



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

**EFEITOS DA ANGIOTENSINA-(1-7) E ANGIOTENSINA II NO
INOTROPISMO CARDÍACO E VASOMOTRICIDADE
CORONARIANA: UM COMPLEXO ENVOLVIMENTO ENTRE OS
RECEPTORES ANGIOTENSINÉRGICOS**

ALLANCER DIVINO DE CARVALHO NUNES

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:

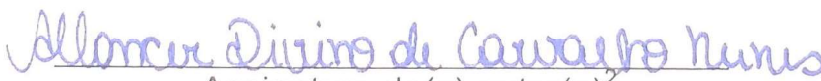
Nome completo do autor: Allancer Divino de Carvalho Nunes

Título do trabalho: Efeitos da Angiotensina-(1-7) e Angiotensina II no inotropismo cardíaco e vasomotricidade coronariana: um complexo envolvimento entre os receptores angiotensinérgicos

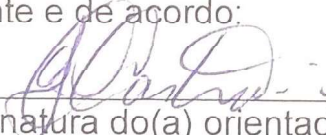
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

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

Data: 16/05 /2018

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.

ALLANCER DIVINO DE CARVALHO NUNES

**EFEITOS DA ANGIOTENSINA-(1-7) E ANGIOTENSINA II NO
INOTROPISMO CARDÍACO E VASOMOTRICIDADE
CORONARIANA: UM COMPLEXO ENVOLVIMENTO ENTRE OS
RECEPTORES ANGIOTENSINÉRGICOS**

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

Área de Concentração: Farmacologia e Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique de Castro

**GOIÂNIA-GO
2018**

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

Nunes, Allancer Divino de Carvalho

Efeitos da Angiotensina-(1-7) e Angiotensina II no inotropismo cardíaco e vasomotricidade coronariana: Um complexo envolvimento entre os receptores angiotensinérgicos [manuscrito] / Allancer Divino de Carvalho Nunes. - 2018.

XXIII, 148 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique de Castro.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Biologia, Goiânia, 2018.

Anexos.

Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Angiotensina-(1-7). 2. Angiotensina II. 3. Contratilidade Cardíaca . 4. Vasomotricidade Coronariana. 5. Receptores Angiotensinérgicos .
I. Castro, Carlos Henrique de, orient. II. Título.

CDU 612.1



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

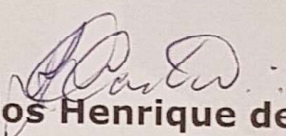
ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE TESE DE Nº 63

1
2 Aos vinte e seis dias do mês de abril do ano de dois mil e dezoito, às oito horas
3 e trinta minutos, no Anfiteatro do Instituto de Ciências Biológicas II da
4 Universidade Federal de Goiás, reuniram-se os componentes da banca
5 examinadora: Prof. Dr. Carlos Henrique de Castro, Profa. Dra. Aline Priscila
6 Pansani, Prof. Dr. Gustavo Rodrigues Pedrino, Profa. Dra. Lusiane Maria
7 Bendhack e Prof. Dr. Anderson José Ferreira para, em sessão pública presidida
8 pelo primeiro examinador citado, procederem à avaliação da defesa de tese
9 intitulada "Efeitos da Angiotensina-(1-7) e Angiotensina II no inotropismo
10 cardíaco e vasomotricidade coronariana: um complexo envolvimento entre os
11 receptores angiotensinérgicos", em nível de doutorado, área de concentração
12 em Farmacologia e Fisiologia, de autoria de **Allancer Divino de Carvalho**
13 **Nunes**, discente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da
14 Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo presidente, que fez a
15 apresentação formal dos membros da banca. A palavra, a seguir, foi concedida
16 ao autor da tese que em cerca de 50 minutos procedeu à apresentação de
17 seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da banca arguiu o
18 examinado, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a
19 fase de arguição, procedeu-se à avaliação da tese. Tendo-se em vista o que
20 consta na Resolução nº1491 de 2017 do Conselho de Ensino, Pesquisa,
21 Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação
22 em Ciências Biológicas, a tese foi APROVADA, considerando-se integralmente
23 cumprido este requisito para fins de obtenção do título de Doutor em Ciências
24 Biológicas pela Universidade Federal de Goiás. A conclusão do curso dar-se-á
25 quando da entrega da versão definitiva da tese na Secretaria do programa,
26 com as devidas correções sugeridas pela banca examinadora, no prazo de



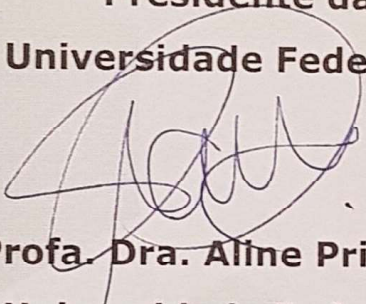
SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

27 trinta dias a contar da data da defesa. Cumpridas as formalidades de pauta, às
28 12 horas e 40 minutos, encerrou-se a sessão de defesa de tese e, para
29 constar, eu, Renato César Rodrigues, Assistente em Administração da
30 Universidade Federal de Goiás, lavrei a presente ata que, após lida e aprovada,
31 será assinada pelos membros da banca examinadora em três vias de igual
32 teor.

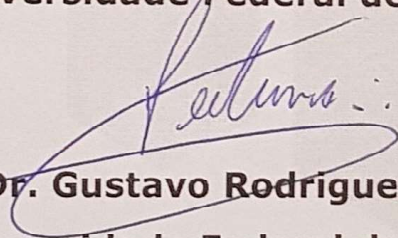
33
34 
Prof. Dr. Carlos Henrique de Castro

35 **Presidente da Banca**

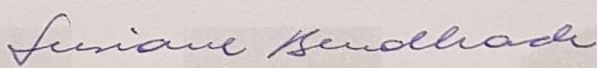
36 **Universidade Federal de Goiás**

37
38 
39 **Profa. Dra. Aline Priscila Pansani**

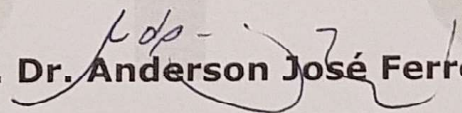
40 **Universidade Federal de Goiás**

41
42 
43 **Prof. Dr. Gustavo Rodrigues Pedrino**

44 **Universidade Federal de Goiás**

45
46 
47 **Prof. Dr. Lusiane Maria Bendhack**

48 **Universidade de São Paulo**

49
50
51 
52 **Prof. Dr. Anderson José Ferreira**

Universidade Federal de Minas Gerais

ALLANCER DIVINO DE CARVALHO NUNES

**EFEITOS DA ANGIOTENSINA-(1-7) E ANGIOTENSINA II NO
INOTROPISMO CARDÍACO E VASOMOTRICIDADE
CORONARIANA: UM COMPLEXO ENVOLVIMENTO ENTRE OS
RECEPTORES ANGIOTENSINÉRGICOS**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Henrique de Castro
Universidade Federal de Goiás

Profª Drª Aline Pansani
Universidade Federal de Goiás

Prof. Dr. Gustavo Rodrigues Pedrino
Universidade Federal de Goiás

Profª Drª Lusiane Maria Bendhack
Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Anderson José Ferreira
Universidade Federal de Minas de Gerais

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Sebastião e Gelma por toda força, compreensão e amor que me permitiram chegar a este momento tão especial. Está é mais uma oportunidade de expressar toda a minha gratidão por tudo o que representam em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador **Prof. Dr. Carlos Henrique de Castro**, pela orientação desse trabalho, pelo apoio, confiança, paciência, amizade e acima de tudo pelos ensinamentos. Obrigado por colaborar imensamente com meu amadurecimento pessoal e profissional. Você sempre será meu exemplo de profissionalismo.

Aos professores do Laboratório Integrado de Fisiopatologia Cardiovascular e Neurológica (LIFCaN), **Prof^a. Dr^a. Elizabeth Pereira Mendes**, **Prof. Dr. Diego Basile Colugnati** e **Prof^a. Dr^a. Aline Priscilla Pansani**, pelo incentivo, confiança, amizade, ensinamentos e principalmente por não medirem esforços para proporcionarem uma excelente formação a todos os alunos.

A todos os demais professores do Departamento de Ciências Fisiológicas do ICB-UFG, em especial ao **Prof. Dr. Gustavo Rodrigues Pedrino**, pela amizade e incentivo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Biológicas do ICB-UFG e ao **Prof. Dr. Paulo César Ghedini**, coordenador do curso de Pós-Graduação por toda dedicação à pós-graduação.

A todos os meus amigos e colegas do LIFCaN, pelo apoio, confiança, companheirismo, carinho e “diversão”. Muito obrigado pela excelente convivência no ambiente de trabalho. Em especial **Beatriz Pacheco**, **Karina Gomes**, **Aryanne Melo** (que é quase do LIFCaN) e **Érika Fernandes** pela grande amizade.

Ao **Prof. Nikolaos Stergiopoulos** do Laboratory of Hemodynamics and Cardiovascular Technology (LHTC) da École Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL) – Suíça, por gentilmente permitir e incentivar partes deste estudo em seu excelente laboratório.

Aos **Dr. Rodrigo Fraga-Silva** e **Dr. Augusto Martins Lima**, pela brilhante colaboração nos experimentos desenvolvidos no LHTC. Além disso,

agradeço a amizade, confiança, ajuda e companheirismo enquanto estive na Suíça.

A todos os meus amigos e colegas que conviveram comigo durante minha passagem pela Suíça. Obrigado pelos ensinamentos, paciência e companheirismo. Em especial **Katharina Holzhausen, Fabiana Fraga, Fabian Manke e Maia Bragina**

Aos ex-alunos do LIFCaN, que de alguma forma contribuíram neste trabalho, seja na convivência ou no conhecimento.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo financiamento do meu doutorado no Brasil e durante minha estadia na Suíça.

A todos os meus familiares e amigos, pela amizade, incentivo e momentos de descontração.

A meu querido irmão, **Diangellys**, por todo o amor, apoio, companheirismo e por sempre elevar minha autoestima e fazer meus dias mais felizes.

Aos meus pais **Sebastião e Gelma**, por fazer parte da minha vida, pelo grande apoio, amor, carinho e incentivo. Obrigado por tudo!

Á **Deus**, pelo dom da vida, por dar-me força, saúde, coragem e muita luz para percorrer essa longa caminhada. Ainda há muito por vir.

“Acho que a vida é um processo. É como subir uma montanha. Mesmo que não esteja tão forte fisicamente, a paisagem visualidade é melhor”.

Lya Luft

“Você não pode mudar o vento, mas pode ajustar as velas do barco para chegar onde quer”.

Confúcio

SUMÁRIO

| | | |
|---------|--|------|
| | Lista de Abreviaturas e Símbolos..... | XI |
| | Lista de Figuras..... | XIV |
| | Lista de Tabelas..... | XIX |
| | Resumo..... | XX |
| | Abstract..... | XXII |
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 24 |
| 1.1 | Função Cardíaca..... | 24 |
| 1.1.1 | Contratilidade Cardíaca..... | 24 |
| 1.1.2 | Regulação Intrínseca da Contratilidade Cardíaca..... | 27 |
| 1.1.2.1 | Frequência Cardíaca..... | 27 |
| 1.1.2.2 | Pré-Carga e Pós-Carga..... | 28 |
| 1.1.3 | Regulação Extrínseca da Contratilidade Cardíaca..... | 29 |
| 1.1.3.1 | Sistema Nervoso Autônomo..... | 29 |
| 1.1.3.2 | Fatores Humorais | 31 |
| 1.2 | Circulação Coronariana..... | 31 |
| 1.2.1 | Autorregulação e Fatores metabólicos de controle da vasomotricidade coronariana..... | 32 |
| 1.2.2 | Mecanismos Neuro-humorais de Controle da Vasomotricidade Coronariana..... | 33 |
| 1.3 | Sistema Renina Angiotensina..... | 33 |
| 1.3.1 | Efeitos Cardíacos da Ang II e Ang-(1-7)..... | 39 |
| 2 | OBETIVOS..... | 41 |
| 2.1 | Objetivo Geral..... | 41 |

| | | |
|-------|---|----|
| 2.2 | Objetivos Específicos..... | 41 |
| 3 | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 42 |
| 3.1 | Animais..... | 42 |
| 3.2 | Parâmetros cardiovasculares <i>in vivo</i> | 42 |
| 3.2.1 | Canulação Intraventricular Esquerda..... | 42 |
| 3.2.2 | Canulação de Veia e Artéria Femoral..... | 43 |
| 3.2.3 | Protocolo para Registro da Pressão Intraventricular e Pressão Arterial..... | 43 |
| 3.3 | Parâmetros Cardiovasculares <i>ex vivo</i> | 44 |
| 3.3.1 | Preparação dos Corações Isolados..... | 44 |
| 3.3.2 | Protocolo dos experimentos de Coração Isolado..... | 45 |
| 3.4 | Sistema de Cultura de Células..... | 47 |
| 3.4.1 | Linhagem Celular..... | 47 |
| 3.4.2 | Cultivo de Células Endoteliais..... | 47 |
| 3.4.3 | Protocolos Experimentais com Cultura de Células..... | 47 |
| 3.4.4 | Silenciamento Gênico..... | 48 |
| 3.5 | Western Blot..... | 48 |
| 3.6 | Análises Estatísticas..... | 49 |
| 4 | RESULTADOS..... | 51 |
| 4.1 | Efeito inotrópico da Ang-(1-7) e Ang II em ratos anestesiados..... | 51 |
| 4.2 | Efeitos da Ang-(1-7) e Ang II sobre a função cardíaca em corações isolados de ratos..... | 56 |
| 4.3 | Participação dos receptores angiotensinérgicos no efeito inotrópico negativo desencadeado pela Ang-(1-7)..... | 60 |

| | | |
|------|--|----|
| 4.4 | Participação do receptor de Alamandina, MrgD, no controle do inotropismo cardíaco..... | 64 |
| 4.5 | Influência do óxido nítrico no efeito inotrópico negativo desencadeado pela Ang-(1-7)..... | 66 |
| 4.6 | Participação das enzimas Adenilato Ciclase (AC) e Guanilato Ciclase (GC) no efeito inotrópico negativo desencadeado pela Ang-(1-7) | 68 |
| 4.7 | Participação dos receptores angiotensinérgicos no efeito inotrópico negativo desencadeado pela Ang II..... | 70 |
| 4.8 | Participação do receptor de Alamandina, MrgD, no controle do inotropismo cardíaco..... | 74 |
| 4.9 | Influência do óxido nítrico no efeito inotrópico negativo desencadeado pela Ang II..... | 76 |
| 4.10 | Participação das enzimas Adenilato Ciclase (AC) e Guanilato Ciclase (GC) no efeito inotrópico negativo desencadeado pela Ang II..... | 78 |
| 4.11 | Efeito inotrópico negativo desencadeado por ativação dos receptores MrgD e AT ₂ | 80 |
| 4.12 | Avaliação da frequência cardíaca em corações isolados de ratos perfundidos com Ang -(1-7) ou Ang II na presença de inibidores ou antagonistas..... | 83 |
| 4.13 | Efeitos da Ang II e Ang-(1-7) na vasomotricidade coronariana de corações isolados de ratos | 86 |
| 4.14 | Participação dos receptores angiotensinérgicos nos efeitos da Ang II e Ang-(1-7) na vasomotricidade coronariana de corações isolados de ratos..... | 86 |
| 4.15 | Participação do receptor MrgD na vasodilatação coronariana induzida por Ang-(1-7) e Ang II..... | 88 |
| 4.16 | Atuação da ECA2 na vasodilatação coronariana induzida por Ang II | 89 |

| | | |
|------|---|-----|
| 4.17 | Influência do NO e das enzimas AC e GC na vasodilatação coronariana induzida por Ang II e Ang-(1-7)..... | 89 |
| 4.18 | Efeitos Coronarianos da Alamandina e C21..... | 91 |
| 4.19 | Efeito do bloqueio farmacológico dos receptores AT1, AT2 e Mas na ativação da AKT induzida por Ang-(1-7)..... | 93 |
| 4.20 | Influência do silenciamento gênico do receptor AT1 e Mas na fosforilação de AKT induzida por Ang-(1-7)..... | 95 |
| 5 | DISCUSSÃO..... | 98 |
| 5.1 | Inotropismo negativo induzido por Ang-(1-7) e Ang II..... | 98 |
| 5.2 | Vasodilatação Coronariana induzida por Ang-(1-7) e Ang II..... | 105 |
| 6 | CONCLUSÃO..... | 110 |
| | REFERÊNCIAS..... | 112 |
| | ANEXO I..... | 122 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AC, Adenilato Ciclase.

ACh, Acetilcolina.

AMPC, Adenosina monofosfato cíclica.

Ang A, Angiotensina A.

Ang I, Angiotensina I.

Ang II, Angiotensina II.

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

AT1, Receptor do tipo 1 de Angiotensina II

AT2, Receptor do tipo 2 de Angiotensina II

ATP, Adenosina trifosfato.

B2, Receptor tipo 2 de Bradicinina.

C21, Composto 21.

Ca²⁺, Cálcio.

CaCl₂ · 2H₂O, Cloreto de cálcio dihidratado.

DMEM, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*.

dP/dt máxima, Velocidade de contração intraventricular.

dP/dt mínima, Velocidade de relaxamento intraventricular.

ECA, Enzima Conversora de Angiotensina.

ECA2, Enzima Conversora de Angiotensina 2.

EDHF, Fator hiperpolarizante derivado do endotélio.

eNOS, Enzima óxido nítrico sintase endotelial.

FBS, Soro Bovino Fetal.

FC, Frequência cardíaca.

GAPDH, Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

GC, Guanilato Ciclase.

G_i, Proteína G inibitória.

GMPc, Guanosina 3'5' – monofosfato cíclico.

G_s, Proteína G estimulatória.

I.p., Intraperitoneal.

K⁺, Potássio.

K_{ATP}, Canais de K⁺ sensíveis a ATP.

KCl, Cloreto de Potássio.

KH₂PO₄, Fosfato de potássio monobásico.

M₂, Receptor muscarínico tipo 2 de Acetilcolina.

MgSO₄. 7H₂O, Sulfato de magnésio heptahidratado.

MrgD, *Mas-related G-protein Coupled Receptor*.

Na⁺, Sódio.

NaCl, Cloreto de Sódio.

NaHCO₃, Bicarbonato de Sódio.

NEP, Endopeptidase neutra, neprilisina.

NO, Óxido Nítrico.

NOS, Óxido Nítrico Sintase.

OMS, Organização Mundial da Saúde.

PAM, Pressão Arterial Média.

PI3K α , Proteína PI3 quinase α .

PIS, Pressão Intraventricular Sistólica.

PKA, Proteína quinase A.

PKC, Proteína quinase C.

RNA, Ácido Ribonucléico.

RS, Retículo Sarcoplasmático.

RyR, Canais de rianodina.

siRNA, Silenciamento do RNA mensageiro

SERCA, Bomba Ca²⁺-ATPase.

SNA, Sistema Nervoso Autônomo.

SRA, Sistema Renina Angiotensina.

VAC_h-T, Transportador vesicular de Acetilcolina.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Ilustração do transiente de Ca^{2+} durante o acoplamento-excitação contração..... | 26 |
| Figura 2 – Resposta celular desencadeada pela estimulação simpática e parassimpática..... | 30 |
| Figura 3 – Ilustração esquemática do Sistema Renina-Angiotensina demonstrando as vias de formação dos peptídeos angiotensinérgicos e seus respectivos receptores..... | 35 |
| Figura 4 – Principais efeitos desencadeados pela ativação do receptor AT1 e AT2 de Ang II..... | 36 |
| Figura 5 – Principais efeitos desencadeados pela ativação do receptor Mas de Ang-(1-7)..... | 38 |
| Figura 6 – Esquema do protocolo experimental de registro dos parâmetros cardiovasculares em animal anestesiado..... | 43 |
| Figura 7 – Esquema do protocolo experimental de coração isolado..... | 45 |
| Figura 8 – Esquema do protocolo experimental de coração isolado utilizando Alamandina ou C21..... | 46 |
| Figura 9 – Efeitos da Ang-(1-7) na contratilidade cardíaca de ratos anestesiados. (A) Pressão Intraventricular Sistólica, (B) dP/dt Máxima, (C) dP/dt Mínima..... | 53 |
| Figura 10 – Efeitos da Ang-(1-7) na PAM e FC de ratos anestesiados. (A) Pressão Arterial Média, (B) Frequência Cardíaca..... | 54 |
| Figura 11 – Efeitos da Ang II na contratilidade cardíaca de ratos anestesiados. (A) Pressão Intraventricular Sistólica, (B) dP/dt | |

| | |
|---|----|
| Máxima, (C) dP/dt Mínima..... | 55 |
| Figura 12 – Efeitos da Ang II na PAM e FC de ratos anestesiados. (A) Pressão Arterial Média, (B) Frequência Cardíaca..... | 56 |
| Figura 13 – Efeitos da Ang II e Ang-(1-7) (20 pmol/L) na contratilidade de corações isolados de ratos. (A) Pressão Intraventricular Sistólica, (B) dP/dt Máxima, (C) dP/dt Mínima..... | 59 |
| Figura 14 – Efeitos da Ang-(1-7) na presença de A-779 na contratilidade cardíaca em corações isolados de ratos. (A) Pressão Intraventricular Sistólica, (B) dP/dt Máxima, (C) dP/dt Mínima..... | 61 |
| Figura 15 – Efeitos da Ang-(1-7) na presença de PD123319 na contratilidade cardíaca em corações isolados de ratos. (A) Pressão Intraventricular Sistólica, (B) dP/dt Máxima, (C) dP/dt Mínima..... | 62 |
| Figura 16 – Efeitos da Ang-(1-7) na presença de Losartan na contratilidade cardíaca em corações isolados de ratos. (A) Pressão Intraventricular Sistólica, (B) dP/dt Máxima, (C) dP/dt Mínima..... | 63 |
| Figura 17 - Efeitos da Ang-(1-7) na presença de D-PRO na contratilidade cardíaca em corações isolados de ratos. (A) Pressão Intraventricular Sistólica, (B) dP/dt Máxima, (C) dP/dt Mínima..... | 65 |
| Figura 18 - Efeitos da Ang-(1-7) na presença de L-Name na contratilidade cardíaca em corações isolados de ratos. (A) Pressão Intraventricular Sistólica, (B) dP/dt Máxima, (C) dP/dt Mínima..... | 67 |
| Figura 19 - Efeitos da Ang-(1-7) na presença de MDL 12,330A e ODQ na contratilidade cardíaca em corações isolados de ratos. | |

| | |
|---|----|
| (A e B) Pressão Intraventricular Sistólica, (C e D) dP/dt Máxima, (E e F) dP/dt Mínima..... | 69 |
| Figura 20 – Efeitos da Ang II na presença de Losartan na contratilidade cardíaca em corações isolados de ratos. (A) Pressão Intraventricular Sistólica, (B) dP/dt Máxima, (C) dP/dt Mínima..... | 71 |
| Figura 21 – Efeitos da Ang II na presença de PD123319 na contratilidade cardíaca em corações isolados de ratos. (A) Pressão Intraventricular Sistólica, (B) dP/dt Máxima, (C) dP/dt Mínima..... | 72 |
| Figura 22 – Efeitos da Ang II na presença de A-779 na contratilidade cardíaca em corações isolados de ratos. (A) Pressão Intraventricular Sistólica, (B) dP/dt Máxima, (C) dP/dt Mínima..... | 73 |
| Figura 23 – Efeitos da Ang II na presença de D-PRO na contratilidade cardíaca em corações isolados de ratos. (A) Pressão Intraventricular Sistólica, (B) dP/dt Máxima, (C) dP/dt Mínima..... | 75 |
| Figura 24 - Efeitos da Ang II na presença de L-Name na contratilidade cardíaca em corações isolados de ratos. (A) Pressão Intraventricular Sistólica, (B) dP/dt Máxima, (C) dP/dt Mínima..... | 77 |
| Figura 25 - Efeitos da Ang II na presença de MDL 12,330A e ODQ na contratilidade cardíaca em corações isolados de ratos. (A e B) Pressão Intraventricular Sistólica, (C e D) dP/dt Máxima, (E eF) dP/dt Mínima..... | 79 |
| Figura 26 – Efeitos da Alamandina na presença de D-PRO na contratilidade cardíaca em corações isolados de ratos. (A) Pressão Intraventricular Sistólica, (B) dP/dt Máxima, (C) dP/dt | |

| | |
|---|----|
| Mínima..... | 81 |
| Figura 27 – Efeitos do C21 na presença de PD123319 na contratilidade cardíaca em corações isolados de ratos. (A) Pressão Intraventricular Sistólica, (B) dP/dt Máxima, (C) dP/dt Mínima..... | 82 |
| Figura 28 - Efeitos da Ang-(1-7) e Ang II na Frequência Cardíaca de corações isolados de ratos..... | 83 |
| Figura 29 - Efeitos da Ang II e Ang-(1-7) na presença de Losartan (A e B), PD123319 (C e D) e A-779 (E e F) na Frequência Cardíaca de corações isolados de ratos..... | 84 |
| Figura 30 - Efeitos da Ang II e Ang-(1-7) na presença de L-Name (A e B), ODQ (C e D) e MDL 12,330A (E e F) na Frequência Cardíaca de corações isolados de ratos..... | 85 |
| Figura 31 - Efeitos da Ang-(1-7) e Ang II na vasomotricidade coronariana em corações isolados de ratos..... | 86 |
| Figura 32 - Efeitos da Ang-(1-7) e Ang II na presença de Losartan (A e B), PD123319 (C e D) e A-779 (E e F) na vasomotricidade coronariana de corações isolados de ratos..... | 87 |
| Figura 33 - Efeitos da Ang II (A) e Ang-(1-7) (B) na presença de D-PRO na vasomotricidade coronariana de corações isolados de ratos..... | 88 |
| Figura 34 – Efeito da Ang II na presença de DX600 na vasomotricidade coronariana de corações isolados de ratos..... | 89 |
| Figura 35 - Efeitos da Ang II e Ang-(1-7) na presença e ausência de L-Name (A e B), ODQ (C e D) e MDL 12,330A (E e F) na vasomotricidade coronariana de corações isolados de ratos..... | 90 |
| Figura 36 - Efeitos da Alamandina (A) e C21 (B) na ausência e presença de D-PRO e PD123319 respectivamente, na | |

| | |
|--|----|
| vasomotricidade coronariana de corações isolados de ratos..... | 91 |
| Figura 37 – Análise da expressão de AKT fosforilada (Fosfo-AKT) em células endoteliais humanas estimuladas com diferentes concentrações de Ang-(1-7) durante 10 minutos..... | 93 |
| Figura 38 – Análise da expressão de AKT fosforilada (Fosfo-AKT) em células endoteliais humanas estimuladas com Ang-(1-7) na presença ou ausência de Losartan ou PD123319 ou A-779 durante 10 minutos..... | 94 |
| Figura 39 – Análise da expressão de AKT fosforilada (Fosfo-AKT) em células endoteliais humanas estimuladas com diferentes concentrações de Ang II durante 10 minutos..... | 95 |
| Figura 40 - Silenciamento do RNA mensageiro dos (A) receptor AT1 e (B) receptor Mas..... | 96 |
| Figura 41 - Análise da expressão de AKT fosforilada (Fosfo-AKT) em células endoteliais humanas estimuladas com Ang-(1-7) na presença ou ausência do silenciamento do RNA mensageiro dos receptores (A) Mas e (B) AT1..... | 96 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Sequência de aminoácidos dos principais peptídeos do SRA..... | 39 |
| Tabela 2 – Solução de Krebs Ringer..... | 45 |
| Tabela 3 – Antagonistas e inibidores utilizados no estudo..... | 46 |
| Tabela 4 – Parâmetros basais em ratos anestesiados antes da infusão de Ang-(1-7)..... | 51 |
| Tabela 5 – Parâmetros basais em ratos anestesiados antes da infusão de Ang II..... | 52 |
| Tabela 6 – Parâmetros basais em corações isolados de ratos antes da perfusão com Ang-(1-7)..... | 57 |
| Tabela 7 - Parâmetros basais em corações isolados de ratos antes da perfusão com Ang II..... | 58 |
| Tabela 8 - Efeitos da Ang-(1-7) e Ang II na contratilidade cardíaca e vasomotricidade coronariana..... | 92 |

RESUMO

Embora a Angiotensina-(1-7) e Angiotensina II sejam considerados importantes peptídeos para regulação do sistema cardiovascular, seus efeitos sobre a contratilidade cardíaca ainda não estão totalmente elucidados. Diversos estudos, utilizando diferentes preparações, têm demonstrado que a Ang II e a Ang-(1-7) promovem efeito inotrópico positivo, negativo ou nenhum efeito inotrópico. Diante disso, o objetivo deste estudo foi ampliar os conhecimentos sobre os efeitos da Ang II e Ang-(1-7) no controle da contratilidade ventricular e função vascular coronariana. Além disso, avaliaremos o envolvimento dos receptores envolvidos nestes efeitos e os possíveis mecanismos de ação. Os efeitos *in vivo* da Ang-(1-7) e Ang II na contratilidade cardíaca foram avaliados em ratos anestesiados com uretana através da canulação intraventricular esquerda. A infusão de Ang-(1-7) 4 nmol/L e Ang II 40 nmol/L promoveram inotropismo negativo em corações de ratos anestesiados. Nenhum dos peptídeos foram capazes de alterar a pressão arterial e frequência cardíaca em ratos anestesiados. Os efeitos diretos da Ang-(1-7) e Ang II na contratilidade cardíaca foram avaliados em corações isolados de ratos. Após o período basal (30-40 minutos), os corações foram perfundidos durante 15 minutos com Ang-(1-7) ou Ang II na concentração de 20 pmol/L na presença ou ausência de antagonista do receptor Mas A-779 (2 nmol/L), antagonista do receptor AT₂ PD123319 (2 nmol/L), antagonista do receptor AT₁ Losartan (1 μ mol/L), antagonista do receptor MrgD D-PRO (2 nmol/L), inibidor da enzima ECA2 DX600 (2nmol/L), inibidor de Óxido nítrico sintase (NOS) L-Name (10 nmol/L), inibidor de Guanilato Ciclase (GC) ODQ (200 nmol/L) e inibidor de Adenilato Ciclase (AC) MDL 12,330A (1 μ mol/L). Concentrações picomolares de Ang-(1-7) e Ang II reduziram a pressão intraventricular sistólica (PIS). O A-779 não bloqueou os efeitos da Ang-(1-7) ou Ang II. PD123319 e Losartan inibiram somente o efeito inotrópico da Ang-(1-7). Por outro lado, D-PRO foi capaz de bloquear o efeito inotrópico de ambos os peptídeos angiotensinérgicos. Além disso, L-Name, ODQ e MDL 12,330A bloquearam apenas o efeito inotrópico da Ang-(1-7). Semelhantemente, baixas concentrações de Ang-(1-7) e Ang II induziram vasodilatação coronariana. O A-

779, D-PRO, L-Name, MDL 12,330A bloquearam a vasodilatação induzida por Ang-(1-7) e Ang II. O DX600 bloqueou a vasodilatação coronariana induzida por Ang II. PD 123319, Losartan e ODQ inibiram apenas a vasodilatação coronariana induzida por Ang-(1-7). Além disso, o bloqueio farmacológico e o silenciamento gênico do receptor AT1 em células endoteliais humanas estimuladas com Ang-(1-7) reduziram a fosforilação de AKT promovida por este peptídeo. Esses resultados demonstram que Ang-(1-7) e Ang II, em concentrações picomolares induzem significativo e similar efeito inotrópico negativo e vasodilatação coronariana, envolvendo complexos mecanismos de interação entre os receptores.

Palavras-Chave: Angiotensina-(1-7), Angiotensina II, Contratilidade Cardíaca, Vasomotricidade Coronariana, Receptores Angiotensinérgicos.

ABSTRACT

Despite Angiotensin-(1-7) [Ang-(1-7)] and Angiotensin II (Ang II) be considered important regulators of the cardiovascular system, its direct effects on cardiac contractility remain unclear and even controversial. Several studies, using different preparations, have showed that Ang-(1-7) or Ang II produce positive, negative or no inotropic effects. Thus, the aim of this study was to increase the knowledge about the effect of the low concentration of Ang-(1-7) and Ang II on cardiac contractility, coronary vascular function and the possible receptors and mechanisms of action involved in these effects. The *in vivo* effects of Ang-(1-7) and Ang II on cardiac contractility were evaluated in anesthetized rats. The Ang-(1-7) 4 nmol/L and Ang II 40 nmol/L caused negative inotropism in anesthetized rats. None of the peptides were able to change heart rate or arterial blood pressure in anesthetized rats. The direct effects of the Ang-(1-7) and Ang II on cardiac contractility were evaluated in isolated perfused rat hearts. After a basal period (30-40 minutes), the hearts were perfused for an additional 15 min with Ang-(1-7) and Ang II (20 pmol/L) in presence or absence of Mas receptor antagonist A-779 (2 nmol/L), AT₂ receptor antagonist PD1233190 (2 nmol/L), AT₁ receptor antagonist Losartan (1µmol/L), MrgD receptor antagonist D-PRO (2 nmol/L), ACE2 inhibitor DX600 (2nmol/L), Nitric Oxide synthase (NOS) inhibitor L-Name (10 nmol/L), Guanylyl cyclase (GC) inhibitor ODQ (200 nmol/L) and Adenylyl cyclase (AC) inhibitor MDL 12,330A (1µmol/L). Low concentrations of Ang-(1-7) and Ang II reduced the left ventricular end-systolic pressure (LVESP). The A-779 did not blocked the effect of Ang-(1-7) or Ang II. PD123319 and Losartan inhibited the Ang-(1-7) but not Ang II-induced negative inotropic effects. On the other hand, D-PRO was able to block the negative inotropic effect of the Ang II and Ang-(1-7). Furthermore, L-Name, ODQ and MDL 12,330A inhibited the Ang-(1-7) but not Ang II-induced negative inotropic effects. Similarly, low concentrations of Ang-(1-7) and Ang II-induced coronary vasodilatation. The A-779, D-PRO, L-Name, MDL 12,330A blocked the effect of Ang-(1-7) or Ang II. The DX600 blocked the vasodilatation induced by Ang II. PD123319, Losartan and ODQ inhibited the Ang-(1-7) but not Ang II-induced coronary vasodilatation. In addition, the

pharmacological blocked and gene silencing of AT1 receptor in endothelial human cells stimulated with Ang-(1-7) decreased AKT phosphorylation induced by Ang-(1-7). These data demonstrate that Ang-(1-7) and Ang II, at picomolar concentrations, induce significant and similar negative inotropic and coronary vasodilatation effects involving complex interaction mechanisms between many different receptors, altering intracellular signaling and their constitutive activity.

Keywords: Angiotensin-(1-7), Angiotensin II, Cardiac Contractility, Coronary Vasomotricity.

1. INTRODUÇÃO

O coração é o órgão central do sistema cardiovascular. Formado principalmente por células musculares contráteis denominadas miócitos ou cardiomiócitos, esse órgão é o grande responsável por manter o fluxo sanguíneo para as mais variadas células do corpo humano. Para que sua tarefa seja realizada de forma eficaz é necessária uma complexa e organizada rede de controle da função cardíaca. Para isso, esse órgão conta com importantes propriedades cardíacas como, automatismo, condutividade, excitabilidade e contratilidade, o que o tornam um órgão singular e fundamental para o funcionamento de todos os tecidos do corpo (1).

Alterações nos mecanismos contráteis estão diretamente relacionadas a diversas patologias cardiovasculares como a hipertensão arterial, infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), as doenças cardiovasculares são responsáveis por 17 milhões ou 30% das mortes no mundo (2). Levantamento realizado em 2013 no Brasil pelo Ministério da Saúde apontou que as doenças cardiovasculares foram às principais causas de morte entre homens e mulheres em todas as regiões do país (2).

Parte das estratégias adotadas hoje na prática clínica para o tratamento de doenças cardiovasculares envolve a utilização de drogas atuantes sobre o Sistema Renina Angiotensina (SRA) (3). Neste contexto, a elucidação dos complexos efeitos da Angiotensina II (Ang II) e Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)], os principais peptídeos biologicamente ativos deste sistema, sobre a função cardíaca e vasomotricidade coronariana pode colaborar para um melhor entendimento de mecanismos fisiopatológicos de algumas disfunções cardíacas e consequentemente auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

1.1. Função Cardíaca

1.1.1. Contratilidade Cardíaca

Em corações normais, a contração do músculo cardíaco é produzida através do acoplamento excitação contração, envolvendo a interação de numerosas proteínas celulares produzindo alterações na homeostasia do íon Cálcio (Ca^{2+}) (4). O evento contrátil do coração inicia-se com a despolarização da membrana, que

ocorre por estímulo elétrico ou químico, desencadeando alterações conformacionais que abrem os canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem, possibilitando assim que o Ca^{2+} se difunda rapidamente para o meio intracelular do cardiomiócito (5). Esse influxo de Ca^{2+} , principalmente através dos canais de Ca^{2+} do tipo L na superfície da membrana, ativa os canais de rianodina (RyR) presentes na membrana do retículo sarcoplasmático (RS) promovendo uma liberação maciça de Ca^{2+} para o citosol a partir do RS (5,6). Esse mecanismo foi identificado e ficou conhecido como liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} .

A principal função do RS é sequestrar e liberar o Ca^{2+} para o citoplasma. As extremidades do RS se localizam próximas aos túbulos T, o que permite uma simultânea ativação dos canais de Ca^{2+} localizados na superfície e em regiões mais profundas das células. Essa organização possibilita uma distribuição regular de íons Ca^{2+} no citoplasma do miócito cardíaco (7). A Figura 1 ilustra o transiente de Ca^{2+} durante o acoplamento excitação-contração.

Para que a contração do miocárdio ocorra é necessário que haja uma interação entre as proteínas contráteis, representadas pelos filamentos finos de actina e filamentos grossos de miosina, proteínas regulatórias, como troponina e tropomiosina, e os íons Ca^{2+} (8). Em repouso, a proteína tropomiosina, bloqueia os sítios de interação entre a actina e a miosina, quando as moléculas de miosina encontram-se energizadas com ATP, ou seja, preparadas para a interação com a miosina (9). Com o aumento do Ca^{2+} intracelular, ocorre a ligação desse íon a outra proteína, a troponina C, promovendo alterações conformacionais no complexo troponina-tropomiosina, permitindo que a tropomiosina exponha os sítios de ligação da miosina nos filamentos de actina, gerando a contração da célula muscular cardíaca (9).

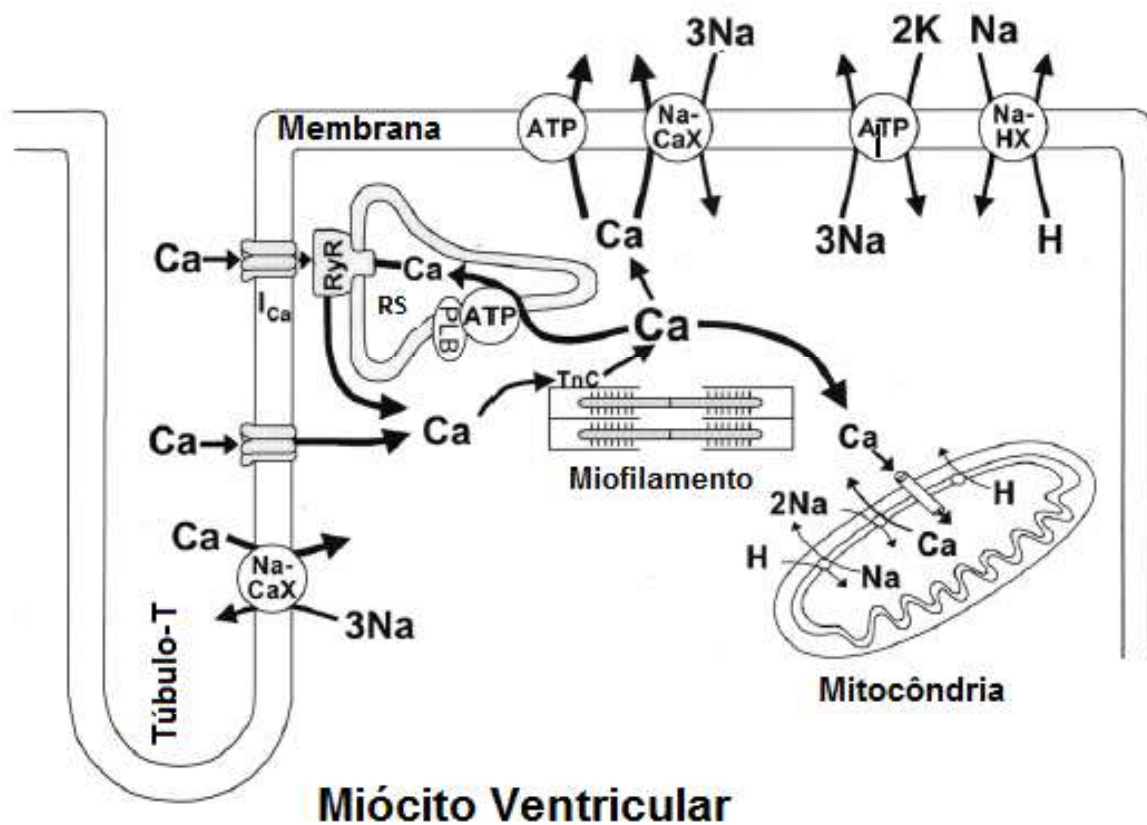


Figura 1 - Ilustração do transiente de Ca^{2+} durante o acoplamento-excitação contração. A despolarização da membrana plasmática da célula cardíaca promove alterações conformacionais dos canais de cálcio (Ca^{2+}) do tipo L, aumentando o influxo desse íon para o meio intracelular. Essa entrada de Ca^{2+} ativa a liberação de mais Ca^{2+} pelo Reticulo Sarcoplasmático (RS) através dos receptores de Rianodina (RyR) presentes na membrana do RS, aumentando ainda mais a concentração de Ca^{2+} intracelular. A redução da concentração intracelular de Ca^{2+} ocorre através dos trocadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ presentes na membrana da célula (Na-CaX) e pela recaptação de Ca^{2+} para dentro do RS. PLB fosfolambam; TnC Troponina C [Adaptado de BERS DM, 2000 (6)].

Durante o relaxamento muscular, dois principais mecanismos estão envolvidos na remoção de Ca^{2+} no citoplasma do miócito cardíaco. O Ca^{2+} é bombeado de volta ao RS através da bomba Ca^{2+} - ATPase, denominada SERCA (*sarcoendoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase*). A atividade da SERCA é regulada principalmente pela fosfolambam, uma proteína presente na membrana do RS que, enquanto desfosforilada, inibe a atividade da SERCA e consequentemente, a recaptação de Ca^{2+} para o RS é interrompida (9). Além disso, parte do Ca^{2+} é removida do citosol através do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ que transporta três íons Na^+ para o meio intracelular em troca de um íon Ca^{2+} para o meio extracelular, gerando um gradiente eletro-químico(4). Esses dois mecanismos contribuem em 70% e 25% respectivamente, para o relaxamento cardíaco(10). Porém, a participação da SERCA

na recaptação de Ca^{2+} é em torno de 92% em roedores. Assim, a concentração de Ca^{2+} sarcoplasmático pode ser considerada um dos principais determinantes da força de contração cardíaca (inotropismo) (8).

Para avaliar possíveis fatores modificadores do inotropismo cardíaco, alguns parâmetros ventriculares como, pressão intraventricular sistólica e suas derivadas, dP/dt máxima e mínima são comumente utilizados, inclusive em preparações de corações isolados.(11,12).

Esses parâmetros ventriculares são influenciados por mecanismos intrínsecos e/ou extrínsecos. Dentre os mecanismos intrínsecos, destaca-se a frequência cardíaca, pré-carga e pós-carga(13). Já os mecanismos extrínsecos são mediados pelo sistema nervoso autônomo (SNA) e por fatores humorais (7,13).

1.1.2. Regulação Intrínseca da Contratilidade Cardíaca

1.1.2.1. Frequência Cardíaca

Descrito por Bowditch em 1871, a frequência cardíaca (FC) é capaz de afetar a contratilidade do coração, efeito esse, mais conhecido como efeito Bowditch ou efeito Treppe (14). De acordo com essa teoria, em muitas espécies de mamíferos o aumento da FC promove um aumento da força de contração cardíaca ou inotropismo positivo. Numerosos estudos vêm tentando elucidar os mecanismos celulares envolvidos nessa resposta. Acredita-se que esse inotropismo positivo provocado pelo aumento da FC ocorre devido ao aumento na concentração dos íons Ca^{2+} no citoplasma, provocado pela entrada de Ca^{2+} a cada batimento cardíaco (4), via canais de Ca^{2+} do tipo L (15) e aumento da captação de Ca^{2+} pela SERCA de volta ao RS.

Atualmente, essa afirmação tem-se tornado controversa em corações de ratos, camundongos ou outros mamíferos com altas FC fisiológicas (13). Diversos estudos têm demonstrado que em FC abaixo dos níveis fisiológicos induz aumento (16,17), diminuição (18) ou nenhum efeito sobre a contratilidade cardíaca (19). Além disso, em FC elevadas ocorre uma redução da força de contração ou inotropismo negativo, provavelmente induzido por complexos mecanismos celulares, como redução da oxigenação na fibra muscular cardíaca, alteração na afinidade de proteínas contráteis ao Ca^{2+} e alteração no PH intracelular (20–23).

1.1.2.2. Pré-Carga e Pós-Carga

A relação entre o estiramento das fibras cardíacas e a força de contração desenvolvida, é uma questão central no estudo da contratilidade cardíaca, visto que, a força máxima desenvolvida pelo coração durante uma contração é determinada pelo grau de sobreposição dos filamentos de miosina e filamentos de actina.

Conceituando, a pré-carga está relacionada ao grau de estiramento que fibras contráteis do ventrículo esquerdo são submetidas antes da contração (24). Inicialmente demonstrado pelos fisiologistas Otto Frank e Ernest Starling no final do século 19 e início do século 20, uma propriedade intrínseca dos cardiomiócitos é que a força de contração depende do comprimento ao qual elas são estiradas (24–26), ou seja, quanto maior a distensão das fibras ventriculares (dentro de certos limites), maior a força de contração. Em reconhecimento ao trabalho dos dois pesquisadores, essa relação é denominada de Mecanismo de Frank-Starling. A pré-carga depende em grande parte do enchimento ventricular. No entanto, estiramentos adicionais das fibras musculares cardíacas, reduzem o volume sanguíneo ejetado pelo ventrículo esquerdo (24). Além disso, as mudanças transitórias na pré-carga ventricular esquerda podem provocar respostas reflexas do Sistema nervoso autônomo (SNA) influenciando a contratilidade através da FC (13).

Além da pré-carga, a pós-carga (ou carga pressórica contra a qual o ventrículo deve atuar para ejetar o sangue durante a contração) também pode desenvolver alterações no inotropismo cardíaco. A pós-carga é largamente dependente da pressão arterial e do tônus vascular (24). Assim, em situações de aumento de resistência vascular, a força de contração cardíaca também é aumentada. Esse inotropismo positivo causado pelo aumento da pós-carga é conhecido como efeito Anrep (27). Adicionalmente, um aumento de pressão de perfusão coronariana leva a aumento do volume microvascular, essa alteração promove a abertura de canais iônicos sensíveis a estiramento, resultando em um aumento da concentração de Ca^{2+} citoplasmático aumentando a contratilidade cardíaca, esse efeito independente de pós-carga é conhecido como efeito Gregg (28,29).

1.1.3. Regulação Extrínseca da Contratilidade Cardíaca

1.1.3.1. Sistema Nervoso Autônomo

O SNA Simpático e Parassimpático é o componente do sistema nervoso periférico que controla a contração muscular, a atividade visceral e a função das diversas glândulas do corpo humano (30). Especificamente no coração, o sistema nervoso simpático aumenta a FC e a contratilidade do miocárdio, ao contrário do sistema nervoso parassimpático, que reduz esses parâmetros (30,31).

A estimulação simpática no coração aumenta a força de contração das fibras cardíacas, ou seja, promove efeito inotrópico positivo. Esse efeito pode ser explicado, devido ao aumento da interação entre os filamentos contráteis de actina e miosina e também devido ao aumento na concentração de Ca^{2+} intracelular. No coração, a norepinefrina liberada pelos neurônios pós-ganglionares simpáticos, ou as catecolaminas circulantes ativam os receptores $\beta 1$ adrenérgicos, acoplados a proteína G estimulatória (Gs), fazendo com que a subunidade αs dessa proteína se dissocie ativando a enzima adenilato ciclase (AC). Essa ativação é responsável por catalizar a conversão de ATP em adenosina monofosfato cíclica (AMPC) (30,31). Esse segundo mensageiro pode ativar inúmeras outras vias de sinalização, canais iônicos e enzimas. Entretanto, no sistema cardiovascular o AMPC é responsável pela ativação da proteína quinase A (PKA) (30,31). No cardiomiócito, a PKA é responsável por fosforilar uma série de proteínas que podem alterar de alguma forma a contratilidade cardíaca. Essa proteína quinase fosforila os canais de Ca^{2+} do tipo L, aumentando o influxo de Ca^{2+} para o meio intracelular do cardiomiócito (30,31). A PKA também aumenta a fosforilação da fosfolambam, aumentando a recaptação de Ca^{2+} pela SERCA, e a fosforilação da troponina I, reduzindo a sensibilidade das proteínas contráteis ao Ca^{2+} (30,31).

Ao contrário do observado durante uma estimulação simpática, o aumento da estimulação parassimpática diminui a FC. No entanto em situações onde a estimulação simpática é baixa, a contratilidade cardíaca não é afetada pela atividade parassimpática, porém em situação de aumento da estimulação simpática a atividade parassimpática pode reduzir a contratilidade cardíaca (31). Essa redução inicia-se com a ligação de Acetilcolina (ACh) aos receptores muscarínicos, principalmente o subtipo M2, levando a uma mudança conformacional na

subunidade inibitória da proteína G (G_i) que através da dissociação da subunidade α_i inibe a AC. Essa inibição leva a redução da formação de AMPc, inibindo a ativação da PKA, reduzindo o influxo de Ca^{2+} para o citoplasma, levando assim a redução da força de contração (30,31). Além disso, em células do sistema nodal do coração, a ativação do receptor M2 estimula a subunidade Gk da proteína G, causando aumento do efluxo de K^+ via canais de K^+ independente da sinalização de segundos mensageiros intracelulares (31). A sinalização intracelular desencadeada pela estimulação simpática e parassimpática encontra-se ilustrada da figura 2.

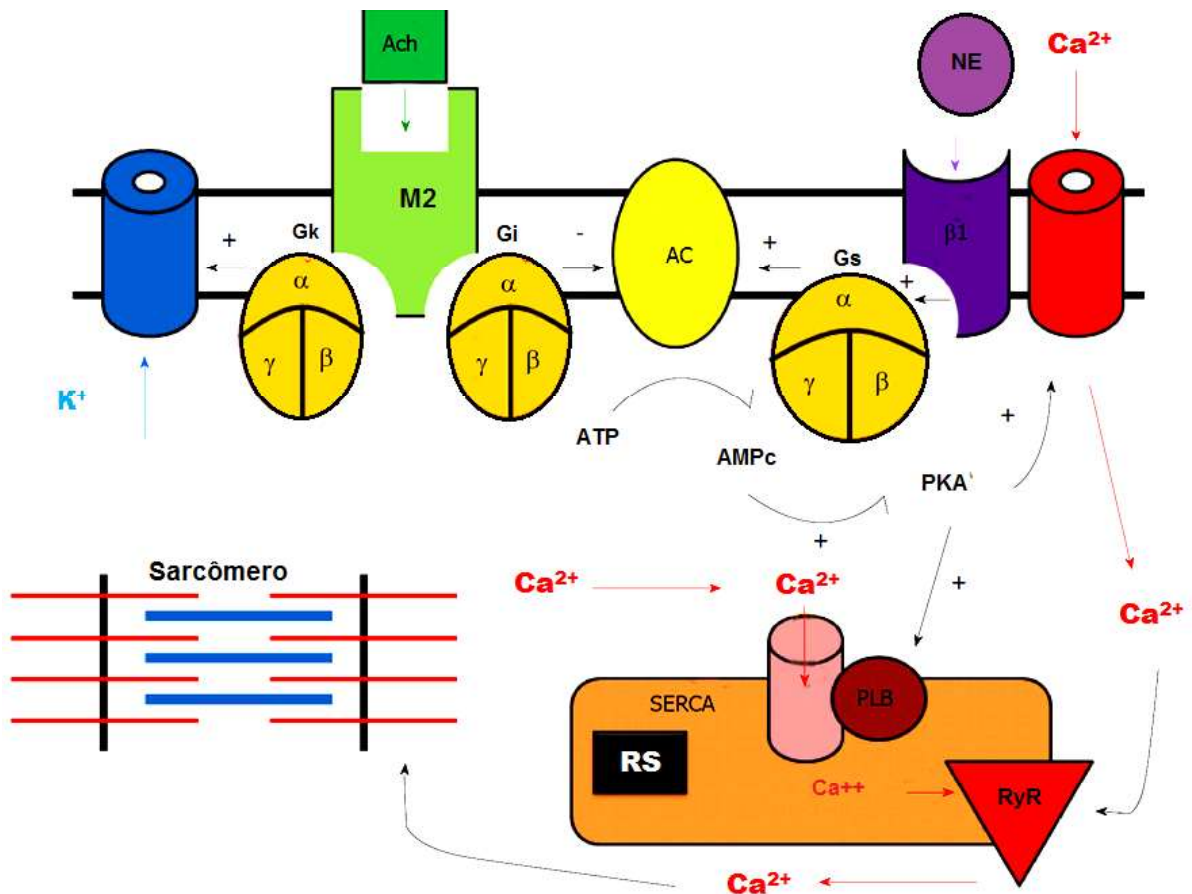


Figura 2 - Resposta celular desencadeada pela estimulação simpática e parassimpática. Ao se ligar ao receptor β -adrenérgico (β_1) a norepinefrina (NE), ativa proteína G estimulatória (G_s) que ativa a enzima adenilato ciclase (AC) aumentando os níveis de AMPc, que por sua vez, ativa a proteína quinase A (PKA), aumentando o influxo de Ca^{2+} através dos canais de Ca^{2+} do tipo L e aumenta a recaptção de Ca^{2+} por aumenta a atividade da SERCA. Diferentemente, a estimulação parassimpática com Acetilcolina (ACh) via receptores muscarínicos do tipo 2 (M2) ativa a proteína G inibitória (G_i) que inibe AC, consequente, reduzindo a concentração intracelular de Ca^{2+} . Além disso, a proteína Gk ativa os canais de K^+ sensíveis a ATP, colaborando ainda mais para o relaxamento das fibras do miocárdio. PLB fosfolamban; RyR canais de rianodina; RS retículo sarcoplasmático [Adaptado de GORDAN et al., 2015 (30)].

1.1.3.2. Fatores Humorais

A função contrátil do coração também pode ser influenciada pela ação de diversos hormônios endócrinos. Esses hormônios são liberados pelas glândulas, adrenal, tireóide e pituitária, células justaglomerulares presentes no rim e através do próprio coração (30). A influência humoral no desempenho cardíaco pode ocorrer por meio de ação direta dos hormônios sobre as células cardíacas ou através de respostas secundárias, via SNA ou alterações na vasomotricidade arterial e venosa levando a alterações na pré e pós-carga (30).

A epinefrina, produzida nas células cromafins da medula adrenal da glândula adrenal influencia a contratilidade cardíaca através de sua ação sobre os receptores β -adrenérgicos (30). Já a endotelina, um potente vasoconstritor, pode afetar a contratilidade cardíaca através de suas ações vasculares (31), assim como a vasopressina, que além de ações vasculares pode influenciar a contratilidade cardíaca por sua atividade hidroeletrólítica (30). Na classe dos hormônios produzidos pelo coração, o peptídeo atrial natriurético liberado por miócitos atriais e o peptídeo cerebral natriurético produzido por miócitos ventriculares, possuem ação cardioprotetora (33). Além disso, o peptídeo atrial natriurético potencializa o inotropismo positivo desencadeado por estimulação adrenérgica (34).

Alguns estudos têm sugerido que alguns peptídeos biologicamente ativos do Sistema Renina Angiotensina (SRA), como a Ang II (35) e Ang-(1-7) (36), podem induzir alterações fisiológicas significativas sobre a contratilidade cardíaca.

1.2. Circulação Coronariana

A circulação coronariana é um sistema de ramificações vasculares, dividido em artérias e veias epicárdicas e vasos intramiocárdicos (28). Uma adequada perfusão coronariana é fundamental para o bom funcionamento cardíaco. Essa perfusão pode ser regulada através de mecanismos neuro-humorais ou principalmente, pelo mecanismo de autorregulação (28).

1.2.1. Autorregulação e Fatores metabólicos de controle da vasomotricidade coronariana

A vasomotricidade coronariana é fortemente determinada pelo mecanismo de autorregulação. A autorregulação é a capacidade de um órgão em regular seu fluxo sanguíneo quando a pressão de perfusão é alterada, não incluindo a influência neuro-humoral (28,37,38). O músculo cardíaco possui um importante papel na autorregulação, pois o fluxo sanguíneo coronariano se ajusta ao metabolismo do músculo cardíaco (37,39), ou seja, em situações onde a demanda por nutrientes e oxigênio é maior, o fluxo sanguíneo coronariano também será maior. Esse rápido controle do fluxo coronariano, ocorre por alterações no diâmetro das arteríolas coronarianas, principais vasos responsáveis pela resistência vascular (38,40). Essas alterações no diâmetro dos vasos ocorrem, em parte, por consequência de fatores dependentes do endotélio vascular, do controle metabólico, e do músculo cardíaco (28).

O principal mediador metabólico liberado pelo endotélio vascular capaz de alterar a vasomotricidade coronariana é o óxido nítrico (NO) (28). O NO quando difundido para o músculo liso vascular desencadeia respostas intracelulares que levarão a vasodilatação coronariana. Além do NO, outros agentes vasodilatadores podem ser liberados pelo endotélio coronariano, como por exemplo, a prostaciclina e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF, *endothelium-derived hyperpolarizing factor*) (41). Por outro lado, o endotélio também é capaz de produzir e liberar mediadores vasoconstritores, tais como endotelina e espécies reativas de oxigênio (41).

Além da resposta endotelial, o controle metabólico pode influenciar a vasomotricidade coronariana (28,41). Em situações de aumento da demanda metabólica pelo músculo cardíaco, agentes como adenosina, redução da pressão parcial de oxigênio, aumento da pressão parcial de dióxido de carbono com consequentemente redução do pH e abertura dos canais de K^+ sensíveis a ATP (K_{ATP}) são produzidos e liberados pelo próprio músculo no intuito de aumentar o fluxo sanguíneo local (42,43). Sumarizando, quanto maior a demanda metabólica tecidual maior o fluxo sanguíneo local.

1.2.2. Mecanismos Neuro-humorais de controle da vasomotricidade coronariana.

Diversos estudos têm relatado a participação do SNA na regulação do tônus vascular coronariano. No geral as catecolaminas podem exercer efeito vasoconstritor ao ativar receptores α -adrenérgicos ou vasodilatador ativando receptores β -adrenérgicos (44). No entanto, a presença de receptores α -adrenérgicos em coronárias é dependente da espécie estudada. A presença de receptores α -adrenérgicos no leito coronariano foi demonstrada em cães (45) e humanos com cardiopatia (46,47). Já a expressão de β -adrenoceptores é similar em todas as espécies, com presença dos receptores β 1-adrenérgicos na musculatura lisa e receptores β 2-adrenérgicos nas células endoteliais dos vasos coronarianos (48). Além disso, estudos relatam que o receptor β 2-adrenérgico é predominantemente expresso em pequenas artérias e arteríolas coronarianas (49).

O sistema nervoso parassimpático pode influenciar a vasomotricidade coronariana através da liberação do neurotransmissor ACh. A ACh, que atuando sobre os receptores muscarínicos promove, na maioria dos leitos e das espécies, vasodilatação através de mecanismos dependente do endotélio (41) e da liberação de NO (50,51). No entanto, o efeito da ACh sobre receptores muscarínicos coronarianos é dependente da espécie observada. Estudos demonstraram que a ACh promove vasodilatação em coronária de cães (50,51), ao passo que esse mesmo neurotransmissor promove vasoconstrição em coronárias de porcos (44).

Além da participação de neurotransmissores simpáticos e parassimpáticos, diversos estudos têm demonstrado importantes efeitos de peptídeos do SRA no controle da vasomotricidade coronariana. Os efeitos contráteis e coronarianos de peptídeos do SRA estão descritos em detalhes a seguir.

1.3. Sistema Renina Angiotensina

O SRA é um dos principais reguladores fisiológicos da pressão arterial e do equilíbrio hidroeletrólítico (52). Além disso, este sistema está envolvido na fisiopatologia de inúmeras doenças cardiovasculares, incluindo a hipertensão

arterial, aterosclerose, infarto do miocárdio, hipertrofia e insuficiência cardíaca e síndrome metabólica (53,54).

Os primeiros estudos relacionados ao SRA ocorreram no final do século XIX, mais precisamente no ano de 1898, quando o fisiologista Robert Tigerstedt e seu estudante Per Bergman demonstraram que a pressão arterial era lentamente aumentada em coelhos anestesiados submetidos à infusão de extratos de rim. A responsabilidade por esse efeito foi atribuída a uma aspartil protease, a qual os autores chamaram de renina (55).

Apesar da descoberta da renina ter sido no final do século XIX, somente em 1956 foi descoberto que o produto da ação da renina era um decapeptídeo, ao qual denominaram de Angiotensina (Ang)I. Posteriormente, foi observado que a substância ativa era o octapeptídeo, denominado Angiotensina II (56). No entanto, somente nos anos 80 e 90, estudos iniciaram os relatos sobre os possíveis receptores de Ang II e seus antagonistas (57,58).

A principal via ativadora do SRA se dá pela redução da perfusão renal e secreção de renina pelas células justaglomerulares. A renina cliva o angiotensinogênio, uma α -globulina secretada principalmente pelo fígado, formando a Ang I. Esta é convertida em Ang II, principalmente pela enzima conversora de angiotensina (ECA), expressa em abundância no endotélio vascular dos pulmões (3). A Ang II também pode ser formada a partir da ação de outras enzimas, como a quimase e a catepsina A sobre a Ang I ou diretamente pela ação das enzimas tonina e Catepsina G sobre o angiotensinogênio (59,60). A formação de Ang II, através de outras peptidases, vem sendo referida na literatura como vias alternativas de geração de Ang II (Figura 3).

A Ang II desencadeia múltiplas ações fisiológicas através da ativação de dois subtipos de receptores, o receptor do tipo 1 (AT1) e do tipo 2 (AT2) (54,61). Ambos os receptores possuem sete domínios transmembrana pertencentes à superfamília de receptores acoplados a proteína G e aproximadamente 34% de homologia em suas sequências peptídicas (61,62).

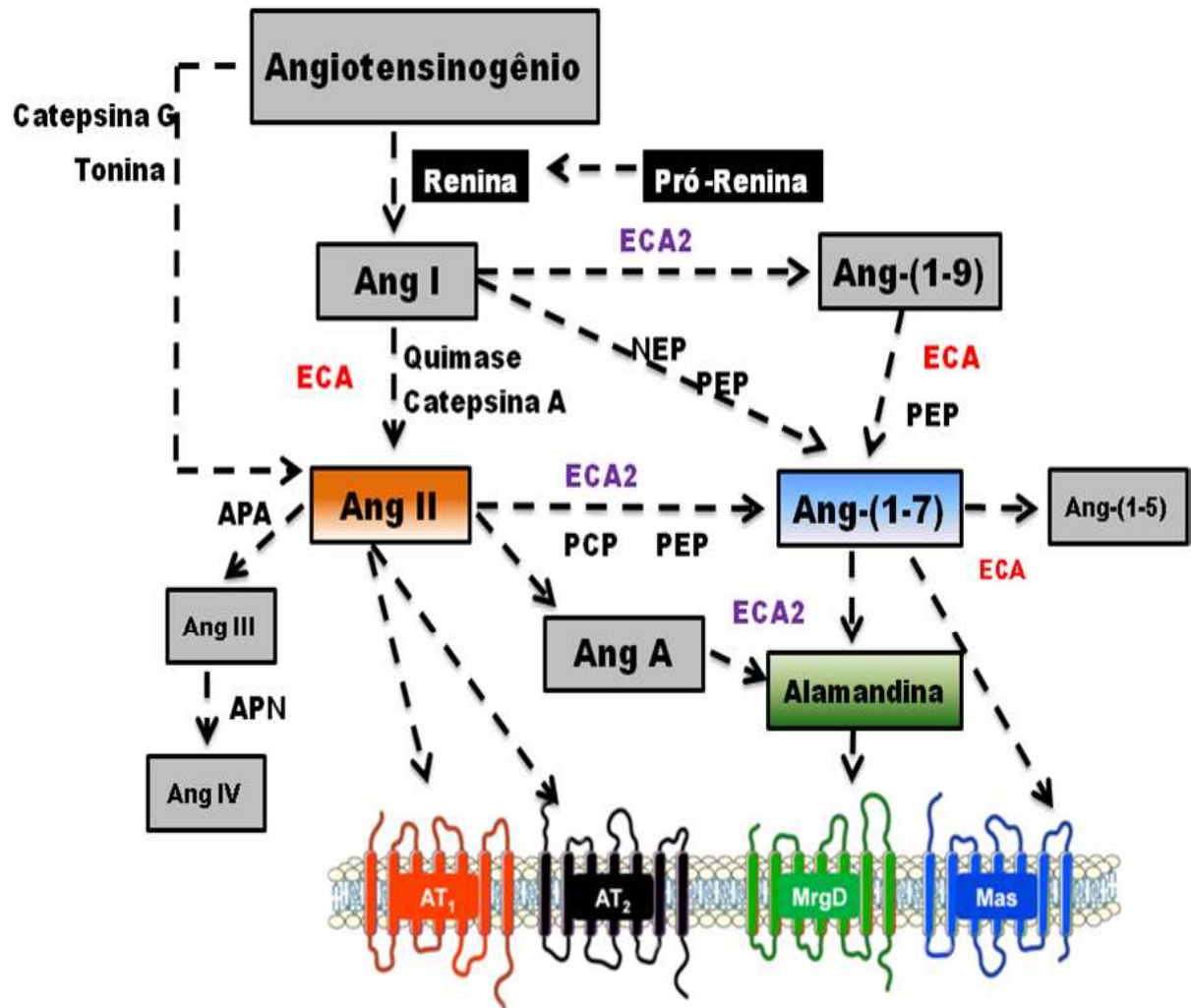


Figura 3 - Ilustração esquemática do Sistema Renina-Angiotensina demonstrando as vias de formação dos peptídeos angiotensinérgicos e seus respectivos receptores. ECA, Enzima Conversora de Angiotensina; ECA2 Enzima Conversora de Angiotensina 2; NEP, Endopeptidase Neutra; PCP, Prolil-carboxipeptidase; PEP, Prolilendopeptidase; APA, Aminopeptidase A; APN, Aminopeptidase N; PCP, Prolilcarboxipeptidase. [Adaptado de SANTOS, RA, 2014(63), LAUTNER et al., 2013 (64), FERREIRA et al., 2012 (65)].

O receptor AT1 é expresso em diferentes células, como por exemplo, em células endoteliais e cardiomiócitos (3,66). A ativação deste receptor é de fundamental importância para a regulação da pressão arterial e homeostasia dos fluidos corporais, promovendo ações vasoconstritoras, proliferação celular, a síntese e secreção de aldosterona e a reabsorção tubular de sódio, dentre outras (67) (Figura 4). No entanto, a ativação excessiva e prolongada deste receptor pode levar ao desenvolvimento de patologias como, a hipertensão arterial, nefropatia diabética e arritmias cardíacas (68–70).

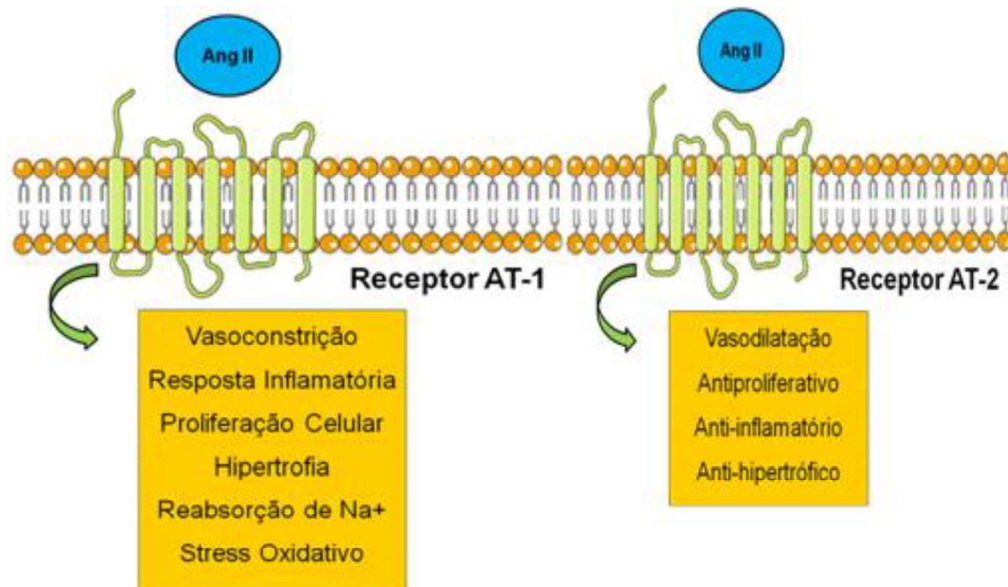


Figura 4 - Principais efeitos desencadeados pela ativação do receptor AT-1 e AT2 de Ang II.

O receptor AT2 é altamente expresso em tecidos mesenquimais fetais, tendo importante participação na diferenciação celular e no desenvolvimento de órgãos. Após o nascimento, ocorre um significativo declínio da expressão deste receptor (71,72). Em tecidos adultos existe uma baixa expressão de receptor AT2 no coração, vasos coronarianos, rins, cérebro, tecidos reprodutivos e na glândula adrenal (73,74). Suas ações fisiológicas ainda não foram totalmente esclarecidas, entretanto já se sabe que a ativação deste receptor promove, dentre outros efeitos, vasodilatação, ação antiproliferativa, anti-inflamatória e anti-hipertrofica (3,75) (Figura 4).

Esse conceito endócrino do SRA, o qual é dependente da existência do hormônio circulante para produzir seus efeitos fisiológicos, tem sido continuamente modificado nos últimos anos. Hoje já se sabe da existência de um SRA local caracterizado pela presença e síntese de seus componentes em diversos tecidos, dentre eles, o coração, rins, cérebro, pâncreas entre outros. Assim, o SRA também representa um sistema parácrino e intrácrico com particularidades específicas que variam de acordo com o tecido (76).

Nas últimas décadas, novas enzimas, peptídeos e receptores foram incluídos ao SRA. Esse conceito moderno do SRA, inclui a Angiotensina-(1-7). Os primeiros estudos relatando a existência desse peptídeo iniciaram na década de 80.

Santos et al. (1988) utilizando homogenato de cérebro de cães observaram que a Ang I radiomarcada era hidrolisada em Ang-(2-8) e Ang-(1-7) e a hidrólise de Ang II radiomarcada produzia principalmente Ang-(1-7). Além disso, os autores demonstraram que as rotas para produção de Ang-(1-7) eram independentes de ECA e Ang II, sugerindo a participação de endopeptidase neutra (NEP) e prolilendopeptidase para a formação da Ang-(1-7) (77).

Logo após a descoberta do peptídeo, iniciaram-se os primeiros estudos demonstrando os efeitos biológicos da Ang-(1-7) (78,79). Nos anos 2000, dois grupos de pesquisadores descreveram a principal via de formação de Ang-(1-7), através da identificação da Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ECA2) (80,81). A ECA2 é uma carboxipeptidase que cliva um único aminoácido da Ang II para produzir a Ang-(1-7) (80,81). Além disso, ela apresenta atividade catalítica sobre a Ang I formando Ang-(1-9) a qual, sobre ação da ECA e NEP, forma Ang-(1-7). Essa enzima é mais abundante no endotélio vascular de rim, coração, hipotálamo e aorta (82). Recentemente, Domenig et al. (2016) demonstraram em homogenatos de rim, que a principal via de formação da Ang-(1-7) em rim de humanos e camundongos, é através da ação da enzima Neprilisina (NEP) sobre a Ang I (83).

Com o avançar das pesquisas a Ang-(1-7) passou a ser efetivamente considerada um importante componente do SRA, pois foram descritas ações cruciais no controle das funções cardiovasculares, que na maioria das vezes, são opostas ou contra-regulatórias às desencadeadas pela Ang II (84,85), como por exemplo, vasodilatação (86–88), efeito antiproliferativo (89), anti-hipertrófico (90) e antiarritmogênico (91) (Figura 5). Esses efeitos da Ang-(1-7) são desencadeados através da ativação do receptor Mas (85), uma proteína com sete domínios transmembrana acoplado a proteína G e expressa em diversos tecidos, como aorta (92), coração (93,94), ovário (95), cérebro, testículos e rim (96) fígado (97) e pulmão (98).

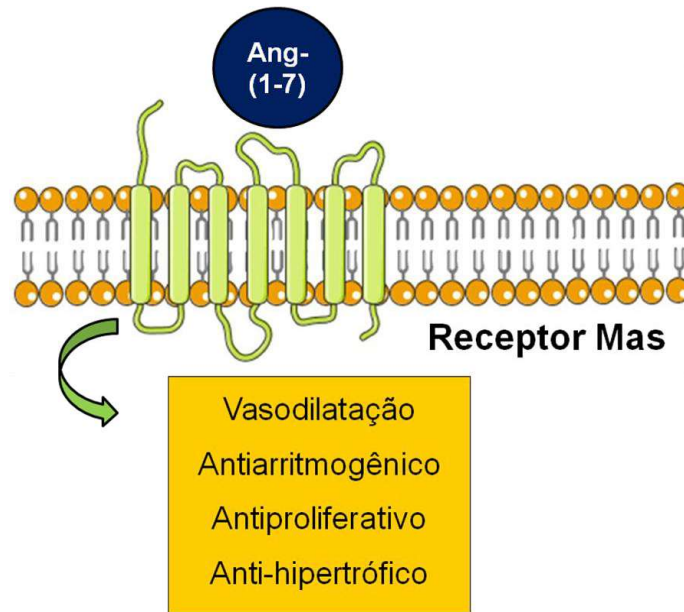


Figura 5 - Principais efeitos desencadeados pela ativação do receptor Mas de Ang-(1-7).

Recentemente, novos componentes do SRA foram identificados, como a Ang A (99), Alamandina e o receptor MrgD (*Mas-related G-protein Coupled Receptor*) (64). A Ang A e a Alamandina são peptídeos estruturalmente e funcionalmente muito semelhante a Ang II e Ang-(1-7), respectivamente. Os dois peptídeos se diferem somente na terminação N, com a substituição da alanina pelo ácido aspártico (100). A Ang A pode se ligar tanto ao receptor AT1 quanto ao receptor AT2. Já os efeitos da Alamandina são mediados principalmente através da ativação do receptor MrgD (64). A formação da Alamandina pode ocorrer por duas vias distintas; (i) pela clivagem de Ang A pela ECA2, ou (ii) a partir da Ang-(1-7) por ação de enzimas que ainda permanecem desconhecidas (64). Essa nova descoberta do eixo Ang A/Alamandina/MrgD amplia as possibilidades de novas interações dos componentes do SRA (63) (Figura 3). A tabela 1 descreve a sequência de aminoácidos dos principais peptídeos do SRA.

Tabela 1. Sequência de aminoácidos dos principais peptídeos do SRA

| Nome | Sequência de aminoácidos |
|---------------------------|---------------------------------|
| Angiotensina II | Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe |
| Angiotensina-(1-7) | Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro |
| Alamandina | Ala-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro |
| Angiotensina A | Ala-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe |

1.3.1. Efeitos Cardiovasculares da Ang II e Ang-(1-7)

Diversos estudos têm demonstrado que o coração e os vasos sanguíneos são importantes órgãos alvos de ação da Ang II e Ang-(1-7) (63,87,101). Embora diversos efeitos biológicos de ambos os peptídeos já serem conhecidos, os efeitos e mecanismos celulares na contratilidade cardíaca ainda não são totalmente elucidados. Diversos estudos têm demonstrado que a Ang II promove aumento da força de contração em miócitos cardíacos, ou seja, efeito inotrópico positivo (35,102). Esse efeito pode estar relacionado com a ativação de canais de Ca^{2+} do tipo L via PKC, aumentando o influxo desse íon para o interior dos cardiomiócitos (102), além disso, a endotelina e as espécies reativas de oxigênio podem influenciar esse efeito desencadeado pela Ang II (103). Em contrapartida, a Ang II em concentrações micromolares e nanomolares também pode desencadear resposta inotrópica negativa em cardiomiócitos de ratos (11,104). Esse efeito pode estar relacionado à ativação da proteína quinase p38 reduzindo a afinidade do Ca^{2+} aos miofilamentos contrateis (104).

Diferentemente, estudos têm demonstrado que a Ang-(1-7) em concentrações micromolares pode desencadear respostas inotrópicas negativas em corações de coelhos através da ativação do receptor Mas, esse efeito em parte é dependente da síntese e liberação de NO (36).

Classicamente, a Ang II promove efeito vasoconstritor em diversos leitos vasculares, inclusive em coronária, van Esch et al. (2008), demonstraram que esse peptídeo promove vasoconstrição coronariana em animais normotensos a partir de

concentrações nanomolares (105). Semelhantemente Moltzer et al. (2010) demonstraram os mesmos efeitos em coronárias de animais hipertensos (106). Ambos os autores concluíram que esse efeito é mediado via receptor AT1. Em leitos vasculares, a Ang II contribui para o equilíbrio da homeostasia vascular, no entanto, elevados níveis de Ang II, causam vasoconstrição e aumento do estresse oxidativo, levando a disfunção endotelial (107).

O efeito vasodilatador da Ang-(1-7) já foi descrito em diversos leitos vasculares, incluindo artérias mesentéricas (108), renais (109), aorta (Le TRAN et al., 1997; SILVA et al., 2007) e coronárias (110–112). Castro et al. (2005) demonstraram o efeito vasodilatador coronariano da Ang-(1-7) em corações isolados de camundongos pré-perfundidos com antagonista do receptor AT1, losartan. Esse efeito foi ausente em camundongos com deleção genética para o receptor Mas. Souza et al. (2013) demonstraram que Ang-(1-7) e AVE 0991, um agonista do receptor Mas, induzem significativa vasodilatação coronariana e aórtica em ratos saudáveis. No entanto, esse efeito foi bloqueado em animais submetidos a sobrecarga pressórica (112). Esses resultados corroboram com os resultados de Silva et al. (2007) que demonstraram ação vasorrelaxante da Ang-(1-7) em vasos, sendo este efeito dependente do endotélio (92). Mais recentemente, Zhang et al. (2015) demonstraram que a Ang-(1-7) promove vasorrelaxamento dependente de endotélio em anéis de artéria renal de pacientes diabéticos (113).

Recentemente, nosso grupo demonstrou pela primeira vez que a Ang-(1-7), em concentrações picomolares (próximas à concentração plasmática fisiológica), foi capaz de promover um importante efeito vasodilatador coronariano em corações isolados de ratos (112). No entanto, o efeito contrátil desse peptídeo em baixas concentrações ainda não foi avaliado. Além disso, o efeito coronariano da Ang II em concentrações picomolares também é desconhecido, bem como o efeito deste peptídeo na contratilidade ventricular ainda é bastante controverso. Desta forma, objetivamos avaliar os efeitos inotrópicos da Ang-(1-7) e Ang II em concentrações picomolares. Também buscaremos ampliar os conhecimentos sobre os possíveis mecanismos de ação, além do envolvimento de diferentes receptores angiotensinérgicos e outros receptores nas ações vasculares coronariana da Ang II e Ang-(1-7).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Ampliar os conhecimentos sobre os efeitos da Ang-(1-7) e Ang II no controle da contratilidade ventricular e função vascular coronariana. Além disso, avaliaremos os possíveis mecanismos de ação.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos da Ang-(1-7) e Ang II na contratilidade cardíaca de ratos anestesiados.
- Avaliar os efeitos da Ang-(1-7) e Ang II na pressão arterial média e frequência cardíaca de ratos anestesiados.
- Avaliar os efeitos da Ang-(1-7) e Ang II na contratilidade cardíaca e vasomotricidade coronariana de corações isolados de ratos.
- Investigar os possíveis mecanismos de ação envolvidos nas respostas contráteis e coronarianas desencadeadas pela Ang-(1-7) e Ang II em corações isolados de ratos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados 146 ratos adultos da linhagem Wistar, pesando entre 280-350 gramas, provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás.

Os animais foram alocados no Biotério Setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas/ICB/UFG, ficando no máximo 5 animais por gaiola com temperatura e intensidade de luz controlada (12 horas claro/ 12 horas escuro), e livre acesso de água e comida. Todos os protocolos utilizados foram submetidos à aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal de Goiás (CEUA/UFG), sob nº 179/2009 e 039/2017.

3.2. Parâmetros cardiovasculares *in vivo*

3.2.1. Canulação Intraventricular Esquerda

Objetivando avaliar os efeitos da Ang-(1-7) e Ang II na contratilidade cardíaca em ratos anestesiados, foi realizado o procedimento cirúrgico de canulação da artéria carótida direita como via de acesso ao ventrículo esquerdo. Inicialmente, os animais foram anestesiados com uretana (1,2g/kg, ip), após a anestesia foi feita uma incisão na região do músculo esternocleidomastoideo para localização e implantação de uma cânula de tygon PE-50 (14 cm) e PE-10 (7cm) na artéria carótida direita. As cânulas foram preenchidas com soro fisiológico 0,9% e heparina sódica 1% (Blau Farmacêutica) na proporção de 10ml para 0,1 ml respectivamente e posicionadas no ventrículo esquerdo. A pressão intraventricular diastólica foi utilizada como parâmetro para certificar o correto posicionamento da cânula no ventrículo esquerdo.

A cânula posicionada no ventrículo esquerdo foi acoplada a um transdutor de pressão ligado a um amplificador acoplado a um conversor analógico-digital (Dataq Instruments), permitindo o registro de Pressão Intraventricular Sistólica (PIS)

e Diastólica Esquerda e suas derivadas em relação ao tempo (dP/dt máxima e mínima).

3.2.2. Canulação de Veia e Artéria Femoral

Após a canulação da artéria carótida direita, foi realizada uma incisão na face ventral da pata traseira esquerda, necessária para expor e dissecar a artéria e a veia femoral, logo em seguida um tubo de polietileno PE-10 de 3 cm (para veia) ou 4 cm (para artéria) foi introduzido em cada vaso. Esses tubos foram soldados a outro tubo de polietileno PE-50 de 13 cm preenchidos com heparina sódica 1% (Blau Farmacêutica). A cânula ligada à artéria foi acoplada a um transdutor de pressão ligado a um amplificador acoplado a um conversor analógico-digital (Dataq Instruments), a fim de registrar as pressões arteriais sistólica e diastólica. A frequência cardíaca foi calculada a partir do registro de pressão arterial. A cânula ligada à veia foi utilizada para administração de Ang-(1-7) ou Ang II.

3.2.3. Protocolo para Registro da Pressão Intraventricular e Pressão Arterial

Após o término do procedimento cirúrgico, foi aguardado um período aproximado de 30 minutos (período basal) para estabilização dos parâmetros cardiovasculares. Após o período basal, Ang-(1-7) ou Ang II foram infundidas continuamente nos animais anestesiados, através de uma bomba de infusão contínua (BI-2008 AVS Projetos) com volume fixo de 10 μ l/min durante 30 minutos. Os peptídeos foram utilizados nas seguintes concentrações: 0,4 nmol/kg/min ou 4 nmol/kg/min ou 40 nmol/kg/min (Figure 6).

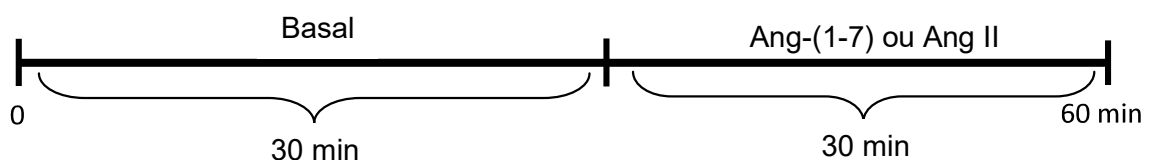


Figure 6 - Esquema do protocolo experimental de registro dos parâmetros cardiovasculares em animal anestesiado.

3.3. Parâmetros Cardiovasculares *ex vivo*

3.3.1. Preparação dos Corações Isolados

Para avaliação da função cardíaca *ex vivo*, foi utilizada a técnica de Langendorff com Fluxo Constante. O fluxo estabelecido foi de 10 ± 2 ml/min, mantidos a uma temperatura de $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

Os animais foram eutanaziados por decapitação 10 minutos após serem heparinizados (300 UI). A cavidade torácica foi aberta, o coração e os órgãos adjacentes foram retirados e colocados em um béquer contendo solução nutritora em temperatura aproximada de 4°C . Esse resfriamento foi necessário para diminuir o metabolismo do miocárdio, antes destes serem conectados ao sistema de perfusão.

Estes órgãos foram transferidos para uma placa de petri para remoção dos pulmões, vasos, esôfago e traquéia que acompanharam o coração. Posteriormente, a aorta ascendente foi seccionada na altura de sua primeira ramificação e fixada à uma agulha de aço inoxidável conectada ao sistema de perfusão contendo a solução nutritora de Krebs Ringer. As concentrações da solução de Krebs Ringer estão descritas na tabela 2.

Para analisar os parâmetros de contratilidade ventricular, um pequeno balão de plástico preenchido com água e conectado a um transdutor de pressão foi inserido na câmara ventricular esquerda a partir de uma incisão no átrio esquerdo. Através deste balão, foi realizado os registros das Pressões Intraventriculares Sistólica e Diastólica, das derivadas dP/dt máxima e mínima e Frequência Cardíaca. Outro transdutor de pressão foi acoplado ao sistema por uma abertura imediatamente acima do coração para o registro da Pressão de Perfusão Coronariana.

Tabela 2. Solução de Krebs Ringer

| Composto | Concentração (mmol/L) |
|---------------------------------------|-----------------------|
| NaCl | 118,4 |
| KCl | 4,7 |
| MgSO ₄ . 7H ₂ O | 1,2 |
| CaCl ₂ . 2H ₂ O | 1,25 |
| Glicose | 11,7 |
| NaHCO ₃ | 26,5 |

3.3.2. Protocolo dos experimentos de Coração Isolado

Após um período para estabilização dos corações (basal) de 20-30 minutos, os corações isolados de ratos foram perfundidos com solução nutritora contendo Ang-(1-7) ou Ang II ambos na concentração de 20pmol/L durante 15 minutos. Para avaliar os possíveis mecanismos de ação envolvidos nas respostas inotrópicas e coronarianas dos dois peptídeos os corações foram inicialmente perfundidos com solução nutritora contendo os inibidores ou antagonistas descritos na tabela 3 por um período de 25-30 minutos. Após este período, os corações foram perfundidos com Ang-(1-7) ou Ang II na concentração de 20 pmol/L durante 15 minutos (Figura 7).

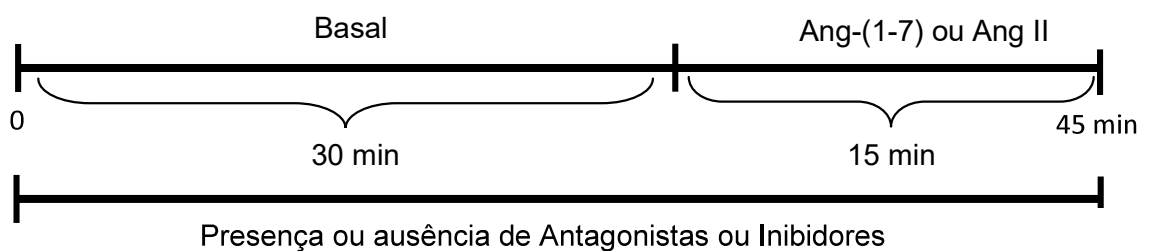


Figura 7 - Esquema do protocolo experimental de coração isolado

Além disso, Alamandina ou C21 (agonista de receptor AT2) na concentração de 20 pmol/L foram utilizados para confirmar os resultados obtidos com os antagonistas dos receptores MrgD e AT2 (Figura 8).

Tabela 3. Antagonistas e inibidores utilizados no estudo

| Antagonistas e Inibidores | Mecanismo de Ação | Concentração Utilizada |
|----------------------------------|---|-------------------------------|
| Losartan | Antagonista do receptor AT1 | 1µmol/L |
| PD123319 | Antagonista do receptor AT2 | 2nmol/L |
| A-779 | Antagonista do receptor Mas | 2nmol/L |
| D-PRO | Antagonista do receptor MrgD | 2nmol/L |
| DX 600 | Inibidor de ECA2 | 2nmol/L |
| L-Name | Inibidor de óxido nítrico sintase (NOS) | 10 nmol/L |
| ODQ | Inibidor de Guanilato ciclase | 200 nmol/L |
| MDL12,330A | Inibidor de Adenilato ciclase. | 1 µmol/L |

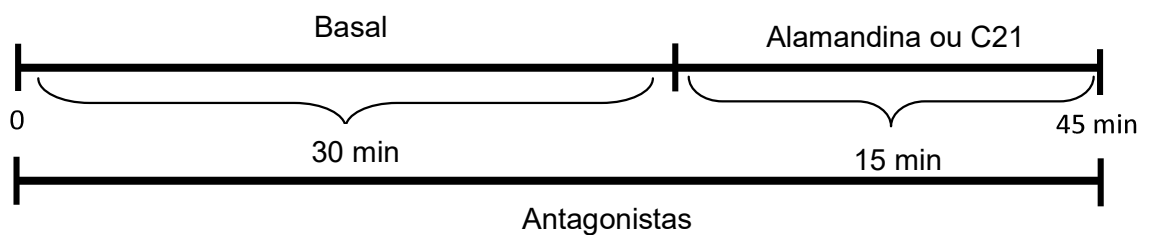


Figura 8 - Esquema do protocolo experimental de coração isolado utilizando Alamandina ou C21

3.4. Sistema de Cultura de Células

3.4.1. Linhagem Celular

Neste estudo, foram utilizadas células endoteliais humanas da linhagem EA.hy 926, cedidas pelo Professor Nickolaos Stergiopoulos do *Laboratory of Hemodynamics and Cardiovascular Technology* (LHTC) da École Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL) – Suíça.

3.4.2. Cultivo de Células Endoteliais

O cultivo das células endoteliais de veias umbilicais humanas, EA.hy 926, foi iniciado após descongelamento rápido a 37°C em banho-maria de alíquotas contendo 1×10^6 células. Após o descongelamento, as células foram submetidas à centrifugação de 1200 rpm durante 10 minutos. Em seguida o sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi resuspenso em 10 ml de meio de crescimento Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma Aldrich), suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS) (Sigma Aldrich) e 1% de antibiótico Penicilina (GIBCO).

As células foram distribuídas em placas de culturas, incubadas em estufa a 37°C e 5%. O meio de cultura foi trocado em intervalos de dois dias até atingirem confluência de aproximadamente 80% de células aderidas.

3.4.3. Protocolos Experimentais com Cultura de Células

Após atingirem o nível estabelecido de confluência as células foram estimuladas a 37°C em 2% de FBS. Inicialmente, as células foram estimuladas com concentrações crescentes de Ang-(1-7) (0,2 pmol/L a 1 μ mol/L) durante 10 minutos. Em seguida, para avaliar a participação dos receptores angiotensinérgicos nas respostas desencadeadas por 20 pmol/L de Ang-(1-7), novas células foram semeadas e cultivadas. Após atingirem o nível adequado de confluência as células foram estimuladas na presença ou ausência dos antagonistas Losartan (1 μ mol/L) durante 10 minutos, PD123319 (2 nmol/L) e A-779 (2 nmol/L) durante 5 minutos, seguidos por Ang-(1-7) 20 pmol/L por 10 minutos. A técnica de Western Blot foi realizada para avaliar a eficácia do protocolo experimental.

3.4.4. Silenciamento Gênico

Visando esclarecer o papel dos receptores angiotensinérgicos nos efeitos coronarianos desencadeados pela Ang-(1-7) realizamos o silenciamento do gene dos receptores Mas e AT1. Para proceder ao silenciamento dos receptores, as células foram semeadas em placas de cultura, suplementadas com FBS 10% sem antibiótico. Em seguida as células foram incubadas até atingirem confluência de aproximadamente 80% (24 horas).

Para o silenciamento dos genes dos receptores Mas e AT1 foram utilizados os oligômeros MAS1(4142) siRNA (MQ-003684-01-0002 *Dharmacon*) e AGTR1(185) siRNA (MQ-005428-02-0002 *Dharmacon*) ambos apresentam quatro diferentes sequências de nucleotídeos para o mesmo gene. Os oligômeros foram transfectados nas linhagens utilizando Lipofectamina RNAiMax (*Invitrogen*). Inicialmente, os oligômeros foram resuspendidos em água livre de RNase a uma concentração de 5 μ M. Para a transfecção 4 μ l de Lipofectamina foram diluídos em 200 μ l do meio *Opti-MEM* e incubado por 5 minutos a temperatura ambiente. Os oligômeros foram diluídos em 200 μ l do meio DMEM sem FBS e antibiótico e incubados por 5 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação da Lipofectamina diluída, essa foi combinada com o oligômero diluído, sendo incubados por 20 minutos em temperatura ambiente. A seguir, 100 μ l do complexo Lipofectamina-oligômero foi adicionado a 400 μ l de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de FBS sem antibióticos. A transfecção ocorreu por um período de 24 horas a 37°C. Após 24 horas de transfecção, as células foram estimuladas com Ang-(1-7) na concentração de 20 pmol/l durante 10 minutos. A eficácia do protocolo experimental foi monitorada pela técnica de Western Blot.

3.5. Western Blot

Ao final do tempo de estimulação as células foram lisadas [Tampão de lise: 150 mmol/L cloreto de sódio, 1% Nonidet P40, 0.5% deoxicolato de sódio, 0.1% SDS (dodecil sulfato de sódio), 50 mmol/L Tris pH:8 e 0.01% inibidor de protease], sonicadas e centrifugadas a 12000 rpm por 20 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o extrato protéico quantificado pelo método de Bradford. O volume de amostras correspondente a 50 μ g foi separado em tubos devidamente identificados onde acrescentou-se tampão de amostra (Load Buffer:

TrisHCl/SDS 4x 7ml, Glycerol 3ml, SDS 1g, β -mercaptoethanol 0,6 ml, Bromophenol blue 1,2 mg). As amostras foram fracionadas por meio de eletroforese em Mini-PROTEAN TGX Precast Gels (BIO-RAD) na concentração de 10%, e corridas a 100 volts por 70 minutos. Após essa etapa, foi realizada a transferência das proteínas do gel para a membrana de PVDF (Immobilon-FL – Millipore) através do sistema *Trans-Blot Turbo*TM (Bio-Rad). A voltagem aplicada foi 25V durante 30 minutos. Para certificarmos a eficiência das etapas de corrida e transferência das proteínas, as membranas foram coradas com Ponceau 0,5%, lavadas com água destilada e incubadas com solução de bloqueio Odyssey (Licor) por 1 hora a fim de diminuir possíveis ligações inespecíficas com o anticorpo, utilizada para a detecção da proteína alvo.

A incubação da membrana com anticorpo primário de interesse ocorreu por 24 horas em agitação a 4°C. Posteriormente, as membranas foram lavadas três vezes com TBS-T durante 10 minutos e incubadas com anticorpo secundário por 2 horas. Ao final do período de incubação, as membranas foram novamente lavadas cinco vezes com TBS-10 durante 10 minutos. As membranas foram reveladas utilizando um detector de fluorescência (Odyssey Imaging System, Li-Cor Biosciences). As bandas foram analisadas pelo software Image J e a expressão das proteínas foi mostrada de forma relativa ao grupo controle, ao qual foi atribuído o valor de 1. As proteínas analisadas por esta técnica e as respectivas concentrações dos anticorpos empregados neste trabalho foram os seguintes: Fosfo-AKT (Cell Signaling – S473) 1:1000, GAPDH (Sigma Aldrich - SAB2500450) 1:1000, MAS (Abcam – ab66030) 1:500 e AT1 (Abcam – ab124505) 1:500. Os anticorpos secundários utilizados neste estudo foram: IRDye 800RD Donkey anti-Goat (Li-Cor) 1:6000 e IRDye 680RD Donkey anti-Rabbit (Li-Cor) 1:6000.

3.6. Análises Estatísticas

Os dados estão expressos com média \pm erro padrão da média. Para análise dos resultados *in vivo* e *ex vivo* foram utilizados os testes Two-Way ANOVA seguido dos pós-testes de Dunnett's para análises com o grupo controle e/ou Sidak para análises entre os grupos. One-Way ANOVA seguido dos pós-testes de Dunnett's e/ou Sidak foram utilizados para análise dos resultados obtidos com a técnica de

western blot. O software GraphPad Prism 6 foi utilizado para confecção e análises dos gráficos.

Todas as análises estatísticas foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Efeito inotrópico da Ang-(1-7) e Ang II em ratos anestesiados

Para avaliar o efeito da Ang-(1-7) e Ang II sobre a contratilidade cardíaca, os animais foram divididos em 7 grupos experimentais. O grupo controle foi infundido apenas com solução salina e os demais grupos foram infundidos continuamente com Ang-(1-7) ou Ang II nas concentrações de 0,4 nmol/L ou 4 nmol/L ou 40 nmol/L durante 30 minutos. Os parâmetros basais dos animais que receberam infusão de Ang-(1-7) e Ang II estão expressos nas tabelas 4 e 5 respectivamente.

Tabela 4. Parâmetros basais em ratos anestesiados antes da infusão de Ang-(1-7)

| Grupos | PIS | dP/dt Máx | dP/dt Min | PAM | FC | N |
|-----------------------------|---------------|------------------|------------------|--------------|--------------|----------|
| Controle | 130,0 ± 7,49 | 5216±634,7 | 3919 ± 76 | 80,89 ± 9,42 | 385,1 ± 3,97 | 7 |
| Ang-(1-7) 0,4 nmol/L | 110,9 ± 24,88 | 3836 ± 1201 | 3151 ± 1166 | 68,21 ± 7,16 | 363,1 ± 27,9 | 5 |
| Ang-(1-7) 4 nmol/L | 112,6 ± 14,40 | 3135 ± 395 | 2813 ± 582,4 | 70,43 ± 2,15 | 392,2 ± 20,4 | 5 |
| Ang-(1-7) 40 nmol/L | 138,6 ± 19,99 | 5278 ± 599,2 | 4275 ± 488,7 | 82,57 ± 5,55 | 390,4 ± 18,6 | 5 |

Pressão Intraventricular Sistólica (PIS); Pressão Arterial Média (PAM); Frequência Cardíaca (FC); número de animais (N).

Tabela 5. Parâmetros basais em ratos anestesiados antes da infusão de Ang II

| Grupos | PIS | dP/dt Máx | dP/dt Min | PAM | FC | N |
|------------------------------|---------------|------------------|------------------|--------------|--------------|----------|
| Controle | 130,0 ± 7,49 | 5216±634,7 | 3919 ± 76 | 80,89 ± 9,42 | 385,1 ± 3,97 | 7 |
| Ang II 0,4 nmol/L | 109,3 ± 10,69 | 5146 ± 1011 | 3468 ± 570,9 | 71,80 ± 6,17 | 384,3 ± 19,3 | 5 |
| Ang II 4 nmol/L | 118,0 ± 6,43 | 5099 ± 437,2 | 4141 ± 321,2 | 84,25 ± 7,43 | 384,1 ± 5,2 | 5 |
| Ang II 40 nmol/L | 135,5 ± 10,34 | 5585 ± 659,6 | 4338 ± 173,1 | 87,86 ± 2,22 | 404,7 ± 4,0 | 6 |

Pressão Intraventricular Sistólica (PIS); Pressão Arterial Média (PAM); Frequência Cardíaca (FC); número de animais (N).

A Ang-(1-7) na dose de 4 nmol/kg/min reduziu a Pressão Intraventricular Sistólica (PIS). Esse efeito não foi observado nas doses de 0,4 nmol/kg/min e 40 nmol/kg/min (Figura 9A). Semelhantemente, somente a dose de 4 nmol/kg/min reduziu a dP/dt máxima (Figura 9B) e dP/dt mínima (Figura 9C) nos animais anestesiados.

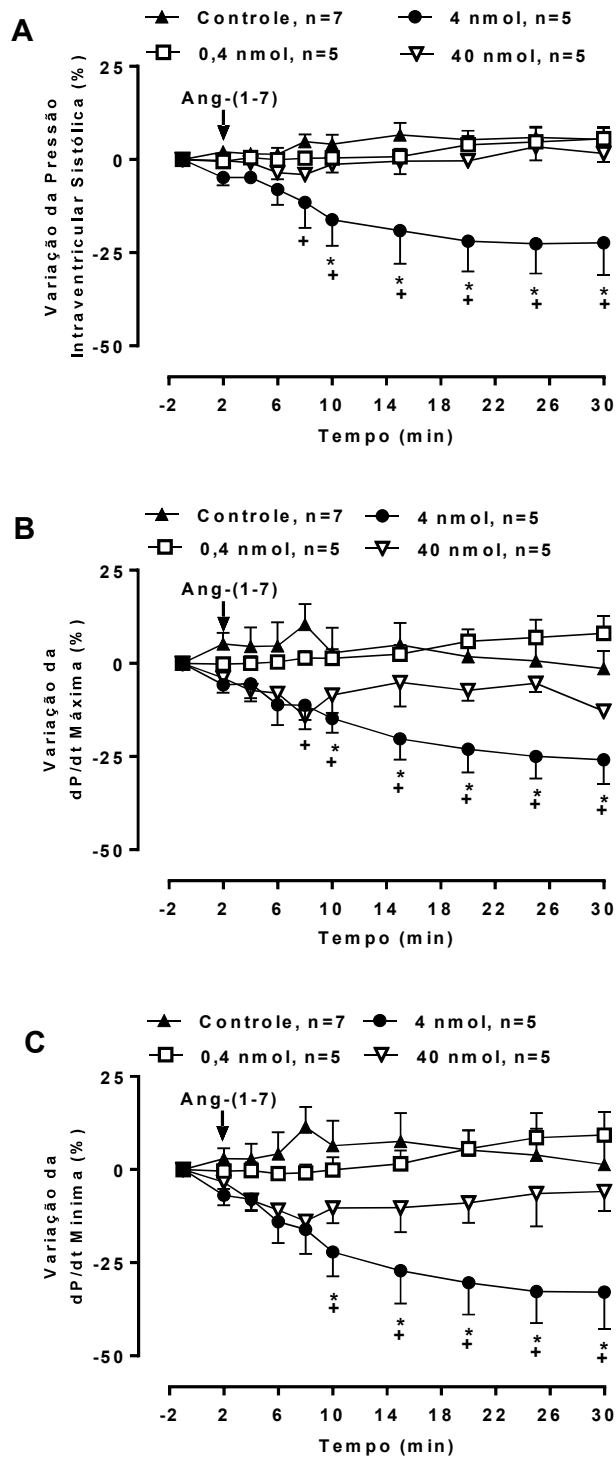


Figura 9 – Efeitos da Ang-(1-7) na contratilidade cardíaca de ratos anestesiados. **(A)** Pressão Intraventricular Sistólica, **(B)** dP/dt Máxima, **(C)** dP/dt Mínima. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média. Two-Way Anova seguido pelos pós-testes de Dunnett's e Sidak. * $p < 0,05$ vs período basal, + $p < 0,05$ vs controle no respectivo tempo.

Apesar do efeito inotrópico negativo desencadeado pela infusão de Ang-(1-7), não foi observada nenhuma alteração significativa da Pressão Arterial Média (PAM) e FC (Figura 10A-B).

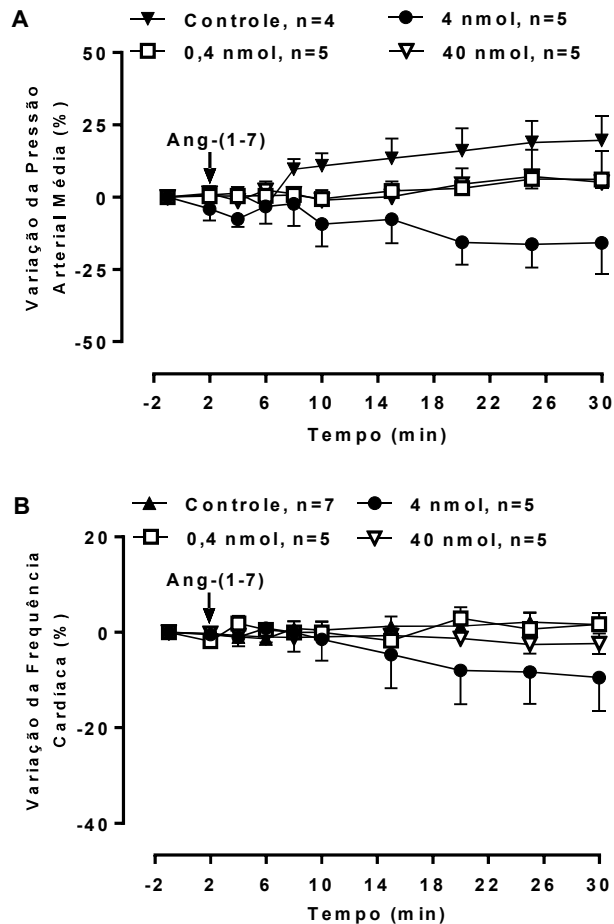


Figura 10 – Efeitos da Ang-(1-7) na PAM e FC de ratos anestesiados. **(A)** Pressão Arterial Média, **(B)** Frequência Cardíaca. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média. Two-Way Anova seguido pelos pós-testes de Dunnett's e Sidak. * $p < 0,05$ vs período basal, + $p < 0,05$ vs controle no respectivo tempo.

A infusão de Ang II não promoveu efeito significativo na PIS em nenhuma das doses utilizadas (Figura 11A). No entanto, na dose de 40 nmol/kg/min reduziu significativamente a dP/dt máxima (Figura 11B) e reduziu parcialmente a dP/dt mínima (Figura 11C).

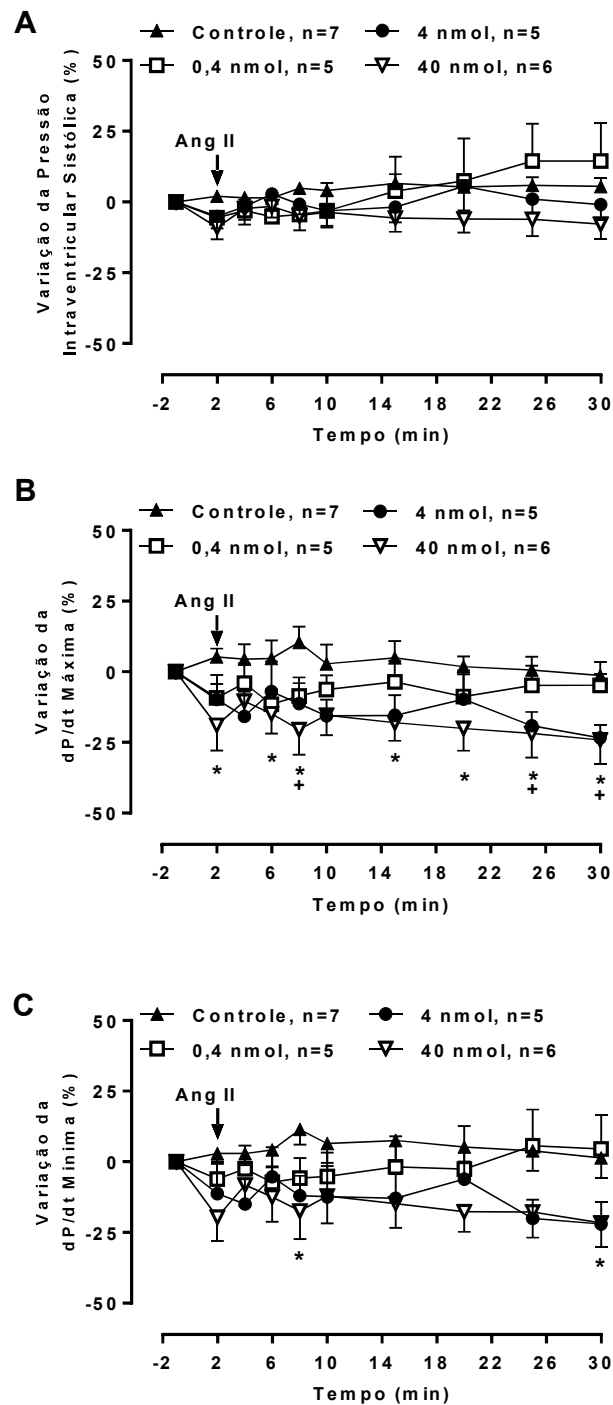


Figura 11 – Efeitos da Ang II na contratilidade cardíaca de ratos anestesiados. **(A)** Pressão Intraventricular Sistólica, **(B)** dP/dt Máxima, **(C)** dP/dt Mínima. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média. Two-Way Anova seguido pelos pós-testes de Dunnett's e Sidak. * $p < 0,05$ vs período basal, + $p < 0,05$ vs controle no respectivo tempo.

Assim como na Ang-(1-7), não foi observado nenhuma alteração da PAM e FC (Figura 12 A-B) durante a infusão de Ang II em ratos anestesiados.

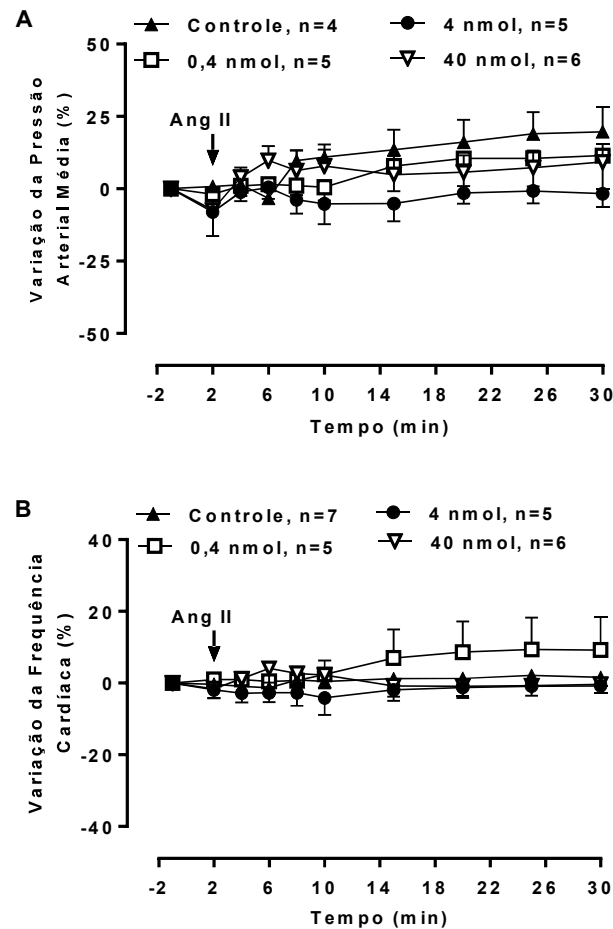


Figura 12 – Efeitos da Ang II na PAM e FC de ratos anestesiados. **(A)** Pressão Arterial Média, **(B)** Frequência Cardíaca. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média. Two-Way Anova seguido pelos pós-testes de Dunnett's e Sidak. * $p < 0,05$ vs período basal, + $p < 0,05$ vs controle no respectivo tempo.

4.2. Efeitos da Ang-(1-7) e Ang II sobre a função cardíaca em corações isolados de ratos

Para avaliar se os efeitos cardíacos da Ang-(1-7) e Ang II encontrados nos ratos anestesiados eram efeitos diretos ou secundários, as ações destes peptídeos foram avaliadas em corações isolados de ratos. Os valores basais de todos os grupos *ex vivo* com Ang-(1-7) e Ang II estão expostos na tabela 6 e tabela 7 respectivamente.

Tabela 6. Parâmetros basais em corações isolados de ratos antes da perfusão com Ang-(1-7)

| Grupos | PIS | dP/dt Máx | dP/dt Min | FC | PP | N |
|-----------------------------------|---------------|------------------|------------------|--------------|---------------|----------|
| Controle | 131,3 ± 11,13 | 3569±228,7 | 2670±246,1 | 274,3 ± 22,8 | 76,5 ± 5,92 | 5 |
| Ang-(1-7) + A-779 | 115,2 ± 17,05 | 3031±418 | 2133±444,8 | 261,1 ± 18,3 | 97,7 ± 14,66 | 5 |
| Ang-(1-7) + PD123319 | 77,3 ± 5,89 | 2355±216,6 | 1273±154,7 | 282,9 ± 26,7 | 66,3 ± 7,88 | 4 |
| Ang-(1-7) + Losartan | 84,8 ± 5,04 | 2516±175,8 | 968±501,5 | 282,3 ± 16,0 | 71,2 ± 3,71 | 5 |
| Ang-(1-7) + D-PRO | 76,4 ± 3,31 | 2220±257,0 | 1371±141,1 | 246,2 ± 36,2 | 81,3 ± 12,88 | 5 |
| Ang-(1-7) + L-Name | 83,2 ± 7,48 | 2536±345,7 | 2670±246,1 | 274,3 ± 22,8 | 83,0 ± 9,74 | 5 |
| Ang-(1-7) + ODQ | 85,5 ± 10,88 | 2481±195,5 | 2670±246,1 | 274,3 ± 22,8 | 110,3 ± 23,15 | 5 |
| Ang-(1-7) + MDL12,330A | 84,3 ± 12,7 | 2124±304,3 | 2670±246,1 | 274,3 ± 22,8 | 67,5 ± 4,68 | 5 |

Pressão Intraventricular Sistólica (PIS); Frequência Cardíaca (FC); Pressão de perfusão (PP); número de animais (N).

Tabela 7. Parâmetros basais em corações isolados de ratos antes da perfusão com Ang II

| Grupos | PIS | dP/dt Máx | dP/dt Min | FC | PP | N |
|----------------------------|---------------|------------------|------------------|--------------|---------------|----------|
| Controle | 111,5 ± 12,60 | 2897±308,4 | 2022±280,9 | 295,1 ± 13,9 | 103,7 ± 7,98 | 5 |
| Ang II + A-779 | 123,5 ± 17,04 | 3130±345,9 | 2303±312,9 | 264,1 ± 19,8 | 73,03 ± 5,67 | 5 |
| Ang II + PD123319 | 115,6 ± 10,19 | 2959±299,0 | 1994±236,9 | 272,1 ± 8,1 | 122,1 ± 10,76 | 4 |
| Ang II + Losartan | 137,1 ± 10,46 | 3479±321,1 | 2605±256,4 | 280,9 ± 3,8 | 122,4 ± 11,28 | 5 |
| Ang II + D-PRO | 75,65 ± 5,58 | 2374±223,2 | 2374±223,2 | 305,4 ± 25,0 | 90,68 ± 5,05 | 5 |
| Ang II + L-Name | 81,48 ± 4,64 | 2174±232,7 | 2174±232,7 | 287,4 ± 9,5 | 127,2 ± 12,80 | 5 |
| Ang II + ODQ | 102,8 ± 6,07 | 2510±291,8 | 2510±291,8 | 233,9 ± 15,2 | 106,2 ± 10,26 | 5 |
| Ang II + MDL12,330A | 101,3 ± 10,15 | 2691±206,3 | 2691±206,3 | 253,8 ± 9,66 | 108,0 ± 7,35 | 5 |

Pressão Intraventricular Sistólica (PIS); Frequência Cardíaca (FC); Pressão de perfusão (PP); número de animais (N).

Semelhante aos resultados encontrados *in vivo*, a Ang-(1-7) e Ang II reduziram significativamente a PIS (Figura 13A), quando comparados com o período basal. Estes peptídeos também reduziram a dP/dt máxima (Figura 13B) e mínima (Figura 13C) dos corações isolados de ratos.

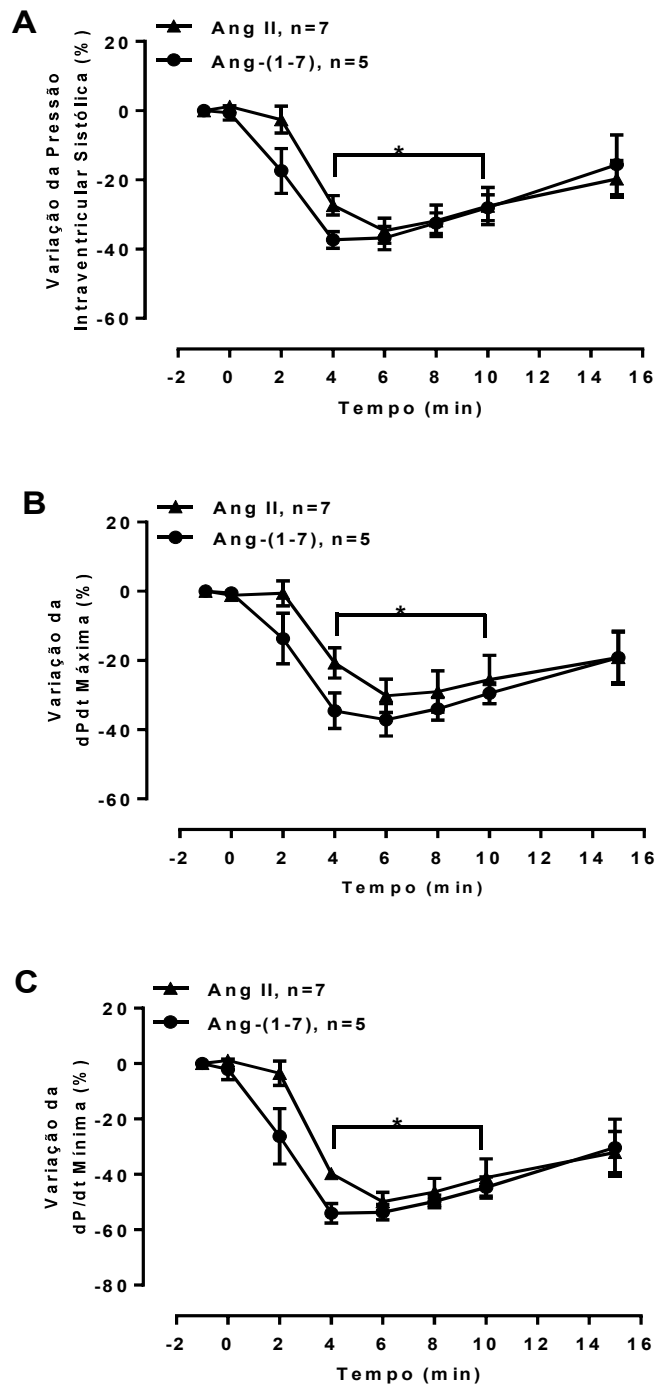


Figura 13 – Efeitos da Ang II e Ang-(1-7) (20 pmol/L) na contratilidade de corações isolados de ratos. (A) Pressão Intraventricular Sistólica, (B) dP/dt Máxima, (C) dP/dt Mínima. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média. Two-Way Anova seguido pelos pós-testes de Dunnett's e Sidak. * $p < 0,05$ vs período basal.

4.3. Participação dos receptores angiotensinérgicos no efeito inotrópico negativo desencadeado pela Ang-(1-7).

Para avaliar a participação dos receptores angiotensinérgicos no inotropismo negativo desencadeado pela Ang-(1-7), os corações foram pré-perfundidos com A-779, PD123319 ou Losartan, antagonistas dos receptores Mas, AT2 e AT1, respectivamente.

Surpreendentemente, o bloqueio do receptor Mas não foi capaz de inibir a diminuição da PIS (Figura 14A), dP/dt Máxima (Figura 14B) e dP/dt Mínima (Figura 14C) promovida pela infusão de Ang-(1-7).

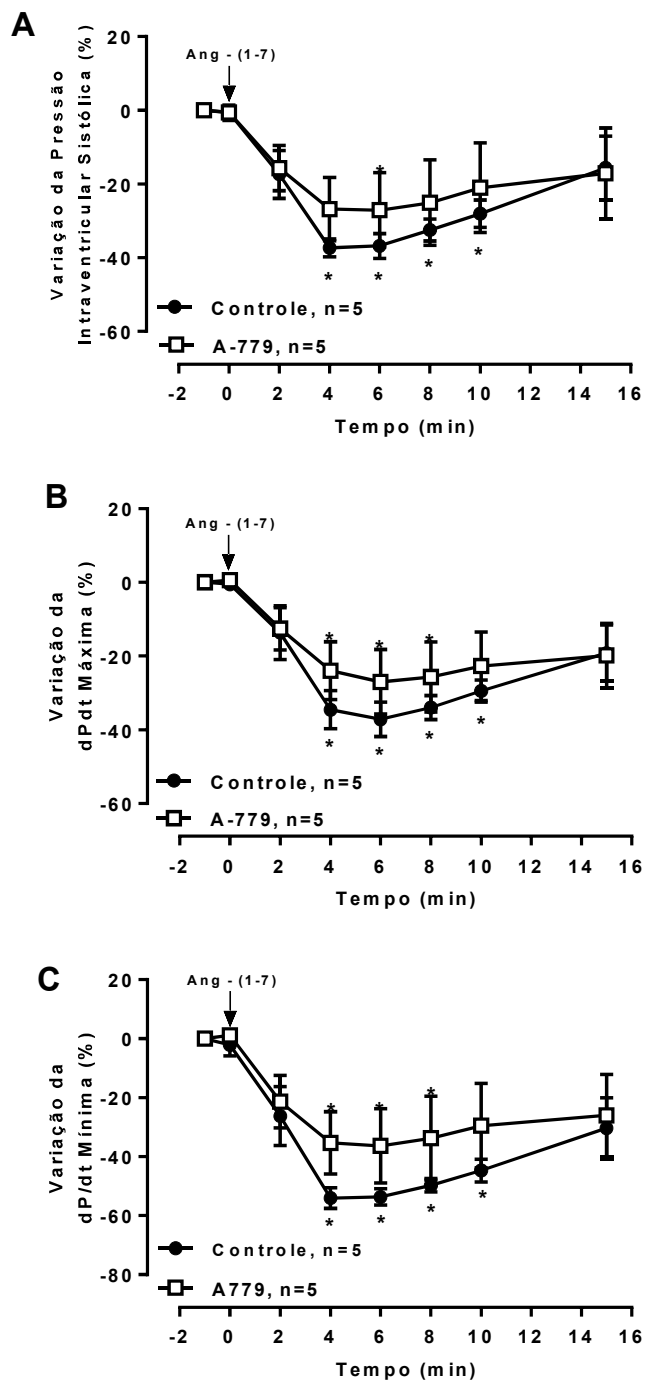


Figura 14 – Efeitos da Ang-(1-7) na presença e ausência de A-779 na contratilidade cardíaca em corações isolados de ratos. **(A)** Pressão Intraventricular Sistólica, **(B)** dP/dt Máxima, **(C)** dP/dt Mínima. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média. Two-Way Anova seguido pelos pós-testes de Dunnett's e Sidak. * $p < 0,05$ vs período basal.

No entanto, o bloqueio do receptor AT₂ inibiu completamente o efeito da Ang-(1-7) na PIS (Figura 15A), dP/dt Máxima (Figura 15B) e dP/dt Mínima (Figura 15C) em corações isolados de ratos.

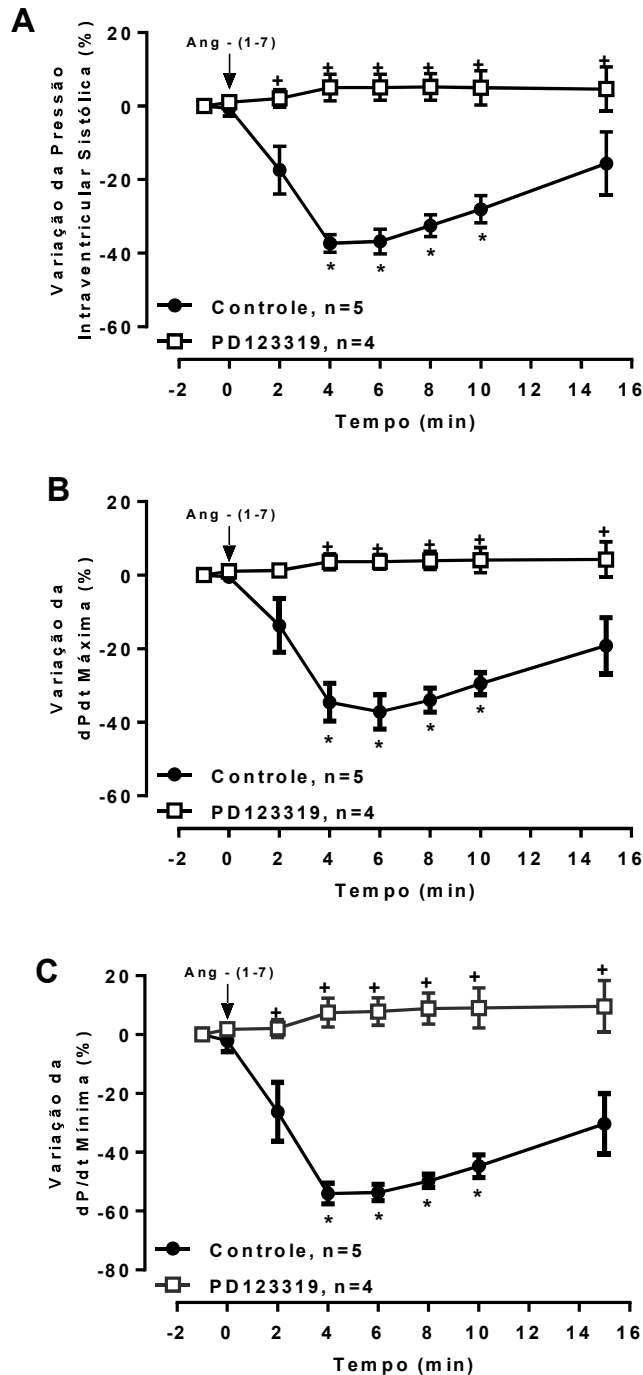


Figura 15 – Efeitos da Ang-(1-7) na presença e ausência de PD123319 na contratilidade cardíaca em corações isolados de ratos. (A) Pressão Intraventricular Sistólica, (B) dP/dt Máxima, (C) dP/dt Mínima. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média. Two-Way Anova seguido pelos pós-testes de Dunnett's e Sidak. * $p < 0,05$ vs período basal e + $p < 0,05$ vs controle no respectivo tempo.

O bloqueio do receptor AT1 também inibiu os efeitos da Ang-(1-7) na PIS (Figura 16A), dP/dt Máxima (Figura 16B) e dP/dt Mínima (Figura 16C).

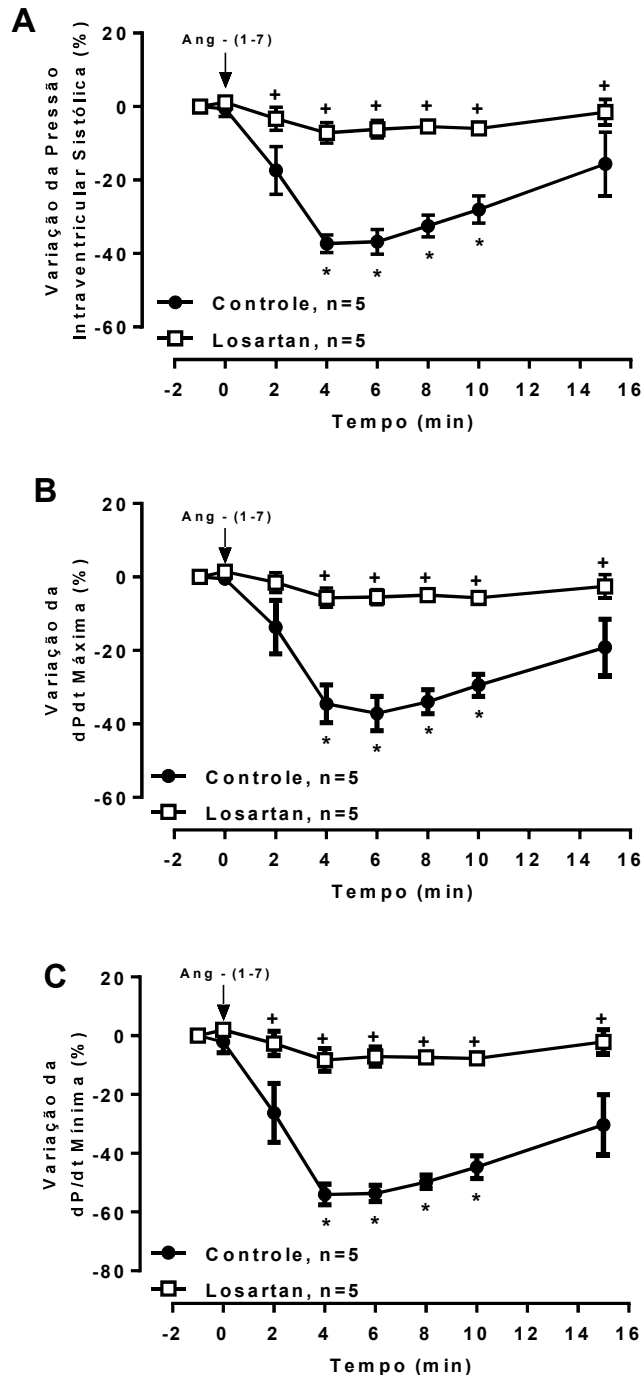


Figura 16 – Efeitos da Ang-(1-7) na presença e ausência de Losartan na contratilidade cardíaca em corações isolados de ratos. (A) Pressão Intraventricular Sistólica, (B) dP/dt Máxima, (C) dP/dt Mínima. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média. Two-Way Anova seguido pelos pós-testes de Dunnett's e Sidak. * $p < 0,05$ vs período basal e + $p < 0,05$ vs controle no respectivo tempo.

4.4. Participação do receptor de Alamandina, MrgD, no controle do inotropismo cardíaco.

O receptor MrgD foi inicialmente descrito como um receptor para alamandina (64). No entanto, recentes pesquisas têm demonstrado que a Ang-(1-7) também pode ser um ligante para este receptor (114). Para investigar se este receptor também está envolvido nos efeitos da Ang-(1-7) no inotropismo cardíaco, os corações foram pré-perfundidos com D-PRO, antagonista do receptor MrgD. Após o período de estabilização os corações foram perfundidos com Ang-(1-7) na concentração de 20 pmol/L durante 15 minutos.

Como resultado podemos observar que o bloqueio do receptor MrgD inibiu a resposta da Ang-(1-7) sobre a PIS (Figura 17A), dP/dt Máxima (Figura 17B) e dP/dt Mínima (Figura 17C).

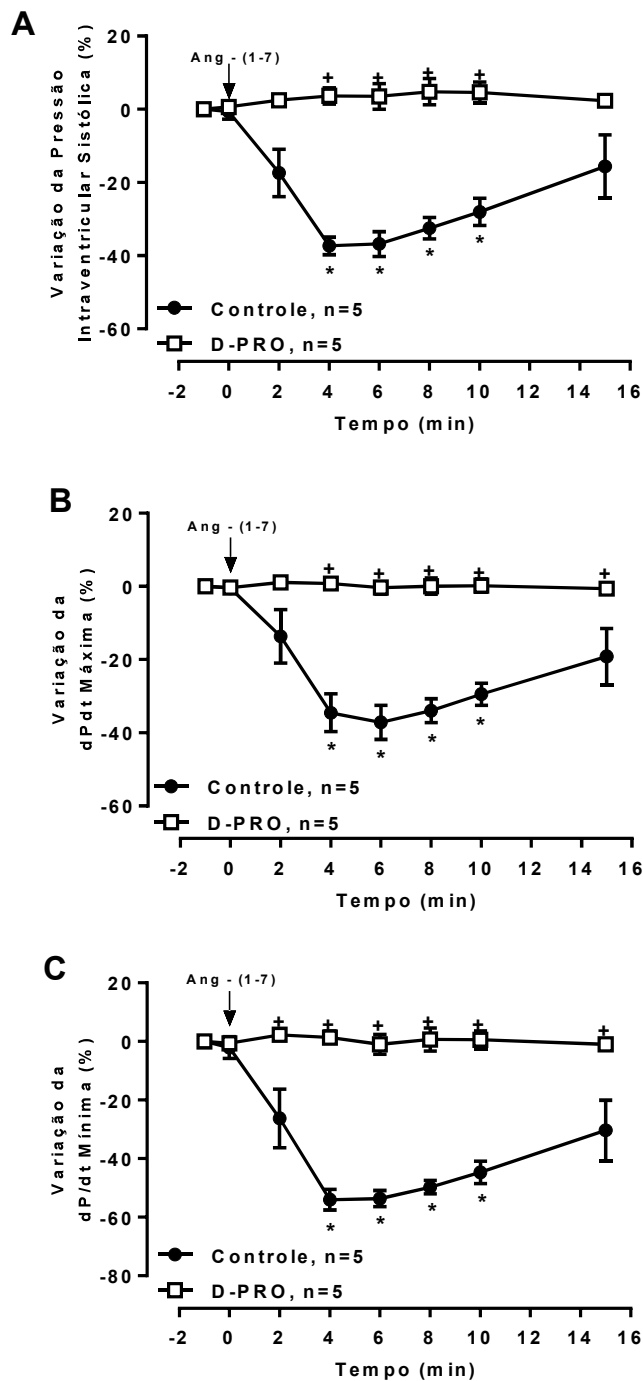


Figura 17 – Efeitos da Ang(1-7) na presença e ausência de D-PRO na contratilidade cardíaca em corações isolados de ratos. **(A)** Pressão Intraventricular Sistólica, **(B)** dP/dt Máxima, **(C)** dP/dt Mínima. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média. Two-Way Anova seguido pelos pós-testes de Dunnett's e Sidak. * $p < 0,05$ vs período basal e + $p < 0,05$ vs controle no respectivo tempo.

4.5. Influência do óxido nítrico no efeito inotrópico negativo desencadeado pela Ang-(1-7)

Avaliamos o envolvimento do NO na resposta inotrópica negativa promovida pela Ang-(1-7). Para isso, os corações foram perfundidos com L-Name, inibidor da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). Após o período de estabilização os corações foram perfundidos com Ang-(1-7) 20 pmol/L durante 15 minutos.

Como observado na figura 18, o efeito inotrópico negativo da Ang-(1-7) foi ausente na presença de L-Name (Figuras 18 A-C).

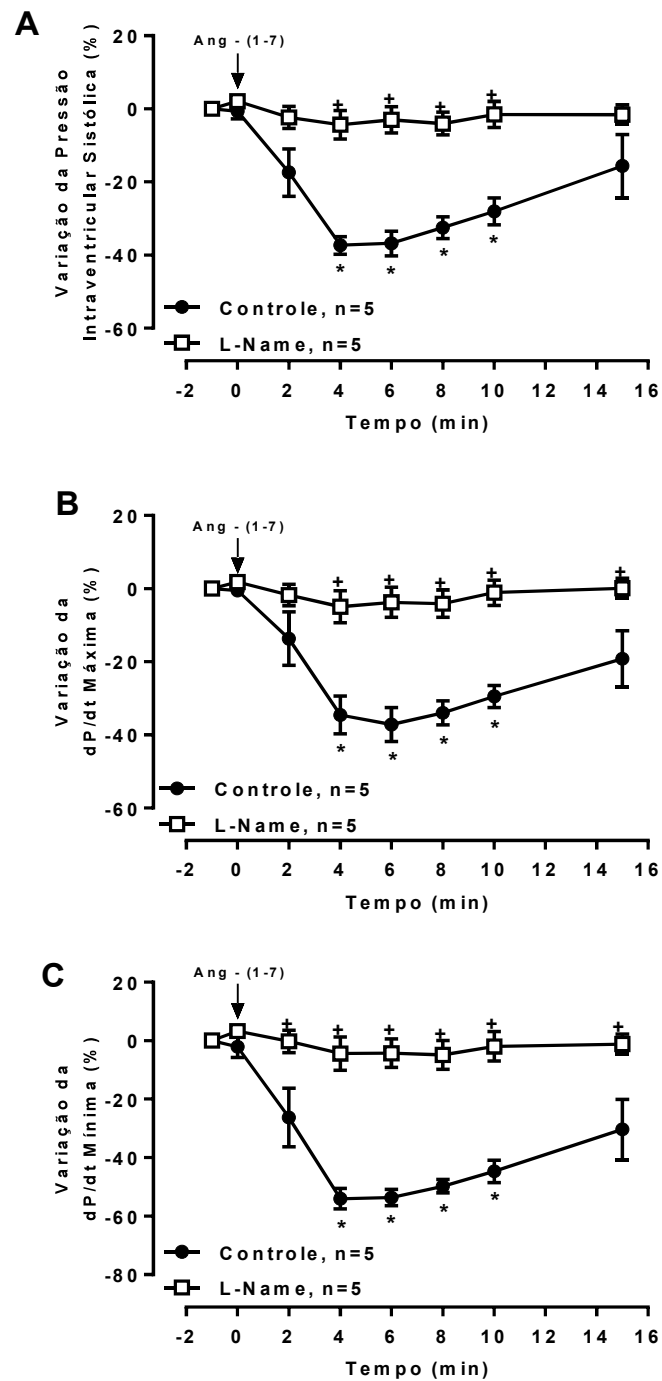


Figura 18 – Efeitos da Ang-(1-7) na presença e ausência de L-Name na contratilidade cardíaca em corações isolados de ratos. (A) Pressão Intraventricular Sistólica, (B) dP/dt Máxima, (C) dP/dt Mínima. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média. Two-Way Anova seguido pelos pós-testes de Dunnett's e Sidak. * $p < 0,05$ vs período basal e + $p < 0,05$ vs controle no respectivo tempo.

4.6. Participação das enzimas Adenilato Ciclase (AC) e Guanilato Ciclase (GC) no efeito inotrópico negativo desencadeado pela Ang-(1-7)

Para avaliar a participação das enzimas AC e GC nos efeitos da Ang-(1-7), os corações isolados de ratos Wistar foram perfundidos com MDL 12,330A e ODQ respectivamente, após o período de estabilização foi infundido Ang-(1-7) 20 pmol/L durante 15 minutos.

Os resultados demonstraram que tanto a inibição da enzima AC quanto da GC foi capaz de inibir a resposta inotrópica negativa da Ang-(1-7) (Figura 19 A-F).

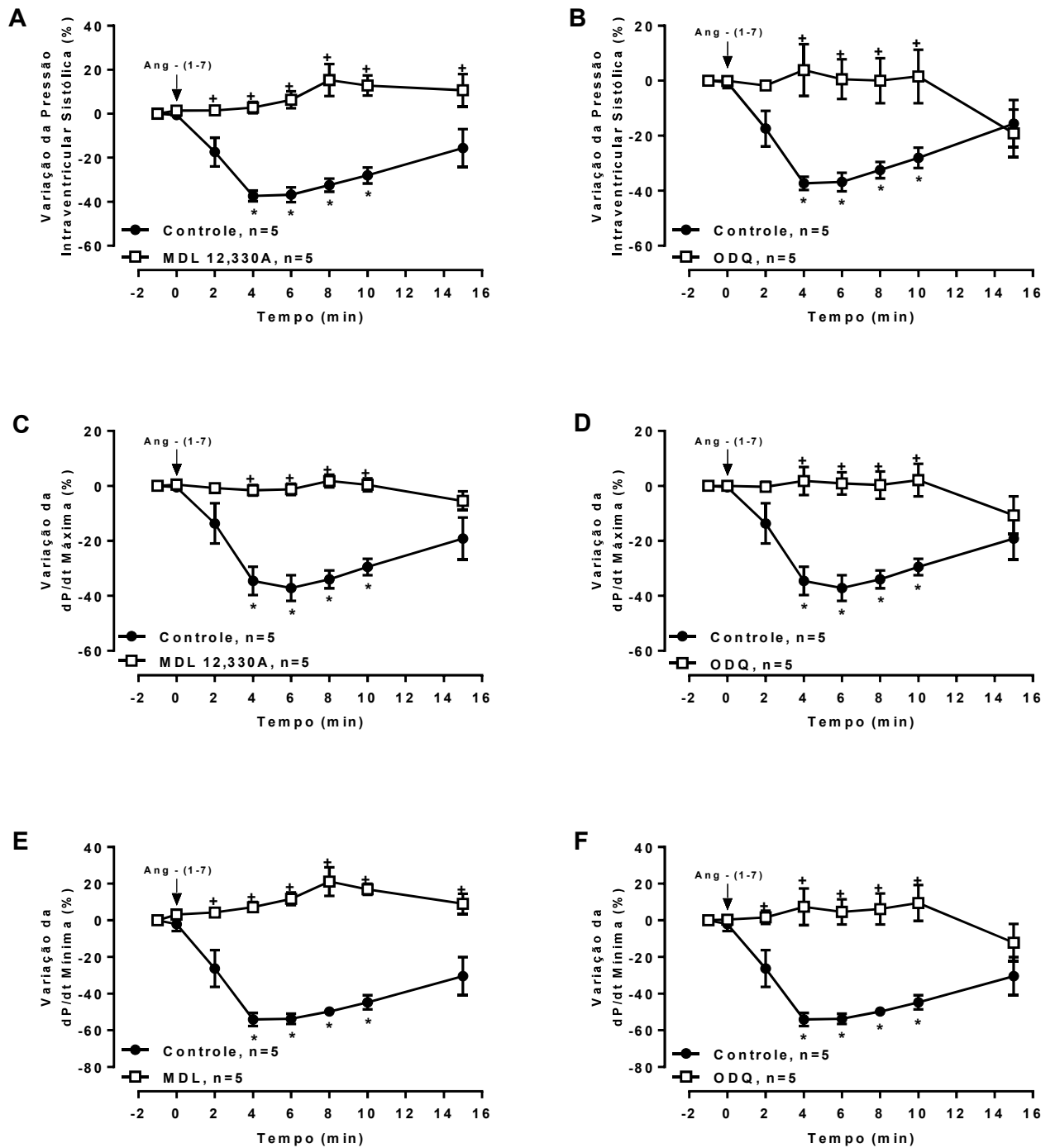


Figura 19 – Efeitos da Ang-(1-7) na presença e ausência de MDL12,330A (gráficos a esquerda) e ODQ (gráficos a direita) na contratilidade cardíaca em corações isolados de ratos. (A e B) Pressão Intraventricular Sistólica, (C e D) dP/dt Máxima, (E e F) dP/dt Mínima. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média. Two-Way Anova seguido pelos pós-testes de Dunnett's e Sidak. * $p < 0,05$ vs período basal, + $p < 0,05$ vs controle no respectivo tempo.

4.7. Participação dos receptores angiotensinérgicos no efeito inotrópico negativo desencadeado pela Ang II.

A participação dos receptores AT1, AT2 e Mas no efeito inotrópico cardíaco da Ang II, também foi avaliada. Para isso, os corações foram perfundidos com Losartan, PD123319 e A-779. Após o período de estabilização os corações foram perfundidos com Ang II 20 pmol/L durante 15 minutos.

Como observado na figura 20, o bloqueio do receptor AT1 com Losartan, não inibiu os efeitos da Ang II na PIS (Figura 20A), dP/dt Máxima (Figura 20B) e dP/dt Mínima (Figura 20C).

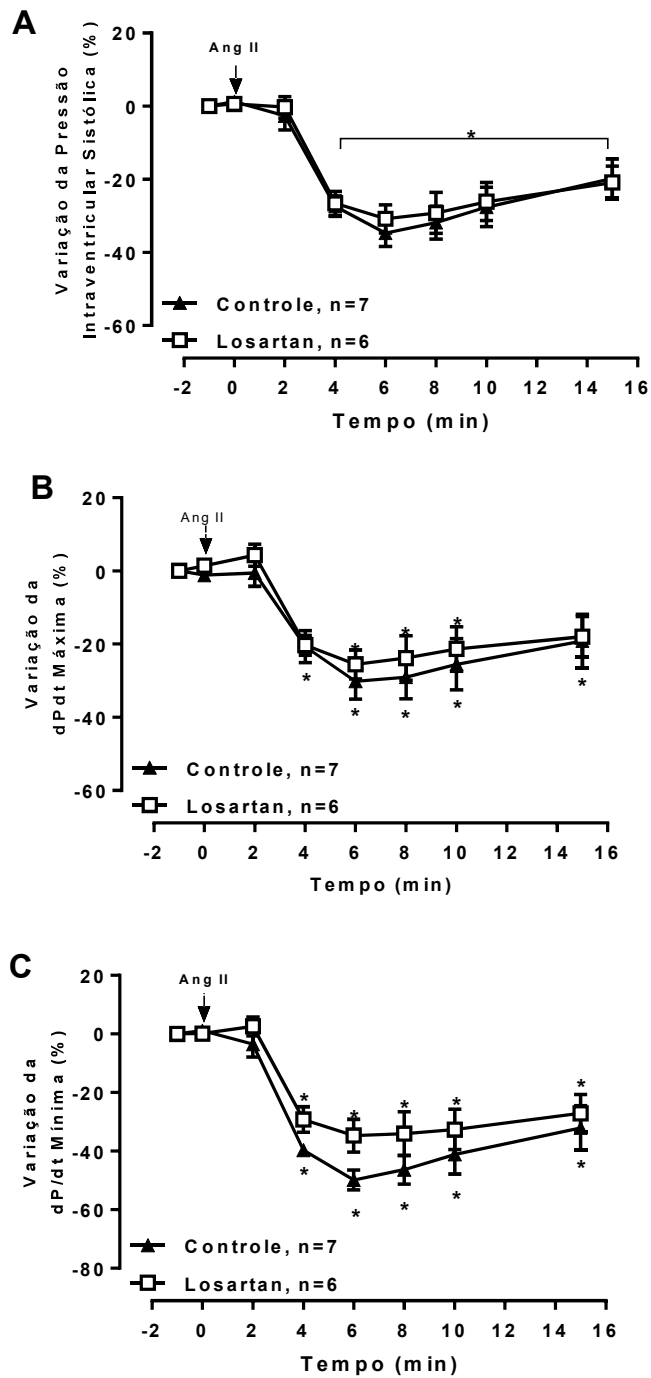


Figura 20 – Efeitos da Ang II na presença e ausência de Losartan na contratilidade cardíaca em corações isolados de ratos. **(A)** Pressão Intraventricular Sistólica, **(B)** dP/dt Máxima, **(C)** dP/dt Mínima. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média. Two-Way Anova seguido pelos pós-testes de Dunnett's e Sidak. * $p < 0,05$ vs período basal.

Similarmente, o bloqueio do receptor AT2 também não inibiu a diminuição da PIS (Figura 21A), dP/dt Máxima (Figura 21B) e Mínima (Figura 21C) promovido pela Ang II.

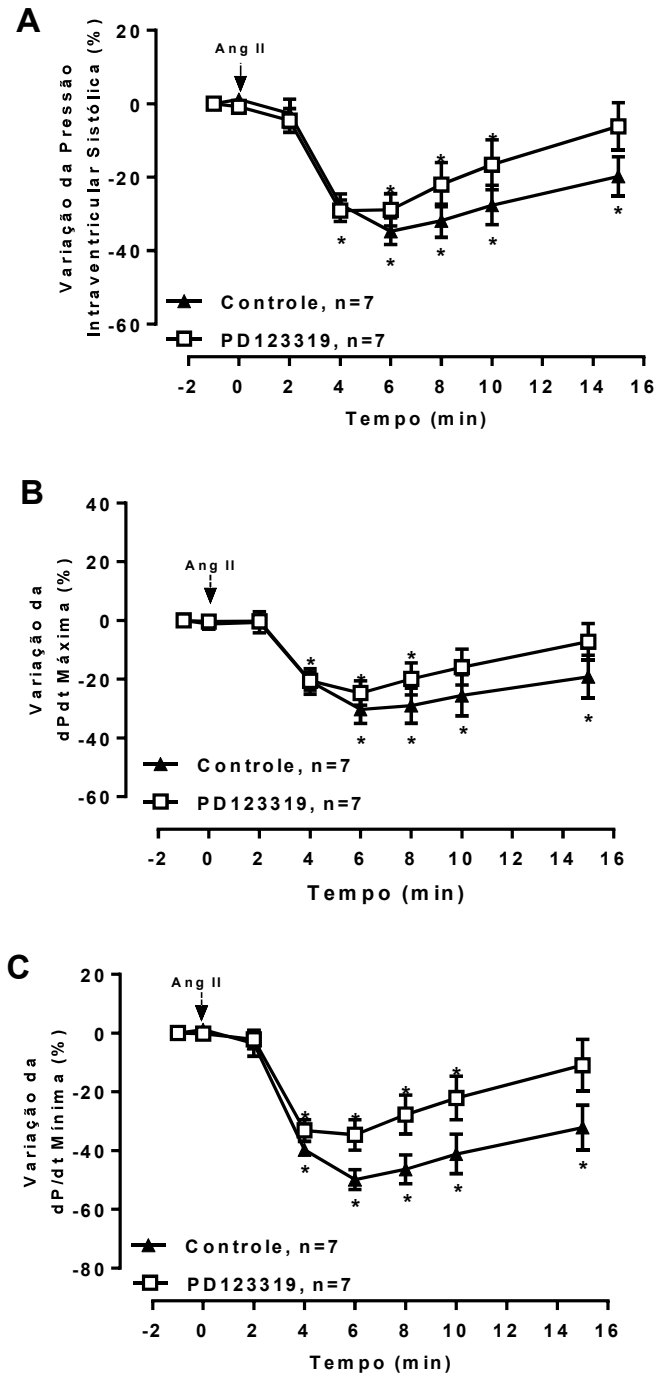


Figura 21 – Efeitos da Ang II na presença e ausência de PD123319 na contratilidade cardíaca em corações isolados de ratos. (A) Pressão Intraventricular Sistólica, (B) dP/dt Máxima, (C) dP/dt Mínima. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média. Two-Way Anova seguido pelos pós-testes de Dunnett's e Sidak. * $p < 0,05$ vs período basal.

Assim como os outros antagonistas de receptores angiotensinérgicos, o A-779, antagonista do receptor Mas, não inibiu os efeitos da Ang II sobre a PIS (Figura 22A), dP/dt Máxima (Figura 22B) e dP/dt Mínima (Figura 22C).

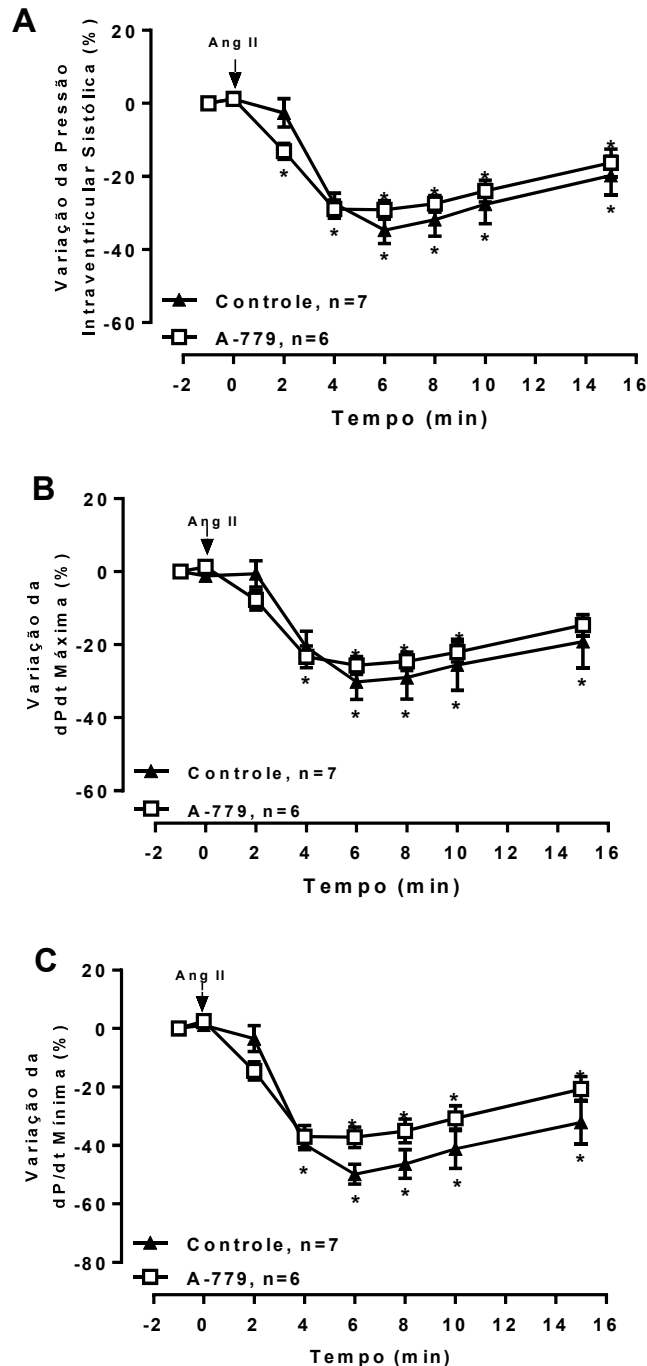


Figura 22 – Efeitos da Ang II na presença e ausência de A-779 na contratilidade cardíaca em corações isolados de ratos. (A) Pressão Intraventricular Sistólica, (B) dP/dt Máxima, (C) dP/dt Mínima. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média. Two-Way Anova seguido pelos pós-testes de Dunnett's e Sidak. * $p < 0,05$ vs período basal e + $p < 0,05$ vs controle no respectivo tempo.

4.8. Participação do receptor de Alamandina, MrgD, no controle do inotropismo cardíaco.

Para avaliar a participação do receptor MrgD no inotropismo negativo desencadeado pela Ang II, os corações foram perfundidos com D-PRO, após o período de estabilização os corações foram perfundidos com Ang II 20 pmol/L durante 15 minutos.

O bloqueio do receptor MrgD inibiu a resposta da Ang II sobre a PIS (Figura 23A), dP/dt Máxima (Figura 23B) e dP/dt Mínima (Figura 23C).

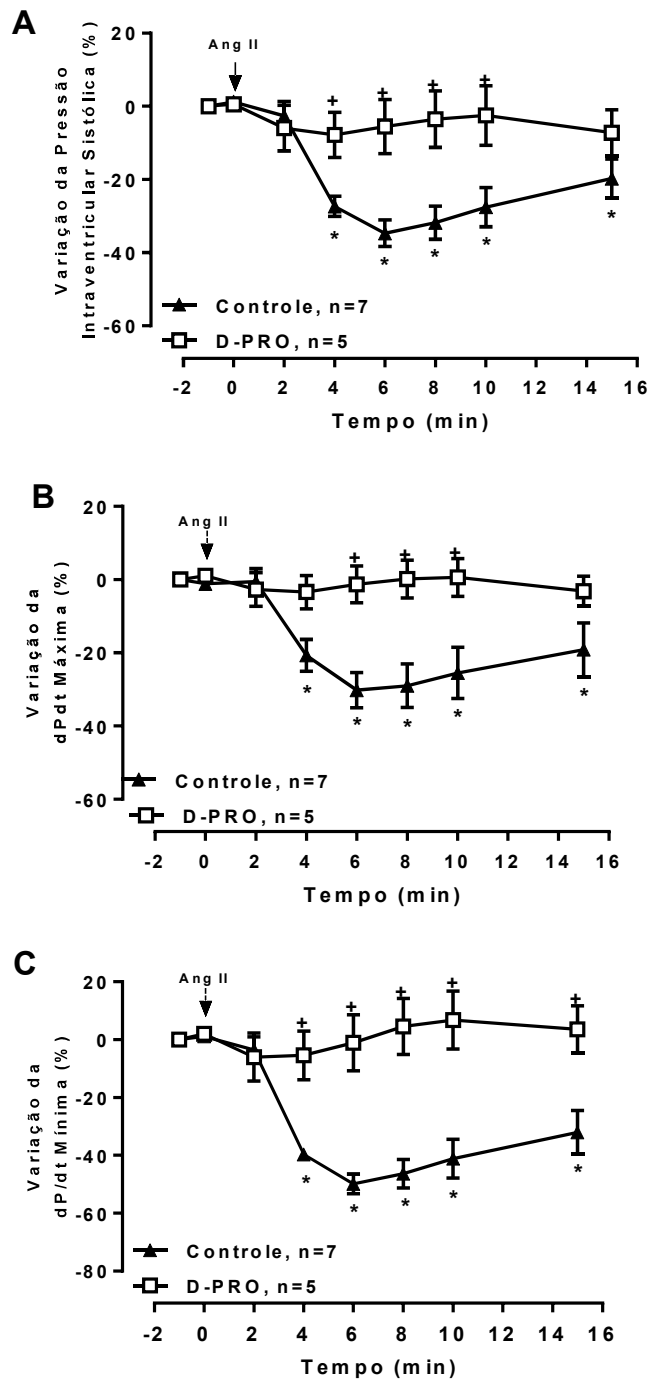


Figura 23 – Efeitos da Ang II na presença e ausência de D-PRO na contratilidade cardíaca em corações isolados de ratos. **(A)** Pressão Intraventricular Sistólica, **(B)** dP/dt Máxima, **(C)** dP/dt Mínima. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média. Two-Way Anova seguido pelos pós-testes de Dunnett's e Sidak. * $p < 0,05$ vs período basal e + $p < 0,05$ vs controle no respectivo tempo.

4.9. Influência do óxido nítrico no efeito inotrópico negativo desencadeado pela Ang II

Assim como nos experimentos utilizando Ang-(1-7), avaliamos o envolvimento do NO na resposta inotrópica negativa desencadeada por Ang II. Para isso, os corações foram perfundidos com L-Name. Após o período de estabilização os corações foram perfundidos com Ang II 20 pmol/L durante 15.

Ao contrário dos efeitos observados com Ang-(1-7), o L-Name não inibiu os efeitos inotrópicos negativos da Ang II (Figura 24).

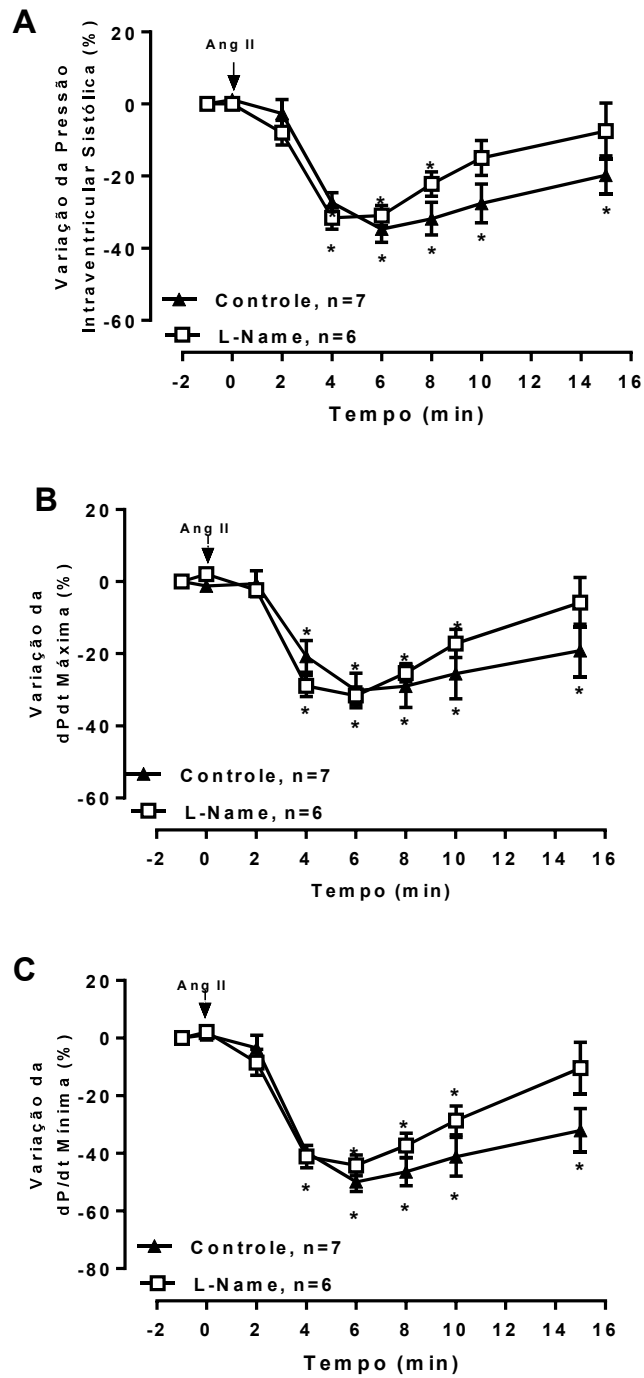


Figura 24 – Efeitos da Ang II na presença e ausência de L-Name na contratilidade cardíaca em corações isolados de ratos. (A) Pressão Intraventricular Sistólica, (B) dP/dt Máxima, (C) dP/dt Mínima. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média. Two-Way Anova seguido pelos pós-testes de Dunnett's e Sidak. * $p < 0,05$ vs período basal.

4.10. Participação das enzimas Adenilato ciclase (AC) e Guanilato ciclase (GC) no efeito inotrópico negativo desencadeado pela Ang II.

Para avaliar a participação das enzimas AC e GC, os corações isolados de ratos Wistar foram perfundidos com MDL 12,330A e ODQ respectivamente, após o período de estabilização foi infundido Ang II 20 pmol/L durante 1 minutos.

Diferentemente dos efeitos obtidos com Ang-(1-7), o MDL 12,330A e ODQ não conseguiram inibir o efeito inotrópico negativo da Ang II (Figura 25 A-F).

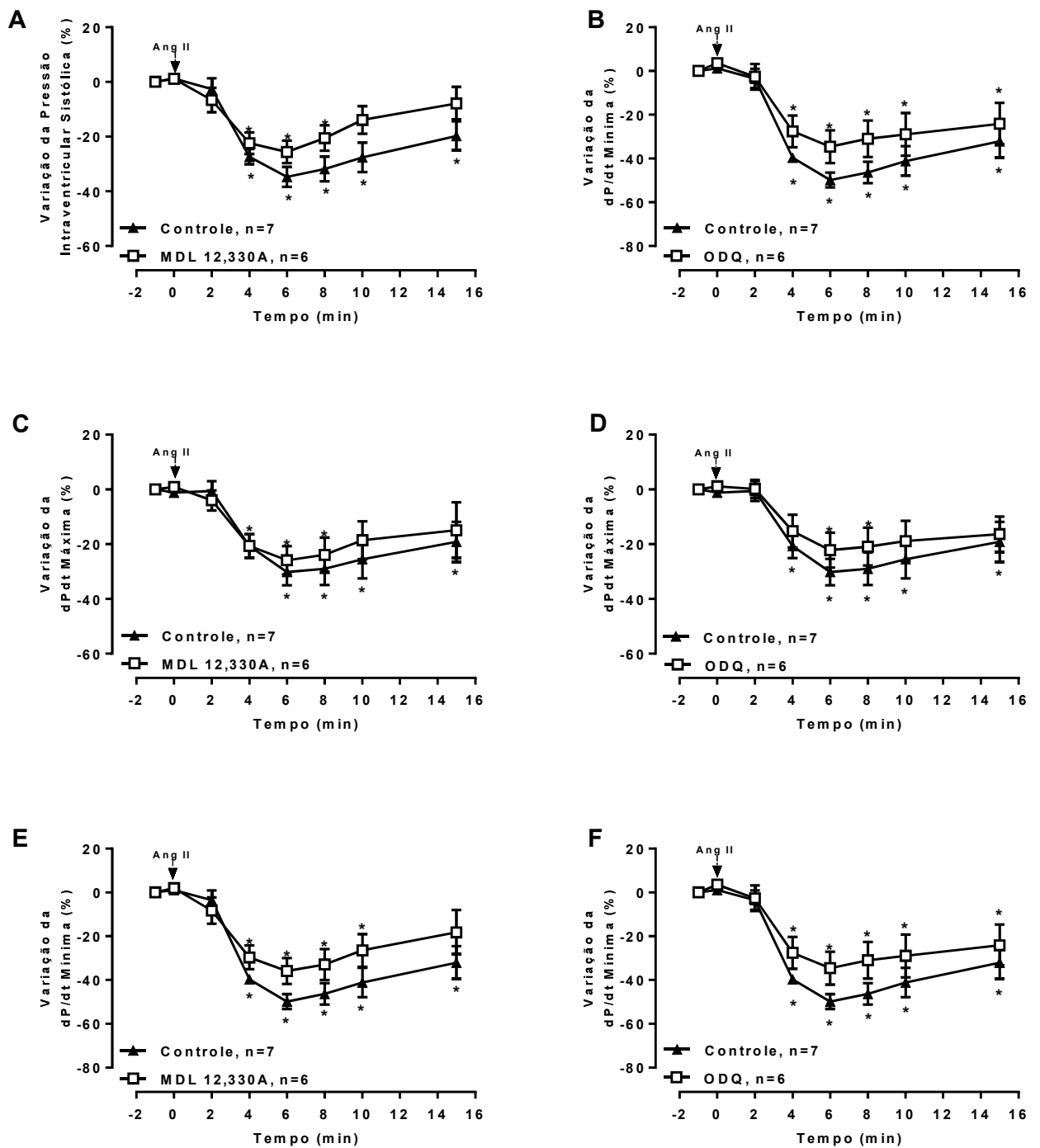


Figura 25 – Efeitos da Ang II na presença e ausência de MDL12,330A (gráficos a esquerda) e ODQ (gráficos a direita) na contratilidade cardíaca em corações isolados de ratos. (**A e B**) Pressão Intraventricular Sistólica, (**C e D**) dP/dt Máxima, (**E e F**) dP/dt Mínima. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média. Two-Way Anova seguido pelo pós-teste de Dunnett's. * $p < 0,05$ vs período basal.

4.11. Efeito inotrópico negativo desencadeado por ativação dos receptores MrgD e AT2.

Para confirmar a participação dos receptores MrgD no efeito inotrópico negativo, os corações foram perfundidos com o agonista do receptor, Alamandina, na concentração equimolar à utilizada com a Ang-(1-7) e Ang II. Como observado na figura 26 A-C, a Alamandina provocou efeito inotrópico negativo em corações isolados de ratos, esse efeito foi bloqueado quando os corações foram pré-perfundidos com D-PRO.

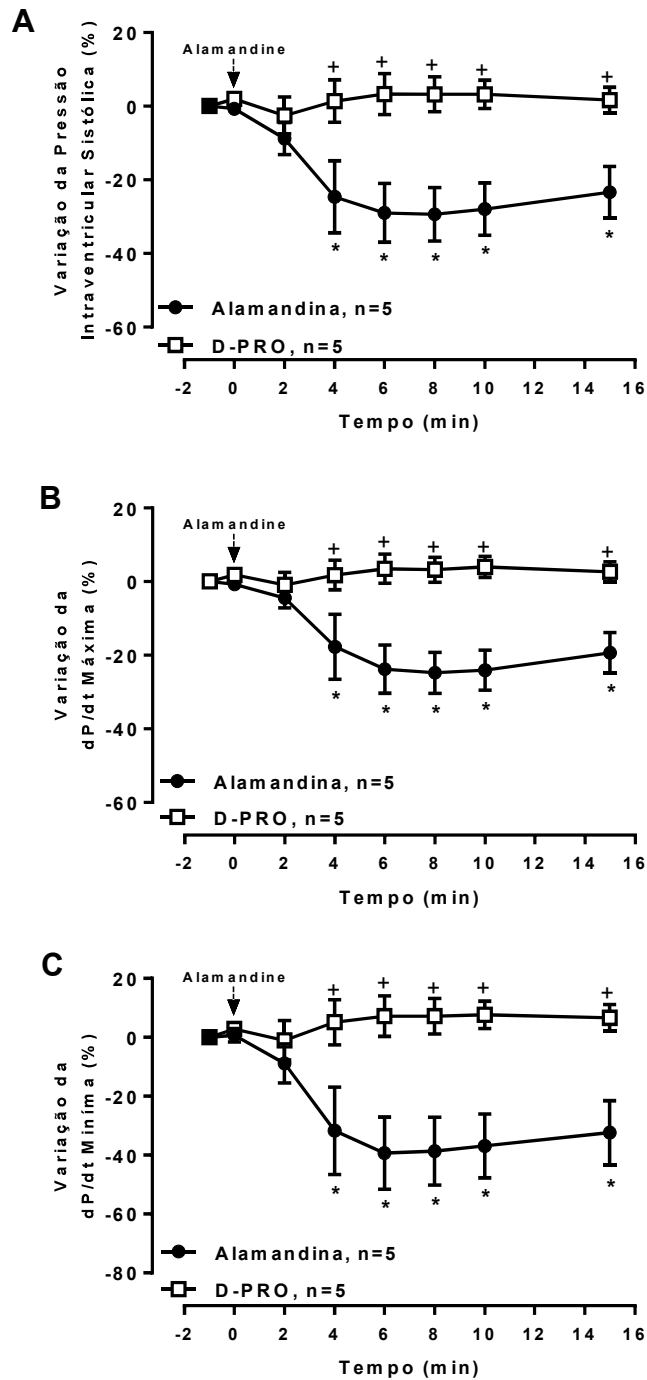


Figura 26 – Efeitos da Alamandina na presença e ausência de D-PRO na contratilidade cardíaca em corações isolados de ratos. **(A)** Pressão Intraventricular Sistólica, **(B)** dP/dt Máxima, **(C)** dP/dt Mínima. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média. Two-Way Anova seguido pelos pós-testes de Dunnett's e Sidak. * $p < 0,05$ vs período basal e + $p < 0,05$ vs controle no respectivo tempo.

Para avaliar a participação do receptor AT₂ no controle do inotropismo cardíaco, os corações foram perfundidos com o agonista específico deste receptor, o

composto 21 (C21). O C21 promoveu efeito inotrópico negativo em corações isolados de ratos. Esse efeito foi inibido na presença de PD123319 (Figura 27 A-C).

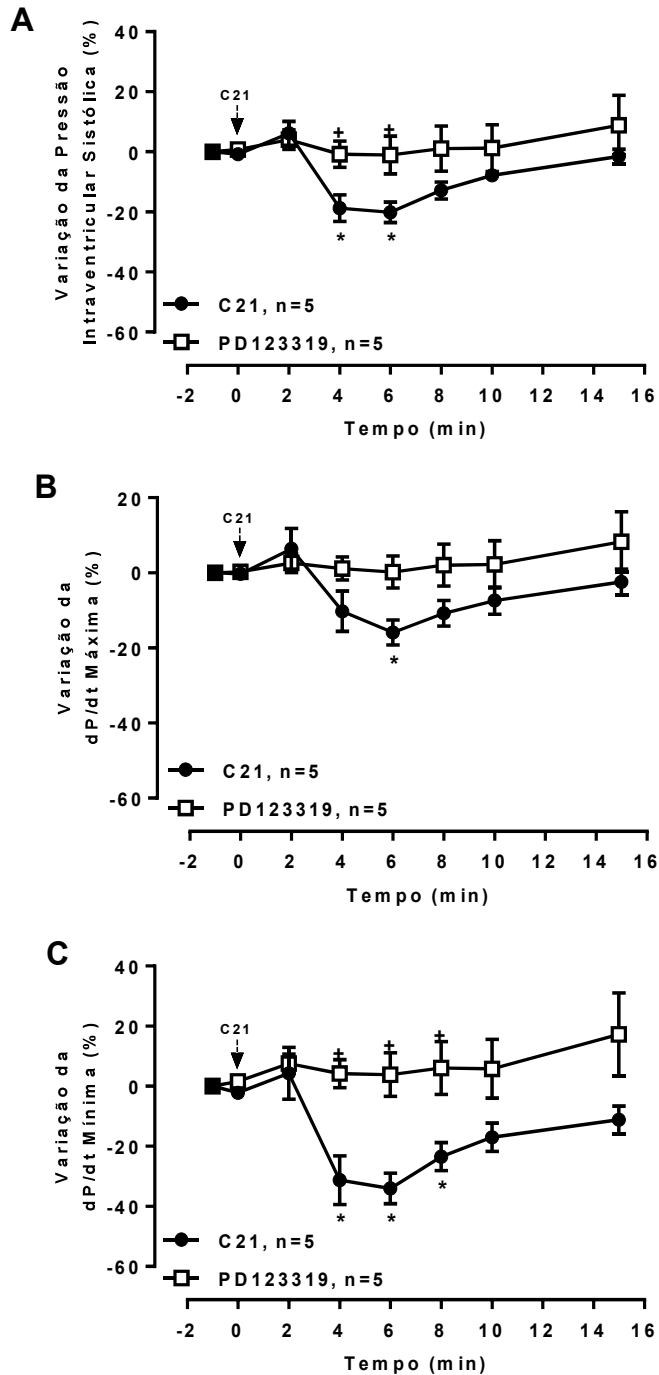


Figura 27 – Efeitos do C21 na presença e ausência de PD123319 na contratilidade cardíaca em corações isolados de ratos. (A) Pressão Intraventricular Sistólica, (B) dP/dt Máxima, (C) dP/dt Mínima. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média. Two-Way Anova seguido pelos pós-testes de Dunnett's e Sidak. * $p < 0,05$ vs período basal e + $p < 0,05$ vs controle no respectivo tempo.

4.12. Avaliação da frequência cardíaca em corações isolados de ratos perfundidos com Ang-(1-7) ou Ang II na presença de inibidores ou antagonistas.

Como observado na figura 28, a Ang-(1-7) e Ang II não promoveram alterações na frequência cardíaca de corações isolados de ratos Wistar.

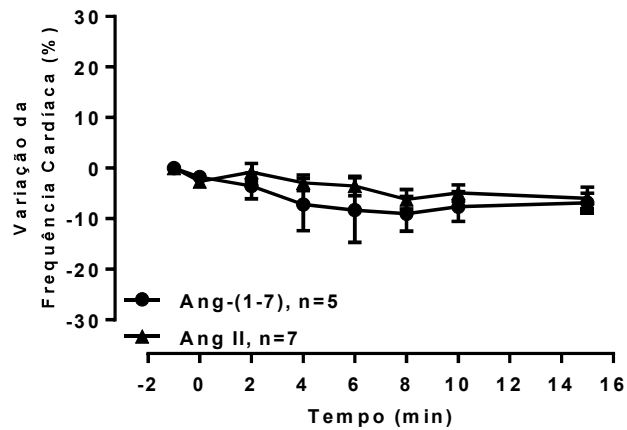


Figura 28 – Efeitos da Ang-(1-7) e Ang II na Frequência Cardíaca de corações isolados de ratos. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média. Two-Way Anova seguido pelos pós-testes de Dunnett's e Sidak.

Nenhum antagonista dos receptores angiotensinérgicos induziram alterações na FC de corações isolados de ratos na presença de Ang II ou Ang-(1-7) (Figura 29).

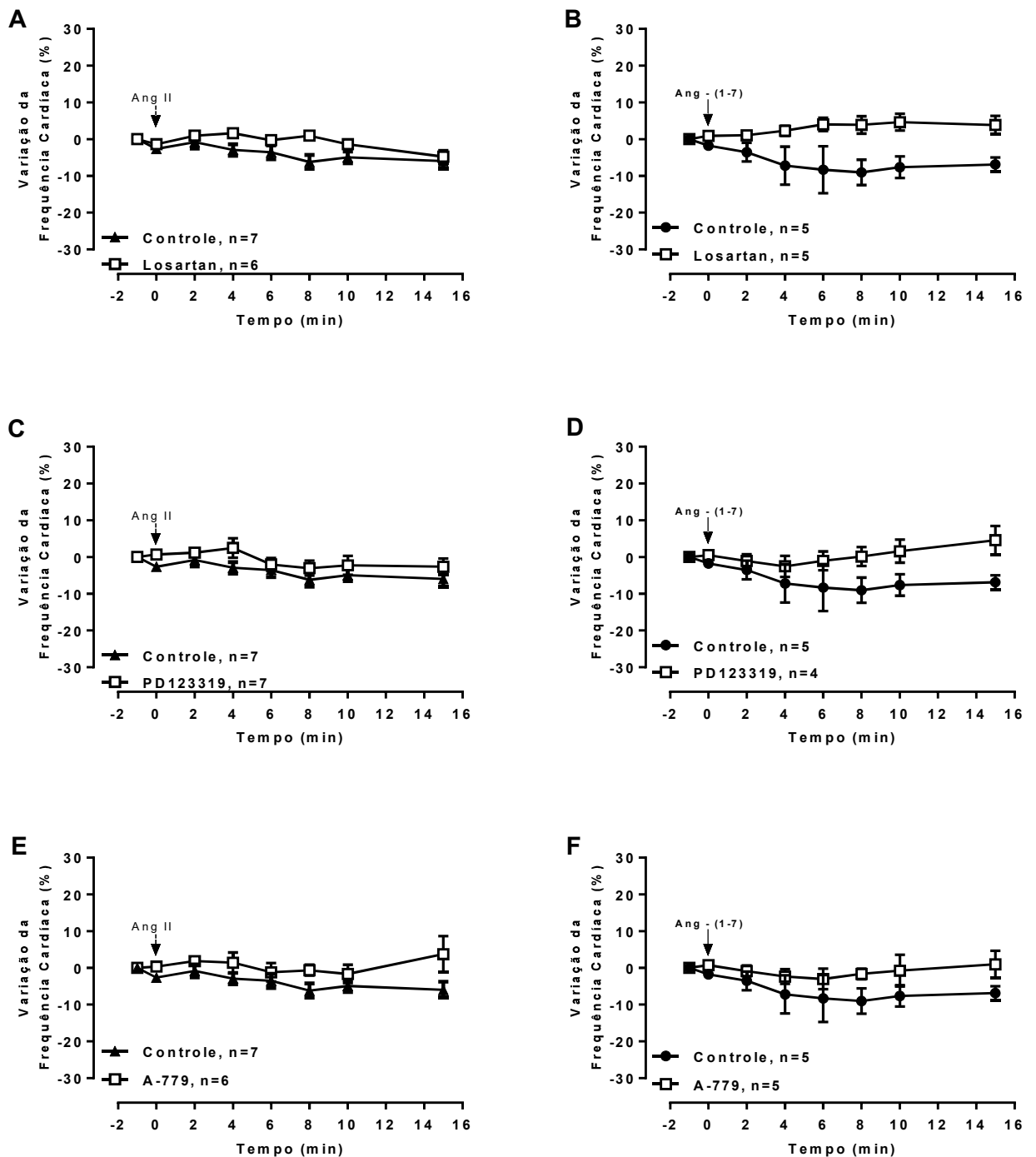


Figura 29 – Efeitos da Ang II e Ang-(1-7) na presença e ausência de Losartan (**A** e **B**), PD123319 (**C** e **D**) e A-779 (**E** e **F**) na Frequência Cardíaca de corações isolados de ratos. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média. Two-Way Anova seguido pelos pós-testes de Dunnett's e Sidak.

Os inibidores L-Name, ODQ e MDL 12,330A não alteraram a FC em corações isolados de ratos Wistar, perfundidos com Ang II ou Ang-(1-7) (Figura 30).

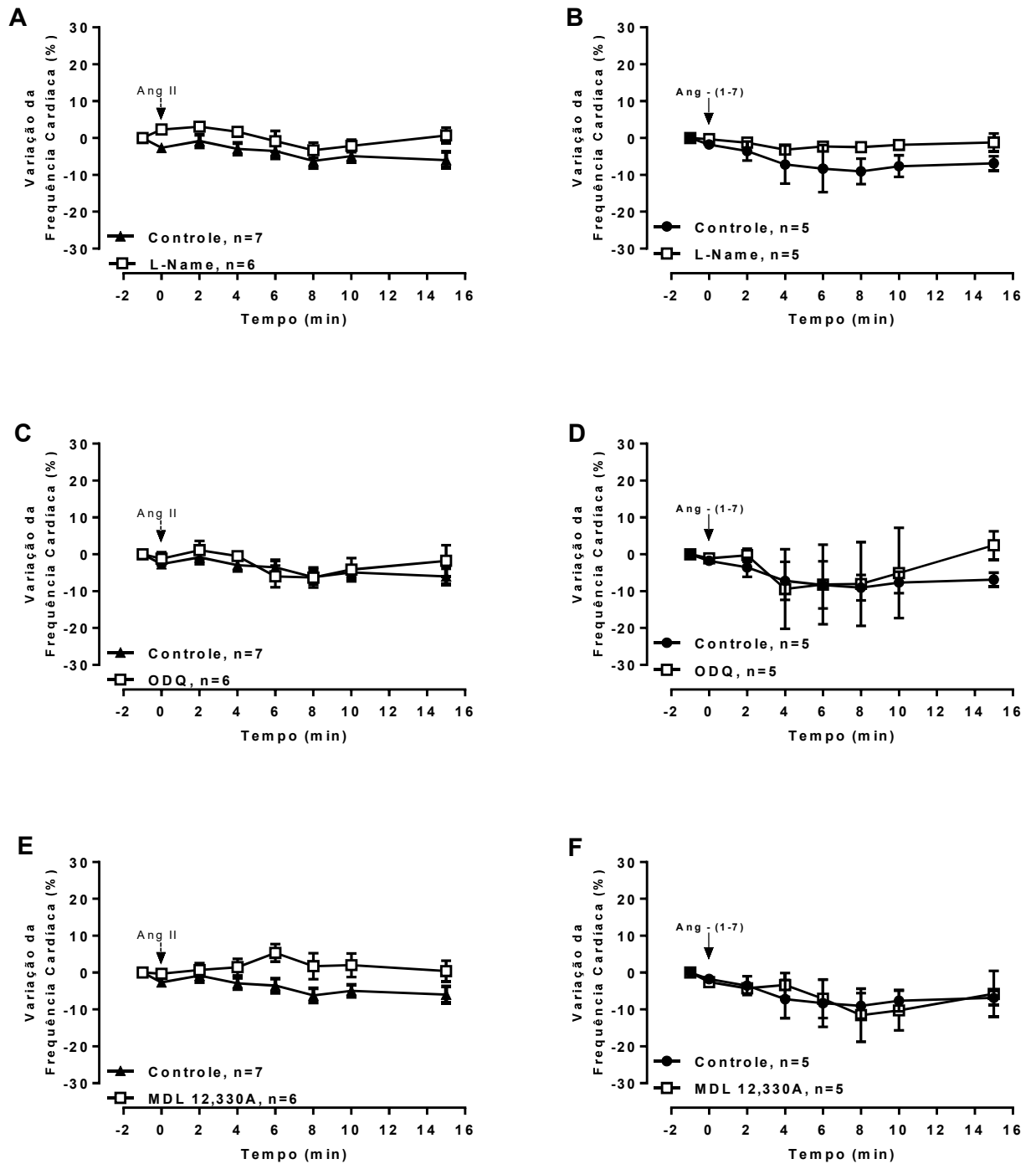


Figura 30 – Efeitos da Ang II e Ang-(1-7) na presença e ausência de L-Name (**A** e **B**), ODQ (**C** e **D**) e MDL 12,330A (**E** e **F**) na Frequência Cardíaca de corações isolados de ratos Wistar. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média. Two-Way Anova seguido pelos pós-testes de Dunnett's e Sidak.

4.13. Efeitos da Ang II e Ang-(1-7) na vasomotricidade coronariana de corações isolados de ratos Wistar

Para avaliar o efeito dos peptídeos angiotensinérgicos na vasomotricidade coronariana, os corações foram perfundidos com Ang-(1-7) ou Ang II 20 pmol/L durante 15 minutos, após o período de estabilização.

Como demonstrado na figura 31, ambos os peptídeos promoveram vasodilatação coronariana.

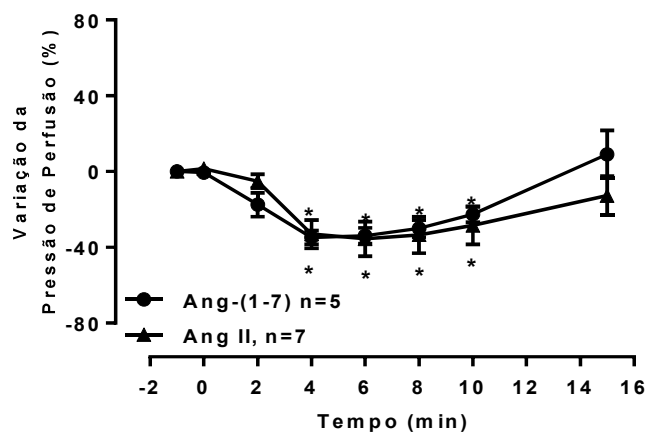


Figura 31 – Efeitos da Ang-(1-7) e Ang II na vasomotricidade coronariana em corações isolados de ratos. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média. Two-Way Anova seguido pelos pós-testes de Dunnett's e Sidak. * $p < 0,05$ vs período basal.

4.14. Participação dos receptores angiotensinérgicos nos efeitos da Ang-(1-7) e Ang II na vasomotricidade coronariana de corações isolados de ratos

Para avaliar a participação dos receptores AT1, AT2 e Mas nos efeitos da Ang-(1-7) e Ang II na vasomotricidade coronariana, os corações foram pré-perfundidos com Losartan, PD123319 e A-779.

O Losartan (Figura 32A), PD123319 (Figura 32C) e A-779 (Figura 32E) inibiram completamente a vasodilatação induzida por Ang-(1-7). No entanto, o Losartan (Figura 32B) e o PD123319 (Figura 32D) atenuaram a vasodilatação coronariana induzida por Ang II. Diferentemente, o A-779 bloqueou esse efeito da Ang II (Figura 32F).

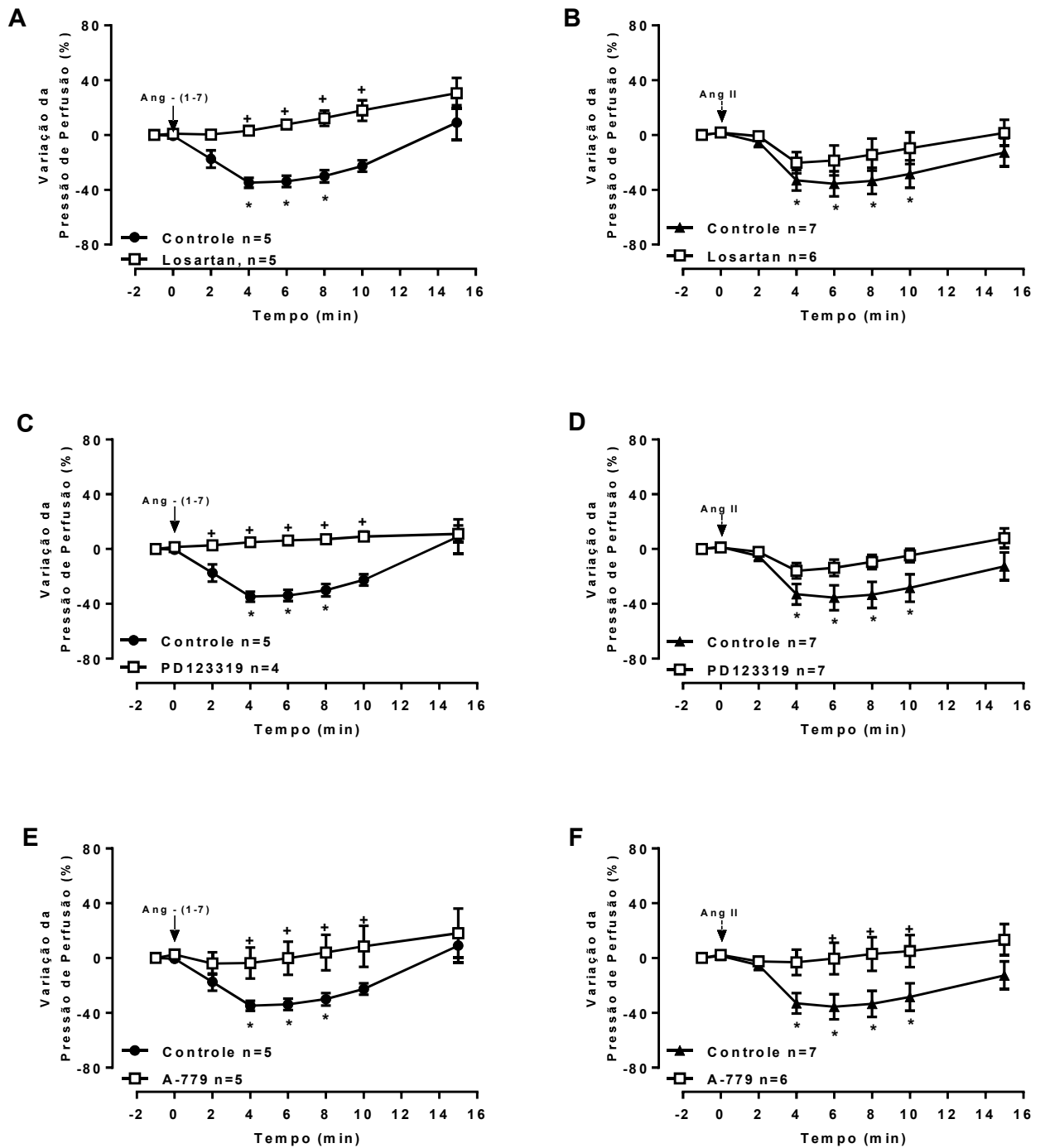


Figura 32 – Efeitos da Ang-(1-7) e Ang II na presença e ausência de Losartan (A e B), PD123319 (C e D) e A-779 (E e F) na vasomotricidade coronariana de corações isolados de ratos. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média. Two-Way Anova seguido pelos pós-testes de Dunnett's e Sidak. * $p < 0,05$ vs período basal, + $p < 0,05$ vs controle no respectivo tempo.

4.15. Participação do receptor MrgD na vasodilatação coronariana induzida por Ang-(1-7) e Ang II.

Para verificar a participação do receptor MrgD na vasodilatação coronariana induzida por Ang-(1-7) e Ang II, os corações foram perfundidos com D-PRO seguido por Ang-(1-7) ou Ang II durante 15 minutos após o período de estabilização.

Como pode ser observado na figura 33 A-B o bloqueio do receptor MrgD inibe o efeito vasodilatador de ambos os peptídeos angiotensinérgicos utilizados neste estudo.

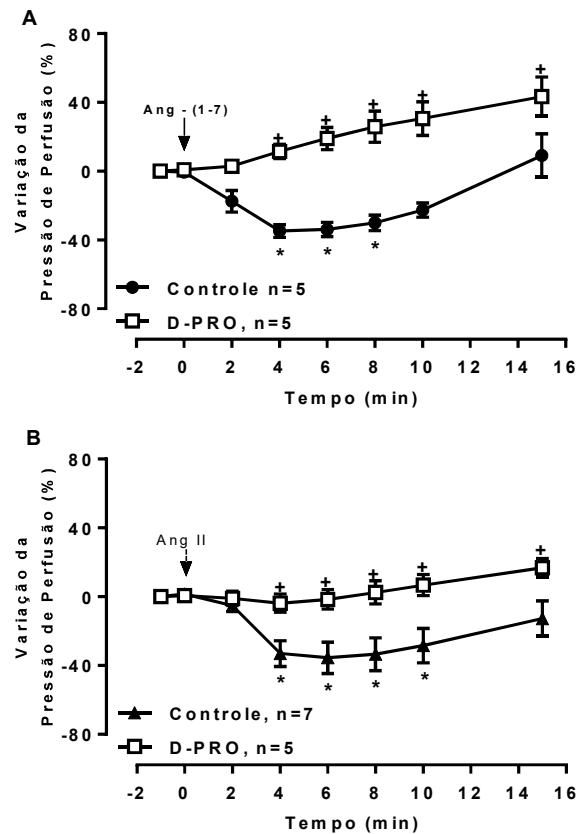


Figura 33 – Efeitos da Ang II (**A**) e Ang-(1-7) (**B**) na presença e ausência de D-PRO na vasomotricidade coronariana de corações isolados de ratos. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média. Two-Way Anova seguido pelos pós-testes de Dunnett's e Sidak. * $p < 0,05$ vs período basal, + $p < 0,05$ vs controle no respectivo tempo.

4.16. Atuação da ECA2 na vasodilatação coronariana induzida por Ang II.

Como demonstrado anteriormente, o bloqueio do receptor Mas inibe a resposta vasodilatadora induzida por Ang II. Diante disso, analisamos se a ECA2 participaria da vasodilatação coronariana induzida por Ang II provavelmente, clivando Ang II em Ang-(1-7). Portanto, foi utilizado o inibidor da ECA2 o DX600 (2nmol/L).

Como observado na figura 34 a inibição da ECA2 bloqueia a vasodilatação induzida por Ang II.

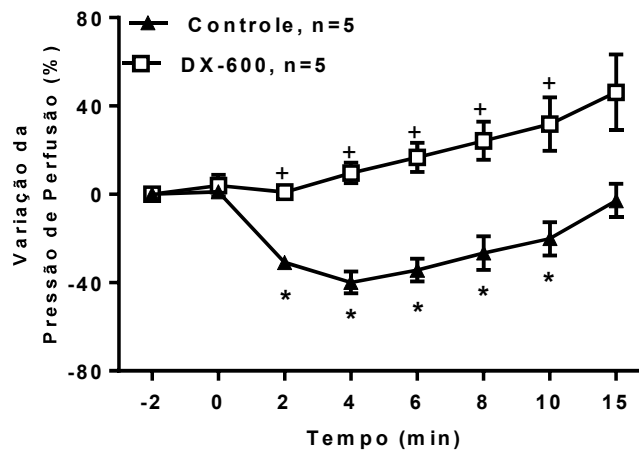


Figura 34 – Efeitos da Ang II na presença e ausência de DX600 na vasomotricidade coronariana de corações isolados de ratos. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média. Two-Way Anova seguido pelos pós-testes de Dunnett's e Sidak. * $p < 0,05$ vs período basal, + $p < 0,05$ vs controle no respectivo tempo.

4.17. Influência do NO e das enzimas AC e GC na vasodilatação coronariana induzida por Ang-(1-7) e Ang II.

Para avaliar a participação do NO e das enzimas AC e GC na vasodilatação coronariana induzida pela Ang-(1-7) e Ang II os corações foram perfundidos com L-Name, MDL 12,330A e ODQ respectivamente, seguidos por Ang-(1-7) ou Ang II durante 15 minutos após o período de estabilização.

O L-Name (Figura 35A-B) e o MDL 12,330A (Figura 35E-F) inibiram a resposta vasodilatadora da Ang-(1-7) e Ang II. No entanto o ODQ inibiu apenas a

resposta vasodilatadora induzida por Ang-(1-7) e atenuando a resposta da Ang II (Figura 35C-D).

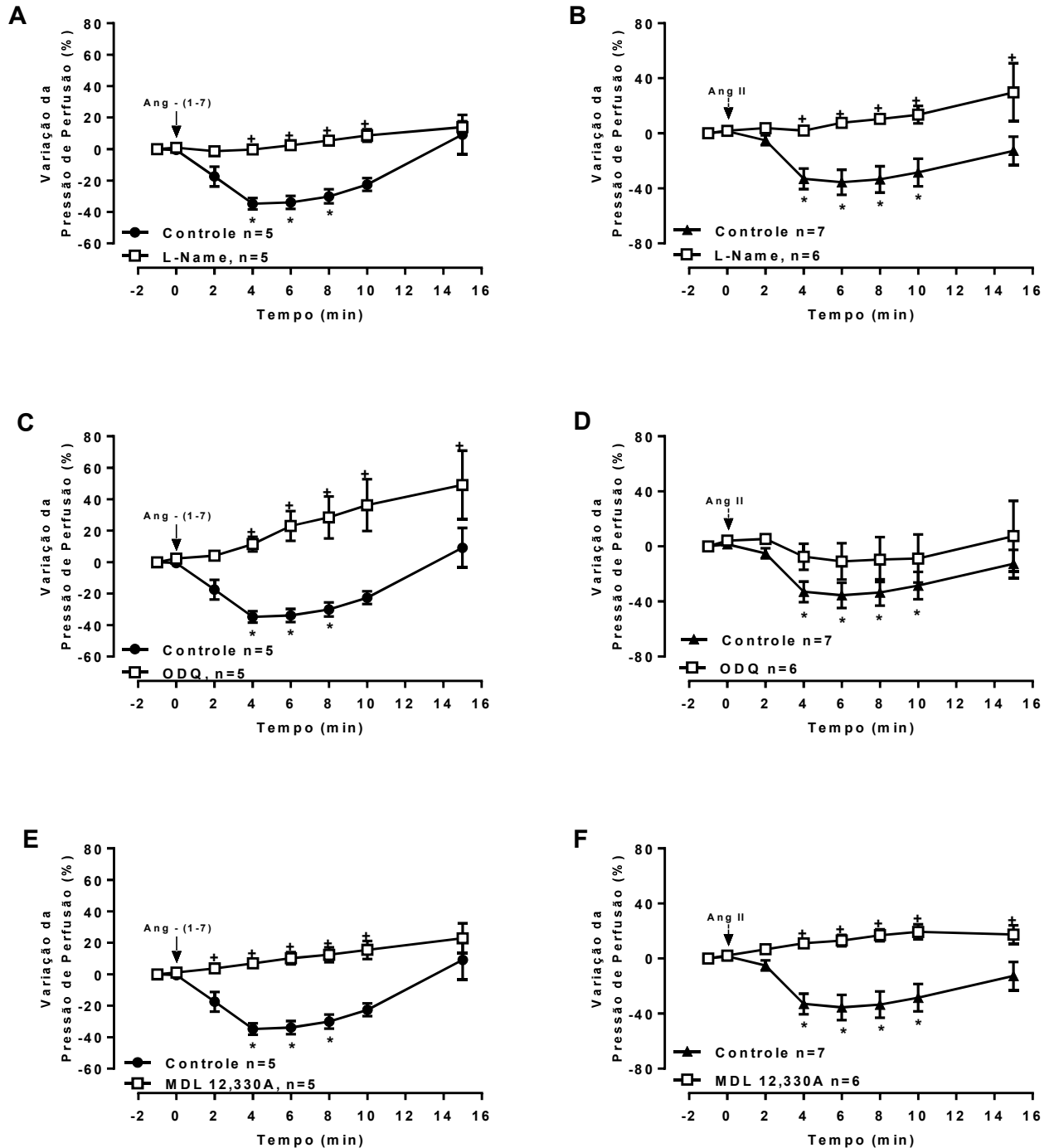


Figura 35 – Efeitos da Ang-(1-7) e Ang II na presença e ausência de L-Name (A e B), ODQ (C e D) e MDL 12,330A (E e F) na vasomotricidade coronariana de corações isolados de ratos. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média. Two-Way Anova seguido pelos pós-testes de Dunnett's e Sidak. * $p < 0,05$ vs período basal, + $p < 0,05$ vs controle no respectivo tempo.

4.18. Efeitos coronarianos da Alamandina e C21.

Para confirmar a participação dos receptores MrgD e AT2 na vasodilatação coronariana promovida por Ang-(1-7) e Ang II, os corações foram perfundidos com alamandina e C21, agonistas dos receptores MrgD e AT2 respectivamente, em concentrações picomolares (20 pmol/L).

Como observado na figura 36 A-B, a alamandina e o C21 promoveram efeito vasodilatador coronariano. Esse efeito foi bloqueado quando os corações foram pré-perfundidos com os antagonistas D-PRO ou PD123319.

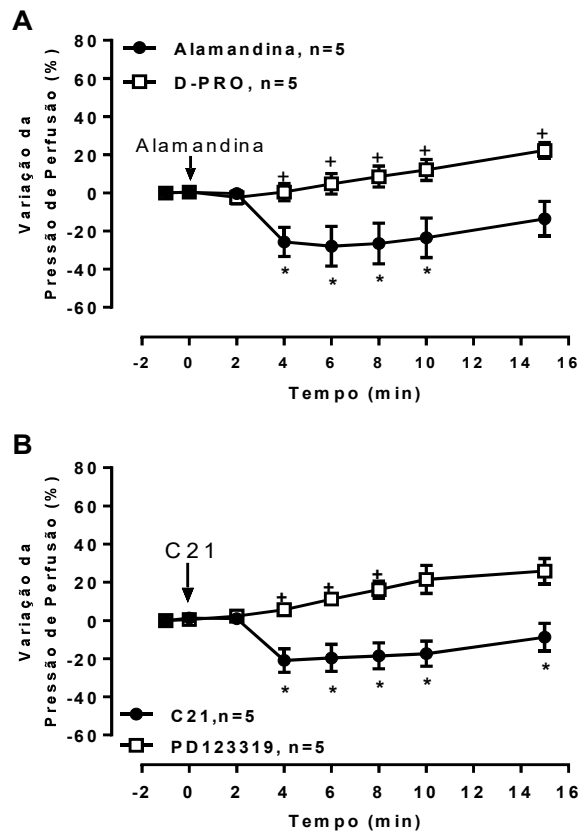


Figura 36 – Efeito da Alamandina (**A**) e C21 (**B**) na presença e ausência de D-PRO ou PD123319 respectivamente, na vasomotricidade coronariana de corações isolados de ratos. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média. Two-Way Anova seguido pelos pós-testes de Dunnett's e Sidak. * $p < 0,05$ vs período basal, + $p < 0,05$ vs controle no respectivo tempo.

A representação simplificada dos resultados de investigação dos mecanismos de ação nos efeitos inotrópicos negativos e vasodilatadores coronarianos da Ang-(1-7) e Ang II estão descritos na tabela 8.

Tabela 8. Efeitos da Ang-(1-7) e Ang II na contratilidade cardíaca e vasomotricidade coronariana

| Peptídeos | Efeito | Losartan | PD123319 | A-779 | D-PRO | DX600 | L-Name | ODQ | MDL |
|--|---------------------------|-----------------|-----------------|--------------|--------------|--------------|---------------|------------|------------|
| Contratilidade Cardíaca | | | | | | | | | |
| Ang-(1-7) | Inotropismo negativo | B | B | NB | B | - | B | B | B |
| Ang II | Inotropismo negativo | NB | NB | NB | B | - | NB | NB | NB |
| Pressão de Perfusão Coronariana | | | | | | | | | |
| Ang-(1-7) | Vasodilatação coronariana | B | B | B | B | - | B | B | B |
| Ang II | Vasodilatação coronariana | A | A | B | B | B | B | A | B |

(B) bloqueio dos efeitos dos peptídeos Ang-(1-7) e Ang II, (NB) Não bloqueia os efeitos dos peptídeos Ang-(1-7) e Ang II, (A) atenuação dos efeitos dos peptídeos Ang-(1-7) e Ang II, (-) não foi avaliado. Losartan antagonista do receptor AT1; PD123319 antagonista AT2; A-779 antagonista do receptor Mas; D-PRO antagonista do receptor MrgD; DX600 inibidor da ECA2; L-Name inibidor da NOS; ODQ inibidor da Guanilato Ciclase e MDL inibidor da Adenilato Ciclase.

4.19. Efeito do bloqueio farmacológico dos receptores AT1, AT2 e Mas na ativação de AKT induzida por Angiotensina-(1-7).

Diante da influência dos receptores angiotensinérgicos e do NO na vasodilatação coronariana induzida por Ang-(1-7) em corações isolados de ratos, células endoteliais humanas foram utilizadas para avaliar a relação dos principais receptores angiotensinérgicos na vasodilatação promovida por Ang-(1-7).

Inicialmente, foi realizada uma curva concentração-resposta de Ang-(1-7) visando estabelecer o maior nível de ativação da proteína AKT. Como observado na figura 37, a concentração de 20 pmol/L de Ang-(1-7) aumentou significativamente a fosforilação da AKT em células endoteliais humanas.

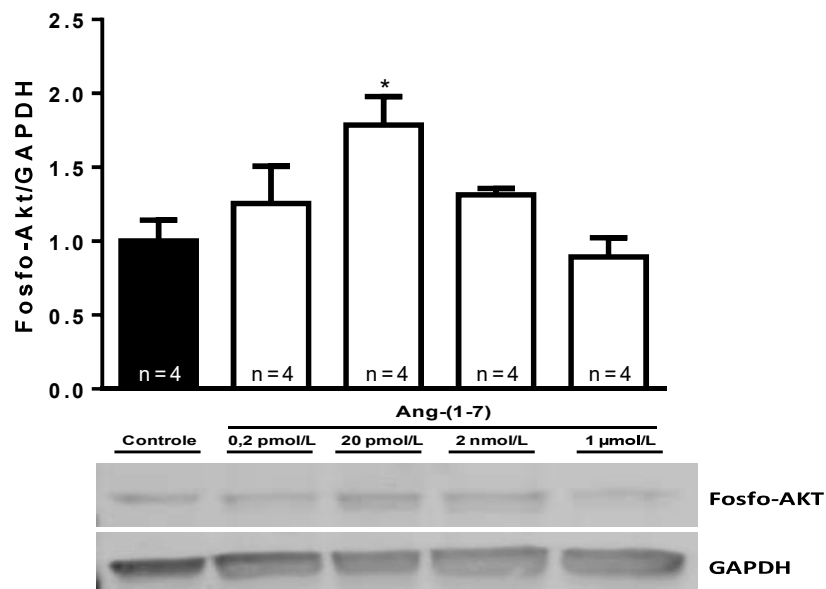


Figure 37 – Análise da expressão de AKT fosforilada (Fosfo-AKT) em células endoteliais humanas estimuladas com diferentes concentrações de Ang-(1-7) durante 10 minutos. Os dados foram expressos em média ± erro padrão da média. One-way Anova seguido pelo pós-teste de Dunnett's. * $p < 0,05$ vs controle.

Em seguida, para investigar uma possível interação entre os receptores angiotensinérgicos no efeito da Ang-(1-7) na fosforilação da AKT, o bloqueio farmacológico com Losartan (1 μmol/L) ou PD123319 (2 nmol/L) ou A-779 (2 nmol/L) foi realizado 10 a 5 minutos antes da incubação com Ang-(1-7) 20 pmol/L por 10 minutos.

O bloqueio farmacológico dos receptores AT1, AT2 e Mas inibiu o aumento da fosforilação da AKT induzida pela Ang-(1-7) (Figura 38).

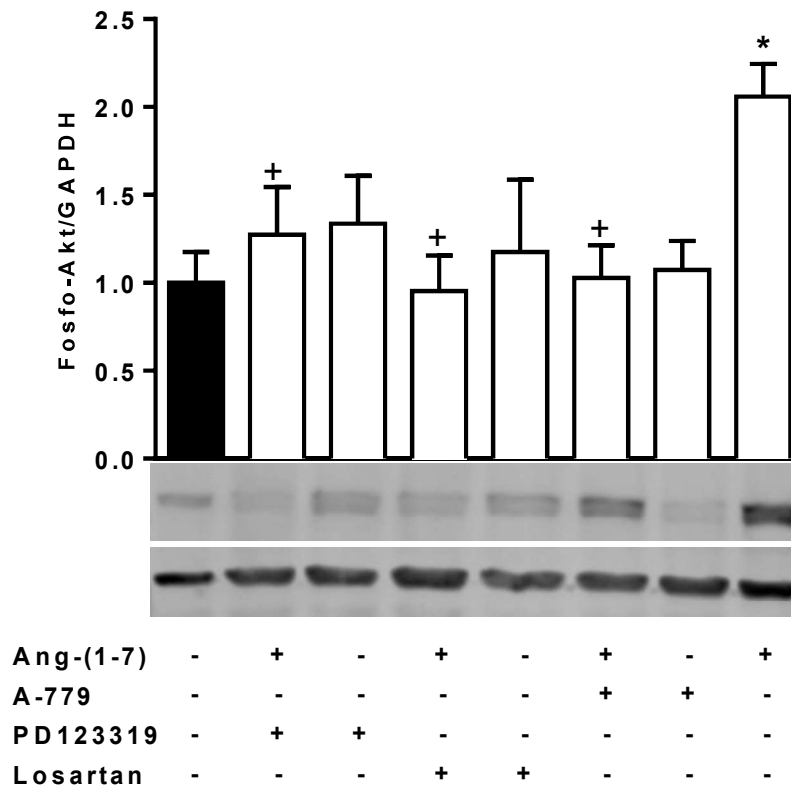


Figura 38 - Análise da expressão de AKT fosforilada (Fosfo-AKT) em células endoteliais humanas estimuladas com Ang-(1-7) na presença ou ausência de Losartan ou PD123319 ou A-779 durante 10 minutos. (+) significa presença e (-) ausência dos peptídeos ou drogas utilizadas. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da medi. One-way Anova seguido pelo pós-teste de Dunnett's. * $p < 0,05$ vs controle, + $p < 0,05$ vs Ang-(1-7).

Para avaliar a influência da Ang II na fosforilação da AKT, uma curva concentração-resposta de Ang II foi realizada nas células endoteliais humanas. Como observado na figura 39, a concentração de 20 pmol/L de Ang II não promove nenhuma alteração na fosforilação da AKT.

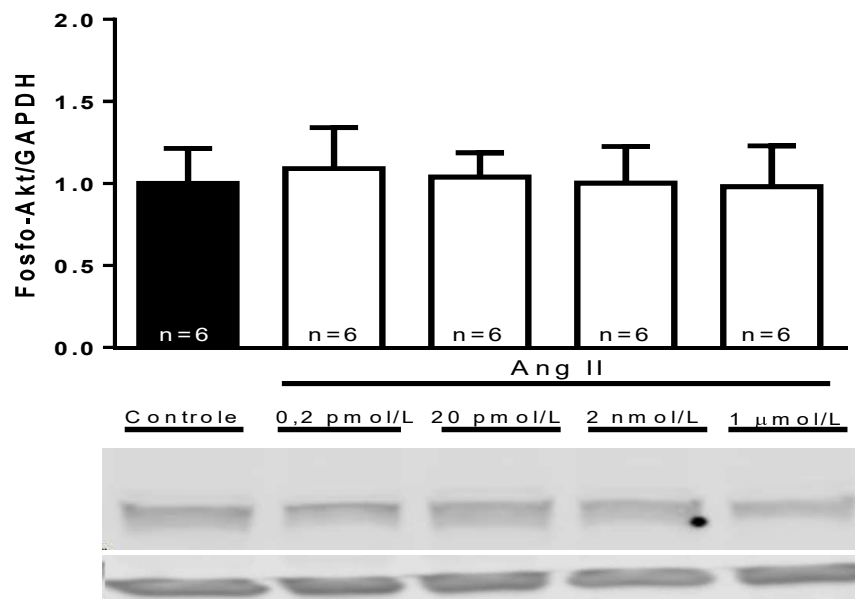


Figure 39 – Análise da expressão de AKT fosforilada (Fosfo-AKT) em células endoteliais humanas estimuladas com diferentes concentrações de Ang II durante 10 minutos. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média.

4.20. Influência do silenciamento gênico do receptor AT1 e Mas na fosforilação de AKT induzida por Ang-(1-7).

Para diminuir possíveis efeitos inespecíficos do bloqueio farmacológico e confirmar a influência do receptor AT1 e Mas nos efeitos da Ang-(1-7), as células endoteliais humanas foram submetidas ao silenciamento do RNA mensageiro dos receptores AT1 (siRNA AT1) e Mas (siRNA Mas). O silenciamento foi confirmado com a diminuição da expressão dos receptores através da técnica de western blot (Figura 40 A e B).

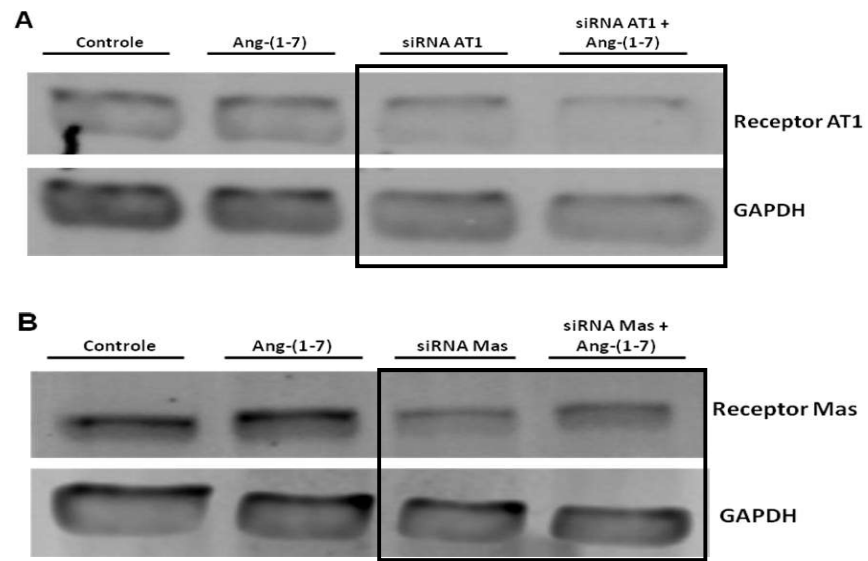


Figura 40 – Silenciamento do RNA mensageiro dos (A) receptor AT1 e (B) receptor Mas.

Após o silenciamento, as células foram estimuladas com Ang-(1-7) 20 pmol/L durante 20 minutos. Como resultados, o silenciamento dos genes dos receptores AT1 (Figura 41 A) e Mas (Figura 41 B) inibiu a fosforilação de AKT induzida por Ang-(1-7).

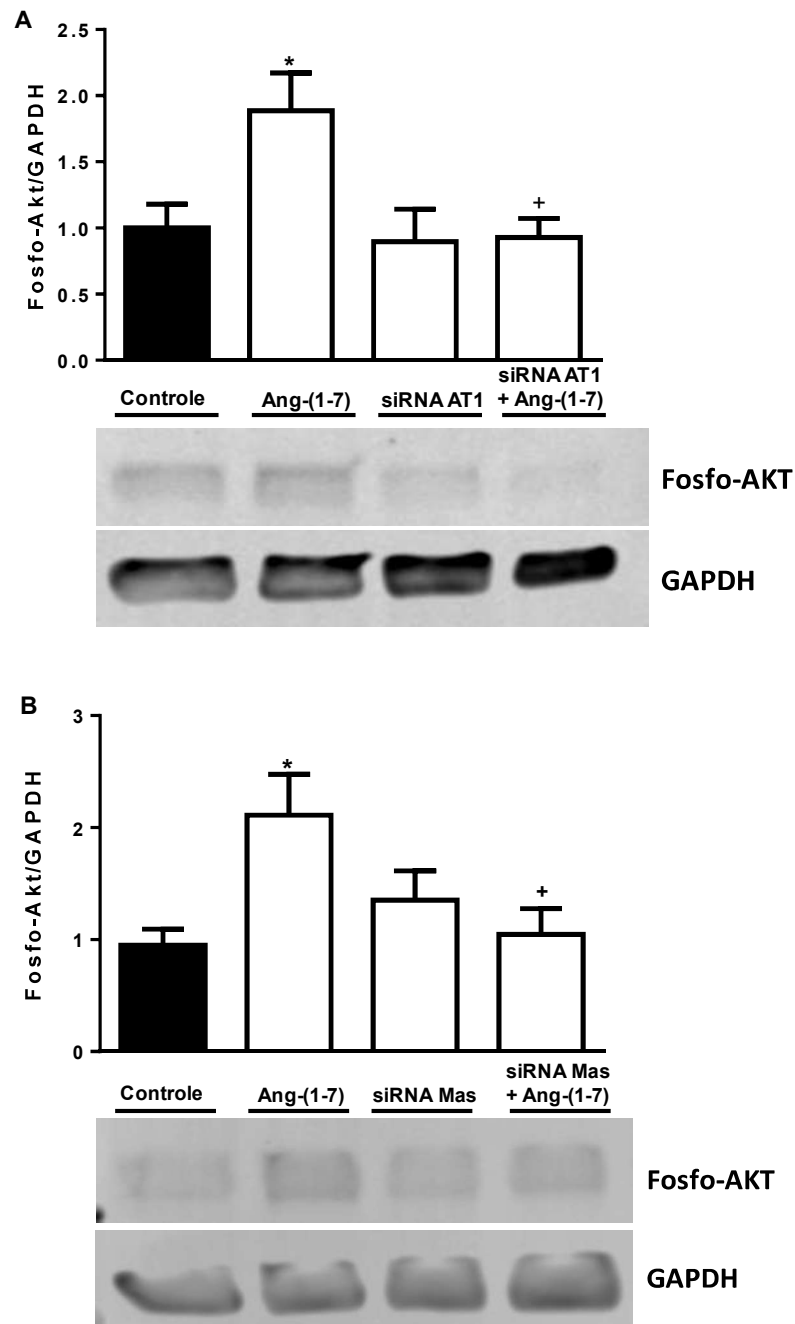


Figura 41 - Análise da expressão de AKT fosforilada (Fosfo-AKT) em células endoteliais humanas estimuladas com Ang-(1-7) na presença ou ausência do silenciamento do RNA mensageiro dos receptores (A) Mas e (B) AT1. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da medi. One-way Anova seguido pelo pós-teste de Sidak. * $p < 0,05$ vs controle, + $p < 0,05$ vs Ang-(1-7).

5. DISCUSSÃO

Os principais achados deste estudo foram: (1) Ang-(1-7) e Ang II em baixas doses promovem efeito inotrópico negativo em ratos Wistar anestesiados independente de alterações na PAM e FC; (2) Ang-(1-7) e Ang II em concentrações picomolares promovem efeito inotrópico negativo e vasodilatação coronariana em corações isolados de ratos; (3) O efeito inotrópico negativo da Ang-(1-7) não foi influenciado pelo bloqueio do receptor Mas; (4) O bloqueio dos receptores AT1, AT2 e MrgD inibiram a resposta inotrópica negativa promovida por Ang-(1-7); (5) Na presença de inibidores da eNOS, GC e AC o efeito inotrópico negativo induzido por Ang-(1-7) foi bloqueado; (6) O efeito inotrópico negativo da Ang II não foi bloqueado na presença dos antagonistas dos receptores AT1, AT2 e Mas; (7) O bloqueio do receptor MrgD inibe a resposta inotrópica negativa induzida por Ang II; (8) A inibição da eNOS, GC e AC também bloqueia o inotropismo negativo desencadeado por Ang II; (9) Os efeitos contráteis de ambos os peptídeos não foram influenciados por alterações na FC em corações isolados de ratos; (10) A vasodilatação coronariana induzida por Ang-(1-7) foi bloqueada na presença dos antagonistas dos receptores Mas, AT1, AT2, MrgD e inibidores das enzimas eNOS, GC e AC; (11) A vasodilatação coronariana promovida por Ang II foi bloqueada na presença dos antagonistas dos receptores Mas e MrgD; (12) Os antagonistas dos receptores AT1 e AT2 atenuaram a vasodilatação coronariana induzida por Ang II; (13) A inibição da ECA2 bloqueia o efeito da Ang II na vasomotricidade coronariana; (14) A vasodilatação coronariana promovida por Ang II foi bloqueada na presença de inibidores das enzimas eNOS e AC e atenuada na presença de inibidor da enzima GC; (15) Ang-(1-7) em baixa concentração induz a fosforilação da AKT em células endoteliais humanas; (16) Não houve alterações na fosforilação da AKT induzidas por Ang II; (17) O bloqueio farmacológico dos receptores angiotensinérgicos diminuíram a fosforilação de AKT induzida pela Ang-(1-7) em células endoteliais humanas; (18) O silenciamento dos genes dos receptores AT1 e Mas também reduziram a fosforilação de AKT em células endoteliais humanas.

5.1. Inotropismo negativo induzido por Ang-(1-7) e Ang II.

Em nosso estudo demonstramos que o inotropismo negativo desencadeado por baixas concentrações de Ang-(1-7) e Ang II em preparações *in vivo* ocorre por

mecanismos independentes de alterações na PAM e FC. Além disso, esses peptídeos promoveram inotropismo negativo em corações isolados de ratos, independentes de alterações na FC.

Poucos estudos têm proposto investigar os efeitos contráteis da Ang-(1-7). Castro-Chaves et al. (2009) utilizando Ang-(1-7) em concentrações micromolares em músculo cardíaco de coelhos demonstraram que, esse peptídeo pode promover efeito inotrópico negativo. Os autores concluíram que esse efeito pode ocorrer por mecanismos dependentes da ativação do receptor Mas e da síntese e liberação de NO (36). Sampaio et al. (2003) demonstraram que a infusão de Ang-(1-7), em concentrações fisiológicas, em ratos Wistar aumentou o débito cardíaco. No entanto, os autores afirmaram que esse efeito pode estar relacionado à diminuição da resistência periférica vascular promovida por Ang-(1-7) (115).

O efeito inotrópico da Ang-(1-7) têm sido muitas vezes relacionado à influência desse peptídeo na cinética do Ca^{2+} em cardiomiócitos (116). Sendo o Ca^{2+} o principal íon responsável pela contratilidade cardíaca, qualquer alteração nos níveis intracelulares ou na afinidade dos filamentos contráteis a esse íon pode desenvolver alterações na contratilidade. Dias-Peixoto et al. (2008) demonstraram em miócitos ventriculares que o tratamento agudo com Ang-(1-7) na concentração de 10 nmol/L não causou nenhuma alteração na cinética do Ca^{2+} . No entanto a deleção crônica do receptor Mas reduziu o transiente de Ca^{2+} e a expressão da SERCA (116). Alterações nas correntes de Ca^{2+} também foram descritas em modelos de superexpressão de Ang-(1-7). Nesse caso, a Ang-(1-7) aumentou o transiente de Ca^{2+} e a expressão da proteína SERCA, aumentando consequentemente a concentração de Ca^{2+} no RS (94).

Surpreendentemente, em nosso estudo demonstramos que o inotropismo negativo promovido por Ang-(1-7) não foi bloqueado na presença de A-779, o antagonista do receptor Mas. Entretanto, esse efeito foi bloqueado na presença de D-PRO, um antagonista do receptor MrgD. Recentemente descrito como receptor do peptídeo alamandina (64), estudos têm demonstrado que esse receptor também possui afinidade a Ang-(1-7) devido a sua alta similaridade ao receptor Mas (114). Como demonstrado por Tetzner et al. (2016), o antagonista do receptor MrgD, D-PRO, também pode inibir a ativação do receptor Mas. Essa participação do receptor

MrgD no inotropismo cardíaco foi confirmada pela utilização de alamandina. Em nosso estudo a alamandina promoveu inotropismo negativo semelhante a Ang-(1-7) e esse efeito foi bloqueado na presença do D-PRO. Dessa forma, esses resultados demonstram a importância dos receptores MrgD no inotropismo negativo provocado por concentrações picomolares de Ang-(1-7).

Ainda na classe dos receptores angiotensinérgicos, nossos resultados demonstraram que o bloqueio dos receptores AT2 e AT1 por PD123319 e Losartan respectivamente, foram capazes de inibir os efeitos cardíacos induzidos por Ang-(1-7) em concentrações picomolares. Diferentes mecanismos podem ajudar a explicar esses resultados. Primeiramente, os antagonistas podem ser inespecíficos em suas ligações. Além disso, pode ocorrer uma interação física e funcional entre os receptores angiotensinérgicos presentes nos cardiomiócitos. Numerosos estudos têm demonstrado que as ações da Ang-(1-7), tais como vasodilatação (117), redução da pressão arterial (118,119) e indução da síntese de NO (120), podem ser bloqueadas por antagonistas do receptor AT2 como o PD123319. Essa interação entre Ang-(1-7) e receptor AT2 tem sido alvo de controversos estudos. Recentemente, Tetzner et al.(2016) demonstraram que o antagonista PD123319 também é capaz de inibir os receptores Mas e MrgD, dois receptores de Ang-(1-7) (114). Assim, esses autores sugerem que os estudos relatando a participação do receptor AT2 nas respostas fisiológicas da Ang-(1-7) na verdade estavam descrevendo um possível bloqueio dos dois receptores causados pelo PD123319 (114). Ao contrário do sugerido por esse autor, nós demonstramos que a Ang-(1-7) pode estar atuando sobre o receptor AT2 visto que a inibição desse receptor aboliu o inotropismo negativo da Ang-(1-7), resultado não observado quando utilizamos o antagonista do receptor Mas. Reforçando a hipótese de participação do receptor AT2, nós demonstramos que a ativação direta desse receptor por seu agonista, o C21, induziu inotropismo negativo em corações isolados de ratos. Em conjunto, esses resultados sugerem que os efeitos da Ang-(1-7) podem estar relacionados à ativação direta do receptor AT2.

Além do receptor AT2, nossos resultados demonstraram também que o receptor AT1 pode estar envolvido no efeito inotrópico negativo desencadeado por Ang-(1-7) em concentrações picomolares, uma vez que, ao ser bloqueado a resposta contrátil foi inibida. De acordo com Galandrin et al. (2016) apesar de

modesta afinidade ao receptor AT1, a Ang-(1-7) pode se ligar a este receptor ativando a via da β -arrestina, sendo essa via, responsável por efeitos opostos aos desencadeados através da via AngII/AT1/Gq (121). A ativação de β -arrestina através do receptor AT1 é independente da ativação da proteína G e alguns análogos de Ang II como o Sar1-Ile4-Ile8-angiotensin (SII) tem sido descritos como agonistas tendenciosos para a via da β -arrestina, ou seja, agonistas do receptor AT1 incapazes de ativar sinalização celular através da proteína G, desencadeando respostas cardioprotetoras devido a ativação de vias relacionadas à β -arrestina. (122,123).

Diversos estudos têm proposto uma possível dimerização e interação funcional entre os receptores AT1 e Mas (87,124,125). Esses receptores acoplados à proteína G com sete domínios transmembrana podem formar homo ou heterodímeros com outros receptores presentes na membrana plasmática (68). Essa dimerização pode ser importante para determinar a função do receptor como, sua ligação, ativação, dessensibilização e vias de resposta intracelular (68). O conhecimento dessas dimerizações pode levar ao desenvolvimento de substâncias, que possam não só ativar receptores únicos como também receptores dimerizados, abrangendo um maior espectro de ações fisiológicas (126). Canals et al. (2006) demonstraram que a atividade do receptor AT1 pode ser modulada pela coexpressão de outros receptores acoplados a proteína G, inclusive ao receptor Mas (125). Essa interação causa modificações conformacionais no receptor AT1 quando heterodimerizado ao receptor Mas (127). Recentemente, nosso grupo demonstrou que o tratamento de ratos com hipertensão arterial induzida por coarctação da aorta abdominal com o antagonista do receptor AT1, Losartan, restauraram o efeito vasodilatador coronariano induzido por Ang-(1-7), o que sugere uma importante interação entre os dois receptores. Essa interação pode, inclusive, promover diferentes respostas entre modelos normais e patológicos (111).

Além dos complexos mecanismos de interação entre receptores angiotensinérgicos propostos acima, diferentes mecanismos intracelulares podem ser sugeridos para explicar os efeitos diretos da Ang-(1-7) na contratilidade cardíaca. Em nosso estudo demonstramos que o L-Name, ODQ e MDL12,330A bloquearam a resposta inotrópica promovida pela Ang-(1-7) em corações isolados de ratos. Diversos estudos têm demonstrado que a ativação da via NO/GC/GMPc reduz a

contratilidade cardíaca, promovendo um efeito inotrópico negativo (128,129). Pellegrino et al. (2009) demonstraram em corações isolados de ratos que o inotropismo negativo desencadeado por nitrito ocorre via ativação de GMPc-PKG e por mecanismos independentes da formação de NO pela eNOS (129). Apesar de ainda escassos, alguns estudos tem proposto a NO sintase neuronal (nNOS) como uma importante isoforma de NOS responsável por alterações na contratilidade cardíaca (130). Como demonstrado por Burkard et al. (2007), a nNOS quando super expressa promove a redução da contratilidade cardíaca em camundongos. Segundo os autores, essa redução pode ter ocorrido devido a dois importantes fatores, primeiro eles observaram uma interação entre a SERCA e nNOS, que potencializou as ações da SERCA e segundo, a nNOS pode reduzir a concentração de canais de Ca^{2+} do tipo L reduzindo a entrada desse íon em cardiomiócitos (130). Além disso, estudos relataram que o tratamento agudo com Ang-(1-7) na concentração de 10 nmol/L pode aumentar os níveis de NO através do aumento da ativação de NOS. Nesse estudo, o efeito da Ang-(1-7) foi bloqueado na presença de antagonista do receptor Mas e com a deleção gênica deste receptor (116).

Semelhante aos efeitos observados com Ang-(1-7) na contratilidade cardíaca, nossos resultados também demonstraram que a Ang II induziu inotropismo negativo em corações isolados de ratos Wistar. Inúmeros estudos vêm demonstrando diferentes efeitos inotrópicos da Ang II. Esses estudos têm demonstrado, que a Ang II pode promover efeito inotrópico positivo (35,102,103,122), negativo (104) ou nenhum efeito (131) sobre a contratilidade cardíaca. No entanto as vias de sinalização envolvidas nessas respostas inotrópicas não estão totalmente esclarecidas. Utilizando Ang II na concentração de 0,5 μ M em preparações de músculo papilar de gatos, Matiazzi (1997) demonstrou que esse peptídeo induz inotropismo positivo mediado pela ativação do receptor AT1 e ativação de segundo mensageiros como o IP_3 e DAG que modificam a concentração de Ca^{2+} intracelular e a sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} . Semelhantemente, Salas et al. (2001) demonstraram em músculo papilar de gatos e miócitos isolados que a Ang II na concentração de 0,5 μ M induz inotropismo positivo mediado pela ativação de PKC. Utilizando cardimiócitos isolados de gatos, Cingolani et al. (2006) demonstraram que a Ang II na concentração de 1nM induz inotropismo positivo mediado por ativação do receptor AT1, aumentando a produção e liberação de

endotelina. Diferentemente, Lefroy et al. (1996) demonstraram em cardiomiócitos isolados de diferentes espécies que a Ang II em concentrações entre 1nM e 10 μ M não é capaz de induzir qualquer alteração contrátil. Semelhante a nossos resultados, inotropismo negativo foi observado em corações isolados de camundongos perfundidos com Ang II na concentração de 3 nmol/L (11). Os autores desse estudo demonstraram que esse efeito está relacionado à ativação do receptor AT1, que inibe a proteína PI3 quinase α (PI3K α). A ativação de PI3K α aumenta o influxo de Ca²⁺ através dos canais de Ca²⁺ do tipo L, assim, sua inibição reduz os níveis citosólicos de Ca²⁺ em cardiomiócitos, levando a diminuição da força de contração (11).

Avaliando a participação dos receptores angiotensinérgicos, demonstramos que o bloqueio do receptor AT1 não inibiu a resposta inotrópica negativa da Ang II, principal agonista desse receptor, demonstrando que o receptor AT1 pode não participar diretamente dessa resposta. Esse resultado sugere que os efeitos da Ang II na contratilidade cardíaca em concentrações picomolares possam estar relacionados à vias de sinalização independentes de ativação do receptor AT1.

Além do receptor AT1, avaliamos se o efeito inotrópico da Ang II estaria relacionado à ativação do receptor AT2. Classicamente associado a efeitos contra regulatórios aos desencadeados pela ativação do receptor AT1 (132,133), o receptor AT2 é expresso em diferentes tipos celulares, como células endoteliais, cardiomiócitos e células da musculatura lisa vascular (3). Em nosso estudo, quando bloqueado o receptor AT2, não houve inibição da resposta inotrópica negativa induzida por Ang II em corações isolados de ratos. Esses resultados sugerem que, assim como o receptor AT1, o receptor AT2 de Ang II parece não participar diretamente das respostas cardiovasculares induzidas por baixas concentrações de Ang II em corações isolados de ratos. Assim como observado nos resultados obtidos com Ang-(1-7), a ausência de efeitos contráteis na presença de D-PRO também foi observada na presença de Ang II. Entretanto, mais estudos são necessários para confirmar a relação do receptor MrgD a mecanismos sinalizadores cardíacos desencadeados pela Ang II.

Apesar da participação do NO no efeito inotrópico negativo desencadeado por Ang-(1-7), o mesmo não pode ser observado nos resultados da Ang II no

inotropismo cardíaco. L-Name, ODQ e MDL 12,330A não alteraram a redução da contratilidade desencadeada pela Ang II em corações isolados de ratos. Esse resultado claramente sugere que vias independentes de NO possam atuar no inotropismo cardíaco desencadeado por Ang II.

Como já citado anteriormente as respostas inotrópicas da Ang II ainda são bastante controversas. Estudos apontam que o inotropismo positivo promovido pela Ang II pode estar relacionado diretamente à ativação da proteína quinase C (PKC) (122), aumento das correntes de Ca^{2+} do tipo L (35), ativação da β -arrestina-2 (122) e secundariamente a liberação de endotelina 1(103). Já o efeito inotrópico negativo pode estar associado com as atividades das proteínas PKC e p38 MAPK (104,134). Palomeque et al. (2006), demonstraram em miócitos isolados de ratos, que a Ang II na concentração de $1\mu\text{mol/L}$ foi capaz de reduzir a função contrátil dos cardiomiócitos. Essa redução não ocorre por diminuição da concentração de Ca^{2+} no meio intracelular e sim por redução da afinidade do Ca^{2+} aos miofilamentos contráteis. Além disso, os autores sugerem que esse efeito ocorre via PKC, tirosina quinase e p38 MAPK, uma vez que, a p38 MAPK é um efetor para a redução da responsividade dos miofilamentos ao íon Ca^{2+} . Os autores também demonstraram em seu estudo que as espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidas pela Ang II, não influenciam na resposta inotrópica negativa desencadeada por este peptídeo (104).

Por fim, a participação da FC nas respostas inotrópicas já é bem estabelecida. No entanto, nosso estudo demonstrou que as respostas inotrópicas e consequentemente, as respostas coronarianas induzidas por Ang-(1-7) e Ang II não são influenciadas pela FC, pois não encontramos nenhuma alteração induzida por ambos os peptídeos ou qualquer antagonista ou inibidor na FC.

Essa escassez e heterogeneidade no tipo de resposta inotrópica desencadeada por Ang-(1-7) e Ang II, respectivamente, no músculo cardíaco sugere que o efeito final de ambos os peptídeos no acoplamento excitação-contração possa ser resultado de um complexo equilíbrio entre a ativação e interação funcional de receptores acoplados a proteína G e a sinalização intracelular desencadeada.

5.2. Vasodilatação Coronariana induzida por Ang-(1-7) e Ang II

Além do inotropismo cardíaco promovido por Ang-(1-7) e Ang II em corações isolados de ratos, nosso estudo demonstrou que ambos os peptídeos em concentrações picomolares induziram significativa vasodilatação coronariana.

Em nosso estudo demonstramos que além de alterações inotrópicas, a Ang-(1-7) em concentrações picomolares promove vasodilatação em coronárias de ratos saudáveis. Esse efeito foi bloqueado na presença de antagonistas dos receptores Mas, MrgD, AT1 e AT2. Além disso, a inibição das vias NO/Gc/GMPc e AC/AMPc também bloqueou a vasodilatação coronariana desencadeada por Ang-(1-7).

Numerosos estudos têm demonstrado o efeito vasodilatador coronariano da Ang-(1-7). De acordo com Souza et al. (2013), a Ang-(1-7) e o AVE 0991, um agonista do receptor Mas, em concentrações picomolares induzem potente vasodilatação coronariana através da ativação do receptor Mas e da via NO-GC em coronárias de ratos saudáveis, no entanto esse efeito é perdido em condições patológicas, tais como a hipertrofia cardíaca induzida por aumento de pressão arterial (112). Segundo Castro et al. (2005), a ação vasodilatadora da Ang-(1-7) em baixas concentrações via ativação do receptor Mas é fortemente influenciada por mecanismos dependentes da sinalização de receptores AT1 e AT2, levando a liberação de NO e prostaglandinas induzida por baixa concentração de Ang-(1-7) em coronárias de camundongos (87). Corroborando com os resultados acima descritos, recentemente, nosso grupo demonstrou em coração de ratos submetidos à sobrecarga pressórica, que o tratamento com antagonista do receptor AT1 restaura o efeito vasodilatador coronariano induzido por Ang-(1-7), esse efeito não foi observado com o tratamento com inibidores de ECA, bloqueadores de canais de Ca^{2+} e antagonistas de receptores mineralocorticoides (111). Além desse já estabelecido efeito vasodilatador da Ang-(1-7) via receptor Mas, também demonstramos que o receptor MrgD, assim como no inotropismo cardíaco, pode ser relacionado à vasodilatação coronariana induzida por concentrações picomolares de Ang-(1-7). Essa participação também foi confirmada na presença de alamandina, que na presença de D-PRO, não promoveu vasodilatação coronariana. Assim, mais uma vez, nossos resultados reforçam que possíveis interações entre Ang-(1-7) e receptor MrgD podem resultar em importantes efeitos cardioprotetores.

Assim como a influência do receptor Mas e MrgD, nossos resultados demonstraram que o receptor AT2 pode influenciar nas respostas vasodilatadoras em coronárias induzida por Ang-(1-7). Essa participação do receptor AT2 foi confirmada em experimentos utilizando o C21, onde, na presença do PD123319, esse seletivo agonista AT2 não foi capaz de induzir vasodilatação coronariana. De acordo com Costa et al. (2010), a Ang-(1-7) ativando receptores AT2 pode causar aumento na atividade da NOS em cardiomiócitos de ratos hipertensos (135). Estudos têm demonstrado que a ativação do receptor AT2 também pode induzir a produção de bradicinina, que estimulando o receptor B2 leva a ativação da NOS com consequente vasodilatação (136). Além disso, em coronárias de cães a resposta vasodilatadora da Ang-(1-7) tem sido atribuída à ativação da produção local de bradicinina mediada por ativação do receptor AT2 (137).

Recentemente, Moraes et al. (2017) demonstraram em corações isolados de ratos, que a Ang-(1-7) induz vasodilatação coronariana mediada por ativação do receptor Mas e interações com a ECA e ECA2. Segundo esses autores o bloqueio do receptor AT1 não foi capaz de inibir essa resposta (138). Diferentemente, em nosso estudo demonstramos que o bloqueio do receptor AT1 com losartan inibiu a vasodilatação coronariana induzida por Ang-(1-7). A participação do receptor AT1 nos efeitos da Ang-(1-7) foi proposto por Teixeira et al. (2017), segundo esses autores, a Ang-(1-7) é capaz de se ligar ao receptor AT1 sem ativar a proteína Gq. No entanto, esse peptídeo quando ligado ao receptor AT1, ativa a via da β -arrestina atuando como um agonista tendencioso. Dessa forma, os autores afirmam que a Ang-(1-7) é capaz de promover respostas cardioprotetoras através da ativação do receptor AT1 (139). Essa influência do receptor AT1 em respostas cardiovasculares desencadeadas pela Ang-(1-7) também foi avaliada em nosso estudo, onde demonstramos em células endoteliais humanas que a fosforilação da AKT, uma proteína relacionada ao aumento da síntese de NO via eNOS (140), induzida por Ang-(1-7) em concentrações picomolares foi inibida tanto por bloqueio farmacológico, quanto por silenciamento gênico do receptor AT1. Em conjunto, esses resultados claramente demonstram que o efeito vasodilatador coronariano da Ang-(1-7) pode também ser influenciado por ativação do receptor AT1 e consequente ativação da via do NO.

A participação do NO nos efeitos vasodilatadores da Ang-(1-7) têm sido descrita em inúmeros estudos (36,87,140). Diversos efeitos promovidos por Ang-(1-7) são mediados via NO (135,141). Sampaio et al. (2007) demonstraram que a vasodilatação desencadeada por Ang-(1-7) pode ser causada em partes, pela liberação de NO (140). O relaxamento coronariano está diretamente relacionado à síntese de NO e ao aumento das concentrações intracelulares de GMPc e AMPc (142). Esses dois nucleotídeos cíclicos, atuando em diferentes alvos intracelulares, modulam a concentração de Ca^{2+} induzindo a vasodilatação coronariana (142). Essa diminuição do Ca^{2+} no músculo liso vascular ocorre devido ao aumento da recaptação de Ca^{2+} através da SERCA (143), redução do influxo de Ca^{2+} através dos canais para Ca^{2+} do tipo L e a ativação dos canais de K^+ induzindo a hiperpolarização (144,145). Essa participação de vias dependentes de NO nos efeitos coronarianos desencadeados por Ang-(1-7) também foi demonstrada em nosso estudo, tanto em órgão isolado quanto em células endoteliais humanas através da fosforilação da AKT.

Assim como a Ang-(1-7), nossos resultados demonstraram que a Ang II em concentrações picomolares, além de induzir inotropismo negativo é capaz de promover vasodilatação em coronárias de ratos saudáveis. Esse efeito não foi bloqueado na presença dos clássicos antagonistas dos receptores AT1 e AT2, Losartan e PD123319 respectivamente. No entanto, demonstramos que a vasodilatação coronariana induzida por Ang II foi bloqueada na presença do inibidor da ECA2 e do bloqueador do receptor Mas e MrgD.

Classicamente, a Ang II tem sido descrita como vasoconstritora em diversos leitos vasculares, inclusive em coronárias (146). Esse efeito vasoconstritor tem sido exaustivamente associado à ativação do receptor AT1 (76,147). No entanto, estudos têm demonstrado que esse peptídeo pode induzir vasodilatação em diferentes leitos vasculares, como arteríolas cerebrais (148) e mesentéricas (149). Vincent et al. (2005) demonstraram vasodilatação promovida por Ang II em arteríolas cerebrais de ratos durante bloqueio do receptor AT1. Segundo Sampson et al. (2012), a contínua infusão de baixas doses de Ang II podem induzir a liberação de NO o que pode ocasionar um efeito vasodilatador (150). A Ang II também pode induzir vasodilatação através da ativação do receptor AT2 e possíveis interações com receptores conhecidos por suas respostas vasodilatadoras (150,151). Diferente do proposto na

literatura, nossos resultados não demonstraram uma influência direta dos receptores AT1 e AT2 no efeito vasodilatador induzido por Ang II, pois na presença de antagonista dos mesmos, esse efeito não foi inibido, mas atenuado.

Como descrito anteriormente, a ECA2 pode induzir a formação de Ang-(1-7) através da clivagem direta de Ang II (152) ou indiretamente através da clivagem de Ang I (80). Predominantemente expressa no rim e coração, a ECA2 é a principal via de síntese de Ang-(1-7) em corações saudáveis de humanos (153). Essa enzima também é expressa em células endoteliais, onde desempenham um importante papel na formação de Ang-(1-7) inclusive na circulação coronariana (153). Como demonstrado por Zisman et al. (2003) quando ocorre a diminuição da síntese de Ang II na presença de enalapril a concentração de Ang-(1-7) é significativamente reduzida em artérias coronárias de humanos. Além disso, Campbell et al. (1986) demonstraram em seu estudo a existência de SRA locais, ou seja, determinamos tecidos possuem a capacidade de sintetizar diversos peptídeos do SRA independentes do SRA circulante exercendo importantes funções fisiológicas nos tecidos de origem (154). Nossos resultados sugerem que através da ECA2 a Ang II perfundida nos corações isolados de ratos foi clivada em Ang-(1-7) resultado em vasodilatação coronariana, pois esse efeito foi inibido na presença de DX600. Reforçando a hipótese de clivagem da Ang II em Ang-(1-7) via ECA2 em coronárias de ratos, nossos resultados demonstram que tanto o bloqueio do receptor Mas quanto o bloqueio do receptor MrgD inibiram essa resposta vasodilatadora, ao contrário do observado na presença dos antagonistas dos receptores AT1 e AT2. Além disso essa resposta também foi dependente de NO, uma vez que, o L-Name inibiu a vasodilatação induzida pela perfusão de Ang II.

Sumarizando, nossos resultados demonstraram os efeitos inotrópico negativo e vasodilatador coronariano da Ang-(1-7) e Ang II em concentrações picomolares. Além disso, a ativação do receptor MrgD pode estar diretamente relacionado a possíveis respostas moduladoras da contratilidade cardíaca e vasomotricidade coronariana de ambos os peptídeos. Em nosso estudo também observamos que o efeito inotrópico negativo, não é dependente de ativação do receptor Mas, pois ao bloquearmos este receptor a redução da força de contração não foi alterada. Também demonstramos que o efeito inotrópico negativo e vasodilatador coronariano desencadeado pela Ang-(1-7) em concentração

picomolar, pode estar relacionado a ativação dos receptores AT1 e AT2, além de uma possível participação das vias NO/GC/GMPc e AC/AMPc. A ativação do receptor AT1 como principal ativador do inotropismo negativo e o receptor AT2 como principal ativador da resposta vasodilatadora coronariana da Ang II, têm sido propostas. No entanto, nosso estudo demonstrou que o bloqueio do receptor AT1 e AT2 não influenciaram na resposta inotrópica negativa e vasodilatadora coronariana desencadeada por Ang II em concentrações picomolares em corações isolados de ratos saudáveis. Interessantemente, nós demonstramos que o efeito inotrópico negativo induzido por Ang II pode estar relacionado à ativação do receptor MrgD sem envolvimento da via do NO. Já a vasodilatação coronariana induzida por Ang II pode envolver uma importante clivagem desse peptídeo em Ang-(1-7), destacando a importância da via ECA2/Ang-(1-7)/Mas proposta em nossos resultados.

6. CONCLUSÃO

- Ang-(1-7) e Ang II em concentrações picomolares promovem efeito inotrópico negativo em ratos anestesiados e em corações isolados de ratos
- O efeito inotrópico negativo observado em ratos anestesiados não é influenciado por alterações na FC e PAM.
- A inibição do receptor Mas não interfere no efeito inotrópico negativo promovido pela Ang-(1-7).
- Os receptores AT1, AT2, Mas e as enzimas NOS, GC e AC parecem não interferir de forma direta nas respostas contráteis promovidas por Ang II.
- Todos os antagonistas e inibidores foram eficazes em bloquear a vasodilatação induzida por Ang-(1-7).
- A inibição da ECA2 bloqueia o efeito vasodilatador da Ang II.
- O bloqueio dos receptores AT1 e AT2 e da enzima GC não interferem na resposta vasodilatadora coronariana induzida por Ang II.
- Os efeitos inotrópicos e vasodilatadores promovidos por ambos os peptídeos não são influenciados por alterações na frequência cardíaca.
- O bloqueio farmacológico dos receptores AT1, AT2 e Mas diminui a fosforilação de AKT induzida por concentrações picomolares de Ang-(1-7) em células endoteliais humanas.
- O silenciamento gênico dos receptores AT1 e Mas reduzem a fosforilação de AKT induzida por baixas concentrações de Ang-(1-7) em células endoteliais humanas.
- A Ang II não promove/altera a fosforilação de AKT em células endoteliais humanas.

Estes resultados sugerem que a Ang-(1-7), em concentrações próximas a concentração fisiológica possui importantes efeitos diretos sobre a contratilidade cardíaca e vasomotricidade coronariana. Similar a Ang-(1-7), a Ang II possui importante, porém controverso efeito sobre a contratilidade cardíaca. Interessantemente, essa perfusão de Ang II em concentração picomolar em

corações isolados ratos induz vasodilatação coronária mediada em partes pela via ECA2/Ang-(1-7)/Mas.

REFERÊNCIAS

1. Bigger J, Weinberg D. Effects of diphenylhydantoin on excitability and automaticity in the canine heart. *Circ Res*. 1970; 26(1):15–8.
2. WHO. Cardiovascular Diseases (CVDs). 2013
3. Artom N, Montecucco F, Mach F, Dallegri F, Pende A. Angiotensin II receptor antagonists in acute coronary syndromes. *Eur J Clin Invest*. 2014; 44(2):219–30.
4. Bers D. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. 2002; 415(6868):198–205.
5. Fabiato A. Simulated Calcium Current Can Both Cause Calcium loading in and trigger Calcium Release from the Sarcoplasmic Reticulum of a Skinned Canine Cardiac Purkinje Cell. *J Gen Physiol*. 1985;85(2):291–320.
6. Bers DM. Calcium fluxes involved in control of cardiac myocyte contraction. *Circ Res*. 2000; 87(4):275–81.
7. MacLeod K. Recent advances in understanding cardiac contractility in health and disease. *F1000 Res*. 2016; 5:1–13.
8. Flynn A, Chokkalingam Mani B, Mather PJ. Sepsis-induced cardiomyopathy: a review of pathophysiologic mechanisms. *Heart Fail Rev*. 2010; 15(6):605–11.
9. Iyer V, Edelman ER, Lilly LS. Basic cardiac structure and function. In: Lilly L, editor. *Pathophysiology of heart disease*. 2007. p. 1–28.
10. Bassani JWM, Bassani RA, Bers DM. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells : species-dependent differences in cellular mechanisms. *J Physiol*. 1994; 476(2):279–93.
11. Liang W, Oudit GY, Patel MM, Shah AM, Woodgett JR, Tsushima RG, et al. Role of phosphoinositide 3-kinase {alpha}, protein kinase C, and L-type Ca²⁺ channels in mediating the complex actions of angiotensin II on mouse cardiac contractility. *Hypertension*. 2010;56(3):422–9.
12. Nunes A, Ramalho L, Souza A, Mendes E, Colugnati D, Zufelato N, et al. Manganese ferrite-based nanoparticles induce ex vivo , but not in vivo , cardiovascular effects. *Int J nano*. 2014;9:3299–312.
13. Nalivaiko E, Antunes VR, Paton JFR. Control of cardiac contractility in the rat working heart-brainstem preparation. *Exp Physiol*. 2010; 95(1):107–19.
14. Bowditch H. Uber die Eigenthuemlichkeiten der Reizbarkeit, welche die Muskelfasern des Herzens zeigen. *Verh K Sachs Gen Wochenschr Leipzig Math Phys Cl*. 1871;23:652–69.
15. Endoh M. Force-frequency relationship in intact mammalian ventricular myocardium: physiological and pathophysiological relevance. *Eur J Pharmacol*. 2004; 500(1–3):73–86.
16. Sonnenblick E, Morrow A, Williams JJ. Effects of heart rate on the dynamics of force development in the intact human ventricle. *Circulation*. 1966; 33:945–51.
17. Schouten V, ter Keurs H. Role of iCa and Na⁺ / Ca²⁺ Exchange in the Force-Frequency Relationship of Rat Heart Muscle. *J Mol Cell Cardiol*. 1991;

- 23:1039–50.
18. Jouannot P, Hatt P. Rat myocardial mechanics during pressure-induced hypertrophy development and reversal. *Am J Physiol.* 1975;229(2):355–64.
 19. Vornanen M. Force-frequency relationship, contraction duration and recirculating fraction of calcium in postnatally developing rat heart ventricles: correlation with heart rate. *Acta Physiol Scand Suppl.* 1992;145(4):311–21.
 20. Maier LS, Bers DM, Pieske B. Differences in Ca(2+)-handling and sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-content in isolated rat and rabbit myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 2000; 32(12):2249–58.
 21. Antoons G, Mubagwa K, Nevelsteen I, Sipido KR. Mechanisms Underlying the Frequency Dependence of Contraction and [Ca²⁺]_i Transients in Mouse Ventricular Myocytes. *J Physiol.* 2002; 543(3):889–98.
 22. Layland J, Kentish J. Positive force- and [Ca²⁺]_i-frequency relationships in rat ventricular trabeculae at physiological frequencies. *Am J Physiol.* 1999; 276(1 Pt 2):H9–18.
 23. Morii I, Kihara Y, Konishi T, Inubushi T, Sasayama S. Mechanism of the negative force–frequency relationship in physiologically intact rat ventricular myocardium—studies by intracellular Ca²⁺ monitor with indo-1 and by ³¹P-nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Jpn Circ J.* 1996; 60:593–603.
 24. Vincent J-L. Understanding cardiac output. *Crit Care.* 2008; 12(4):174.
 25. ter Keurs H. Heart failure and Starling’s Law of the heart. *Can J Cardiol.* 1996; 12(10):1047–57.
 26. Sarnoff S, Berglund E. Starling’s Law of the Heart Studied by Means of Simultaneous Right and Left Ventricular Function Curves in the Dog. *Circulation.* 1954; 9:706–18.
 27. von Anrep G. On the part played by the suprarenals in the normal vascular reactions of the body. *J Physiol.* 1912; 45:301–17.
 28. Westerhof N, Boer C, Lamberts RR, Sipkema P. Cross-talk between cardiac muscle and coronary vasculature. *Physiol Rev.* 2006; 86(4):1263–308.
 29. Sabiston D, Gregg D. Effect of Cardiac Contraction Coronary Blood Flow. *Circulation.* 1957; 15:14–20.
 30. Gordan R, Gwathmey JK, Xie L-H. Autonomic and endocrine control of cardiovascular function. *World J Cardiol.* 2015; 7(4):204–14.
 31. Vaseghi M, Shivkumar K. The Role of the Autonomic Nervous System in Sudden Cardiac Death. *Prog Cardiovasc Dis.* 2008; 50(6):404–19.
 32. James A, Xie L, Fujitani Y, Hayashi S, Horie M. Inhibition of the cardiac protein kinase A-dependent chloride conductance by endothelin-1. *Nature.* 1994; 370:297–300.
 33. Kasama S, Furuya M, Toyama T, Ichikawa S, Kurabayashi M. Effect of atrial natriuretic peptide on left ventricular remodelling in patients with acute myocardial infarction. *Eur Hear J.* 2008; 29(12):1485-1494.
 34. Perera RK, Sprenger JU, Steinbrecher JH, Hübscher D, Lehnart SE, Abesser M, et al. Microdomain switch of cGMP-regulated phosphodiesterases leads to ANP-induced augmentation of β -adrenoceptor-stimulated contractility in early

- cardiac hypertrophy. *Circ Res.* 2015; 116(8):1304–11.
35. Mattiazzi A. Positive Inotropic Effect of Angiotensin Ca²⁺ + or Changes in Myofilament II . Increases in Intracellular. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 1997; 37(4):205–14.
 36. 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.
 37. Merkus D, Chilian WM, I DWS. Functional Characteristics of the Coronary Microcirculation. *Herz.* 1999;508(7):496–508.
 38. Rouleau J, Boerboom LE, Surjadhana A. The Role of Autoregulation and Tissue Diastolic Pressures in the Transmural Distribution of Left Ventricular Blood Flow in Anesthetized Dogs. *Circ Res.* 1975; 45:804–15.
 39. Johnson P. Review of Previous Studies and Current Theories of Autoregulation. *Circ Res.* 1964;15:2–9.
 40. Mosher P, Ross Jj, McFate P, Shaw R. Control of Coronary Blood Flow By an Autoregulatory Mechanism. *Circ Res.* 1964;14:250–9.
 41. Duncker DJ, Bache RJ, Merkus D. Regulation of coronary resistance vessel tone in response to exercise. *J Mol Cell Cardiol.* 2012; 52(4):802–13.
 42. Kehat I, Molkentin JD. Molecular pathways underlying cardiac remodeling during pathophysiological stimulation. *Circulation.* 2010; 122:2727–35.
 43. Feigl EO. Berne 's adenosine hypothesis of coronary blood flow control. *Am J Physiol Hear Circ Physiol.* 2004; 7290:1891–4.
 44. Duncker D, Stubenitsky R, Verdouw P. Autonomic control of vasomotion in the porcine coronary circulation during treadmill exercise: evidence for feedforward beta-adrenergic control. *Circ Res.* 1998; 82:1312–22.
 45. Araiza AG, Knudson JD, Molina PE, Tune JD. Sensitization of Coronary α - Adrenoceptor Vasoconstriction in the Prediabetic Metabolic Syndrome. *Microcirculation.* 2006; 13:587–95.
 46. Gregorini L, Marco J, Farah B, Bernies M, Palombo C, Kozàková M, et al. Effects of Selective α 1- and α 2-Adrenergic Blockade on Coronary Flow Reserve After Coronary Stenting. *Circulation.* 2002; 106(23):2901–7.
 47. Heusch G, Baumgart D, Camici P, Chilian W, Gregorini L, Hess O, et al. alpha-adrenergic coronary vasoconstriction and myocardial ischemia in humans. *Circulation.* 2000; 101(6):689–94.
 48. Amenta F, Coppola L, Gallo P, Ferrante F, Forlani A, Monopoli A, et al. Autoradiographic Localization of / 3-Adrenergic Receptors in Human Large Coronary Arteries. *Circ Res.* 1991; 68:1591–9.
 49. Hein TW, Zhang C, Wang W, Kuo L, Arterioles C. Heterogeneous beta 2 - Adrenoceptor Expression and Dilatation in Coronary Arterioles Across the Left Ventricular Wall. *Circulation.* 2004;110(17): 2708–13.
 50. Shen W, Ochoa M, Xu X, Wang J, Hintze T. Role of EDRF/NO in parasympathetic coronary vasodilation following carotid chemoreflex activation in conscious dogs. *Am J Physiol Hear Circ Physiol.* 1994; 267:H605–13.
 51. Broten T, Miyashiro J, Moncada S, Feigl E. Role of endothelium-derived

- relaxing factor in parasympathetic coronary vasodilation. *Am J Physiol Hear Circ Physiol*. 1992; 262:H1579-1584.
52. Santos RA, Campagnole-Santos MJ, Andrade SP. Angiotensin-(1-7): an update. *Regul Pept*. 2000; 91(1-3):45-62.
 53. Peiro C, Vallejo S, Gembardt F, Azcutia V, Heringer-Walther S, Rodriguez-Manas L, et al. Endothelial dysfunction through genetic deletion or inhibition of the G protein-coupled receptor Mas: a new target to improve endothelial function. *J Hypertens*. 2007; 25(12):2421-5.
 54. Jiang F, Yang J, Zhang Y, Dong M, Wang S, Zhang Q, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin 1-7: novel therapeutic targets. *Nat Rev Cardiol*. 2014;11(7):413-26.
 55. Tigerstedt R, Bergman P. Niere und Kreislauf. *Scand Arch Physiol*. 1898; 8:223-71.
 56. Skeggs LT, Kahn JR, Shumway NP. The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme. *J Exp Med*. 1956;103:295-9.
 57. Timmermans P, Wong P, Chiu A, Herblin W, Benfield P, Carini D, et al. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev*. 1993; 45(2):205-51.
 58. Goodfriend T, Elliott M, Catt K. Angiotensin receptors and their antagonists. *N Engl J Med*. 1996; 334(25):1649-54.
 59. Kobori H, Nagaku M, Navar L, Nishiyama A. The Intrarenal Renin-Angiotensin System : From Physiology to the Pathobiology of Hypertension and. *Pharmacol Rev*. 2007; 59(3):251-87.
 60. Becari C, Oliveira EB, Salgado MCO. Alternative pathways for angiotensin II generation in the cardiovascular system. *Brazilian J Med Biol Res*. 2011; 44(9):914-9.
 61. Chow B, Allen T. Angiotensin II type 2 receptor (AT2R) in renal and cardiovascular disease. *Clin Sci (Lond)*. 2016; 1307-26.
 62. Zuo Y, Wang Y, Liu J. Recent advances and findings of angiotensin type 2 receptor: a review. *Chin Med J*. 2010; 123:3462-6.
 63. Santos RA. Angiotensin-(1-7). *Hypertension*. 2014; 63(6):1138-47.
 64. Lautner RQ, Villela DC, Fraga-Silva R a, 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.
 65. Ferreira AJ, Murça TM, Fraga-Silva R a, Castro CH, Raizada MK, Santos R a S. New cardiovascular and pulmonary therapeutic strategies based on the Angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin-(1-7)/mas receptor axis. *Int J Hypertens*. 2012; 2012:147825.
 66. Shanmugan S, Sandberg K. Ontogeny of angiotensin II receptors. *Cell Biol Int*. 1996; 20(3):169-76.
 67. Deshotels MR, Xia H, Sriramula S, Lazartigues E, Filipeanu CM. Angiotensin II mediates angiotensin converting enzyme type 2 internalization and degradation through an angiotensin II type I receptor-dependent mechanism. *Hypertension*. 2014; 64(6):1368-75.

68. Lyngsø C, Erikstrup N, Hansen JL. Functional interactions between 7TM receptors in the renin-angiotensin system--dimerization or crosstalk? *Mol Cell Endocrinol.* 2009; 302(2):203–12.
69. Zaman MA, Oparil S, Calhoun D a. Drugs targeting the renin-angiotensin-aldosterone system. *Nat Rev Drug Discov.* 2002; 1(8):621–36.
70. Healey JS, Baranchuk A, Crystal E, Morillo C a, Garfinkle M, Yusuf S, et al. Prevention of atrial fibrillation with angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers: a meta-analysis. *J Am Coll Cardiol.* 2005; 45(11):1832–9.
71. Levy BI. How to explain the differences between renin angiotensin system modulators. *Am J Hypertens.* 2005;18:134S–141S.
72. Li Y, Li X-H, Yuan H. Angiotensin II type-2 receptor-specific effects on the cardiovascular system. *Cardiovasc Diagn Ther.* 2012; 2(1):56–62.
73. Steckelings UM, Kaschina E, Unger T. The AT2 receptor-a matter of love and hate. *Peptides.* 2005; 26(8):1401–9.
74. Yu L, Shao C, Gao L. Developmental expression patterns for angiotensin receptors in mouse skin and brain. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst [Internet].* 2014 Jun [cited 2016 Aug 22];15(2):139–49. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23204186>
75. Lemarié CA, Schiffrin EL. The angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular disease. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2010;11:19–31.
76. Fyhrquist F, Saijonmaa O. Renin-angiotensin system revisited. *J Intern Med.* 2008;264(3):224–36.
77. Santos RA, Brosnihan KB, Chappell MC, Pesquero J, Chernicky CL, Greene LJ, et al. Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brainstem. *Hypertension.* 1988; 11:1153-7.
78. Schiavone MT, Santos RA, Brosnihan KB, Khosla MC, Ferrario CM. Release of vasopressin from the rat hypothalamo-neurohypophysial system by angiotensin-(1-7) heptapeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988; 85(11):4095–8.
79. Campagnole-Santos MJ, Diz DI, Santos RA, Khosla MC, Brosnihan KB, Ferrario CM. Cardiovascular effects of angiotensin-(1-7) injected into the dorsal medulla of rats. *Am J Physio.* 1989; 257:H324-9.
80. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res.* 2000; 87(5):E1-9.
81. Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem.* 2000; 275(43):33238–43.
82. Santos RA, Ferreira AJ. Angiotensin-(1-7) and the renin-angiotensin system. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2007;16(2):122–8.
83. Domenig O, Manzel A, Grobe N, Königshausen E, Kaltenecker C, Kovarik J, et al. Nepriylsin is a Mediator of Alternative Renin-Angiotensin-System Activation in the Murine and Human Kidney. *Sci Rep.* 2016; 6:33678.