no controle do sistema cardiovascular, especialmente da pressão arterial (PA). Estudos clínicos e experimentais mostraram que disfunções no controle autonômico do sistema cardiovascular, principalmente as que levam a uma ativação anormal do SNS, estão intimamente ligadas à origem e progressão da hipertensão (11). Tanto em humanos quanto em modelos animais de hipertensão essencial, como os ratos espontaneamente hipertensos (SHR), as alterações autonômicas são grandes responsáveis na geração e manutenção de níveis aumentados da PA. Estes efeitos estão diretamente associados tanto a um aumento da atividade nervosa simpática quanto a uma redução do tônus vagal para o coração (12–14). Além disso, este desequilíbrio autonômico também exerce um papel importante no desenvolvimento de lesões nos órgãos alvo, levando a várias outras complicações decorrentes do quadro hipertensivo (15). A progressão e manutenção da hipertensão, engatilhada pelo desequilíbrio autonômico, também recebem contribuição de sistemas hormonais, como o SRA (16).

1.3. Sistema Renina-Angiotensina

O SRA (Figura 2) é um importante mecanismo envolvido na regulação da pressão arterial, do volume sanguíneo e da composição eletrolítica dos fluidos corporais (17,18).

Este sistema é ativado principalmente pela diminuição na PA e consequente liberação de pró-renina, que pode ser sintetizada e armazenada pelas células justaglomerulares nos rins. Com a queda de pressão na artéria renal, o seguimento pró é clivado e deixa de cobrir o sítio ativo desta molécula, fazendo com que as moléculas de pró-renina sejam convertidas em renina (19).

A renina atua clivando uma das ligações peptídicas do angiotensinogênio plasmático (produzido pelo fígado), o que resulta na formação do decapeptídeo angiotensina I (Ang I). A Ang I é posteriormente clivada pela enzima conversora de angiotensina (ECA), originando o octapeptídeo angiotensina II (Ang II), que exerce suas ações ativando dois subtipos de receptores, os receptores de Ang II tipo um (AT1) e tipo dois (AT2) (20,21). Quando este peptídeo liga-se ao receptor AT1, evoca efeitos relacionados a condições patológicas, como aumento da PA, fibrose, inflamação, insuficiência cardíaca e alterações metabólicas. Já a ativação do receptor AT2 exerce efeitos contrarregulatórios, como processos antiinflamatórios, diminuição da atividade simpática e do remodelamento cardíaco (22–25).

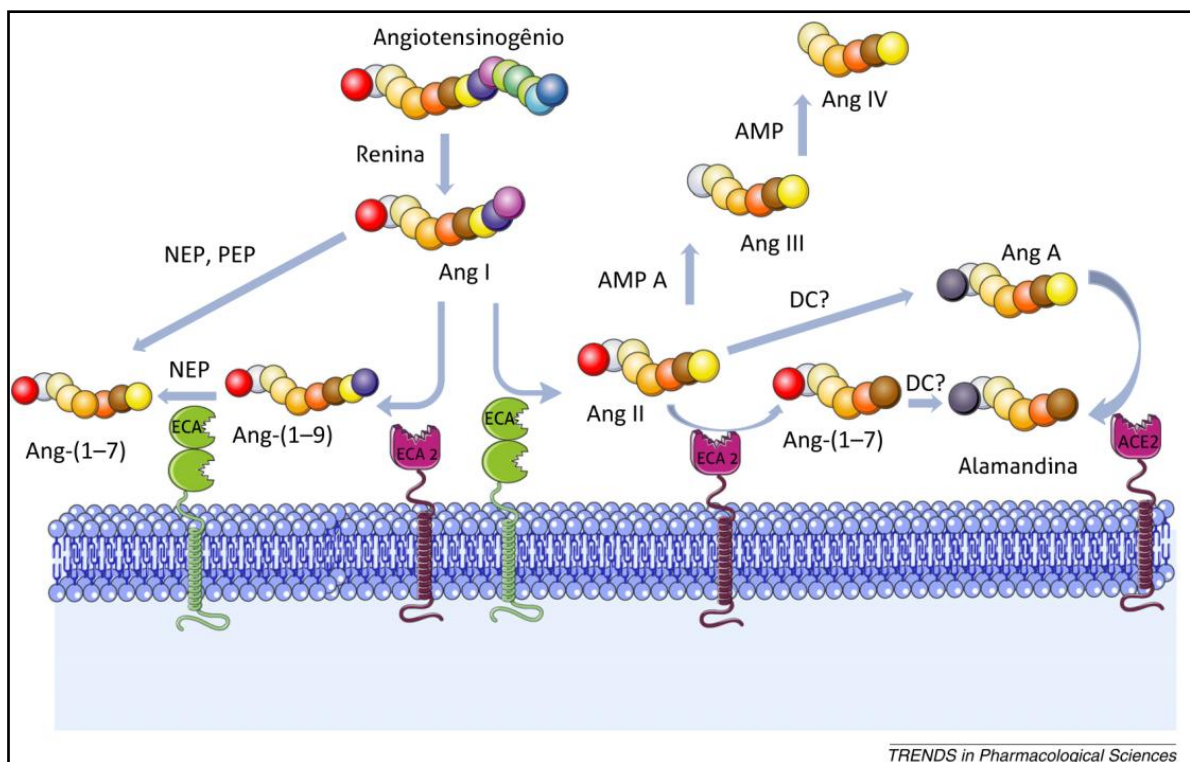


Figura 2. Visão simplificada da cascata do Sistema Renina-Angiotensina. NEP, endopeptidase neutra; PEP, prolil-endopeptidase; Ang-(1-7), angiotensina-(1-7); ECA, enzima conversora de angiotensina; Ang-(1-9), angiotensina-(1-9); Ang I, angiotensina I; ECA2, enzima conversora de angiotensina 2; Ang II, angiotensina II; Ang IV, angiotensina IV; AMP, aminopeptidase; AMP A, aminopeptidase A; Ang III, angiotensina III; DC, descarboxilase; Ang A, angiotensina A. Adaptado de Passos-Silva et al. (2015) (26).

No entanto, nas últimas décadas vários estudos mostraram que além destes componentes já conhecidos, existem vários outros que contribuem para o funcionamento deste sistema. Descobriu-se que além da Ang II, outros peptídeos também apresentam importantes atividades biológicas, como por exemplo, a

angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] (27,28), a alamandina (29), a angiotensina III (Ang III) (30) e a angiotensina IV (Ang IV) (31). Dentre estes peptídeos, a Ang-(1-7) é um dos mais estudados atualmente, e por ser alvo de estudo deste trabalho, será dado um enfoque aos seus efeitos cardiovasculares.

1.4. Angiotensina-(1-7)

A Ang-(1-7) é um heptapeptídeo de sequência Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro, eum importante membro do SRA (32). Este peptídeo pode ser formado diretamente pela ação da enzima conversora de angiotensina dois (ECA2) sobre a Ang I, formando angiotensina-(1-9) [Ang-(1-9)], que por sua vez é convertida em Ang-(1-7) pela ação da ECA ou endopeptidase neutra (NEP). Outra importante via de formação desse peptídeo é pela ação da ECA2 sobre a Ang II. No entanto, outras enzimas como prolil-endopeptidases (PEP), prolil-carboxipeptidases e oligopeptidases também podem atuar alterando a estrutura dos peptídeos desse sistema com consequente formação de Ang-(1-7) (21,26).

A Ang-(1-7) apresenta ações benéficas e contrarregulatórias às desencadeadas pela Ang II via receptor AT1 (28). Dessa forma, atualmente o SRA pode ser definido por duas vias distintas: uma com atividade pressórica, composta principalmente pela ECA, Ang II, e receptor AT1, e outra com atividade cardioprotetora e hipotensora, composta pela ECA2, Ang-(1-7) e receptor Mas (26).

Os estudos que evidenciam os efeitos cardioprotetores da Ang-(1-7) mostram que esse peptídeo é capaz de reduzir arritmias e melhorar a contratilidade cardíaca na reperfusão após isquemias (33,34). Além disso, também já foi demonstrado que a Ang-(1-7) pode exercer seu efeito benéfico reduzindo a formação de fibrose ventricular (34–36).

Muitos estudos mostram o papel essencial que o eixo Ang-(1-7)/ECA2/Mas desempenha na manutenção da estrutura e função do cardíaca (37–40). Como a ECA2 e a Ang-(1-7) estão presentes nos cardiomiócitos, o coração é um importante local para a formação destes componentes e o desempenho de suas funções (41). No entanto, as vias intracelulares que levariam a tais efeitos ainda não foram totalmente descritas. Contudo, a recente descoberta do receptor específico da Ang-(1-7), chamado receptor Mas, possibilitou novos estudos acerca de seu mecanismo de ação (42).

Dessa forma, estudos já evidenciaram o papel da Ang-(1-7) via receptor Mas na modulação da contratilidade cardíaca. Santos e colaboradores (2006) mostraram que a deleção genética do receptor Mas resultou em uma função cardíaca prejudicada, com redução de parâmetros contráteis, como tensão sistólica, dP/dt máx. e min. (36). De forma complementar, o mesmo grupo em 2010, ao desenvolver um modelo de ratos transgênicos que superexpressam Ang-(1-7) no coração, mostrou que esse peptídeo promove uma melhora significativa na função cardíaca por meio do aumento na dinâmica de Ca^{2+} e expressão da SERCA2, levando a uma maior concentração deste íon no RS (34). Recentemente, também foi mostrado que a Ang-(1-7) exerce alguns de seus efeitos no coração por meio da regulação dos canais de Ca^{2+} , além de causar um aumento significativo na corrente de Ca^{2+} do tipo L ($I_{Ca,L}$) em corações com insuficiência cardíaca (41).

Além disso, Dias-Peixoto e colaboradores (2008) mostraram que a ligação da Ang-(1-7) ao receptor Mas leva à ativação da via Fosfatidilinositol-3-Quinase /Proteína Quinase B (PI3K/Akt), com consequente aumento na produção de óxido nítrico (NO) por meio da fosforilação da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (43). O NO é capaz de modular vários componentes do acoplamento excitação-contração (44), e uma parte da proteína eNOS encontra-se associada ao RyR2 (45), o que aumenta a sua probabilidade de abertura em resposta ao estiramento dos cardiomiócitos (46). Dessa forma, a Ang-(1-7) também pode modular indiretamente a dinâmica intracelular de Ca^{2+} , uma vez que interfere na formação e liberação de NO.

1.5. Interação entre Sistema Nervoso Autônomo e Sistema Renina-Angiotensina

A função cardíaca é regulada e mantida por vários mecanismos neuro-humorais. Dessa forma, é necessário um equilíbrio entre estes sistemas, impedindo a predominância da atividade de algum de seus componentes (18,26). Dentre estes mecanismos, o SRA e o SNA desempenham um grande papel no controle da função cardíaca. Sabe-se que há uma interação entre esses sistemas e já é bem estabelecido na literatura que há uma correlação entre os efeitos desencadeados pela Ang II e o SNA (47).

No cérebro há um SRA local, com todos os componentes, enzimas, precursores e receptores necessários para o seu funcionamento (48). Já foi

demonstrado que os efeitos pressores da Ang II envolvem a ativação de áreas centrais relacionadas ao controle simpático, levando a uma maior liberação de norepinefrina, com consequente aumento na ativação simpática (49). Uma dessas áreas que são ativadas pela Ang II é o núcleo paraventricular do hipotálamo, que desempenha um papel essencial no controle autonômico da função cardiovascular. Ao ativar esse núcleo, a Ang II evoca uma resposta pressora mediada pelo SNS e pela liberação de vasopressina (50).

No sistema nervoso central (SNC), a Ang-(1-7) age como um importante neuromodulador, atuando em áreas relacionadas ao controle reflexo da PA (51,52). Os principais efeitos deste peptídeo estão relacionados ao controle do SNA, inclusive do barorreflexo, podendo levar a um aumento ou queda da PA, dependendo da área central ativada e de condições fisiopatológicas envolvidas (53). O barorreflexo é um mecanismo que promove ajustes na frequência cardíaca e tônus simpático. Para isto, os barorreceptores, que são encontrados no arco aórtico e seios carotídeos, são ativados de forma mecânica pelo estiramento das terminações neurais localizadas nestes locais. Tal estimulação promove uma grande interação neuronal entre no sistema nervoso central, envolvendo vários núcleos e de forma especial o CVLM (bulbo ventrolateral caudal) e o RVLM (bulbo rostroventrolateral) (54). O CVLM é apresenta ação inibitória na resposta barorreflexa (55). Neste local, a Ang-(1-7) induz uma redução na pressão arterial média (PAM), agindo por uma via dependente de NO (56), além de promover ajustes na resposta da frequência cardíaca (FC) por um mecanismo dependente da modulação parassimpática periférica (57). Já no RVLM, microinjeções de Ang-(1-7) induzem um aumento do reflexo aferente simpático cardíaco e da atividade nervosa simpática renal, resultando em uma resposta pressora (51,58,59).

Um possível efeito da Ang-(1-7) no SNA foi inicialmente sugerida por Gironacci e colaboradores (2000) (60). Foi observado que a Ang-(1-7) inibi a liberação de norepinefrina em hipotálamos de SHR, por meio de um mecanismo dependente de NO. Lima e colaboradores (2013) demonstraram que a administração periférica de Ang-(1-7) é capaz de atenuar a taquicardia evocada pelo estresse emocional e pela injeção de um agonista adrenérgico (isoproterenol). Além disso, também observaram que em cardiomiócitos isolados, o efeito cronotrópico provocado pelo isoproterenol foi atenuado na presença da Ang-(1-7). Esses achados

indicam que este peptídeo pode atuar na modulação do controle cronotrópico mediado pela ativação dos receptores β adrenérgicos cardíacos (61), sugerindo assim um papel inibitório do eixo Ang-(1-7)/Receptor Mas na regulação do SNS.

Recentemente, Moura e colaboradores (2017) verificaram que ratos com uma elevada concentração plasmática de Ang-(1-7) de forma crônica apresentam uma atenuação na resposta taquicárdica ao estresse emocional agudo. Estes animais também tiveram uma redução na atividade simpática renal. Em conjunto, estes resultados mostram que a Ang-(1-7) é capaz de modular as respostas à estimulação simpática (62). Dartora e colaboradores (2017) mostraram por meio de análises da variabilidade da FC, que a administração aguda de Ang-(1-7) é capaz de promover uma modulação parassimpática: enquanto a estimulação do receptor Mas pela Ang-(1-7) induz efeitos cardiovasculares predominantemente dependentes da ativação parassimpática, o bloqueio pelo seu antagonista leva a respostas predominantemente simpáticas (63). Tais achados suportam a hipótese de que também há uma modulação fisiológica do SNS pelo eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas.

A despeito dos estudos conclusivos citados acima que comprovam que o eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas modula o SNS e seus efeitos em diferentes leitos, incluindo o leito cardíaco, ainda não se sabe se a Ang-(1-7) pode influenciar a sensibilidade colinérgica diretamente no coração ou se estes efeitos poderiam ser dependentes de alterações na PA. Além disso, ainda não foi avaliado se a magnitude dos possíveis efeitos da Ang-(1-7) sobre o coração estaria alterada durante a hipertensão essencial experimental.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Avaliar a influência da Ang-(1-7) na modulação cardíaca colinérgica em corações de ratos normotensos e hipertensos.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a influência da Ang-(1-7) nas alterações cardiovasculares promovidas pela ACh em ratos normotensos e hipertensos;
- Avaliar a influência da Ang-(1-7) nas alterações cardíacas promovidas pela ACh em coração isolado de ratos normotensos e hipertensos;
- Avaliar a participação de receptores angiotensinérgicos nos efeitos cardíacos da ACh em ratos normotensos e hipertensos;
- Avaliar os possíveis mecanismos de ação envolvidos nos efeitos cardíacos da ACh em ratos normotensos e hipertensos.

3. METODOLOGIA

3.1. Animais

Neste estudo foram utilizados ratos das linhagens Wistar e SHR machos provenientes do Biotério da Universidade Federal de Goiás (UFG), com peso variando entre 250g a 350g. Os mesmos foram mantidos sob condições ambientais controladas (temperatura ambiente de 23 ± 2 °C e ciclo claro/escuro de 12h), tendo livre acesso à água e comida. Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com os princípios éticos da CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) e foram feitos todos os esforços possíveis para minimizar o número de animais utilizados para a conclusão dos experimentos. Os protocolos utilizados foram submetidos à aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da UFG (Protocolo nº 064/16).

3.2. Avaliação dos parâmetros cardiovasculares (*in vivo*)

Para a realização dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram anestesiados pela via intraperitoneal (i.p.) com uretano (1,2 a 1,4 g/kg), e a sua eficácia verificada antes do início e durante todo o procedimento.

Posteriormente, foi feita uma incisão na região inguinal de uma das patas traseiras para a exposição e dissecação do feixe vâsculo-nervoso femoral. Foram implantadas cânulas de polietileno PE-50 (14 cm) e PE-10 (3 cm para veia e 4 cm para artéria) preenchidas com heparina (400 U.I./mL) e posteriormente fixadas por amarraduras. A cânula implantada na veia esquerda foi utilizada para as injeções de ACh e a direita para infusão de Ang-(1-7), A-779 ou ambos. Já a cânula arterial foi acoplada a um sistema de aquisição de dados (Dataq Instruments) com transdutor de pressão para obtenção dos parâmetros de PA e FC.

Após a canulação de veia e artéria femorais, foi feita uma incisão na região do músculo esternocleidomastóideo, a fim de localizar a artéria carótida direita e realizar sua dissecação do nervo vago e tecidos adjacentes para a implantação de uma cânula de polietileno PE-50 (14 cm) e PE-10 (6 cm) acoplada ao sistema de aquisição de dados (Dataq Instruments, EUA), com frequência amostral de 1000 Hz. A mesma foi dirigida ao interior do ventrículo esquerdo cardíaco até que a

localização fosse confirmada quando a pressão diastólica atingisse valores próximos a zero (Figura 3). Com a realização deste procedimento, foi possível a obtenção dos valores de pressão ventricular esquerda sistólica e diastólica, bem como de suas derivativas (dP/dt máx e dP/dt min). Entre as injeções das diferentes doses de ACh, as cânulas foram lavadas com 0,3 mL de salina e o tempo entre elas foi de 3 minutos ou até que ocorresse a estabilização dos parâmetros analisados.

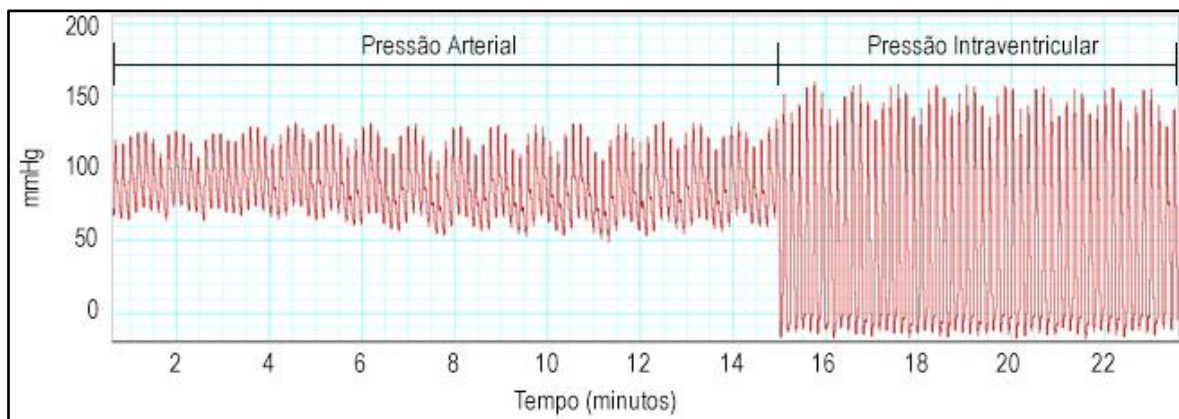


Figura 3. Registro de pressão exemplificando o momento em que o ventrículo esquerdo cardíaco foi acessado.

3.2.1. Protocolo

Após os procedimentos cirúrgicos e um período de estabilização de aproximadamente 30 minutos, os protocolos seguiram conforme descrito abaixo:

Grupo Controle: Foi realizada uma infusão com veículo (NaCl 0,9%) por mais 30 minutos (taxa de infusão: 10 μ L/min), e então iniciou-se uma curva dose-reposta de ACh (10, 20, 40 e 80 ng/kg) (Wistar n=6 e SHR n=6);

Grupo Ang-(1-7): Foi realizada uma infusão com Ang-(1-7) (7×10^{-12} mol/min) por mais 30 minutos (taxa de infusão: 10 μ L/min), e então se iniciou uma curva dose-reposta de ACh (10, 20, 40 e 80 ng/kg) (Wistar n=5 e SHR n=7);

Grupo A-779: Foi realizada uma infusão com antagonista do receptor Mas, A-779 (7×10^{-11} mol/min) por mais 30 minutos (taxa de infusão: 10 μ L/min), e então se

iniciou uma curva dose-reposta de ACh (10, 20, 40 e 80 ng/kg) (Wistar n=5 e SHR n=5);

Grupo Ang-(1-7)+A-779: Foi realizada uma infusão com A-779 juntamente com Ang-(1-7) por mais 30 minutos (taxa de infusão: 10 μ L/min), e então se iniciou uma curva dose-reposta de ACh (10, 20, 40 e 80ng/kg) (Wistar n=5 e SHR n=5);

Para cada grupo, foram utilizados ratos Wistar e SHR e todos os procedimentos experimentais seguiram conforme demonstrado na Figura 4. As doses utilizadas foram baseadas no trabalho prévio de Faria-Silva et al. (64) e em estudos preliminares.

	30 min	30 min	Acetilcolina (i.v.)			
Procedimentos Cirúrgicos	Estabilização		10 ng/kg	20 ng/kg	40 ng/kg	80 ng/kg
		Infusão	NaCl(0,9%) Ang-(1-7) (7×10^{-12} mol/min) A-779 (7×10^{-11} mol/min) Ang-(1-7)+A-779			

Figura 4. Esquema representativo do protocolo experimental *in vivo*.

3.3. Coração Isolado

Para a avaliação dos parâmetros cardíacos *ex vivo*, foi realizada a técnica de Langendorff com pressão constante (70 mmHg).

Os animais foram heparinizados (400 U.I./mL) e após 10 minutos, eutanasiados por decapitação. A cavidade torácica foi exposta, o coração retirado e a aorta ascendente canulada e conectada ao sistema de perfusão contendo a solução nutritora (Solução de Krebs-Ringer) mantida em temperatura de $37 \pm 1^\circ\text{C}$. A composição da solução de Krebs-Ringer está descrita na Tabela 1. Além disso, com a função de oxigenar e tamponar a solução, uma mistura carbogênica (95% O_2 + 5% CO_2) foi constantemente adicionada à solução durante o experimento.

Tabela 1. Composição da solução de Krebs-Ringer

COMPOSTO	CONCENTRAÇÃO EM mmol/L
NaCl	118,41
KCl	4,69
KH ₂ PO ₄	1,17
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,17
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,25
Dextrose Anidra (Glicose)	11,65
NaHCO ₃	26,24

Para o registro da pressão intraventricular, um balão preenchido com água foi introduzido no ventrículo esquerdo e conectado a um transdutor de pressão. Os registros foram realizados através de um sistema de aquisição de dados (Biopac Systems, Inc.), com frequência amostral de 1000 Hz. As derivadas $dP/dt_{máx}$ e $dP/dt_{mín}$ e FC foram calculadas a partir da onda de pressão intraventricular. Antes da análise, os registros passaram por um o tratamento com filtro de passa-baixa (50 Hz), a fim de se minimizar os ruídos da rede elétrica.

3.3.1. Protocolo

Após um período de estabilização de aproximadamente 30 minutos, foram realizados os protocolos específicos para cada grupo, conforme descrito abaixo:

Grupo Controle: Foi realizada uma curva dose-reposta de ACh (10^{-7} , 10^{-6} e 10^{-5} mol/L) (Wistar n=9 e SHR n=7);

Grupo Ang-(1-7): Os corações foram perfundidos com Ang-(1-7) (2×10^{-11} mol/L) por 30 minutos, seguido de curva dose-reposta de ACh (10^{-7} , 10^{-6} e 10^{-5} mol/L) (Wistar n=9 e SHR n=5);

Grupo A-779: Os corações foram perfundidos com o antagonista do receptor Mas, A-779 (2×10^{-10} mol/L), por 30 minutos, seguido de curva dose-reposta de ACh (10^{-7} , 10^{-6} e 10^{-5} mol/L) (Wistar n=7 e SHR n=5);

Grupo Ang-(1-7)+A-779: Os corações foram perfundidos com Ang-(1-7) (2×10^{-11} mol/L) juntamente com A-779 (2×10^{-10} mol/L) por 30 minutos, seguido de curva dose-reposta de ACh (10^{-7} , 10^{-6} e 10^{-5} mol/L) (Wistar n=5 e SHR n=7);

Grupo D-PRO: Os corações foram perfundidos com o antagonista do receptor MrgD (receptor acoplado à proteína G relacionado ao receptor Mas, tipo D), D-PRO, (2×10^{-10} mol/L) por 30 minutos, seguido de curva dose-reposta de ACh (10^{-7} , 10^{-6} e 10^{-5} mol/L) (SHR n=6);

Grupo D-PRO+Ang-(1-7): Os corações foram perfundidos com o antagonista do receptor MrgD, D-PRO, (2×10^{-10} mol/L) juntamente com Ang-(1-7) (2×10^{-11} mol/L) por 30 minutos, seguido de curva dose-reposta de ACh (10^{-7} , 10^{-6} e 10^{-5} mol/L) (SHR n=5);

Para cada grupo, foram utilizados ratos normotensos e hipertensos, com exceção dos grupos D-PRO e D-PRO+Ang-(1-7), que foram realizados apenas com SHR. Todos os procedimentos experimentais seguiram conforme demonstrado na Figura 5.

30 min	30 min	Acetilcolina		
Estabilização		10^{-7} mol/L	10^{-6} mol/L	10^{-5} mol/L
Perfusão		Solução de Krebs-Ringer		
		Ang-(1-7) (2×10^{-11} mol/L)		
		A-779 (2×10^{-10} mol/L)		
		Ang-(1-7)+A-779		
		D-PRO (2×10^{-10} mol/L)*		
		D-PRO+Ang-(1-7)*		

* Protocolo realizado apenas em SHR

Figura 5. Esquema representativo do protocolo experimental de corações isolados.

As doses utilizadas no protocolo acima descrito foram baseadas em trabalhos prévios (65,66) e estudos preliminares.

3.4. Anéis Isolados de Aorta

Para a obtenção dos vasos, os animais foram heparinizados (400 U.I. de heparina) e após 10 minutos, eutanasiados por decapitação. A avaliação da reatividade vascular foi realizada utilizando-se a preparação de banho de órgãos isolados. A aorta torácica descendente foi retirada e dividida em 4 anéis de 4 mm cada, sem tecido adiposo e conectivo. Os anéis foram montados em solução de Krebs-Henseleit oxigenada (95% O₂ + 5% CO₂), cuja composição está descrita na Tabela 2. Além disso, foram mantidos a uma temperatura de 37 °C durante todo o protocolo e a uma tensão de 1,5g por um período de 1 hora para estabilização da preparação. A atividade mecânica foi registrada usando um sistema de aquisição de dados (Dataq Instruments, EUA), com frequência amostral de 1000 Hz.

Tabela 2. Composição da solução de Krebs-Henseleit

COMPOSTO	CONCENTRAÇÃO EM mmol/L
NaCl	118,6
KCl	4,6
KH ₂ PO ₄	0,4
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2,4
CaCl ₂ ·2H ₂ O	3,3
Dextrose Anidra (Glicose)	11,1
NaHCO ₃	24,9

3.4.1. Protocolo

Após um período de estabilização de 1 hora, Ang-(1-7) (2×10^{-11} mol/L ou 2×10^{-10} mol/L) ou veículo foi adicionado nas cubas. Após um período de 15 minutos, foi feita uma curva cumulativa dose-resposta de ACh (10^{-9} a 10^{-5} mol/L).

Para cada grupo, foram utilizados ratos normotensos e hipertensos e os procedimentos experimentais seguiram conforme demonstrado na Figura 7.

1 hora	15 min	Acetilcolina				
Estabilização		10 ⁻⁹ mol/L	10 ⁻⁸ mol/L	10 ⁻⁷ mol/L	10 ⁻⁶ mol/L	10 ⁻⁵ mol/L
		Perfusão				
		Ang-(1-7) (2x10 ⁻¹¹ mol/L)				
		Ang-(1-7) (2x10 ⁻¹⁰ mol/L)				

Figura 6. Esquema representativo do protocolo experimental de vaso isolado

As doses utilizadas no protocolo acima descrito foram baseadas em trabalhos prévios (65,66) e estudos preliminares do grupo de pesquisa.

3.5. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média, e considerados significativos quando $p < 0,05$. Para as análises estatísticas, utilizou-se o programa GraphPad Prism versão 5 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA).

Para as análises dos valores basais, foi utilizado o teste *One-way* ANOVA seguido de múltiplas comparações de Tukey.

Nos experimentos *in vivo*, foi utilizada a análise de *Two-way* ANOVA, cujos fatores de interação considerados para comparação foram as doses de ACh e os grupos. Foi realizado o pós-teste de Dunnett para comparações múltiplas das injeções de ACh vs. veículo. Já para as análises entre os grupos, foi utilizado o pós-teste de Sidak.

Para as análises dos experimentos de coração isolado, foi utilizado teste *Two-way* ANOVA, considerando os mesmos fatores de interação das análises *in vivo*. Foi realizado o pós-teste de Dunnett para comparações múltiplas das injeções de ACh vs. veículo, e para as análises entre os grupos, foi utilizado o pós-teste de Fisher. Nas análises de vaso isolado, foi utilizado *Two-way* ANOVA com pós teste de Tukey.

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação da influência da Ang-(1-7) nos efeitos inotrópicos cardíacos da ACh

Inicialmente, foi realizada uma avaliação da pressão arterial sistólica (PAS) dos ratos Wistar e SHR por meio de pletismografia de cauda. A PAS obtida dos animais Wistar foi de $135,3 \pm 5,67$ mmHg e dos SHR de $174,4 \pm 5,25^*$ mmHg.

Após os animais serem anestesiados, foram obtidos os valores dos parâmetros cardiovasculares: Pressão Intraventricular Sistólica (PIVS), dP/dt máx, dP/dt mín, PAS, Pressão Arterial Diastólica (PAD) e PAM antes e após a infusão de veículo ou dos peptídeos: Ang-(1-7), A-779 ou Ang-(1-7) + A-779. Estes valores estão agrupados nos gráficos do Anexo I. Nenhum dos tratamentos alterou os parâmetros basais nos ratos Wistar. No entanto, em SHR, o A-779 promoveu uma redução na PIVS, PAS, PAD e PAM. Nesta mesma linhagem, a infusão de Ang-(1-7) promoveu um aumento na dP/dt mín.

Após 30 minutos de infusão com veículo ou com os peptídeos, foi realizada uma curva dose-resposta de ACh. Os valores descritos abaixo são referentes aos efeitos mais pronunciados da ACh em Wistar (40 ng/Kg) e SHR (80 ng/Kg).

Como mostrado na Figura 7, a infusão de Ang-(1-7) atenuou a redução na PIVS evocada pela ACh em Wistar e SHR (Wistar: Δ :-12,2 vs. -6,8%, $p < 0,05$; SHR: Δ :-18,9 vs. -10,5%, $p < 0,05$). A Ang-(1-7) também atenuou o efeito da ACh na redução da dP/dt máx (Wistar: Δ :-11,0 vs. -6,3%, $p < 0,05$; SHR: Δ :-19,0 vs. -12,5%, $p < 0,05$) e dP/dt mín (Wistar: Δ :-14,4 vs. -6,6%, $p < 0,05$; SHR: Δ :-22,7 vs. -10,9%, $p < 0,05$) (Figuras 8 e 9, respectivamente).

O co-tratamento dos ratos com o antagonista do receptor Mas, o A-779, atenuou o efeito da Ang-(1-7) na redução do efeito inotrópico da ACh (PIVS: Wistar: Δ :-12,2 vs. -14,6%, $p < 0,05$; SHR: Δ :-18,9 vs. -12,5%, $p < 0,05$), (dP/dt máx: Wistar: Δ :-11,0 vs. -15,1%, $p < 0,05$; SHR: Δ :-19,0 vs. -15,0%, $p < 0,05$), (dP/dt mín: Wistar: Δ :-14,4 vs. -22,7%, $p < 0,05$; SHR: Δ :-22,7 vs. -19,5%, $p < 0,05$), (Figuras 7, 8 e 9, respectivamente).

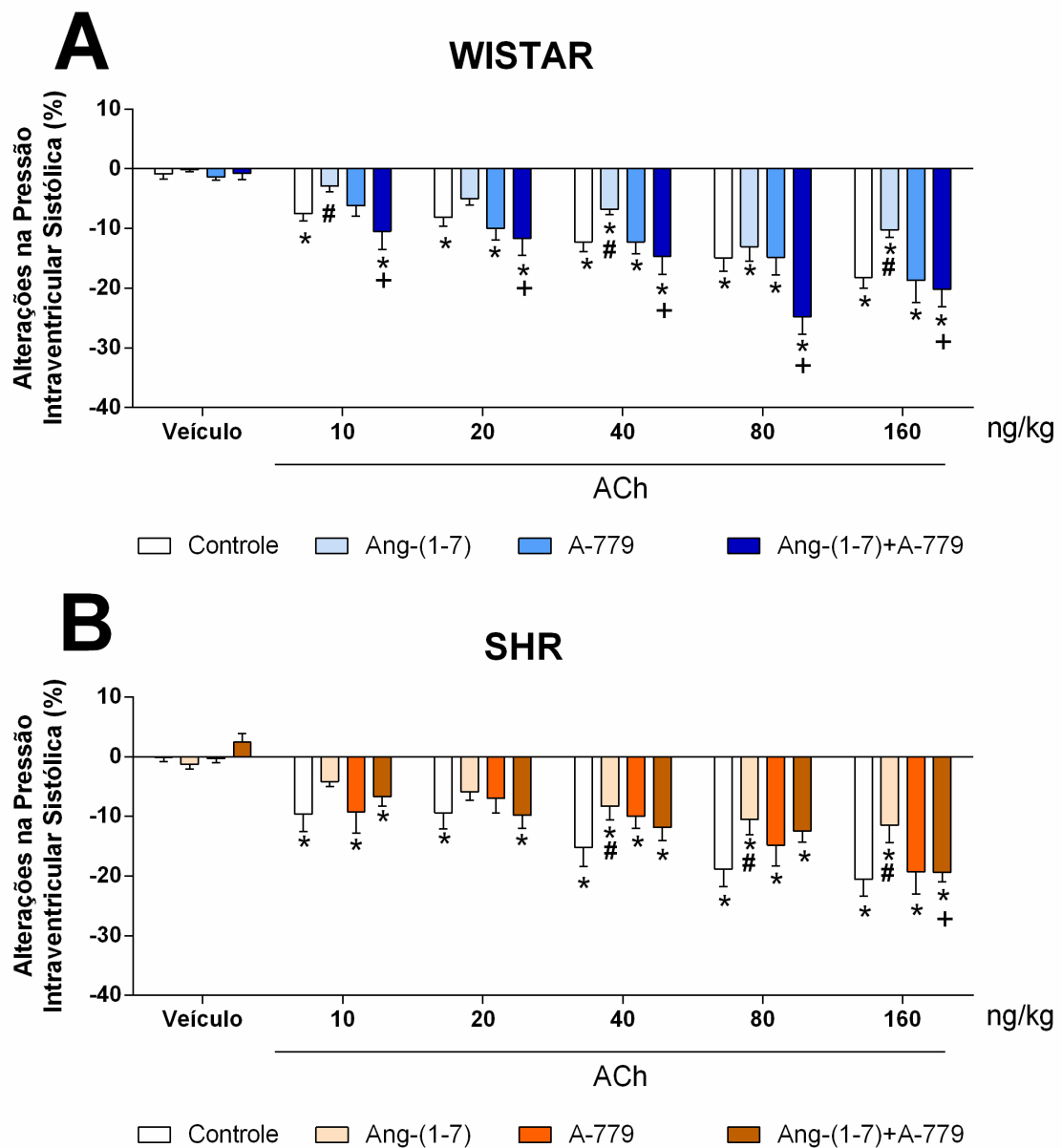


Figura 7: Influência da Ang-(1-7) nos efeitos da ACh na Pressão Intraventricular Sistólica em ratos anestesiados (A) Wistar e (B) SHR. ACh: Acetilcolina. Os dados estão apresentados como média±erro padrão da média. * $P < 0,05$ vs. veículo, # $P < 0,05$ vs. grupo controle, + $P < 0,05$ vs. grupo Ang-(1-7). Foi utilizado *Two-way ANOVA* seguido do pós-teste de comparações múltiplas de Sidak e Dunnet.

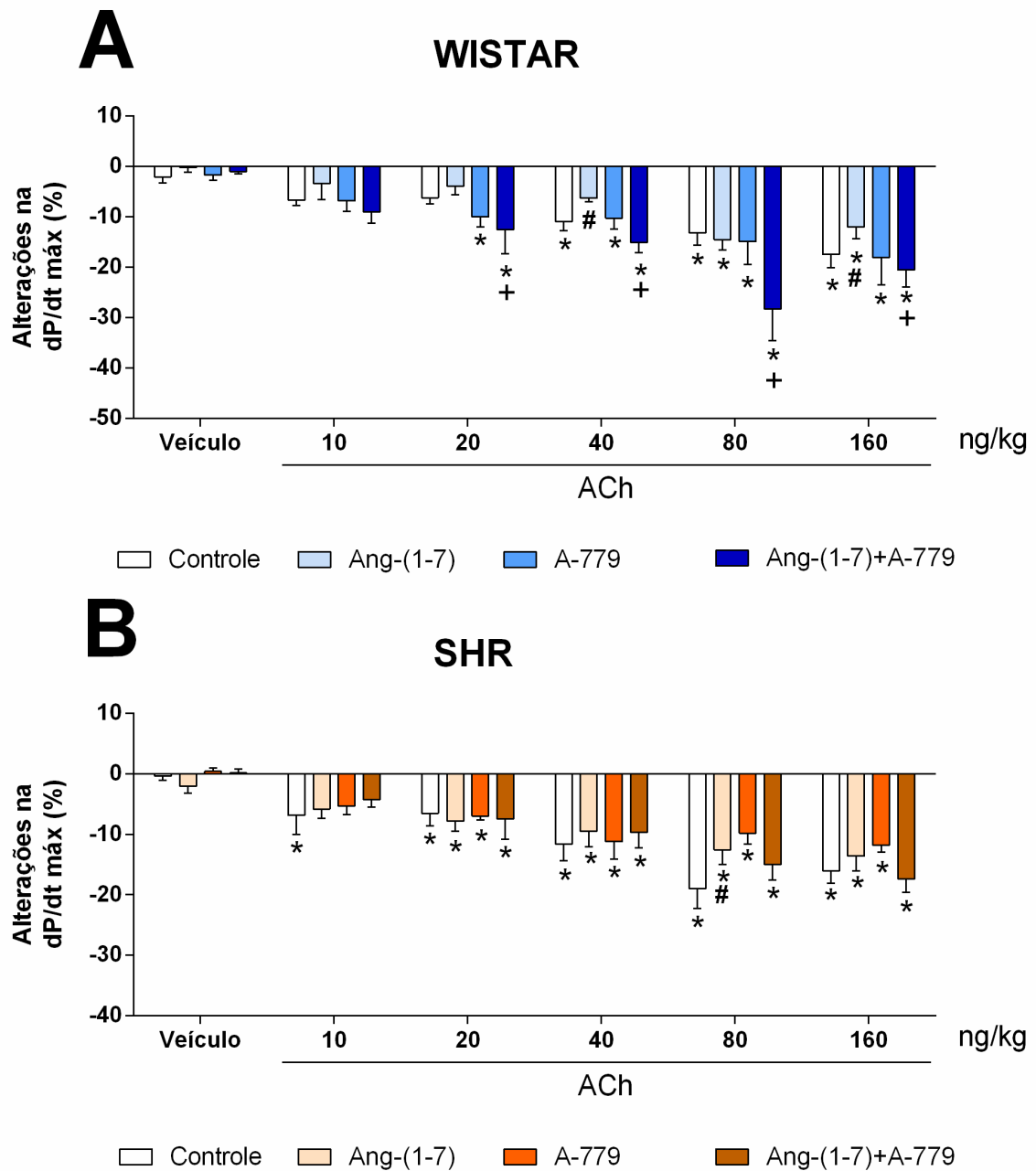


Figura 8: Influência da Ang-(1-7) nos efeitos da ACh na dP/dt máx em ratos anestesiados (A) Wistar e (B) SHR. ACh: Acetilcolina. Os dados estão apresentados como média±erro padrão da média. * $P < 0,05$ vs. veículo, # $P < 0,05$ vs. grupo controle, + $P < 0,05$ vs. grupo Ang-(1-7). Foi utilizado *Two-way ANOVA* seguido do pós-teste de comparações múltiplas de Sidak e Dunnet.

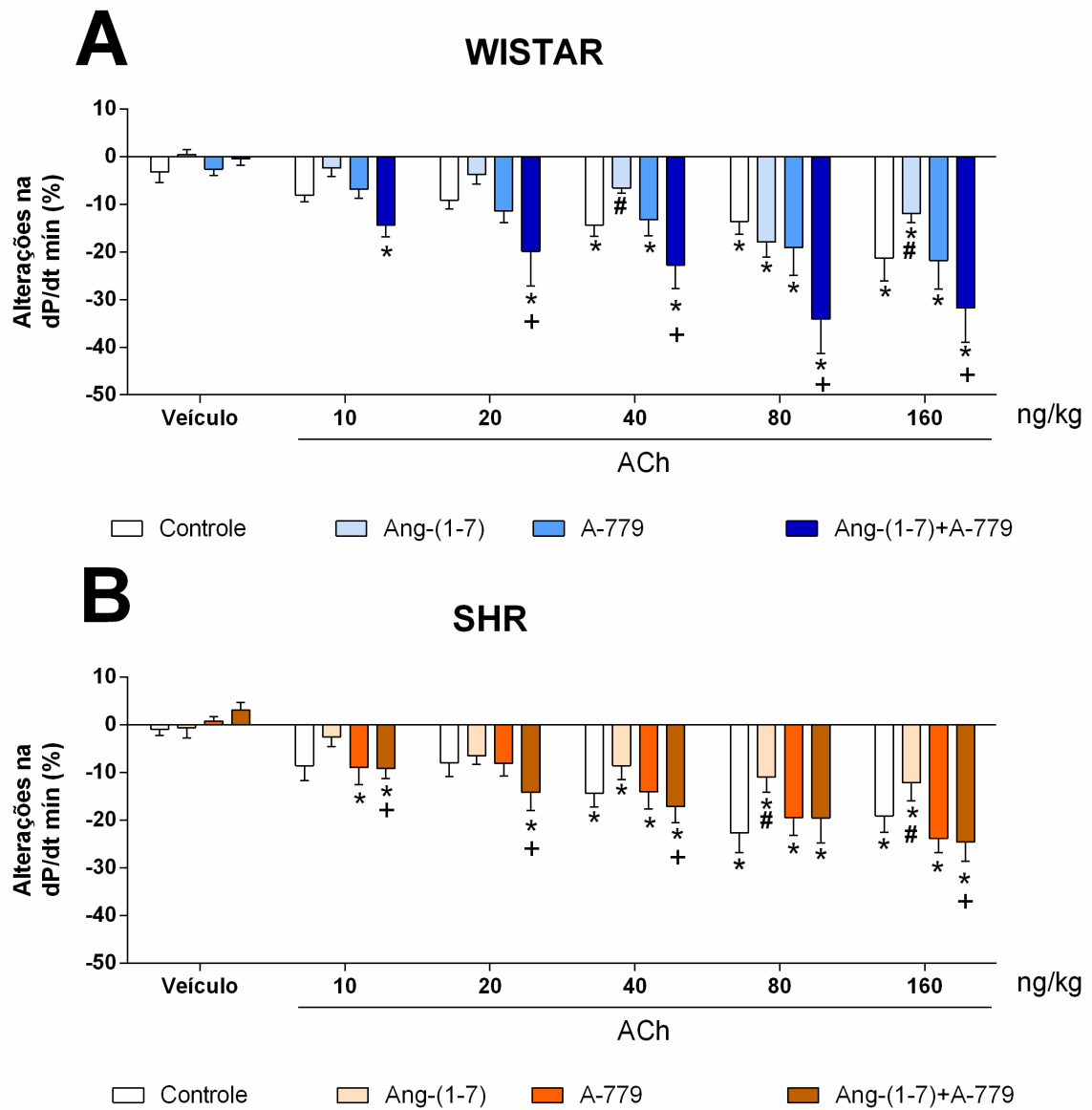


Figura 9: Influência da Ang-(1-7) nos efeitos da ACh na dP/dt mín em ratos anestesiados (A) Wistar e (B) SHR. ACh: Acetilcolina. Os dados estão apresentados como média±erro padrão da média. * $P < 0,05$ vs. veículo, # $P < 0,05$ vs. grupo controle, + $P < 0,05$ vs. grupo Ang-(1-7). Foi utilizado *Two-way ANOVA* seguido do pós-teste de comparações múltiplas de Sidak e Dunnet.

De forma diferente, a infusão de Ang-(1-7) e a inibição do receptor Mas não alteraram o efeito da ACh na redução da PAS e PAD em ratos Wistar e SHR (Figuras 10 e 11).

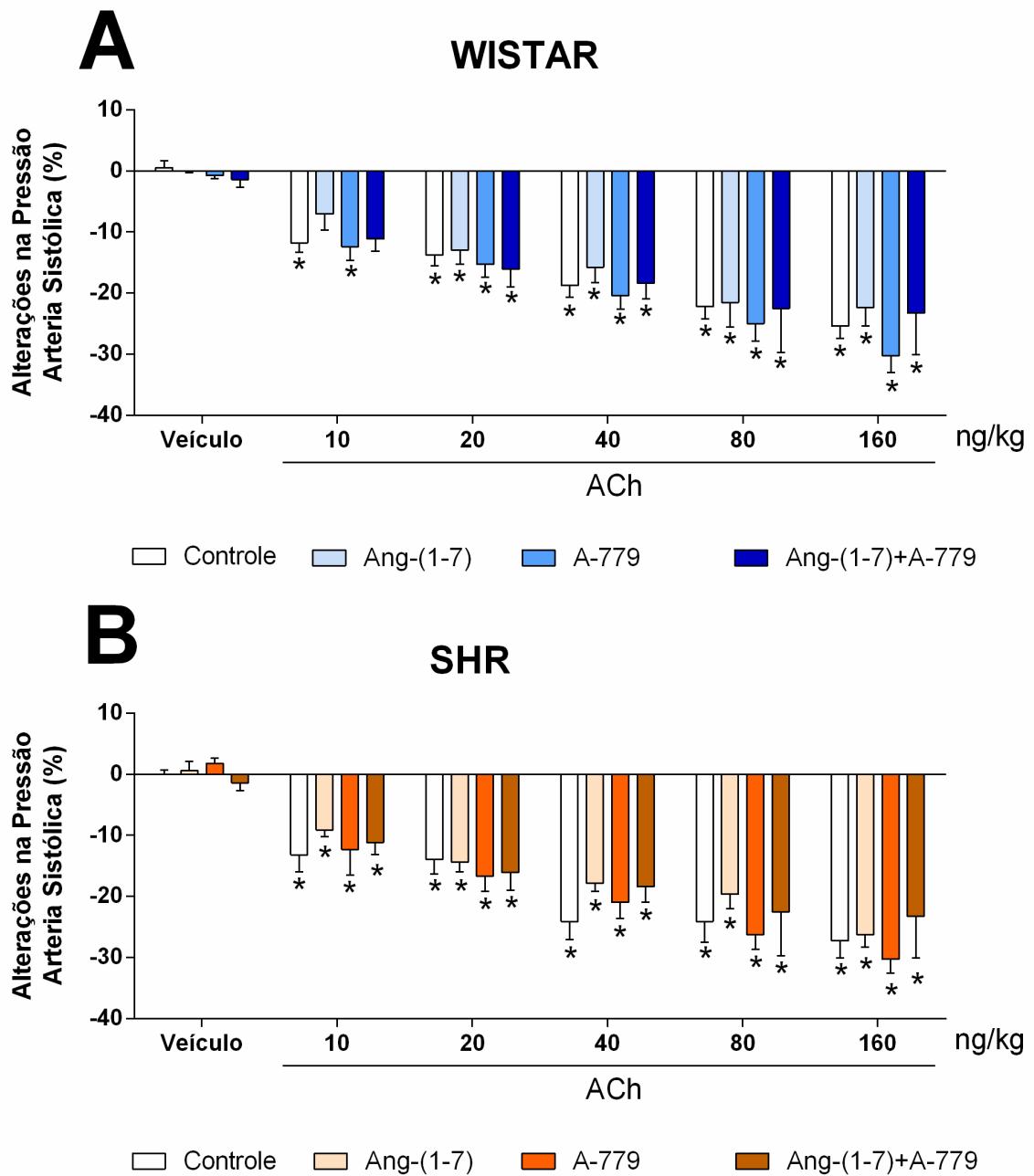


Figura 10: Influência da Ang-(1-7) nos efeitos da ACh na Pressão Arterial Sistólica em ratos anestesiados (A) Wistar e (B) SHR. ACh: Acetilcolina. Os dados estão apresentados como média±erro padrão da média. * $P < 0,05$ vs. veículo. Foi utilizado *Two-way ANOVA* seguido do pós-teste de comparações múltiplas de Sidak e Dunnet.

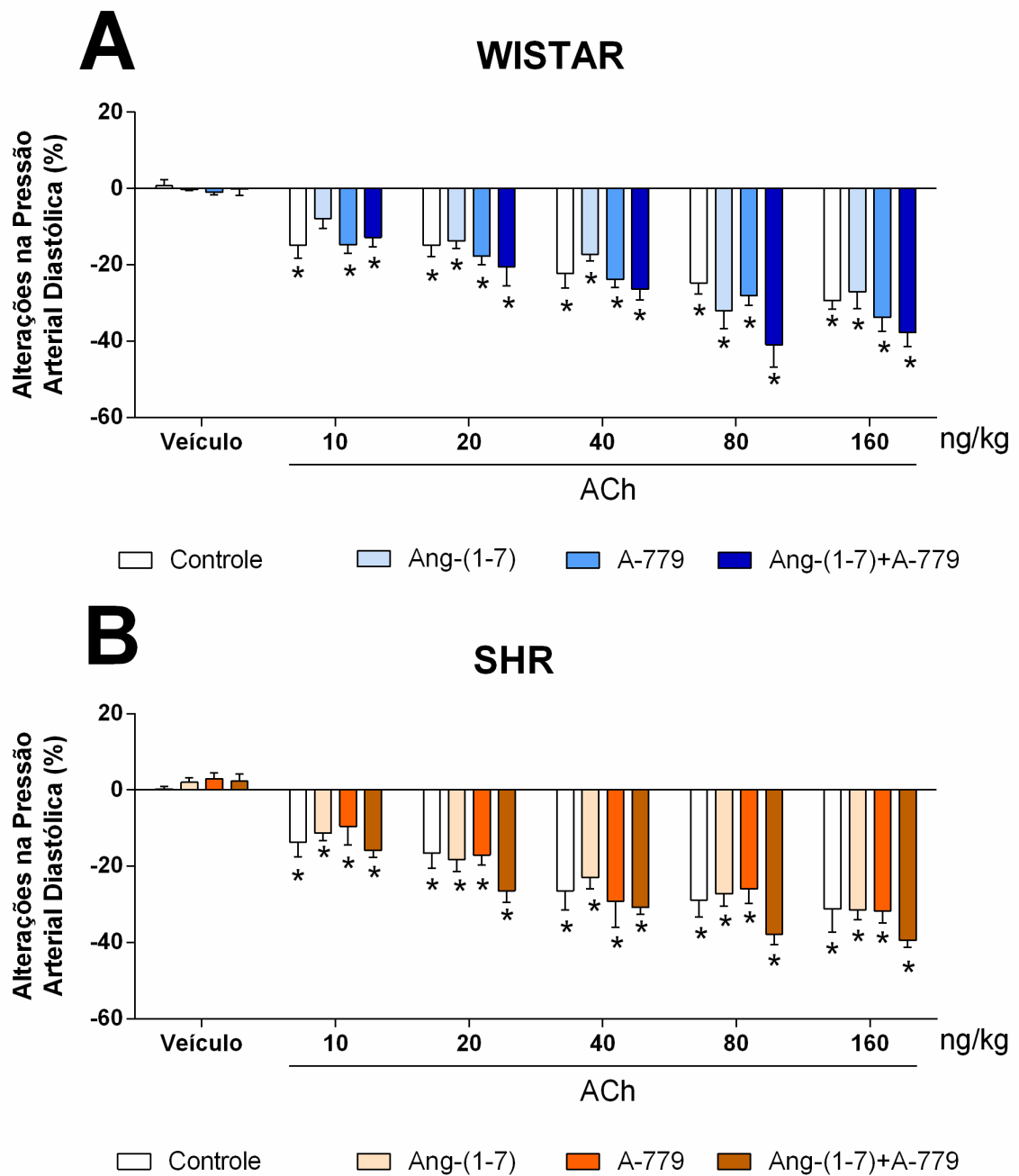


Figura 11: Influência da Ang-(1-7) nos efeitos da ACh na Pressão Arterial Diastólica em ratos anestesiados (A) Wistar e (B) SHR. ACh: Acetilcolina. Os dados estão apresentados como média±erro padrão da média. * $P < 0,05$ vs. veículo. Foi utilizado *Two-way ANOVA* seguido do pós-teste de comparações múltiplas de Sidak e Dunnet.

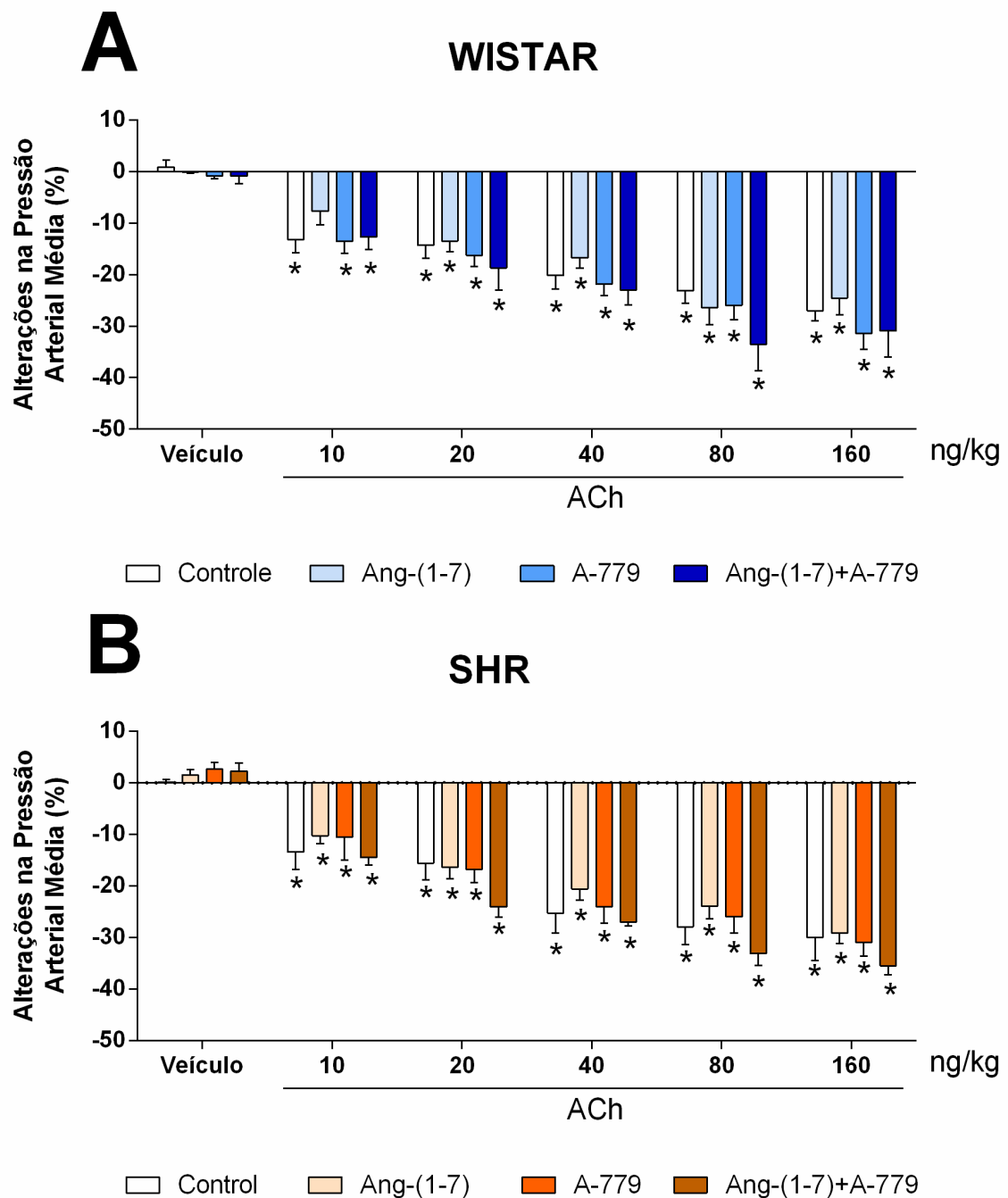


Figura 12: Influência da Ang-(1-7) nos efeitos da ACh na Pressão Arterial Média em ratos anestesiados (A) Wistar e (B) SHR. Influência da Ang-(1-7) nos efeitos da ACh na Pressão Arterial Média em ratos anestesiados (A) Wistar e (B) SHR. ACh: Acetilcolina. Os dados estão apresentados como média±erro padrão da média. * $P < 0,05$ vs. veículo. Foi utilizado Two-way ANOVA seguido do pós-teste de comparações múltiplas de Sidak e Dunnett.

Uma vez que os resultados obtidos nos experimentos *in vivo* levaram a alterações apenas nos parâmetros de contratilidade, sem alterações na PA, foram feitos experimentos de coração isolado, de acordo com a técnica de Langendorf com pressão constante. Nestes experimentos, foi avaliada a influência da Ang-(1-7) nos efeitos colinérgicos cardíacos sem a interferência dos sistemas neuro-humorais de regulação da função cardíaca. No Anexo I, estão representados os valores basais dos parâmetros avaliados nos experimentos de coração isolado.

Os efeitos descritos abaixo são referentes às respostas obtidas na concentração de 10^{-5} mol/L de ACh.

A Ang-(1-7) também foi capaz de atenuar o efeito da ACh nos corações isolados de Wistar e SHR, evocando uma redução na PIVS (Wistar: Δ :-46,1 vs. -19,8%, $p<0,05$; SHR: Δ :-50,6 vs. -29,4%, $p<0,05$), dP/dt máx (Wistar: Δ :-53,9 vs. -24,9%, $p<0,05$; SHR: Δ :-56,2 vs. -38,8%, $p<0,05$) e dP/dt mín (Wistar: Δ :-58,4 vs. -30,3%, $p<0,05$; SHR: Δ :-60,2 vs. -39,0%, $p<0,05$) (Figuras 12, 13 e 14).

Na presença do antagonista do receptor Mas, o A-779, houve um bloqueio dos efeitos da Ang-(1-7) nos corações isolados de Wistar, mas nos SHR este efeito foi diferente. Além disso, de uma forma bastante interessante, a infusão de apenas A-779 potencializou os efeitos cardíacos nas concentrações mais baixas de ACh (10^{-7} e 10^{-6} mol/L).

Recentemente, foi mostrado que a Ang-(1-7) pode-se ligar ao receptor MrgD (67). Dessa forma, nós investigamos se os efeitos da Ang-(1-7) nos corações de SHR poderiam ser mediados pela ativação do receptor MrgD. No entanto, a perfusão dos corações com o D-PRO, um antagonista do receptor MrgD, não foi capaz de alterar a influência da Ang-(1-7) nos efeitos colinérgicos nos corações de SHR (Figuras 12, 13 e 14, Painel B).

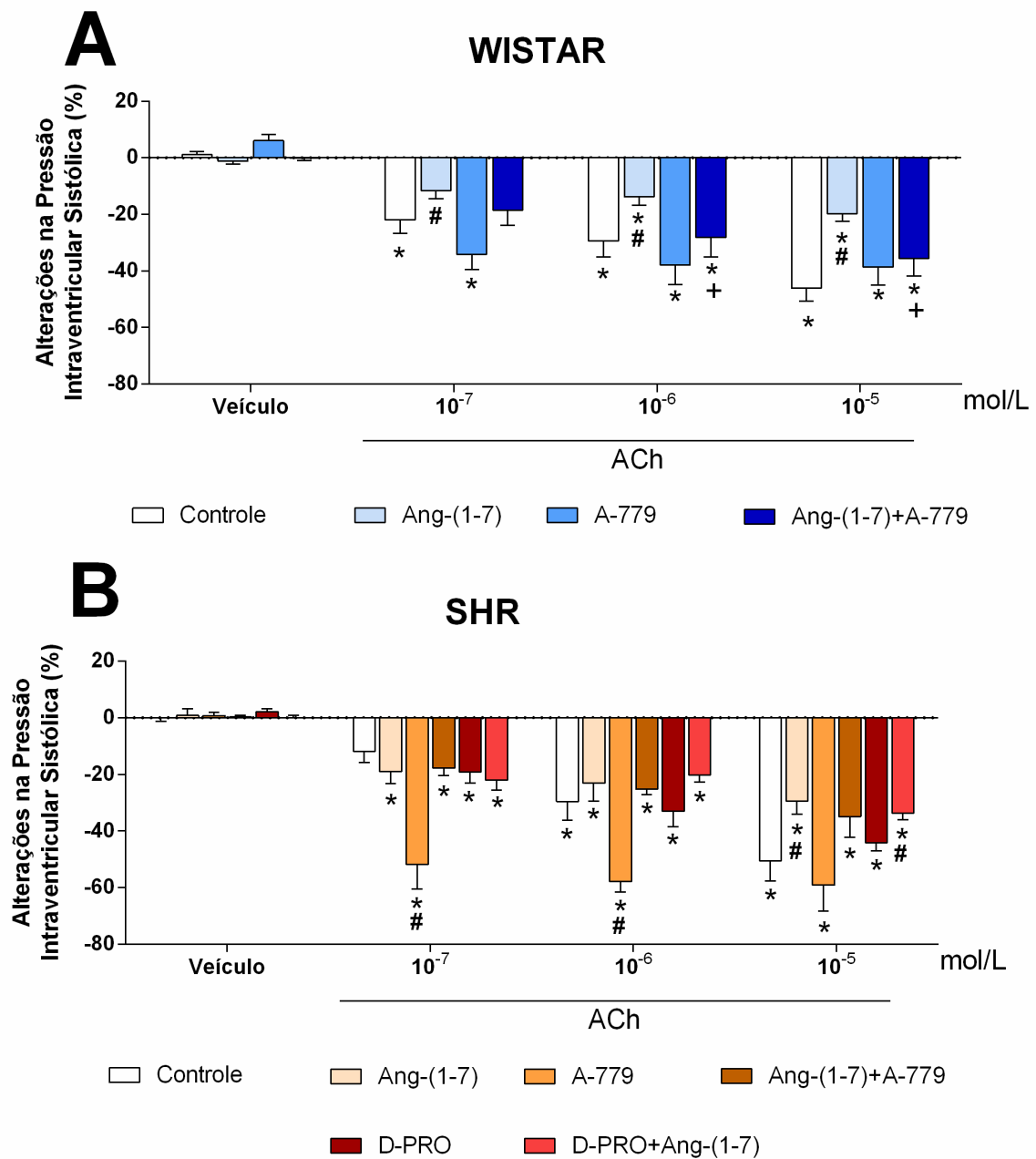


Figura 13: Influência da Ang-(1-7) nos efeitos da ACh na Pressão Intraventricular Sistólica em corações isolados de (A) Wistar e (B) SHR. ACh: Acetilcolina. Os dados estão apresentados como média±erro padrão da média. *P<0,05 vs. veículo, #P<0,05 vs. grupo controle, +P<0,05 vs. grupo Ang-(1-7). Foi utilizado *Two-way* ANOVA seguido do pós-teste de comparações múltiplas de Sidak e Tukey.

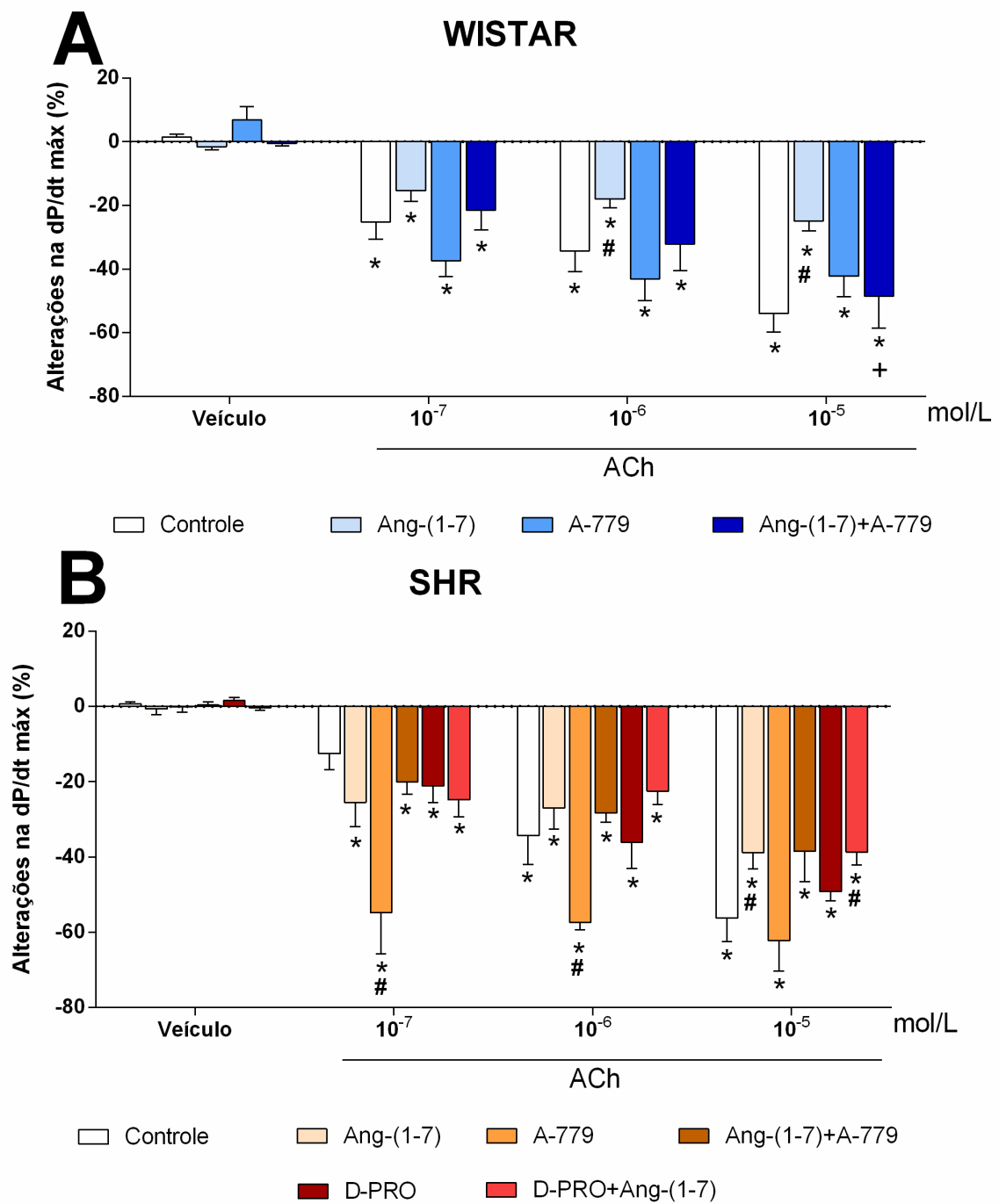


Figura 14: Influência da Ang-(1-7) nos efeitos da ACh na dP/dt máx em corações isolados de (A) Wistar e (B) SHR. ACh: Acetilcolina. Os dados estão apresentados como média±erro padrão da média. *P<0,05 vs. veículo, #P<0,05 vs. grupo controle, +P<0,05 vs. grupo Ang-(1-7). Foi utilizado *Two-way ANOVA* seguido do pós-teste de comparações múltiplas de Sidak e Tukey.

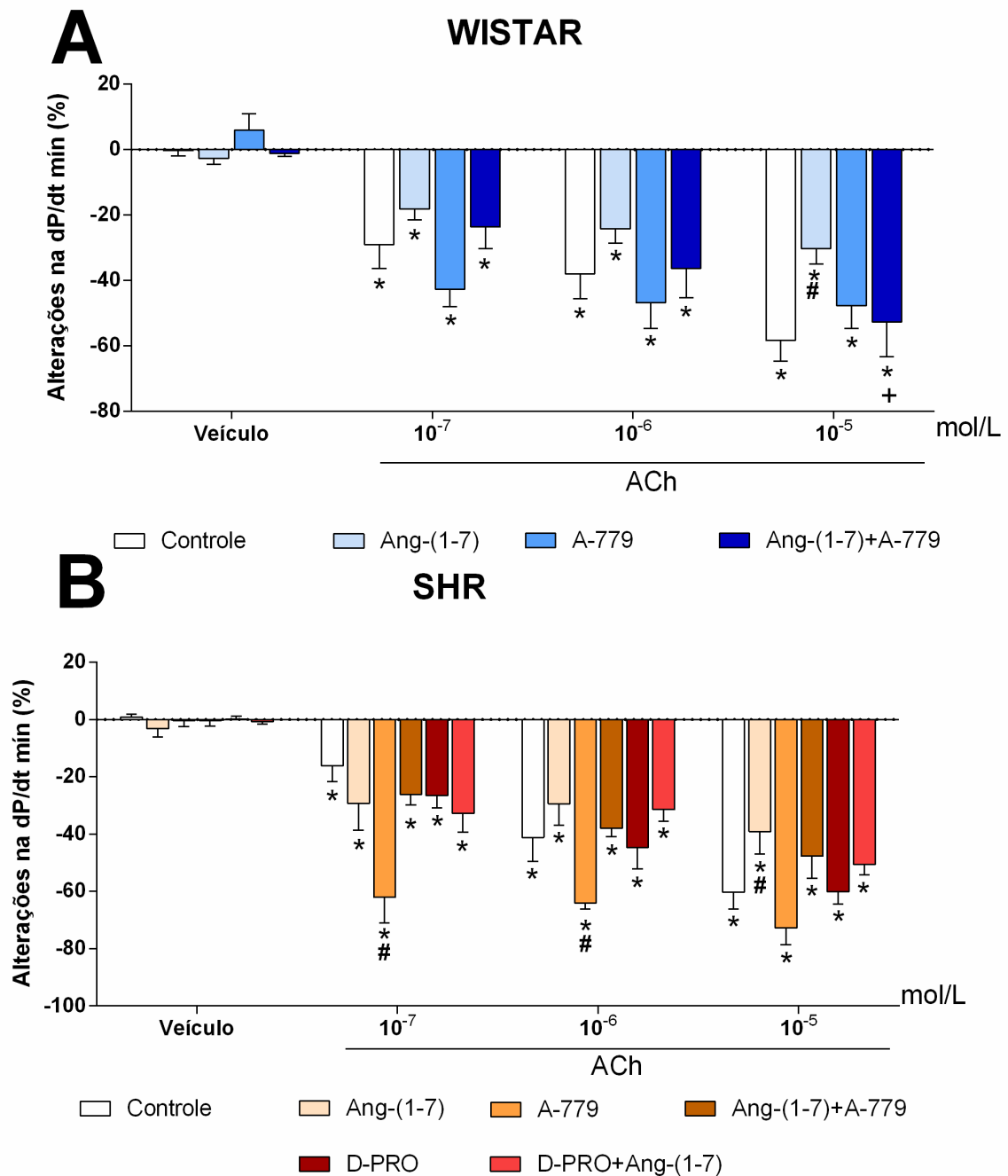


Figura 15: Influência da Ang-(1-7) nos efeitos da ACh na dP/dt mín em corações isolados de (A) Wistar e (B) SHR. ACh: Acetilcolina. Os dados estão apresentados como média±erro padrão da média. *P<0,05 vs. veículo, #P<0,05 vs. grupo controle, +P<0,05 vs. grupo Ang-(1-7). Foi utilizado Two-way ANOVA seguido do pós-teste de comparações múltiplas de Sidak e Tukey.

Para avaliar se as influências da Ang-(1-7) nos efeitos da ACh seriam específicos do coração, foi testada uma possível ação da Ang-(1-7) na reatividade vascular de anéis de aorta. A Figura 15 mostra que a Ang-(1-7) (2×10^{-11} mol/L ou

2×10^{-10} mol/L) não foi capaz de alterar o vasorrelaxamento induzido pela ACh nas aortas de Wistar e SHR. No entanto, a Ang-(1-7) atenuou o vasorrelaxamento em resposta à ACh na aorta de SHR (Δ : -79,5 vs. -57,2%, $p < 0,05$).

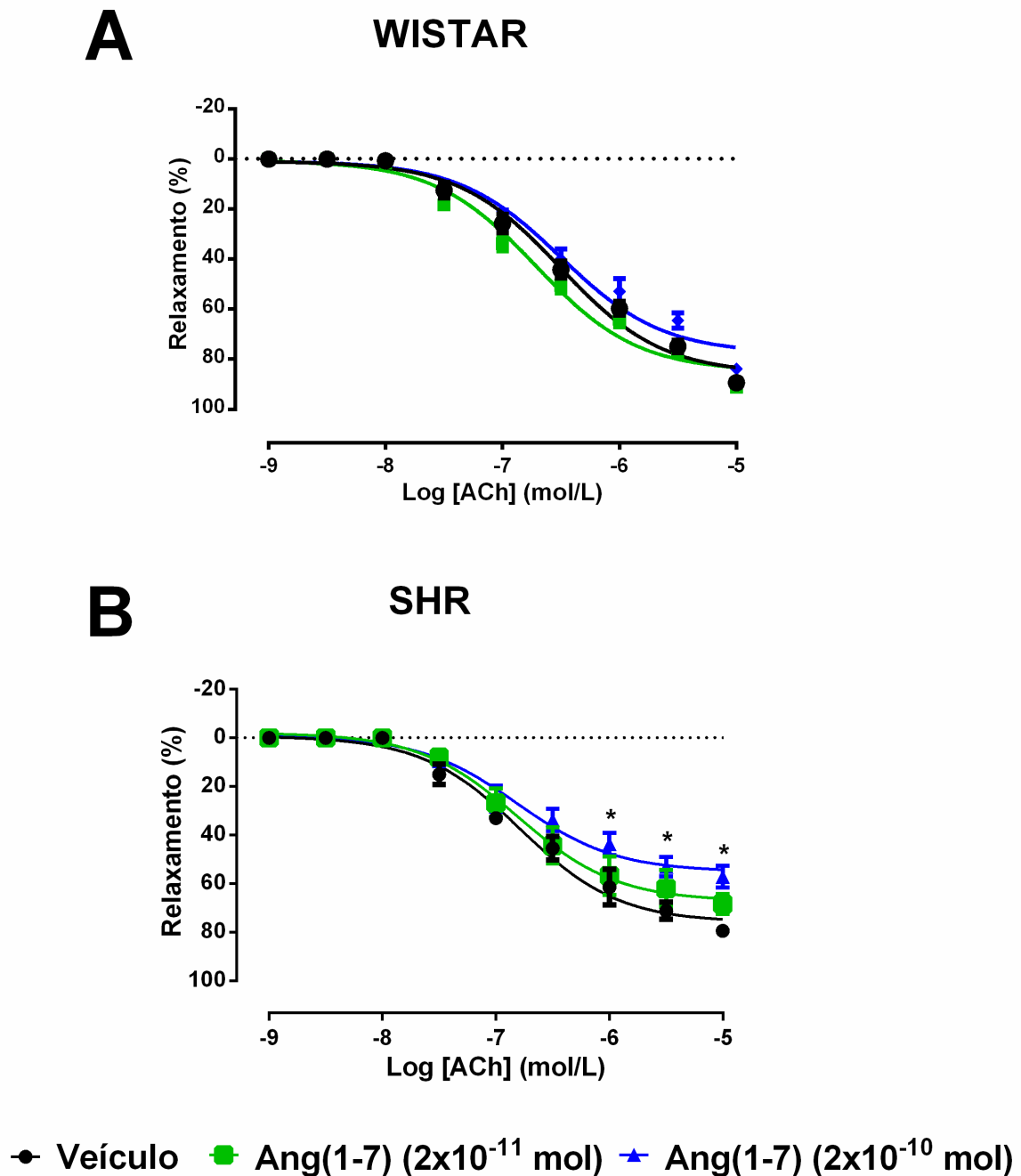


Figura 16: Influência da Ang-(1-7) nos efeitos da ACh no vasorrelaxamento de anéis isolados de aorta em ratos (A) Wistar e (B) SHR. ACh: Acetilcolina. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. * $P < 0,05$ vs. veículo. Foi utilizado *Two-way* ANOVA seguido do pós-teste de comparações múltiplas de Tukey.

4.2. Resumo dos Resultados

Tabela 3. Resumo esquemático mostrando os resultados dos experimentos *in vivo* com Wistar

	Controle	Ang-(1-7)	A-779	Ang-(1-7)+A-779
PIVS (mmHg)	↓↓	↓	↓↓	↓↓
dP/dt máx (mmHg/s)	↓↓	↓	↓↓	↓↓
dP/dt min (mmHg/s)	↓↓	↓	↓↓	↓↓
PAS (mmHg)	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓
PAD (mmHg)	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓
PAM (mmHg)	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓

PIVS, Pressão Intraventricular Sistólica; **PAS**, Pressão Arterial Sistólica; **PAD**, Pressão Arterial Diastólica; **PAM**, Pressão Arterial Média. ↓: Redução em resposta à injeção de ACh.

Tabela 4. Resumo esquemático mostrando os resultados dos experimentos *in vivo* com SHR

	Controle	Ang-(1-7)	A-779	Ang-(1-7)+A-779
PIVS (mmHg)	↓↓	↓	↓↓	↓↓
dP/dt máx. (mmHg/s)	↓↓	↓	↓↓	↓↓
dP/dt min. (mmHg/s)	↓↓	↓	↓↓	↓↓
PAS (mmHg)	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓
PAD (mmHg)	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓
PAM (mmHg)	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓

PIVS, Pressão Intraventricular Sistólica; **PAS**, Pressão Arterial Sistólica; **PAD**, Pressão Arterial Diastólica; **PAM**, Pressão Arterial Média. ↓: Redução em resposta à injeção de ACh.

Tabela 5. Resumo esquemático mostrando os resultados dos experimentos de coração isolado com Wistar

	Controle	Ang-(1-7)	A-779	Ang-(1-7)+A-779
PIVS (mmHg)	↓↓	↓	↓↓	↓↓
dP/dt máx. (mmHg/s)	↓↓	↓	↓↓	↓↓
dP/dt min. (mmHg/s)	↓↓	↓	↓↓	↓↓

PIVS, Pressão Intraventricular Sistólica. ↓: Redução em resposta à ACh.

Tabela 6. Resumo esquemático mostrando os resultados dos experimentos de coração isolado com SHR

	Controle	Ang-(1-7)	A-779	Ang-(1-7) + A-779	D-PRO	D-PRO + Ang-(1-7)
PIVS (mmHg)	↓↓	↓	↓↓↓	↓↓	↓↓	↓
dP/dt máx (mmHg/s)	↓↓	↓	↓↓↓	↓↓	↓↓	↓
dP/dt min (mmHg/s)	↓↓	↓	↓↓↓	↓↓	↓↓	↓

PIVS, Pressão Intraventricular Sistólica. ↓: Redução em resposta à ACh.

Tabela 7. Resumo esquemático mostrando os resultados dos experimentos de vaso isolado com Wistar

	Controle	Ang-(1-7) (2×10^{-11} mol/L)	Ang-(1-7) (2×10^{-10} mol/L)
Vasorrelaxamento	↓↓	↓↓	↓↓

↓: Redução em resposta à ACh.

Tabela 8. Resumo esquemático mostrando os resultados dos experimentos de vaso isolado com SHR

	Controle	Ang-(1-7) (2×10^{-11} mol/L)	Ang-(1-7) (2×10^{-10} mol/L)
Vasorrelaxamento	↓↓	↓↓	↓

↓: Redução em resposta à ACh.

5. DISCUSSÃO

Os principais achados deste estudo foram: (i) a Ang-(1-7) atenua a resposta inotrópica negativa provocada pela ACh em animais normotensos e hipertensos; (ii) a atenuação dos efeitos colinérgicos pela Ang-(1-7) foi bloqueada pelo antagonista do receptor Mas em Wistar; (iii) a Ang-(1-7) também foi capaz de atenuar o efeito inotrópico da ACh em corações isolados de Wistar e SHR; e (iv) os mecanismos envolvidos nesta resposta parecem ser diferentes entre ratos normotensos e hipertensos.

Inicialmente, observamos que a Ang-(1-7) não alterou os parâmetros cardiovasculares basais em ratos Wistar. Em animais normotensos, a Ang-(1-7) é capaz de evocar alterações no fluxo sanguíneo regional, com o aumento da condutância vascular nos leitos mesentérico, cerebral, cutâneo e renal (68). No entanto, este efeito pode ocorrer juntamente com um aumento do débito cardíaco e com redução na resistência periférica total, fazendo que juntos, estes ajustes não provoquem alterações substanciais na PA (68).

Por outro lado, diversos estudos têm mostrado que a Ang-(1-7) exerce efeitos importantes sobre o sistema cardiovascular, podendo atuar no controle da PA em condições de hipertensão (69,70). Benter e colaboradores foram os primeiros a descrever os efeitos anti-hipertensivos da Ang-(1-7), mostrando que a infusão deste peptídeo leva a uma redução significativa dos níveis plasmáticos de vasopressina, com consequente queda na PAS de animais SHR (69). Neste estudo, observamos que a infusão de Ang-(1-7) provocou um aumento na dP/dt mín em SHR antes do início da curva de ACh. Por outro lado, o A-779 induziu uma redução na PIVS. Já foi demonstrado que a Ang-(1-7) via receptor Mas é capaz de modular o transiente de Ca^{2+} no coração, o que pode resultar na melhora da contratilidade e do relaxamento do músculo ventricular (71). Este achado está de acordo com diversos trabalhos prévios que demonstram efeitos benéficos da Ang-(1-7) melhorando a disfunção cardíaca em diferentes modelos experimentais (40,72,73). De forma inesperada, a infusão com A-779 também reduziu os níveis da PAS, PAD e PAM de SHR. Já se sabe que a Ang-(1-7) apresenta efeitos anti-hipertensivos em ratos SHR (69). No entanto, a redução da PA causada pelo A-779 pode ser decorrente da redução na PIVS e consequência de ajustes no débito cardíaco.

Os valores basais da PA dos animais SHR anestesiados apresentaram-se mais baixos do que os observados pela pletismografia de cauda. Este efeito pode ser uma consequência do uso do anestésico uretano, que apresenta como uma desvantagem o fato de atenuar a contribuição simpática para o controle da PA. Bencze e colaboradores em 2013, ao analisar quatro diferentes classes de anestésicos, mostraram esta redução da PA em SHR anestesiados com uretano (74). Por outro lado, a redução dos níveis pressóricos dos animais hipertensos, que atingiu níveis semelhantes aos vistos em animais normotensos, permitiu que as análises dos parâmetros cardíacos ocorressem de forma independente dos efeitos diretos dos níveis aumentados da pressão arterial.

Neste estudo, foi mostrado que a Ang-(1-7) é capaz de atenuar os efeitos inotrópicos negativos da ACh em ratos normotensos e hipertensos anestesiados, como revelado pela PIVS, dP/dt máx e dP/dt mín. A ausência desses efeitos na presença concomitante do A-779 em ratos Wistar e SHR indicam o envolvimento do receptor Mas. No entanto, a Ang-(1-7) não alterou a resposta à ACh na pressão arterial, sugerindo que o efeito inotrópico observado ocorreu de forma independente de alterações da pressão arterial. De forma controversa, Faria-Silva e colaboradores (2005) demonstraram que a Ang-(1-7) foi capaz de aumentar significativamente o efeito hipotensor da ACh em animais normotensos (64). No entanto, é importante salientar que há diferenças metodológicas entre o nosso estudo e o citado anteriormente, como as doses de acetilcolina que foram administradas e o desenho experimental.

Vários estudos também têm sugerido que os efeitos cardiovasculares da Ang-(1-7) parecem ocorrer de forma independente de ajustes na PA (35,36). Já foi mostrado que em concentrações micromolares, a Ang-(1-7) desencadeou um efeito inotrópico negativo em coração isolado de coelho, e que esta resposta ocorre por meio da ativação do receptor Mas e de forma dependente da liberação de NO (75). De acordo com os dados obtidos neste estudo, a Ang-(1-7) provocou uma diferença na resposta contrátil, mas não modificou a amplitude da resposta hipotensora à ACh.

O SNA também exerce uma influência fundamental no controle do sistema cardiovascular. Nos últimos anos, vários estudos têm demonstrado uma modulação deste sistema pela Ang-(1-7) (60–63). No entanto, ainda não foi mostrado se a Ang-(1-7) poderia modular diretamente os efeitos parassimpáticos no coração. Uma vez que a atenuação do efeito inotrópico negativo da ACh ocorreu de forma

independente de ajustes na PA, hipotetizamos que poderia estar havendo um efeito direto sobre a atividade de terminações colinérgicas autonômicas que inervam o coração ou diretamente sobre os receptores colinérgicos cardíacos. Assim, a fim de avaliar os efeitos cardíacos da Ang-(1-7) ausência de modulação nervosa, foram feitos experimentos de coração isolado. Nos corações isolados de ratos normotensos e hipertensos, a Ang-(1-7) também foi capaz de atenuar os efeitos inotrópicos da ACh, reproduzindo de forma similar o que ocorreu nos experimentos *in vivo*, com efeito no coração. Isso demonstra que a Ang-(1-7) modifica a sensibilidade de receptores colinérgicos cardíacos de maneira independente da presença/atividade de terminações vagais.

Em corações isolados de normotensos, o bloqueio do receptor Mas atenuou o efeito da Ang-(1-7), revelando o envolvimento deste receptor nas respostas colinérgicas controladas pelos receptores M2 cardíacos. Diferentemente, nos corações de SHR, o antagonismo do receptor Mas pelo A-779 não aboliu os efeitos da Ang-(1-7), e nos corações que receberam apenas o A-779, houve uma potenciação do efeito inotrópico negativo da ACh. Tais resultados sugerem que os efeitos da Ang-(1-7) que interferem sobre a atividade colinérgica cardíaca durante hipertensão ocorreriam através de mecanismos dependentes de outras vias, além daquelas controladas pela ativação do receptor Mas. Sabe-se que na hipertensão essencial, ocorre uma desregulação autonômica, levando a uma predominância dos efeitos simpáticos com consequente aumento da liberação adrenérgica, de tal forma que esta hiperatividade simpática geralmente é acompanhada por uma descompensação do controle vagal no coração (13). Além disso, o desbalanço adrenérgico também pode participar do desenvolvimento de danos aos órgãos alvo, levando a várias complicações relacionadas à hipertensão (11). Assim, tal desbalanço autonômico poderia provocando estes efeitos diferentes entre as linhagens. Uma hipótese adicional que não pode ser descartada é a participação de diferentes receptores. Recentemente, Tetzner et al. (2016) mostraram que a Ang-(1-7) também pode-se ligar ao receptor MrgD (67). Diante disto, nós avaliamos se este receptor poderia estar envolvido no efeito da Ang-(1-7) em atenuar a ação da ACh nos corações de SHR. Entretanto, o antagonista do receptor MrgD, o D-PRO, também não foi capaz de bloquear o efeito da Ang-(1-7) nos corações de SHR, mostrando então que este receptor não está envolvido nos efeitos que foram observados. Assim, outra possibilidade que pode ser levantada é de que a influência

da Ang-(1-7) sobre os efeitos da ACh em SHR poderia receber a contribuição de outros receptores angiotensinérgicos. No entanto, experimentos complementares são necessários para avaliar esta hipótese.

Observamos que a Ang-(1-7) atenua os efeitos colinérgicos cardíacos de forma dependente da ativação do receptor Mas. De acordo com um estudo de Dias-Peixoto et al. (2008), a Ang-(1-7) liga-se ao receptor Mas e ativa a via da PI3-K/Akt, resultando na ativação da síntese e geração de NO, envolvendo também a geração de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) (43). Além disso, sabe-se que o NO modula alguns componentes do acoplamento excitação-contração (44) e a ACh inibi a PKA, que exerce um importante papel na regulação de todos os elementos envolvidos no processo de contração. Dessa forma, pode-se sugerir que há uma interação entre as vias intracelulares ativadas pelos receptores M2 e Mas, podendo alterar a dinâmica do cálcio, levando a alterações na resposta contrátil à ACh. No entanto, outros experimentos serão necessários para confirmar esta hipótese. Além disso, também não pode ser descartada a possibilidade de que esteja ocorrendo algum tipo de interação física entre os receptores angiotensinérgicos. Sabe-se que os receptores acoplados à proteína G são capazes de formar heterodímeros, e esta interação física pode alterar tanto a sua função, como os efeitos intracelulares (76). Nesse sentido, já foi descrito que o receptor Mas pode formar heterodímeros com os receptores AT1 (77) e AT2 (78). Assim, pode-se hipotetizar que uma heterodimerização entre os receptores M2 e Mas expressos no coração pode modular a sensibilidade destes receptores muscarínicos em resposta à ACh.

Para avaliar se os efeitos da Ang-(1-7) na modulação da atividade muscarínica seriam limitados ao coração, sem o envolvimento de ajustes vasculares, foram feitos experimentos com anéis de aorta isolados. Na presença da Ang-(1-7), o vasorrelaxamento da aorta promovido pela ACh não foi alterado em ratos normotensos. Entretanto, na sua maior dose, este peptídeo foi capaz de atenuar o relaxamento evocado pela ACh na aorta de SHR, sugerindo que a alteração na responsividade de receptores colinérgicos na presença da Ang-(1-7) não se limita ao leito cardíaco. Sabe-se que a hipertensão leva a vários danos nos órgãos alvo e promove uma disfunção vascular, e uma das consequências destes danos é a redução na expressão de receptor Mas, o que pode justificar a diferença no vasorelaxamento da aorta entre os grupos (79). Além disso, não se pode descartar a hipótese de que nestas condições, outros receptores estariam envolvidos nos efeitos

da Ang-(1-7). Dessa forma, estes dados demonstram que na hipertensão, a Ang-(1-7) pode modular a sensibilidade colinérgica em outros locais além do coração, provavelmente devido aos danos vasculares e disfunção endotelial causados pela hipertensão.

Apesar dos nossos dados mostrarem que a Ang-(1-7) foi capaz de modular os efeitos da ACh diretamente no coração, não podemos descartar as possibilidades de que a Ang-(1-7) poderia atuar: i) ao nível de núcleos pré-motores simpáticos e parassimpáticos; ii) ao nível dos gânglios do SNS e SNP, modulando a intensidade do efluxo de estímulos para terminações pós-ganglionares; iii) nas placas motoras compostas pelas terminações axonais pós-ganglionares autonômicas e os órgãos alvo (coração e leitos vasculares). A Ang-(1-7) influencia os níveis pressóricos agindo tanto de forma direta no coração e vasos sanguíneos, quanto em algumas áreas do SNC, incluindo os núcleos responsáveis pelo controle do SNA. Já é bem estabelecido que a Ang-(1-7) também atua na modulação do barorreflexo, e dependendo da área central específica ativada, este peptídeo pode levar a um aumento ou redução da PA. Este efeito ocorre principalmente devido a um aumento do componente bradicárdico do controle da FC, tanto em animais normotensos, quanto em hipertensos (51,53). Já foi mostrado que infusões crônicas de Ang-(1-7) no SNC atenuaram o aumento na PA em vários modelos de hipertensão (51). Sabendo disso, não pode ser descartada a hipótese de que a Ang-(1-7) também pode estar atuando na modulação de núcleos do SNC que são responsáveis pelo controle do sistema cardiovascular. Nesse sentido, há a necessidade de realizar experimentos adicionais com o intuito de testar essas múltiplas hipóteses e revelar se a Ang-(1-7) central provocaria efeitos similares aos desencadeados pela sua administração periférica.

6. CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados, podemos concluir que:

- A Ang-(1-7) atenua os efeitos inotrópicos negativos mediados pela ACh;
- Tal efeito é resultado da ativação do receptor Mas, uma vez que o seu bloqueio aboliu os efeitos da Ang-(1-7) em Wistar e parcialmente em SHR;
- A Ang-(1-7) modula os efeitos colinérgicos cardíacos, mas não promove alterações na resposta pressora à ACh;
- Os animais hipertensos apresentaram respostas diferentes dos normotensos tanto nos experimentos *in vivo* quanto nos *ex vivo* de coração e vaso isolado.

Sendo assim, nossos resultados demonstram que a via Ang-(1-7)/receptor Mas é capaz de interagir com os receptores muscarínicos presentes no coração, levando a uma atenuação dos efeitos inotrópicos evocados pela ACh. Tal efeito da Ang-(1-7) não influencia as respostas da ACh na pressão arterial. No entanto, as respostas entre ratos normotensos e hipertensos são diferentes, mas os mecanismos pelos quais isto ocorre ainda precisam ser estudados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gordan R, Gwathmey JK, Xie L-H. Autonomic and endocrine control of cardiovascular function. *World J Cardiol*. 2015;7(4):204–14.
2. Mori S, Spicer DE, Anderson RH. Revisiting the Anatomy of the Living Heart. *Circ J* [Internet]. 2016;80(1):24–33. Available from: https://www.jstage.jst.go.jp/article/circj/80/1/80_CJ-15-1147/_article
3. Eisner D, Bode E, Venetucci L, Trafford A. Calcium flux balance in the heart. Vol. 58, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2013. p. 110–7.
4. Aronsen JM, Louch WE, Sjaastad I. Cardiomyocyte Ca^{2+} dynamics: clinical perspectives. *Scand Cardiovasc J* [Internet]. 2016;50(2):65–77. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/14017431.2015.1136079>
5. Bers DM. Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature* [Internet]. 2002;415(6868):198–205. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/415198a>
6. Eisner DA, Caldwell JL, Kistamás K, Trafford AW. Calcium and Excitation-Contraction Coupling in the Heart. *Circ Res*. 2017;121(2):181–95.
7. Brodde O-E, Michel MC. Adrenergic and Muscarinic Receptors in the Human Heart. *Pharmacol Rev* [Internet]. 1999;51:651–90. Available from: <http://pharmrev.aspetjournals.org/cgi/content/abstract/51/4/651>
8. Woodcock EA, Du XJ, Reichelt ME, Graham RM. Cardiac alpha 1-adrenergic drive in pathological remodelling. Vol. 77, *Cardiovascular Research*. 2008. p. 452–62.
9. Zarghooni S, Wunsch J, Bodenbenner M, Brüggmann D, Grando SA, Schwantes U, et al. Expression of muscarinic and nicotinic acetylcholine receptors in the mouse urothelium. *Life Sci*. 2007;80(24–25):2308–13.
10. Ryberg AT, Warfvinge G, Axelsson L, Soukup O, Götrick B, Tobin G. Expression of muscarinic receptor subtypes in salivary glands of rats, sheep and man. *Arch Oral Biol*. 2008;53(1):66–74.
11. Mancia G, Grassi G. The autonomic nervous system and hypertension. Vol. 114, *Circulation Research*. 2014. p. 1804–14.
12. Folkow B, Wang JJ, Wong TY, Rohtchina E, Klein R, Leeder SR, et al. Physiological aspects of primary hypertension. *Physiol Rev* [Internet]. 1982;62(2):347–504. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6461865>
13. Mark AL. The sympathetic nervous system in hypertension: a potential long-term regulator of arterial pressure. *J Hypertens Suppl*. 1996;14(5):S159–65.
14. Smith PA, Graham LN, Mackintosh AF, Stoker JB, Mary DASG. Relationship between central sympathetic activity and stages of human hypertension. *Am J Hypertens*. 2004;17(3):217–22.
15. Mancia G, Grassi G, Giannattasio C, Seravalle G. Sympathetic Activation in the Pathogenesis of Hypertension and Progression of Organ Damage. *Hypertension* [Internet]. 1999;34(4):724–8. Available from: <http://hyper.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.HYP.34.4.724>
16. Esler M, Lambert E, Schlaich M. Point: Chronic Activation of the Sympathetic Nervous System is the Dominant Contributor to Systemic Hypertension. *J Appl Physiol* [Internet]. 2010;109(6):1996–8. Available from: <http://jap.physiology.org/cgi/doi/10.1152/japplphysiol.00182.2010>
17. Haber E. Renin inhibitors. *Hypertension* [Internet]. 1986;8(12):1093–5. Available from: <http://hyper.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.HYP.8.12.1093>

18. Brunner HR, Laragh JH, Baer L, Newton MA, Goodwin FT, Krakoff LR, et al. Essential hypertension: renin and aldosterone, heart attack and stroke. *N Engl J Med* [Internet]. 1972;286(9):441–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4257928>
19. Campbell DJ, Nussberger J, Stowasser M, Danser AHJ, Morganti A, Frandsen E, et al. Activity assays and immunoassays for plasma renin and prorenin: Information provided and precautions necessary for accurate measurement. Vol. 55, *Clinical Chemistry*. 2009. p. 867–77.
20. De Mello WC. Opposite effects of angiotensin II and angiotensin (1-7) on impulse propagation, excitability and cardiac arrhythmias. Is the overexpression of ACE2 arrhythmogenic? Vol. 153, *Regulatory Peptides*. 2009. p. 7–10.
21. Ferrario CM, Barnes KL, Block CH, Brosnihan KB, Diz DI, Khosla MC, et al. Pathways of angiotensin formation and function in the brain. *Hypertension* [Internet]. 1990;15(2 Suppl):I13-9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2404855
22. Ferrario CM, Strawn WB. Role of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System and Proinflammatory Mediators in Cardiovascular Disease. Vol. 98, *American Journal of Cardiology*. 2006. p. 121–8.
23. Te Riet L, Van Esch JHM, Roks AJM, Van Den Meiracker AH, Danser AHJ. Hypertension: Renin-Angiotensin-Aldosterone System Alterations. Vol. 116, *Circulation Research*. 2015. p. 960–75.
24. Chappell MC. Biochemical evaluation of the renin-angiotensin system: the good, bad, and absolute? *Am J Physiol - Hear Circ Physiol* [Internet]. 2016;310(2):H137–52. Available from: <http://ajpheart.physiology.org/lookup/doi/10.1152/ajpheart.00618.2015>
25. Galandrin S, Denis C, Boularan C, Marie J, Kadmi CM, Pilette C, et al. Renin – Angiotensin System II Type 1 Receptor. 2016;
26. Passos-Silva DG, Brandan E, Santos RAS. Angiotensins as therapeutic targets beyond heart disease. *Trends Pharmacol Sci*. 2015;36(5):310–20.
27. Santos RAS, Brosnihan K, Chappell M, Pesquero J, Chernicky C, Greene L, et al. Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brainstem. *Hypertension*. 1988;11:153–7.
28. Ferrario CM, Chappell MC, Tallant EA, Brosnihan KB, Diz DI. Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7). *Hypertension* [Internet]. 1997;30(3 Pt 2):535–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9322978>
29. Lautner RQ, Villela DC, Fraga-Silva RA, Silva N, Verano-Braga T, Costa-Fraga F, et al. Discovery and characterization of alamandine: A novel component of the renin-angiotensin system. *Circ Res*. 2013;112(8):1104–11.
30. Abhold RH, Sullivan MJ, Wright JW, Harding JW. Binding, degradation and pressor activity of angiotensins II and III after aminopeptidase inhibition with amastatin and bestatin. *J Pharmacol Exp Ther* [Internet]. 1987;242(3):957–62. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0023638822&partnerID=tZOtx3y1>
31. Swanson GN, Hanesworth JM, Sardinia MF, Coleman JKM, Wright JW, Hall KL, et al. Discovery of a distinct binding site for angiotensin II (3-8), a putative angiotensin IV receptor. *Regul Pept*. 1992;40(3):409–19.
32. Schiavone MT, Santos RAS, Brosnihan KB, Khosla MC, Ferrario CM. Release

- of vasopressin from the rat hypothalamo-neurohypophysial system by angiotensin-(1-7) heptapeptide. *Neurobiology*. 1988;85:4095–8.
33. Castro CH, Santos RAS, Ferreira AJ, Bader M, Alenina N, Almeida AP. Effects of genetic deletion of angiotensin-(1-7) receptor Mas on cardiac function during ischemia/reperfusion in the isolated perfused mouse heart. *Life Sci*. 2006;80(3):264–8.
 34. Ferreira AJ, Castro CH, Guatimosim S, Almeida PWM, Gomes ERM, Dias-Peixoto MF, et al. Attenuation of isoproterenol-induced cardiac fibrosis in transgenic rats harboring an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein in the heart. *Ther Adv Cardiovasc Dis*. 2010;4(2):83–96.
 35. Grobe JL. Chronic angiotensin-(1-7) prevents cardiac fibrosis in DOCA-salt model of hypertension. *AJP Hear Circ Physiol* [Internet]. 2006;290(6):H2417–23. Available from: <http://ajpheart.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajpheart.01170.2005>
 36. Santos RAS, Castro CH, Gava E, Pinheiro SVB, Almeida AP, De Paula RD, et al. Impairment of in vitro and in vivo heart function in angiotensin-(1-7) receptor mas knockout mice. *Hypertension*. 2006;47(5):996–1002.
 37. Averill DB, Ishiyama Y, Chappell MC, Ferrario CM. Cardiac Angiotensin-(1-7) in Ischemic Cardiomyopathy. *Circulation*. 2003;108(17):2141–6.
 38. De Mello WC. Renin Angiotensin system as a regulator of cell volume. Implications to myocardial ischemia. *Curr Cardiol Rev* [Internet]. 2009;5(1):65–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2803291&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 39. Ferreira AJ, Santos RA, Almeida AP. Angiotensin-(1-7): cardioprotective effect in myocardial ischemia/reperfusion. *Hypertension*. 2001;38(3 Pt 2):665–8.
 40. Loot AE, Roks AJM, Henning RH, Tio RA, Suurmeijer AJH, Boomsma F, et al. Angiotensin-(1-7) attenuates the development of heart failure after myocardial infarction in rats. *Circulation*. 2002;105(13):1548–50.
 41. Zhou P, Cheng CP, Li T, Ferrario CM, Cheng H-J. Modulation of cardiac L-type Ca²⁺ current by angiotensin-(1-7): Normal versus heart failure HHS Public Access. *Ther Adv Cardiovasc Dis* [Internet]. 2015;9(6):342–53. Available from: <http://www.sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav>
 42. Santos RAS, e Silva ACS, Maric C, Silva DMR, Machado RP, de Buhr I, et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2003;100(14):8258–63. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1432869100>
 43. Dias-Peixoto MF, Santos RAS, Gomes ERM, Alves MNM, Almeida PWM, Greco L, et al. Molecular mechanisms involved in the angiotensin-(1-7)/mas signaling pathway in cardiomyocytes. *Hypertension*. 2008;52(3):542–8.
 44. Hare JM. Nitric oxide and excitation-contraction coupling. Vol. 35, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2003. p. 719–29.
 45. Martinez-Moreno M, Alvarez-Barrientos A, Roncal F, Albar JP, Gavilanes F, Lamas S, et al. Direct interaction between the reductase domain of endothelial nitric oxide synthase and the ryanodine receptor. *FEBS Lett* [Internet]. 2005;579(14):3159–63. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15922337
 46. Lascano E, Negroni J, Vila Petroff M, Mattiazzi A. Impact of RyR2 potentiation on myocardial function. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol* [Internet].

- 2017;312(6):H1105–9. Available from: <http://ajpheart.physiology.org/lookup/doi/10.1152/ajpheart.00855.2016>
47. Reid I a. Interactions between ANG II, sympathetic nervous system, and baroreceptor reflexes in regulation of blood pressure. *Am J Physiol* [Internet]. 1992;262(6 Pt 1):E763-78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1616014>
 48. Wright JW, Harding JW. Brain renin-angiotensin-A new look at an old system. Vol. 95, *Progress in Neurobiology*. 2011. p. 49–67.
 49. Fischer-Ferraro C, Nahmod VE, Goldstein DJ, Finkielman S. Angiotensin and renin in rat and dog brain. *J Exp Med* [Internet]. 1971;133(2):353–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4332372> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2138896>
 50. Khanmoradi M, Nasimi A. Angiotensin II in the paraventricular nucleus stimulates sympathetic outflow to the cardiovascular system and make vasopressin release in rat. *Neurosci Lett*. 2016;632:98–103.
 51. Santos RAS, Sampaio WO, Alzamora AC, Motta-Santos D, Alenina N, Bader M, et al. The ACE2/Angiotensin-(1–7)/MAS Axis of the Renin-Angiotensin System: Focus on Angiotensin-(1–7). *Physiol Rev* [Internet]. 2018;98(1):505–53. Available from: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.00023.2016>
 52. Diz DI, Arnold AC, Nautiyal M, Isa K, Shaltout HA, Tallant EA. Angiotensin peptides and central autonomic regulation. *Curr Opin Pharmacol*. 2011;11(2):131–7.
 53. Bomtempo CAS, Santos GFP, Santos RAS, Campagnole-Santos MJ. Interaction of bradykinin and angiotensin-(1-7) in the central modulation of the baroreflex control of the heart rate. *J Hypertens*. 1998;16(12):1797–804.
 54. Fernandez G, Lee JA, Liu LC, Gassler JP. The Baroreflex in Hypertension. 2015;
 55. Willette RN, Krieger AJ, Barcas PP, Sapru HN. Medullary gamma-aminobutyric acid (GABA) receptors and the regulation of blood pressure in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*. 1983;226(3):893–9.
 56. Alzamora AC, Santos RAS, Campagnole-Santos MJ. Hypotensive effect of ANG II and ANG-(1–7) at the caudal ventrolateral medulla involves different mechanisms. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol* [Internet]. 2002;283(5):R1187–95. Available from: <http://ajpregu.physiology.org/lookup/doi/10.1152/ajpregu.00580.2001>
 57. Alzamora AC. Baroreflex modulation by angiotensins at the rat rostral and caudal ventrolateral medulla. *AJP Regul Integr Comp Physiol* [Internet]. 2005;290(4):R1027–34. Available from: <http://ajpregu.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajpregu.00852.2004>
 58. Li P, Sun H, Cui B, Zhou Y, Han Y. Angiotensin-(1–7) in the Rostral Ventrolateral Medulla Modulates Enhanced Cardiac Sympathetic Afferent Reflex and Sympathetic Activation in Renovascular Hypertensive Rats. *Hypertension*. 2013;820–7.
 59. Zhou LM, Shi Z, Gao J, Han Y, Yuan N, Gao XY, et al. Angiotensin-(1-7) and angiotension II in the rostral ventrolateral medulla modulate the cardiac sympathetic afferent reflex and sympathetic activity in rats. *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2010;459(5):681–8.
 60. Gironacci MM, Vatta M, Rodriguez-Fermepín M, Fernández BE, Peña C. Angiotensin-(1-7) reduces norepinephrine release through a nitric oxide

- mechanism in rat hypothalamus. *Hypertension* [Internet]. 2000;35(6):1248–52. Available from: <http://hyper.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.HYP.35.6.1248>
61. Lima a M, Xavier CH, Ferreira a J, Raizada MK, Wallukat G, Velloso EP, et al. Activation of angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin-(1-7)/Mas axis attenuates the cardiac reactivity to acute emotional stress. *Am J Physiol Hear Circ Physiol* [Internet]. 2013;305:H1057–67. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=23873801
 62. Moura Santos D, Ribeiro Marins F, Limbor??o-Filho M, de Oliveira ML, Hamamoto D, Xavier CH, et al. Chronic overexpression of angiotensin-(1-7) in rats reduces cardiac reactivity to acute stress and dampens anxious behavior. *Stress*. 2017;20(2):189–96.
 63. Dartora DR, Irigoyen M-C, Casali KR, Moraes-Silva IC, Bertagnolli M, Bader M, et al. Improved cardiovascular autonomic modulation in transgenic rats expressing an Ang-(1-7)-producing fusion protein. *Can J Physiol Pharmacol*. 2017;
 64. Faria-Silva R, Duarte F V, Santos R a S. Short-term angiotensin(1-7) receptor MAS stimulation improves endothelial function in normotensive rats. *Hypertension* [Internet]. 2005;46(4):948–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16087780>
 65. Nunes ADC, Souza APS, Macedo LM, Alves PH, Pedrino GR, Colugnati DB, et al. Influence of antihypertensive drugs on aortic and coronary effects of Ang-(1-7) in pressure-overloaded rats. *Brazilian J Med Biol Res*. 2017;50(4):1–8.
 66. Souza ÁPS, Sobrinho DBS, Almeida JFQ, Alves GMM, Macedo LM, Porto JE, et al. Angiotensin II type 1 receptor blockade restores angiotensin-(1-7)-induced coronary vasodilation in hypertrophic rat hearts. *Clin Sci (Lond)* [Internet]. 2013;125(9):449–59. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23718715>
 67. Tetzner A, Gebolys K, Meinert C, Klein S, Uhlich A, Trebicka J, et al. G-Protein-Coupled Receptor MrgD Is a Receptor for Angiotensin-(1-7) Involving Adenylyl Cyclase, cAMP, and Phosphokinase A. *Hypertension*. 2016;68(1):185–94.
 68. Sampaio WO, Nascimento AAS, Santos RAS. Systemic and regional hemodynamic effects of angiotensin-(1-7) in rats. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol* [Internet]. 2003;284(6):H1985–94. Available from: <http://ajpheart.physiology.org/lookup/doi/10.1152/ajpheart.01145.2002>
 69. Benter IF, Ferrario CM, Morris M, Diz DI. Antihypertensive actions of angiotensin-(1-7) in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol* [Internet]. 1995;269(1 Pt 2):H313-9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7631863>
 70. Heitsch H, Brovkovich S, Malinski T, Wiemer G. Angiotensin (1-7)- Stimulated Nitric Oxide and Superoxide Release From Endothelial Cells. *Hypertension*. 2001;37(1):72–6.
 71. Gomes ERM, Santos R a S, Guatimosim S. Angiotensin-(1-7)-mediated signaling in cardiomyocytes. *Int J Hypertens*. 2012 Jan;2012:493129.
 72. Ferreira AJ, Castro CH, Guatimosim S, Almeida PW, Gomes ER, Dias-Peixoto MF, et al. Attenuation of isoproterenol-induced cardiac fibrosis in transgenic rats harboring an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein in the heart. *Ther Adv Cardiovasc Dis*. 2010;4(2):83–96.
 73. Mercure C, Yogi A, Callera GE, Aranha AB, Bader M, Ferreira AJ, et al.

- Angiotensin(1-7) Blunts Hypertensive Cardiac Remodeling by a Direct Effect on the Heart. *Circ Res*. 2008/10/11. 2008;
74. Bencze M, Behuliak M, Zicha J. The Impact of Four Different Classes of Anesthetics on the Mechanisms of Blood Pressure Regulation in Normotensive and Spontaneously Hypertensive Rats. *Physiol Res* [Internet]. 2013;62:471–8. Available from: www.biomed.cas.cz/physiolres
 75. Castro-Chaves P, Pintalhao M, Fontes-Carvalho R, Cerqueira R, Leite-Moreira AF. Acute modulation of myocardial function by angiotensin 1-7. *Peptides*. 2009;30(9):1714–9.
 76. Barnes PJ. Receptor heterodimerization: A new level of cross-talk. Vol. 116, *Journal of Clinical Investigation*. 2006. p. 1210–2.
 77. Kostenis E, Milligan G, Christopoulos A, Sanchez-Ferrer CF, Heringer-Walther S, Sexton PM, et al. G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor. *Circulation*. 2005;111(14):1806–13.
 78. Leonhardt J, Villela DC, Teichmann A, Münter LM, Mayer MC, Mardahl M, et al. Evidence for Heterodimerization and Functional Interaction of the Angiotensin Type 2 Receptor and the Receptor MAS. *Hypertension*. 2017;69(6):1128–35.
 79. Silva DMR, Gomes-Filho a., Olivon VC, Santos TMS, Becker LK, Santos R a. S, et al. Swimming training improves the vasodilator effect of angiotensin-(1-7) in the aorta of spontaneously hypertensive rat. *J Appl Physiol*. 2011;111(5):1272–7.

8. ANEXOS

ANEXO I. Valores nos parâmetros basais antes e após a infusão de veículo ou peptídeos.

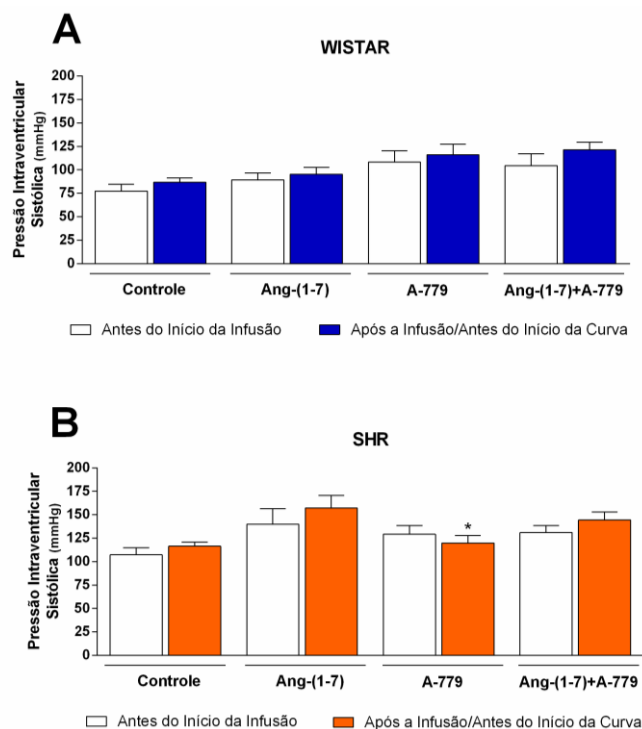


Figura 17: Valores de Pressão Intraventricular Sistólica de (A) Wistar e (B) SHR antes e após a infusão de veículo e peptídeos. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Foi utilizado o teste t pareado, sendo considerado significativo quando $*P<0.05$ vs. antes da infusão.

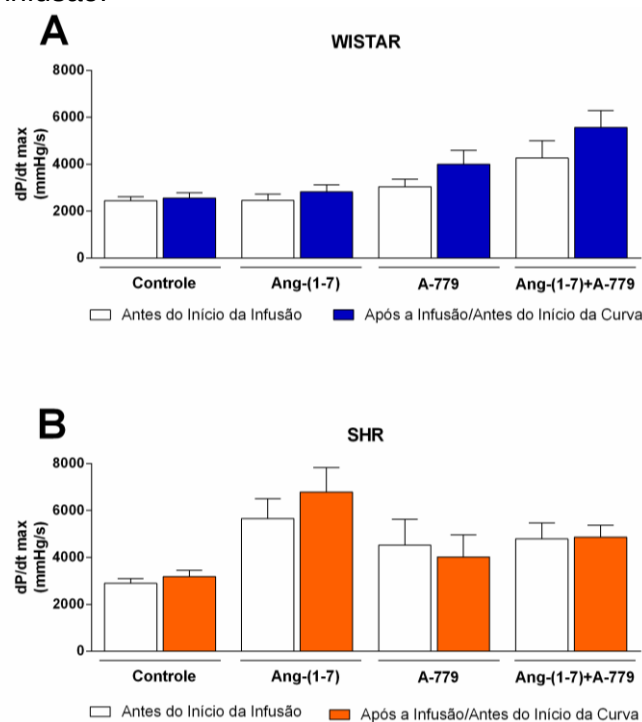


Figura 18: Valores de dP/dt máx de (A) Wistar e (B) SHR antes e após a infusão de veículo e peptídeos. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Foi utilizado o teste t pareado, sendo considerado significativo quando $*P<0.05$ vs. antes da infusão.

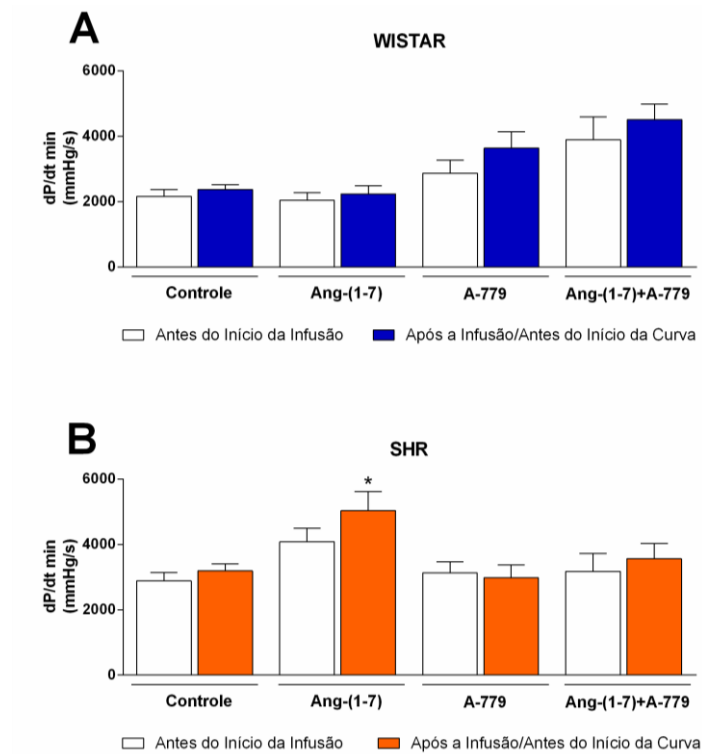


Figura 19: Valores de dP/dt mín de (A) Wistar e (B) SHR antes e após a infusão de veículo e peptídeos. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Foi utilizado o teste t pareado, sendo considerado significativo quando $*P < 0.05$ vs. antes da infusão.

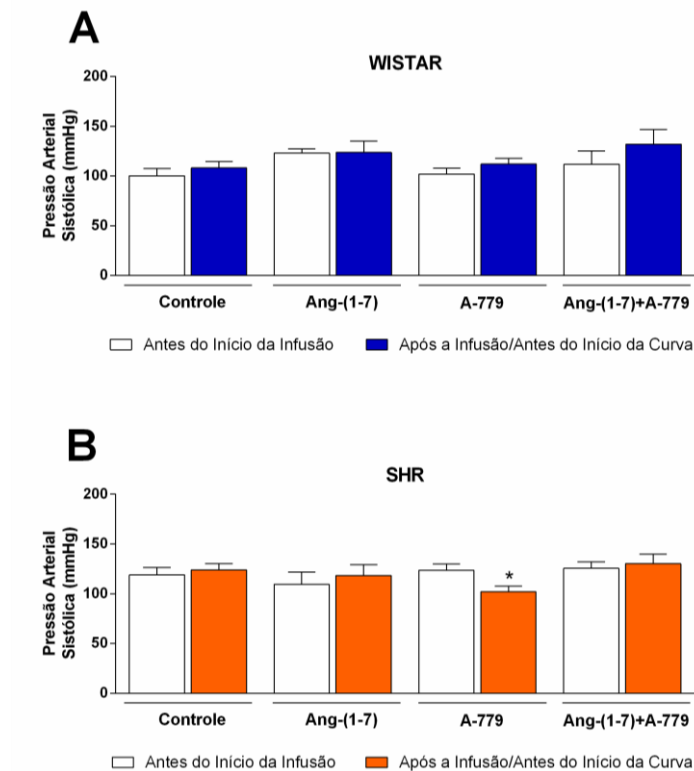


Figura 20: Valores de Pressão Arterial Sistólica de (A) Wistar e (B) SHR antes e após a infusão de veículo e peptídeos. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Foi utilizado o teste t pareado, sendo considerado significativo quando $*P < 0.05$ vs. antes da infusão.

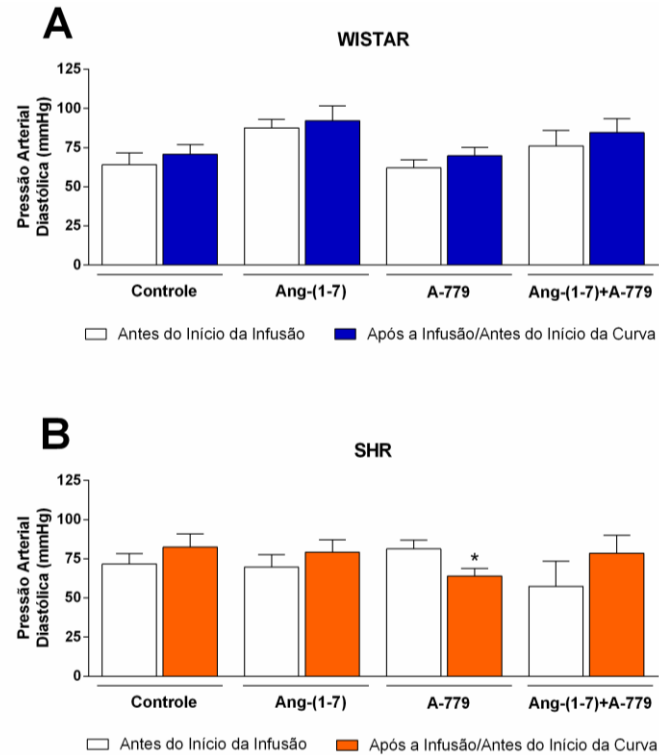


Figura 21: Valores de Pressão Arterial Diastólica de (A) Wistar e (B) SHR antes e após a infusão de veículo e peptídeos. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Foi utilizado o teste t pareado, sendo considerado significativo quando $*P < 0.05$ vs. antes da infusão.

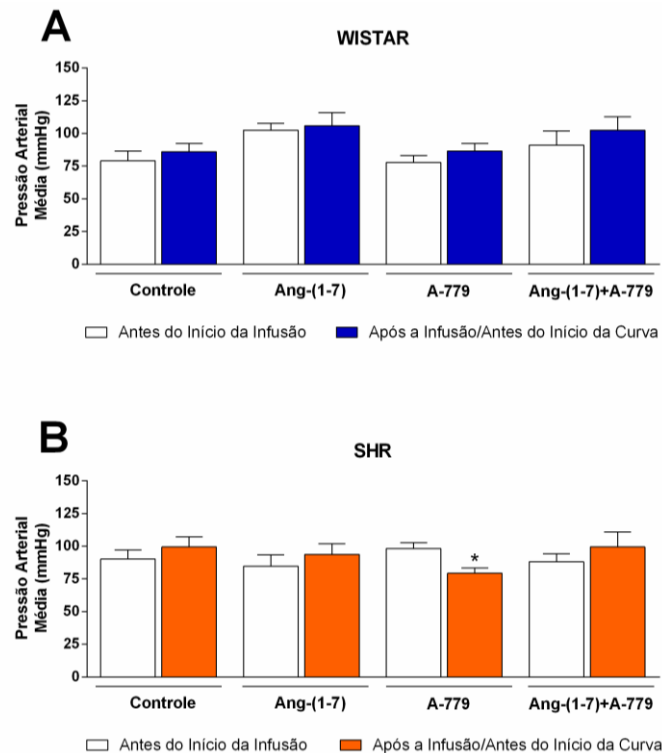


Figura 22: Valores de Pressão Arterial Média de (A) Wistar e (B) SHR antes e após a infusão de veículo e peptídeos. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Foi utilizado o teste t pareado, sendo considerado significativo quando $*P < 0.05$ vs. antes da infusão.