

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CARDIOVASCULARES DO ACETURATO  
DE DIMINAZENO (DIZE) EM RATOS SUBMETIDOS À SOBRECARGA  
PRESSÓRICA**

**Larissa Matuda Macedo**

Goiânia

2014

## TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) 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), 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

Autor (a):	Larissa Matuda Macedo		
E-mail:	Larissa.matuda@gmail.com		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?	<input checked="" type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	
Vínculo empregatício do autor	Técnico de Laboratório		
Agência de fomento:	Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Goiás	Sigla:FA PEG	
País:	Brasil	UF:GO	CNPJ: 08.156.102/0001-02
Título:	Avaliação dos efeitos cardiovasculares do aceturato de diminazeno (DIZE) em ratos		
submetidos à sobrecarga pressórica			
Palavras-chave:	Hipertrofia cardíaca, Sistema Renina-Angiotensina, aceturato de diminazeno (DIZE)		
Título em outra língua:	Evaluation of the cardiovascular effects of diminazene aceturate (DIZE) in pressure-overloaded rat hearts		
Palavras-chave em outra língua:	Cardiac hypertrophy, Renin-angiotensin system, diminazene aceturate (DIZE)		
Área de concentração:	Biologia geral		
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	12/02/2014		
Programa de Pós-Graduação:	Mestrado em Biologia		
Orientador (a):	Prof. Dr. Carlos Henrique de Castro		
E-mail:	castroufg@gmail.com		
Co-orientador (a):*	Prof. Dr. Diego Basile Colugnati		
E-mail:	dcolugnati@yahoo.com.br		

### 3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento  SIM       NÃO<sup>1</sup>

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

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do (a) autor (a)

<sup>1</sup> 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.

LARISSA MATUDA MACEDO

Avaliação dos efeitos cardiovasculares do aceturato de diminazeno (DIZE) em ratos submetidos à sobrecarga pressórica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás para obtenção do título de Mestre em Biologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique de Castro

Co-orientador: Prof. Dr. Diego Basile Colugnati

Goiânia

2014

### Dados Internacionais de Catalogação da Publicação (CIP)

Macedo, Larissa Matuda.

M141a Avaliação dos efeitos cardiovasculares do aceturato de diminazeno (DIZE) em ratos submetidos à sobrecarga pressórica [manuscrito] / Larissa Matuda Macedo. – 2014.

xv, 70 f.: il.; 30 cm.

“Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique de Castro”.

“Co-orientador: Prof. Dr. Diego Basile Colugnati”.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, 2014.

Inclui referências bibliográficas.

Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.

Apêndices.

1. Sistema cardiovascular - Doenças. I. Título.

CDU 616.1(043)

## DEDICATÓRIA

A Deus,

O alfa e ômega, o princípio da existência, aquele que mudou a minha história.

Ao meu marido Erik,

Pela força e compreensão em todos os momentos, por me amar acima das circunstâncias.

A meus pais Ilson e Marta,

Pelo incentivo sempre presente, por projetar comigo um sonho por vezes difícil de ser alcançado.

A Igreja Apostólica Fonte da Vida,

Pelo sustento emocional e espiritual, sem os quais não poderia ter chegado até aqui.

## AGRADECIMENTOS

Aos Professores Carlos Henrique de Castro e Diego Basile Colugnati, pela brilhante orientação e ensino, fundamentais à minha formação acadêmica e profissional.

À Técnica e também Mestre em Biologia Lécia Garcia de Matos, por ser apoio e suporte sempre presentes, sendo sempre um incentivo ao meu crescimento.

Às Professora Elizabeth Pereira Mendes e Patrícia Maria Ferreira, pelo convite e incentivo a pesquisa, oferecendo também o Laboratório de Fisiologia de Órgãos Isolados para a execução de parte dos experimentos.

Ao Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, nas pessoas dos Professores Reginaldo Nassar Ferreira e Cirano José Ulhoa, ex- e atual diretores da instituição, por acreditarem no meu trabalho e me incentivado na pós-graduação.

Ao Departamento de Ciências Fisiológicas/ICB/UFG, nas pessoas dos Professores Gustavo Rodrigues Pedrino, Élon Alves Costa e Daniel Alves Rosa, ex- e atual chefes de departamento, por permitirem meu acesso e participação na pós-graduação.

Aos Professores Anderson José Ferreira e Robson Augusto Souza dos Santos, da Universidade Federal de Minas Gerais, pelo apoio e contribuição designados a este trabalho.

Aos Professores do Laboratório de Biologia Molecular/UFG, nas pessoas dos Professores Célia Maria de Almeida Soares, Clayton Luiz Borges e Alexandre Melo Bailão, pela disponibilização de diversos aparelhos utilizados nos experimentos.

Aos colegas Álvaro Paulo Silva Souza e Marilda Luz Andrade De Maria, pelo auxílio com os experimentos de vaso isolado e análise morfométrica, respectivamente.

A todos os professores e colegas de laboratório do Núcleo Integrado de Neurociência e Fisiologia Cardiovascular/UFG, sem os quais não haveria trabalho em equipe e calorosas discussões acerca do material aqui apresentado.

“A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável.”

Galileu Galilei

“Um especialista é um homem que sabe cada vez mais sobre cada vez menos, e por fim acaba sabendo tudo sobre nada”.

George Bernard Shaw

## RESUMO

A ativação do eixo Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ECA2)-Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)]-Receptor Mas resulta em importantes efeitos protetores no sistema cardiovascular. A ECA 2 é um importante componente do Sistema Renina-Angiotensina, pois hidrolisa a Angiotensina II em Ang-(1-7). Recentes estudos tem demonstrado que o aceturato de diminazeno (DIZE) apresenta capacidade de aumentar a atividade da ECA 2. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos cardiovasculares do DIZE nas mudanças induzidas por sobrecarga pressórica e possíveis mecanismos intracelulares envolvidos nestes efeitos. Foram utilizados ratos Wistar (200-350 g), divididos em quatro grupos: (1) Sham; (2) Coarctados (coarctação da aorta abdominal, CAA), (3) CAA + DIZE (1 mg/kg, gavagem); e (4) CAA + DIZE (1 mg/kg, gavagem) + A-779 (120 µg/dia, mini-bombas osmóticas). Decorridos 21 dias da coarctação, a pressão arterial dos animais foi registrada, os corações foram isolados e perfundidos pelo método de Langendorff com pressão constante. A reatividade vascular foi avaliada por preparação de anéis de aorta isolada. Para avaliar a hipertrofia cardíaca, o peso dos ventrículos esquerdos foi normalizado pelo comprimento das tíbias e expresso como índice de massa ventricular (IMV), além da área de secção transversa dos cardiomiócitos (AST) ser também medida. Os níveis de mRNA para ANP, BNP e TGF-β também foram avaliados por qRT-PCR. A expressão de ECA 2 e das proteínas ERK1/2, AKT, mTOR, GATA-4, SOD e catalase, envolvidas em vias pró-hipertróficas, foi analisada através da técnica de Western Blot. Os resultados foram apresentados como média ± erro padrão da média. Para as análises de pressão arterial média, coração isolado e parâmetros morfométricos, qRT-PCR e Western Blot, foi utilizado o teste ANOVA One Way seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls. Para a preparação de anéis de aorta isolada, foi usado ANOVA Two Way seguido pelo teste de Bonferroni. As diferenças foram consideradas significativas com  $P < 0,05$ . Os corações isolados dos ratos coarctados apresentaram diminuição significativa da pressão ventricular esquerda ao final da sístole ( $128,1 \pm 9,0$  vs.  $79,1 \pm 12,8$  mmHg em CAA,  $P < 0,05$ ), pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo ( $118,1 \pm 8,9$  vs.  $69,0 \pm 12,7$  mmHg em CAA,  $P < 0,05$ ),  $+dP/dt$  ( $2295,0 \pm 161,8$  vs.  $1406,0 \pm 246,5$  mmHg/s em CAA,  $P < 0,05$ ) e  $-dP/dt$  ( $1787,0 \pm 166,0$  vs.  $1066,0 \pm 181,9$  mmHg/s em CAA,  $P < 0,05$ ). A ativação da ECA 2 atenuou a disfunção ventricular esquerda induzida pela coarctação. O tratamento com DIZE aumentou o fluxo coronariano dos corações hipertrofiados (CAA:  $11,6 \pm 0,8$  vs. CAA+DIZE:  $15,8 \pm 0,6$  mL/min,  $P < 0,05$ ). Este efeito foi bloqueado pelo A-779. Os corações submetidos a sobrecarga pressórica mostraram um aumento significativo do IMV ( $0,17 \pm 0,01$  vs.  $0,21 \pm 0,01$  g/cm em CAA,  $P < 0,05$ ) e AST ( $9,37 \pm 0,55$  vs.  $10,72 \pm 0,27$  µm em CAA,  $P < 0,05$ ). A ativação da ECA 2 preveniu a hipertrofia cardíaca (AST:  $10,72 \pm 0,27$  vs.  $9,25 \pm 0,23$  µm em CAA + DIZE,  $P < 0,05$ ). O tratamento com A-779 atenuou o efeito anti-hipertrófico produzido pelo DIZE nos corações coarctados. A coarctação também promoveu aumento da expressão de mRNA de ANP, BNP e TGF-β e o tratamento com DIZE reverteu esse efeito. A sobrecarga pressórica diminuiu o relaxamento induzido por acetilcolina em anéis de aorta isolada e o tratamento com o ativador da ECA 2 não foi capaz de alterar esse efeito. A coarctação diminuiu a fosforilação da AKT e o tratamento com DIZE não foi capaz de alterá-la. Não foram encontradas alterações na expressão das proteínas ECA 2, ERK1/2 total e fosforilada, AKT total, mTOR, GATA-4, SOD e catalase. Tais resultados mostram que o tratamento crônico com

DIZE apresenta efeitos cardioprotetores contra a disfunção cardíaca induzida pela sobrecarga pressórica através da diminuição da hipertrofia ventricular esquerda, sem mudanças na expressão de ECA 2, ERK1/2, AKT, mTOR, GATA-4, SOD e catalase. Portanto, o DIZE possui importante potencial terapêutico frente a doenças cardiovasculares.

## ABSTRACT

Activation of the Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2)-Angiotensin-(1-7) [Ang-(1-7)]-Mas Receptor axis results in protective effects in the cardiovascular system. ACE 2 is an important component of Renin-Angiotensin System, because it is able to convert Angiotensin II in Ang-(1-7). Recent studies have shown that diminazene aceturate (DIZE) act as an activator of ACE 2. The objective of this study was to evaluate the cardiovascular effects of chronic treatment with DIZE in pressure-overloaded rats and the possible mechanisms involved in these effects. Male Wistar rats (200-350 g) were divided in four groups: (1) Sham; (2) Coarcted (abdominal aortic banding, CAA); (3) CAA + DIZE (1 mg/kg, gavage); e (4) CAA + DIZE (1 mg/kg, gavage) + A-779 (120 µg/day, osmotic mini-pumps). Twenty one days after surgery procedure, the blood pressure was recorded, the hearts were isolated and perfused according to Langendorff method. Vascular reactivity was measured by isolated aortic ring preparation. In order to evaluate the cardiac hypertrophy, the left ventricular mass index (VMI) was calculated through the ratio of the left ventricular wet weight to tibia length. The cross-sectional area of cardiomyocytes (CSA) was also evaluated. The mRNA levels for ANP, BNP e TGF-β were also evaluated by qRT-PCR. The expression of ACE-2 and ERK1/2, AKT, mTOR, GATA-4, catalase and SOD proteins involved in hypertrophic pathways was analyzed by Western Blot technique. The results are presented as means ± SEM. One-way ANOVA followed by the Newman-Keuls post-test was used to analyze the blood pressure, cardiac morphometric parameters, isolated heart, qRT-PCR and Western Blot experiments. Two-way ANOVA followed by the Bonferroni post-test was used for aortic rings preparation protocols. All statistical analyses were considered significant at P<0.05. Isolated hearts from coarcted rats presented a significant decrease in the left ventricular end systolic pressure (128.1 ± 9.0 vs. 79.1 ± 12.8 mmHg in CAA, P<0.05), left ventricular developed pressure (118.1 ± 8.9 vs. 69.0 ± 12.7 mmHg in CAA, P<0.05), +dP/dt (2295.0 ± 161.8 vs. 1406.0 ± 246.5 mmHg/s in CAA, P<0.05) and -dP/dt (1787.0 ± 166.0 vs. 1066.0 ± 181.9 mmHg/s in CAA, P<0.05). The DIZE treatment attenuated all of these effects induced by CAA. Moreover, DIZE treatment increased the coronary flow in hypertrophic hearts (CAA: 11.6 ± 0.8 vs. CAA+DIZE: 15.8 ± 0.6 mL/min, P<0.05). This effect was blocked by A-779. Pressure-overloaded hearts showed a significant increase in VMI (0.17 ± 0.01 vs. 0.21 ± 0.01 g/cm in CAA, P<0.05) and CSA (8.98 ± 0.54 vs. 10.72 ± 0.27 µm in CAA, P<0.05). The chronic treatment with DIZE prevented the heart hypertrophy (10.72 ± 0.27 in CAA vs. 9.25 ± 0.23 µm in CAA+DIZE, P<0.05). Indeed, treatment with A-779 attenuated the anti-hypertrophic effect induced by DIZE treatment. The coarcted rats presented a increase in mRNA expression of ANP, BNP and TGF-β and the DIZE treatment reverted this effect. The pressure overload decreased the acetylcholine-induced relaxation in aortic rings from coarcted rats and treatment with DIZE was not able to improve this effect. The coarctation decreased the phosphorylation of the AKT, which was not changed by DIZE treatment. The expression of ACE 2, total and phosphorylated ERK1/2, total AKT, mTOR, SOD and catalase was not changed by coarctation or by ACE 2 activation. These results show that the chronic treatment with DIZE was efficient in preventing the left ventricular hypertrophy and cardiac dysfunction induced by pressure overload. These effects were independent of

changes in the expression of ACE 2, ERK1/2, AKT, mTOR, SOD and catalase. Thus, DIZE has important therapeutic potential for cardiovascular diseases.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Figura 1** - Hipertrofia cardíaca fisiológica e patológica.

**Figura 2** - Hipertrofia cardíaca concêntrica e excêntrica.

**Figura 3** - Ilustração da formação dos principais componentes do Sistema Renina-Angiotensina.

**Figura 4** - Ilustração das vias de sinalização envolvidas no processo hipertrófico cardíaco.

**Figura 5** - Ilustração da técnica de coração isolado (método de Langendorff).

**Figura 6** - Pressão arterial média dos animais dos respectivos grupos estudados.

**Figura 7** - Frequência cardíaca dos animais dos respectivos grupos estudados.

**Figura 8** - Pressão intraventricular esquerda ao final da sístole (A) e da diástole (B) dos corações isolados de ratos.

**Figura 9.** Pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo de corações isolados de ratos.

**Figura 10** - Velocidades de contração (A) e relaxamento (B) de corações isolados de ratos.

**Figura 11** - Fluxo coronariano de corações isolados de ratos.

**Figura 12.** Frequência cardíaca de corações isolados de ratos.

**Figura 13** - Relaxamento de anéis de aorta torácica com endotélio dos ratos sham, coarctados (CAA) e coarctados tratados com DIZE (CAA + DIZE) frente a concentrações crescentes de acetilcolina após pré-constricção com fenilefrina.

**Figura 14** - Relaxamento de anéis de aorta torácica sem endotélio dos ratos sham e coarctados (CAA) frente a concentrações crescentes de nitroprussiato de sódio após pré-constricção com fenilefrina.

**Figura 15** - Análise da expressão de mRNA dos genes codificantes para ANP (A), BNP (B) e TGF- $\beta$  (C) em amostras de corações de ratos.

**Figura 16** - Análise da expressão de ECA 2 em amostras de corações de ratos.

**Figura 17** - Análise da expressão de ERK1/2 total (A) e fosforilada (Fosfo-ERK) (B) em amostras de corações de ratos.

**Figura 18** - Análise da expressão de AKT total (A), AKT fosforilada (Fosfo-AKT) (B) e mTOR (C) em amostras de corações de ratos.

**Figura 19** - Análise da expressão de GATA-4 em amostras de corações de ratos.

**Figura 20** - Análise da expressão de SOD (A) e catalase (B) em amostras de corações de ratos.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** - Composição da solução de Krebs-Ringer.

**Tabela 2** - Composição da solução de Krebs-Henseleit.

**Tabela 3** - Descrição dos procedimentos para a realização da coloração dos cortes histológicos com hematoxilina e eosina.

**Tabela 4** - Parâmetros morfométricos dos animais Sham, Coarctados, Coarctados tratados com DIZE e Coarctados tratados com DIZE e A-779.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- dP/dt, Velocidade de relaxamento intraventricular.  
+dP/dt, Velocidade de contração intraventricular.  
µg, Microgramas.  
µL, Microlitros.  
µM, Micromolar.  
A-779, D-Alanina-Angiotensina-(1-7).  
Ach, Acetilcolina.  
AKT ou PKB, Proteína Quinase B.  
Ang I, Angiotensina I.  
Ang II, Angiotensina II.  
Ang-(1-7), Angiotensina-(1-7).  
Ang-(1-9), Angiotensina-(1-9).  
ANP, Peptídeo Natriurético Atrial ou tipo A.  
APA, Aminopeptidase.  
AST, Área de Secção Transversa dos Cardiomiócitos.  
AT1, Receptor de Angiotensina II Tipo 1.  
AT2, Receptor de Angiotensina II Tipo 2.  
ATP, Trifosfato de Adenosina.  
BCIP, 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato.  
BNP, Peptídeo Natriurético Cerebral ou tipo B.  
BPM, Batimentos por minuto.  
cDNA, Àcido Desoxirribonucleico complementar.  
cm, Centímetros.  
CO<sub>2</sub>, Dióxido de Carbono.  
DAP, Dipeptidil-Aminopeptidase.  
DIZE, Aceturato de Diminazeno.  
ECA, Enzima Conversora de Angiotensina.  
ECA 2, Enzima Conversora de Angiotensina 2.  
ERK, Quinase Reguladora de Sinal Extracelular.  
ERK1/2, Quinase Reguladora de Sinal Extracelular 1 e 2.  
EROs, Espécies Reativas de Oxigênio.

Fosfo-ERK, Quinase Reguladora de Sinal Extracelular fosforilada.

Fosfo-AKT, Proteína Quinase B fosforilada.

g, Gramas.

GMPc, Monofosfato Cíclico de Guanosina.

GPCRs, Receptores Acoplados a Proteína G.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Peróxido de Hidrogênio.

HCl, Ácido Clorídrico.

IMV, Índice de Massa Ventricular Esquerda.

kg, Quilograma.

M, Molar.

MAPK, Proteína Quinase Ativada por Mitógeno.

mg, Miligrama.

MHC, Cadeia Pesada de Miosina.

mL, Mililitros.

mm, Milímetros.

mmHg, Milímetros de Mercúrio.

mRNA, Ácido Ribonucleico do tipo mensageiro.

mTOR, Alvo Mamário da Rapamicina.

NADPH, Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzida.

NBT, Nitro Azul de Tetrazol.

NEP, Endopeptidase Neutra ou Neprilisina.

NFAT, Fator Nuclear de células-T ativadas.

Nox-2, Subunidade da NADPH oxidase.

NP, Peptídeo Natriurético.

NPS, Nitroprussiato de Sódio.

O<sub>2</sub><sup>-</sup>, Ânion Superóxido.

O<sub>2</sub>, Oxigênio.

°C, graus Celsius.

OH<sup>-</sup>, Hidroxila.

OP, Oligopeptidase.

PAM, Pressão Arterial Média.

PBS, Tampão Fosfato-Salino.

PC, Peso Corporal.

PCor, Peso do Coração.

PVE, Peso do Ventrículo Esquerdo.

PCP, Prolil-carboxipeptidases.

PCR, Reação em cadeia de polimerase.

PDK1, Proteína Quinase Dependente de Fosfatidilinositol 1.

PDVE, Pressão Desenvolvida pelo Ventrículo Esquerdo.

PEP, Proplil-endopeptidase.

PI3K, Fosfatidilinositol 3-quinase.

PIP3, Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato.

PIVED, Pressão intraventricular esquerda ao final da diástole.

PIVES, Pressão intraventricular esquerda ao final da sístole.

qRT-PCR, Reação com transcriptase reversa seguida de reação em cadeia de polimerase quantitativa.

RPM, Rotações por Minuto.

SDS, Dodecil Sulfato de Sódio.

SOD, Superóxido Dismutase.

SRA, Sistema Renina-Angiotensina.

TBS-T, Tampão Tris-salino com Tween.

TGF- $\beta$ , Fator de Transformação de Crescimento Beta 1.

UI, Unidades Internacionais.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Hipertrofia cardíaca	16
1.2	Sistema Renina-Angiotensina (SRA)	20
2	OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS	30
3	MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1	Animais	31
3.2	Coarctação da aorta abdominal	31
3.3	Registro da pressão arterial	32
3.4	Avaliação da função ventricular esquerda	32
3.5	Avaliação da reatividade vascular	34
3.6	Análise morfométrica	35
3.7	Análise da expressão de mRNA de marcadores hipertróficos	36
3.8	Análise de proteínas de interesse por Western Blot	37
3.9	Análise estatística	38
4	RESULTADOS	39
4.1	Avaliação da pressão arterial	39
4.2	Avaliação da função ventricular esquerda	40
4.3	Análise da reatividade vascular em anéis de aorta torácica isolada	45
4.4	Avaliação da hipertrofia ventricular esquerda	46
4.5	Investigação da expressão de proteínas sinalizadoras envolvidas em vias pró-hipertróficas	48
5	DISCUSSÃO	52
6	CONCLUSÕES	59
7	REFERÊNCIAS	60

## 1 – INTRODUÇÃO

### 1.1 – Hipertrofia cardíaca

Mesmo com o desenvolvimento contínuo de novos fármacos, as doenças cardiovasculares ainda são a maior causa de morte na população mundial. Em 2008, 17,3 milhões de pessoas morreram por causa dessas patologias, representando 30% dos óbitos em todo o mundo (WHO, 2013). A estimativa da Organização Mundial de Saúde é que em 2030 esse número aumente para 23,3 milhões e que, em 2040, o Brasil seja o campeão mundial em mortalidade por doenças cardiovasculares. Assim, o aprimoramento de terapias farmacológicas já existentes e o desenvolvimento de novos fármacos com potencial terapêutico sobre o sistema cardiovascular, bem como a melhor compreensão dos mecanismos de ação, são essenciais para o controle desse grupo de patologias.

Dentre as morbidades relacionadas às doenças cardiovasculares, destaca-se a hipertrofia cardíaca, que está fortemente associada ao risco de morte súbita, evolução para insuficiência cardíaca e ocorrência de infarto do miocárdio e arritmias cardíacas (GROSSMAN; JONES; MCLAURIN, 1975; LORELL; CARABELLO, 2000). De forma geral, a hipertrofia cardíaca é o termo utilizado para descrever o aumento do tamanho do coração como resultado do aumento das dimensões dos cardiomiócitos e do conteúdo de matriz extracelular (FREY; OLSON, 2003). Este processo patológico é decorrente de uma resposta adaptativa do coração a situações de sobrecarga hemodinâmica, possibilitando-o aumentar sua capacidade contrátil e resultando na normalização do estresse na parede cardíaca e manutenção do débito cardíaco (RUWHOF; VAN DER LAARSE, 2000). No entanto, o benefício desta resposta adaptativa pode ser superado pelo efeito deletério na morfologia e função cardíacas, tornando a hipertrofia cardíaca uma importante causa de morbidade e mortalidade.

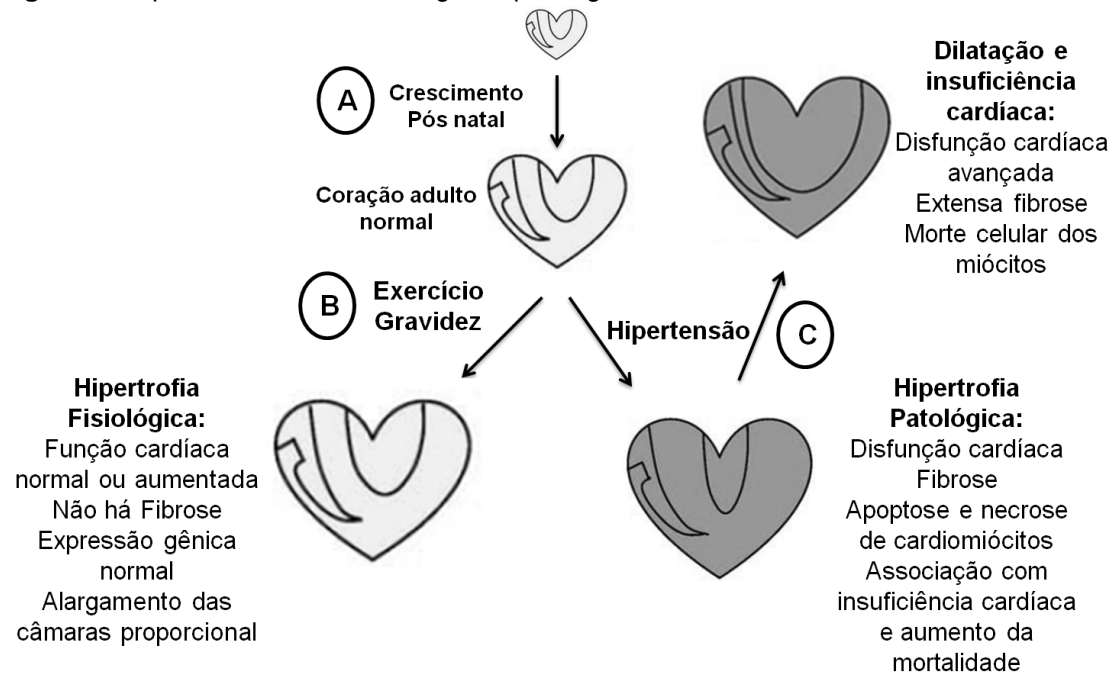
Do ponto de vista morfológico, o coração é composto por (i) cardiomiócitos, responsáveis pela função contrátil, (ii) células não-miocíticas, como por exemplo, fibroblastos, células endoteliais, mastócitos, células musculares lisas e (iii) matriz extracelular. Os cardiomiócitos ventriculares são responsáveis por um terço do número total de células do coração, totalizando 70 a 80% da massa cardíaca (NAG, 1980). Com o passar do tempo, a maioria dos cardiomiócitos perdem a capacidade

de se proliferar (hiperplasia) e o crescimento cardíaco ocorre pelo aumento do tamanho das células (hipertrofia) (SOONPAA et al., 1996).

Os cardiomiócitos são compostos basicamente por feixes de miofibrilas. As miofibrilas, por sua vez, contêm miofilamentos de actina e miosina que se organizam em conjuntos de sarcômeros, a unidade básica do cardiomiócito. Os cardiomiócitos se dispõem em uma orientação espiral e circular em volta do ventrículo esquerdo e precisam contrair-se de forma rítmica, para que a ejeção do volume sanguíneo seja eficiente. O ritmo normal do coração é controlado pelas células nodais, facilitado pelo sistema de condução formado pelo Feixe Átrio-ventricular e o Sistema de Purkinje. Discos intercalados, localizados nas extremidades dos miócitos, conectam os cardiomiócitos entre si formando um sincício, também sendo responsáveis por transmitir os potenciais de ação que permitem que a força contrátil seja transmitida. O crescimento dos cardiomiócitos é dependente do início de uma série de eventos em resposta ao aumento da carga funcional, incluindo ativação de vias de sinalização, mudanças na expressão de genes, aumento da síntese protéica, e organização das proteínas contráteis dentro da unidade sarcomérica (BERNARDO et al., 2010).

Do ponto de vista funcional, o crescimento cardíaco pode ser classificado como fisiológico ou patológico (Figura 1). O crescimento cardíaco fisiológico inclui o crescimento pós-natal (Figura 1, A), o crescimento induzido pela gravidez e a hipertrofia induzida por exercício (Figura 1, B). A hipertrofia cardíaca fisiológica está associada à estrutura cardíaca normal e função cardíaca normal ou aumentada. Em contraste, o crescimento patológico ocorre em resposta à sobrecarga crônica de volume ou pressão, que pode ocorrer, por exemplo, em casos de hipertensão (Figura 1, C), doença cardíaca valvular, infarto do miocárdio, isquemia associada com doença arterial coronariana, ou anormalidades que induzem cardiomiopatia (por exemplo, mutações genéticas hereditárias ou diabetes). A hipertrofia patológica é tipicamente associada com a perda de cardiomiócitos, rearranjo fibrótico, disfunção cardíaca e aumento do risco de insuficiência cardíaca e morte súbita (LEVY et al., 1990).

**Figura 1** - Hipertrofia cardíaca fisiológica e patológica.



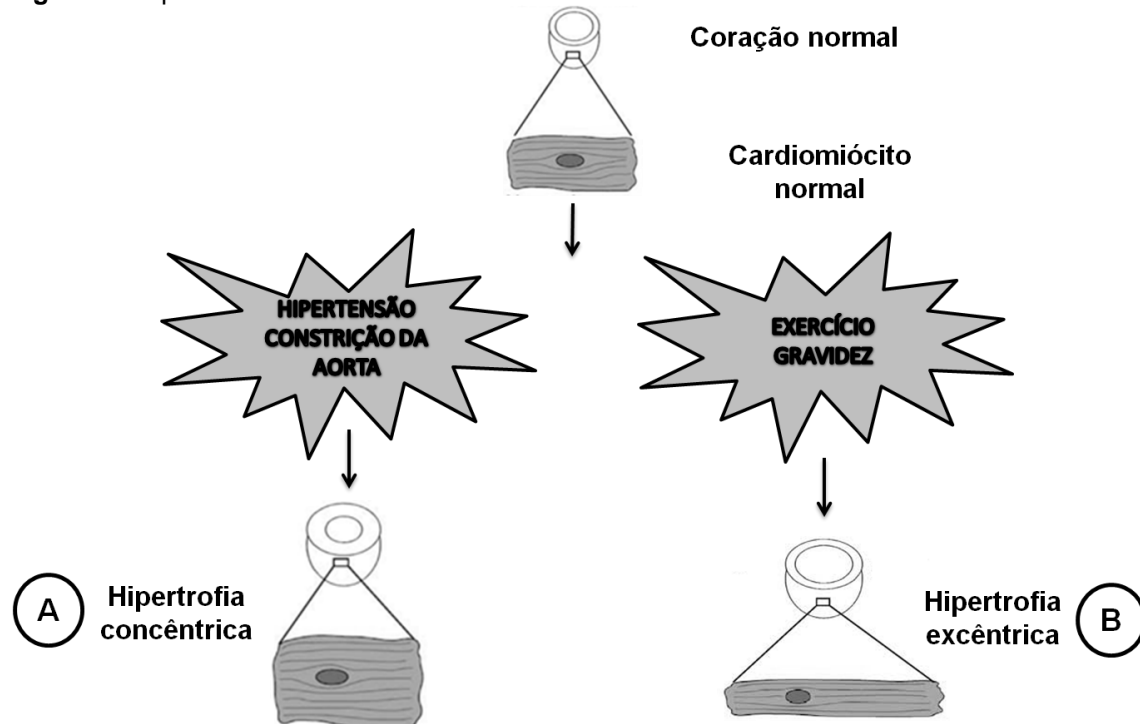
(Adaptado de BERNARDO et. al., 2010)

A hipertrofia cardíaca patológica pode ser classificada em concêntrica e excêntrica (Figura 2). A hipertrofia concêntrica se refere ao aumento da espessura relativa da parede e massa cardíacas, com uma pequena ou nenhuma redução do volume da câmara ventricular (Figura 2, A). Ela também é caracterizada pela adição de sarcômeros em paralelo, o que leva ao aumento da largura dos cardiomiócitos. A hipertrofia excêntrica se refere ao aumento da massa cardíaca com aumento do volume da câmara, ou seja, as câmaras se encontram dilatadas (Figura 2, B). A espessura relativa da parede pode ser normal, diminuída ou aumentada. Na hipertrofia excêntrica, a adição de sarcômeros em série induz aumento no comprimento do cardiomiócito (GROSSMAN; JONES; MCLAURIN, 1975; PLUIM et al., 2000).

A hipertrofia patológica é gerada pelo aumento do estresse na parede ventricular produzido pela sobrecarga pressórica, resultando em hipertrofia concêntrica que, a longo prazo, pode evoluir para hipertrofia excêntrica como pode ser visto na cardiomiopatia dilatada (GROSSMAN; JONES; MCLAURIN, 1975) ou em modelos experimentais de coarctação de aorta. Essas alterações são desencadeadas por estiramento mecânico ('stretch'); não obstante, existem também vários outros fatores incluindo isquemia, mudanças na expressão gênica e proteica, hormônios e peptídeos vasoativos, que podem modificar os efeitos de fator

mecânico (SWYNGHEDAUW, 1999). Tais alterações moleculares, celulares e hormonais resultam no remodelamento cardíaco, que se manifesta clinicamente em mudanças no tamanho, forma e função do coração (KEHAT; MOLKENTIN, 2010).

**Figura 2 - Hipertrofia cardíaca concêntrica e excêntrica.**



(Adaptado de BERNARDO et. al., 2010)

O aumento do estresse mecânico ou sobrecarga pressórica provocam a reativação do programa de genes fetais: um conjunto de genes que são normalmente expressos durante o desenvolvimento do coração fetal e são re-expressos no miocárdio adulto (BARRY; DAVIDSON; TOWNSEND, 2008). A ativação desses genes fetais permite a síntese coordenada de proteínas necessárias para aumentar o tamanho do cardiomiócito e ajustar a alteração na demanda de energia de células maiores. Alguns destes genes estão descritos abaixo:

**Miosina de Cadeia Pesada (Myosin heavy chain - MHC).** A Miosina de Cadeia Pesada é um dímero composto por filamentos alfa e beta, e que aparecem sob a forma de homodímeros alfa-alfa, beta-beta ou de heterodímero alfa-beta (SAFI-JR., 1998). Já é conhecido há 20 anos que um dos marcadores para a hipertrofia cardíaca em pacientes e modelos de roedores é o aumento da expressão de  $\beta$ -MHC e a diminuição da expressão de  $\alpha$ -MHC (IZUMO et al., 1987). Uma vez

que cada isoforma tem uma atividade enzimática distinta, significa que um aumento na taxa relativa dessas proteínas influencia grandemente a função cardíaca. Assim, um aumento na expressão de  $\beta$ -MHC e a diminuição na expressão de  $\alpha$ -MHC estão associados à diminuição da velocidade da enzima ATPase da miosina, a qual por sua vez diminui a taxa de contração do miócito, uma adaptação chave para a carga de trabalho alterada (LOWES et al., 1997).

**Peptídeos natriuréticos (NPs).** Peptídeos natriuréticos são uma família de hormônios que atuam sobre os sistemas endócrino e cardiovascular através de ações diuréticas, natriuréticas, vasorrelaxantes e de inibição da síntese de aldosterona e da secreção de renina (NISHIKIMI; MAEDA; MATSUOKA, 2006). Os NPs são potentes inibidores de hipertrofia e a ação deles é considerada como mecanismo compensatório a insuficiência cardíaca. Os peptídeos natriuréticos atrial (ANP) e cerebral (BNP) são encontrados em altos níveis durante o desenvolvimento embrionário e em neonatos, mas ausentes em adultos saudáveis (GARDNER, 2003). O estímulo hipertrófico, porém, aumenta a expressão de ANP e BNP através da transcrição do fator GATA-4 e a principal função deles no miocárdio é inibir a resposta hipertrófica (GARDNER et al., 2007).

## 1.2– Sistema Renina-Angiotensina (SRA)

O SRA (Figura 3) é um importante modulador da homeostasia hidroeletrolítica e das funções cardiovasculares, além de estar envolvido na gênese e desenvolvimento de diferentes patologias que afetam o sistema circulatório (MEHTA; GRIENGLING, 2007).

A renina é sintetizada e armazenada sob a forma inativa, pró-renina, nas células justaglomerulares dos rins. Quando há uma diminuição da pressão arterial média com consequente queda da pressão sanguínea na artéria renal, reações intrínsecas nos próprios rins fazem com que muitas moléculas de pró-renina se dividam e liberem a renina (CAMPBELL et al., 2009). Grande parte da renina liberada para a corrente sanguínea atua sobre uma proteína plasmática, o angiotensinogênio, produzido principalmente pelo fígado. A ação enzimática da renina sobre esta globulina libera um peptídeo de 10 aminoácidos, a Angiotensina I (Ang I). A Ang I, por sua vez, é substrato da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA), uma dicarboxipeptidase que retira os dois últimos aminoácidos do

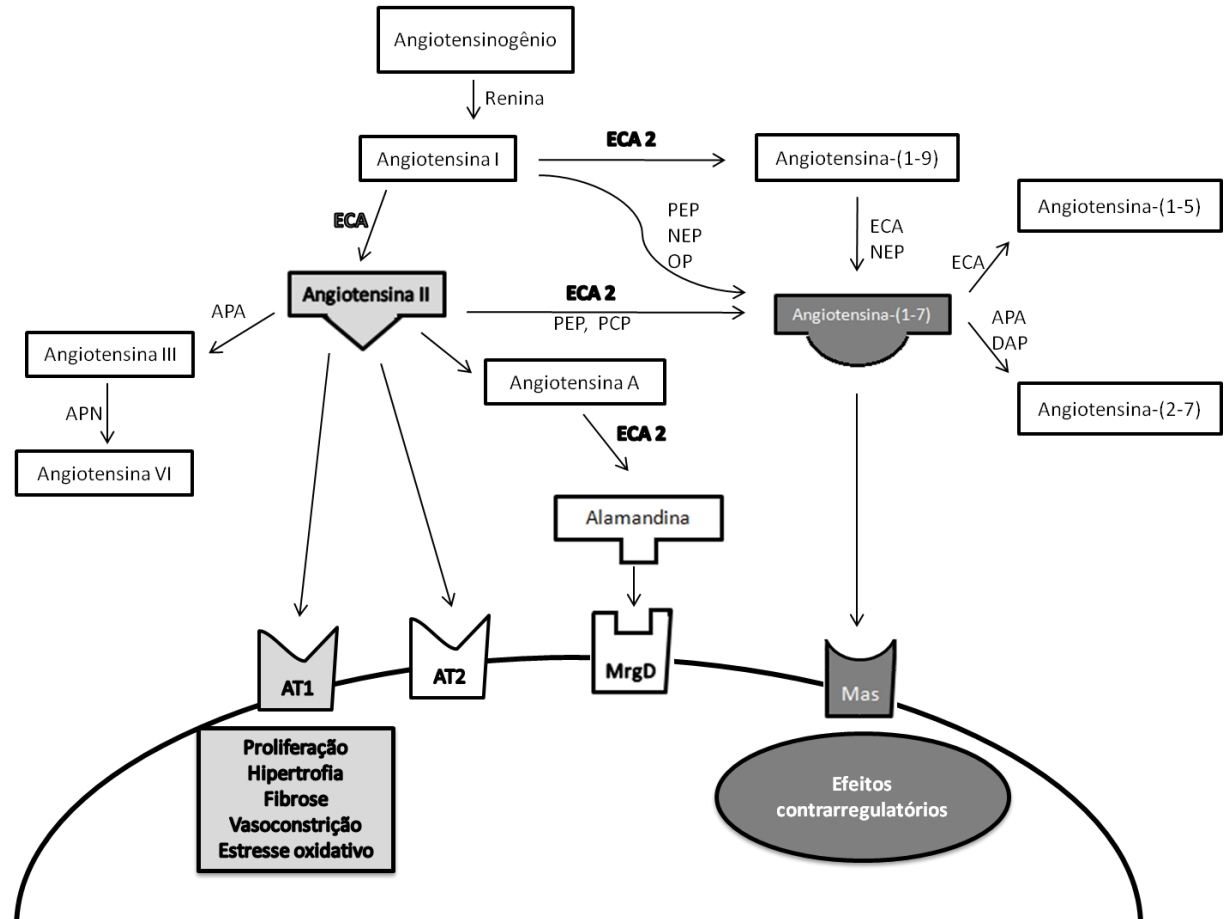
decapeptídeo, formando o octapeptídeo Angiotensina II (Ang II). Essa conversão ocorre quase que totalmente nos pequenos vasos dos pulmões. A Ang II exerce seus efeitos ligando-se ao receptor tipo 1 (AT1) ou tipo 2 (AT2). Através do receptor AT1, a Ang II possui ações vasoconstritoras, hipertróficas, fibróticas e de aumento do estresse oxidativo (AKERS et al., 2000; BAKER et al., 1990; MEZZANO; RUIZ-ORTEGA; EGIDO, 2001; TOUYZ; SCHIFFRIN, 2001; TOUYZ, 2005). Já por meio do receptor AT2, seus efeitos são geralmente opostos (MASAKI et al., 1998; SAVOIA et al., 2006; ZHANG et al., 2003; ZHU et al., 2003). Entretanto, os principais efeitos da Ang II são atribuídos a sua ligação ao receptor AT1 (FEOLDE; VIGNE; FRELIN, 1993).

A identificação de uma monocarboxipeptidase homóloga à ECA, a Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ECA 2) (DONOGHUE et al., 2000; TIPNIS et al., 2000) e da Angiotensina-(1-7) [(Ang-(1-7)] (CAMPAGNOLE-SANTOS et al., 1989; SANTOS et al., 1988; SCHIAVONE et al., 1988) trouxe novos conceitos sobre o SRA. A ECA 2 é capaz de clivar a Ang I, formando Ang-(1-9) que posteriormente pode ser convertida em Ang-(1-7) pela ECA (DONOGHUE et al., 2000) ou pela endopeptidase neutra (NEP) (RICE et al., 2004). A ECA 2 também pode produzir Ang-(1-7) diretamente pela clivagem de Ang II, sendo que esta via é a mais relevante para a geração desse heptapeptídeo (VICKERS et al., 2002). Outras enzimas [prolil-endopeptidases (PEP), prolil-carboxipeptidases (PCP) e oligopeptidases (OP)] também contribuem para a formação de outros fragmentos angiotensinérgicos, como pode ser visto na Figura 3 (CAMPBELL et al., 2004; CHAPPELL et al., 1998, 2000; STANZIOLA; GREENE; SANTOS, 1999). Recentemente, a Alamandina foi descrita como um novo componente do SRA (LAUTNER et al., 2013). Este peptídeo, formado a partir da Angiotensina A (JANKOWSKI et al., 2007) pela ação catalítica da ECA 2, possui efeitos vasodilatadores semelhantes àqueles da Ang-(1-7) ao se ligar ao receptor MrgD (receptor acoplado a proteína G relacionado ao Mas) (LAUTNER et al., 2013), demonstrando outro importante papel da ECA 2 no SRA.

A Ang-(1-7) exerce seus efeitos através da ligação a um receptor distinto dos receptores AT1 e AT2 (AMBUHL; FELIX; KHOSLA, 1994; SANTOS et al., 1994). Ela se liga ao receptor Mas, acoplado a uma proteína G (SANTOS et al., 2003), através do qual, na maioria das vezes, exerce efeitos benéficos e opostos aos efeitos

deletérios produzidos pela Ang II (FERRARIO et al., 1997; SANTOS; CAMPAGNOLE-SANTOS; ANDRADE, 2000).

**Figura 3** - Ilustração da formação dos principais componentes do Sistema Renina-Angiotensina.



Destaca-se a existência de dois eixos principais contrarregulatórios: o eixo ECA-Ang II-AT1, vasoconstritor, proliferativo, hipertrófico, e o eixo formado por ECA 2-Ang-(1-7)-Mas, com efeitos antiproliferativos, anti-hipertróficos e vasodilatadores (Adaptado de YANG et al., 2011).

Assim, o SRA é atualmente reconhecido pela presença de dois eixos principais distintos, um vasoconstritor/hipertrófico/proliferativo, tendo como principal mediador a Ang II via receptor AT1, e outro vasodilatador/anti-hipertrófico/anti-proliferativo, mediado principalmente pela Ang-(1-7) via receptor Mas (Figura 3). O balanço da atividade destes dois eixos é promovido, principalmente, pela expressão e atividade da ECA 2 (CRACKOWER et al., 2002a).

Estudos demonstram que o equilíbrio entre esses dois eixos reguladores encontra-se alterado na hipertrofia cardíaca patológica. Durante o desenvolvimento da hipertrofia, ocorre aumento na síntese tecidual de Ang II secundário ao aumento nos níveis de Angiotensinogênio e Enzima Conversora de Angiotensina (BAKER et

al., 1990; OUDOT et al., 2005), demonstrando a importância desse sistema na gênese dessa patologia.

Alguns componentes do SRA podem modular diferentes vias de sinalização envolvidas no processo hipertrófico cardíaco. Algumas dessas vias são descritas abaixo (Figura 4):

**MAPKs (proteínas quinases ativadas por mitógenos).** Tanto o metabolismo, quanto a síntese proteica, transporte, regulação de volume, expressão gênica e crescimento celular dependem das MAPKs (MEHTA; GRIENGLING, 2007). Dentre as MAPKs, destacam-se as ERKs (quinases reguladoras de sinal extracelular), as quais fosforilam um grande número de substratos nucleares e citosólicos (CHEN et al., 2001). Elas são ativadas em resposta aos agonistas dos receptores acoplados a proteína G (GPCRs), dentre eles receptores adrenérgicos, de Ang II e Endotelina 1, bem como por estresse mecânico (BARAUNA et al., 2013; LAL et al., 2007). São expressas em vários tecidos e ainda não está claro se a ERK1/2 é um mediador crítico da resposta hipertrófica, mas estudos mostram que a ativação da ERK1/2 é suficiente, mas não crítica, para a indução da hipertrofia (BERNARDO et al., 2010). O SRA modula essa via na medida em que a infusão de Ang II induz hipertrofia por aumento da fosforilação e ativação das ERKs 1 e 2 (ERK1/2), e a Ang-(1-7) é capaz de inibir a ativação dessas vias e atenuar o remodelamento cardíaco (MCCOLLUM; GALLAGHER; ANN TALLANT, 2012; PATEL et al., 2012).

**Fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K/AKT/mTOR).** PI3Ks são uma família de enzimas que tem sido relacionada com um grupo diverso de funções celulares, tais como crescimento celular, sobrevivência, diferenciação e proliferação (CANTLEY, 2002). Após ativação de receptores tirosina-quinases, a PI3K, uma lipídio quinase, libera produtos lipídicos de inositol da membrana plasmática, entre eles o Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3), os quais, por sua vez, modulam a sinalização intracelular (TOKER; CANTLEY, 1997). Na hipertrofia patológica, as PI3Ks da classe I<sub>B</sub> possuem como subunidade regulatória a p101 e como subunidade catalítica a p110 $\gamma$ , a qual está acoplada a GPCRs. A PI3K (p110 $\gamma$ ) não afeta o tamanho do coração em condições basais, mas é um regulador negativo da contratilidade (CRACKOWER et al., 2002b) e está fortemente associada à hipertrofia patológica. A PI3K induz hipertrofia através da ativação da AKT.

A AKT ou PKB (proteína quinase B) é uma proteína quinase serina/treonina envolvida em alguns processos celulares, tais como sobrevivência celular, ciclo celular, metabolismo e síntese proteica (OUDIT et al., 2004; SHIOJIMA; WALSH, 2006). Sua atividade é regulada pela PIP3 recrutada da membrana e pela atividade de PDK1. A PDK1, proteína quinase dependente de fosfatidilinositol 1, ativada e a produção de PIP3 permitem a co-localização dessas duas enzimas na membrana plasmática e resulta na ativação de AKT, através da fosforilação de seus resíduos serina-treonina pela PDK1 (SHIOJIMA; WALSH, 2006). A AKT é totalmente ativa após a fosforilação da Treonina 308 e da Serina 473, e fosforila mTOR (ver abaixo), exercendo então seus efeitos biológicos. A ativação a curto prazo da AKT em camundongos transgênicos induz hipertrofia fisiológica com crescimento moderado do tamanho do coração (aproximadamente 80%), enquanto que a ativação prolongada resulta em hipertrofia patológica com um aumento do tamanho do coração de 2,7 vezes (SHIOJIMA et al., 2005). A natureza fisiológica da hipertrofia cardíaca induzida por ativação de AKT em curto prazo é demonstrada pelas seguintes observações: função contrátil preservada, fibrose intersticial inexistente, não indução de genes cardíacos fetais e hipertrofia completamente reversível. Entretanto, a hipertrofia cardíaca patológica depois de ativação prolongada de AKT está associada com fibrose intersticial, indução de genes fetais, dilatação ventricular esquerda e disfunção contrátil (SHIOJIMA; WALSH, 2006).

A proteína mTOR (*mammalian target of rapamycin*, alvo mamário da rapamicina) é uma quinase serina/treonina conservada que regula o crescimento e o metabolismo celular. Seu nome se deve a sua identificação como uma proteína homóloga a outra encontrada em leveduras que são alvo da droga rapamicina (SARBASSOV; ALI; SABATINI, 2005; WULLSCHLEGER; LOEWITH; HALL, 2006). A mTOR é ativa logo após ser fosforilada pela AKT. Assim, a hipertrofia cardíaca induzida por superexpressão de AKT é efetivamente bloqueada pelo tratamento por rapamicina (SHIOI et al., 2002; SHIOJIMA et al., 2005), indicando que a hipertrofia induzida por AKT é predominantemente mediada pela via AKT-mTOR.

Estudos prévios tem demonstrado a influência do SRA na hipertrofia induzida pela via PI3K-AKT-mTOR. Como exemplo, o bloqueio do receptor AT1 preveniu o aumento da fosforilação de AKT induzida por hormônio tireoideano, mostrando que a Ang II pode ativar essa via de sinalização (DINIZ; CARNEIRO-RAMOS; BARRETO-CHAVES, 2009). Ao contrário, animais deficientes em Mas apresentaram diminuição

da fosforilação de AKT, sugerindo atuação da Ang-(1-7) na modulação dessa via (DIAS-PEIXOTO et al., 2008).

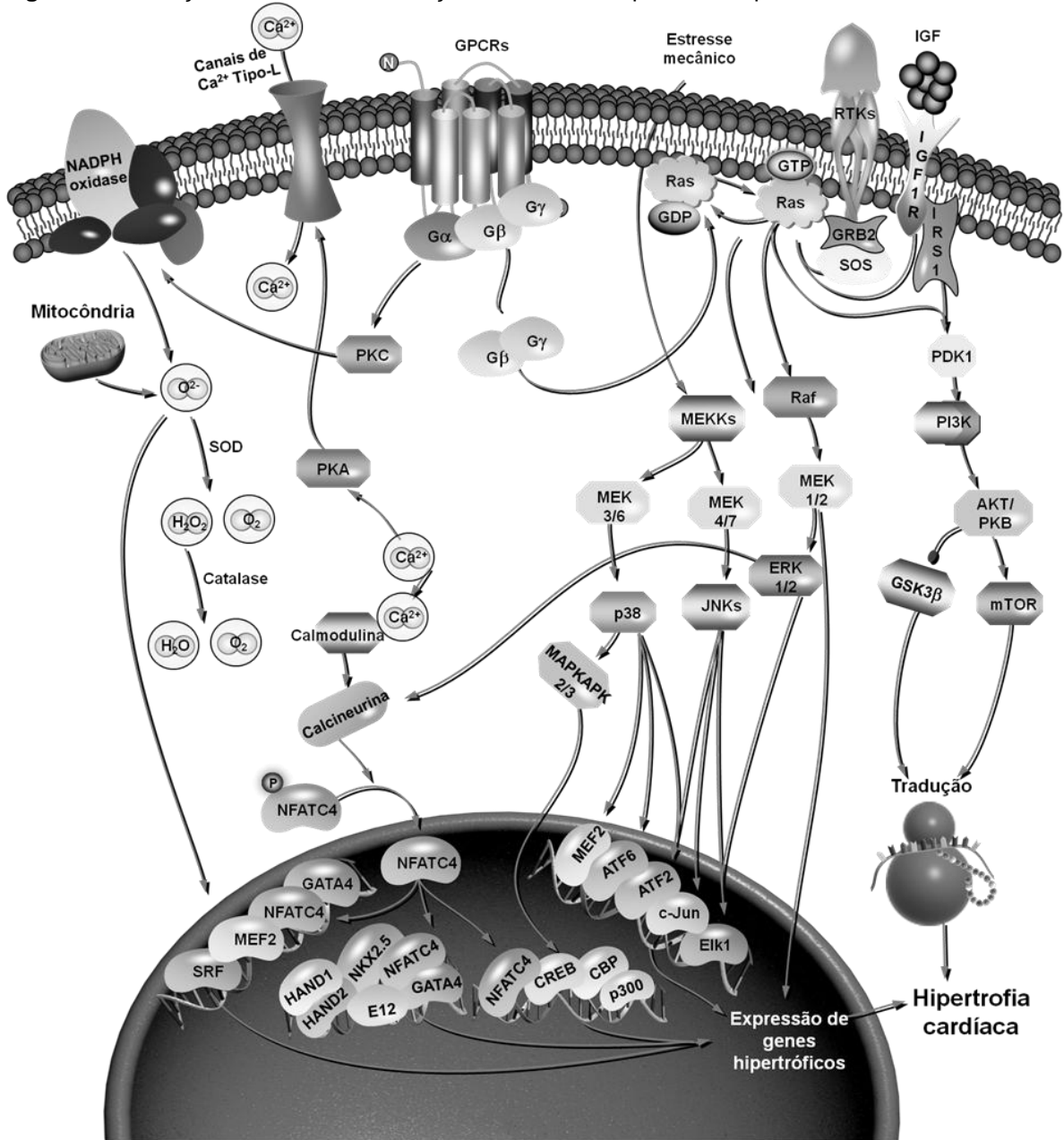
**Estresse oxidativo.** O estresse oxidativo ocorre quando a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (PHUNG et al., 2006) supera a capacidade antioxidante da célula (MCMURRAY et al., 1993). As EROs incluem radicais livres como ânion superóxido ( $O_2^-$ ), hidroxila ( $OH^-$ ), e o componente mais reativo, o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). A principal fonte geradora de EROs é a cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, mas estímulos hipertróficos, como a Angiotensina II, Endotelina-1 e catecolaminas, são capazes de aumentar a produção de EROs em cardiomiócitos por estimular a ativação de NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida) oxidase (GEISZT; LETO, 2004; LIU et al., 2004). A NADPH oxidase é responsável por doar elétrons para as enzimas óxido nítrico sintases, as quais sintetizam óxido nítrico a partir da L-arginina (ZAGO; ZANESCO, 2006). O ânion superóxido produzido por essas duas vias é dismutado em  $H_2O_2$  e  $O_2$  em uma reação catalisada pela superóxido dismutase (SOD) (KONDO et al., 2012), sendo uma importante via antioxidante. O  $H_2O_2$  gerado, por sua vez, sofre atuação da catalase produzindo duas moléculas de água e uma de oxigênio. Além da mitocôndria e da NADPH oxidase, xantina oxidase, óxido nítrico sintases não acopladas e células inflamatórias são largamente envolvidas no remodelamento cardíaco (MURDOCH et al., 2006). Estudos têm demonstrado que a regulação redox parece ser importante no desenvolvimento do fenótipo da insuficiência cardíaca, favorecendo a hipertrofia cardíaca, fibrose intersticial e remodelamento das câmaras cardíacas. A Nox-2, uma subunidade da NADPH oxidase, está envolvida na resposta hipertrófica cardíaca à Ang II. Assim, em camundongos deficientes em Nox-2, a infusão de Ang II não foi capaz de aumentar a atividade da NADPH oxidase e hipertrofia cardíaca (BENDALL et al., 2002; BYRNE et al., 2003). Ao contrário, o pré-tratamento com Ang-(1-7) é capaz de diminuir a atividade da NADPH oxidase em células endoteliais humanas (SAMPAIO et al., 2007), além de aumentar a liberação de óxido nítrico em células endoteliais bovinas (HEITSCH et al., 2001) e em cardiomiócitos ventriculares através do receptor Mas (DIAS-PEIXOTO et al., 2008).

**Cálcio-calcineurina.** Além do acoplamento excitação-contração, o cálcio está envolvido em processos como crescimento celular, metabolismo, secreção hormonal, motilidade, expressão gênica, regulação celular e proteica, necrose e apoptose (DHALLA et al., 2012). O cálcio intracelular pode se ligar a calmodulina e

esse complexo é capaz de regular a calcineurina, uma fosfatase serina-treonina, que desfosforila o fator nuclear de células-T ativadas (NFAT), translocando-o do citosol para o núcleo para a ativação de genes pró-hipertrofos (ZARAIN-HERZBERG; FRAGOSO-MEDINA; ESTRADA-AVILES, 2011). Fatores estimulantes da hipertrofia, como a Ang II, causam um aumento na frequência de oscilação do transiente de cálcio; isso permite o aumento do tamanho celular através dessa via de sinalização (CARTWRIGHT, 2011). Já a Ang-(1-7) é capaz de produzir GMPc (monofosfato cíclico de guanosina) e suprimir a ativação de NFAT, prevenindo o remodelamento cardíaco (GOMES et al., 2010).

Diante de tais efeitos benéficos, a Ang-(1-7) tem se tornado alvo de importantes estudos nas últimas décadas. Vários deles têm apontado o coração e os vasos sanguíneos como os principais alvos para as ações da Ang-(1-7), as quais incluem alterações bioquímicas e funcionais que levam, além da diminuição da hipertrofia cardíaca, à vasodilatação e melhora da função cardíaca (BOTELHO-SANTOS et al., 2007; CASTRO et al., 2005, 2006; FERREIRA et al., 2010; SAMPAIO; NASCIMENTO; SANTOS, 2003). Como exemplo, a Ang-(1-7) foi capaz de prevenir o remodelamento cardíaco induzido pela Ang II em ratos Sprague-Dawley (GROBE et al., 2007), e, em camundongos transgênicos, foi demonstrado que esse é um efeito direto do heptapeptídeo no coração (MERCURE et al., 2008). Ela também bloqueou os efeitos pró-oxidantes da Ang II (POLIZIO et al., 2007), além de preservar a função cardíaca, perfusão coronariana e função endotelial aórtica em modelo de insuficiência cardíaca em ratos (CASTRO et al., 2006; LOOT et al., 2002). Em ratos com superexpressão de Ang-(1-7), houve melhora da função cardíaca e efeito antifibrótico independente da pressão arterial com diminuição da hipertrofia induzida por isoproterenol, quando comparados a ratos Sprague-Dawley (FERREIRA et al., 2010; SANTOS et al., 2004). Além disso, camundongos deficientes no receptor Mas apresentaram disfunção cardíaca e aumento do conteúdo de colágeno (SANTOS et al., 2006).

**Figura 4** - Ilustração das vias de sinalização envolvidas no processo hipertrófico cardíaco.



(Adaptado de BERNARDO et al., 2010, e KEHAT and MOLKENTIN, 2010)

Observando os efeitos benéficos da Ang-(1-7), vários pesquisadores direcionaram seus estudos para a investigação da enzima formadora desse heptapeptídeo, a ECA 2. A deleção do gene da ECA 2 provocou dilatação das câmaras ventriculares e disfunção cardíaca, (CRACKOWER et al., 2002a), através do aumento local de Ang II, com aumento da hipertrofia cardíaca (YAMAMOTO et al., 2006). Esses estudos mostram a ECA 2 como um importante regulador da função cardíaca. Já a superexpressão do gene da ECA 2 atenuou a fibrose cardíaca e melhorou o remodelamento ventricular e função sistólica em modelo de infarto do

miocárdio em ratos (ZHAO et al., 2010), promovendo proteção contra a disfunção cardíaca induzida por isquemia (DER SARKISSIAN et al., 2008). O aumento da expressão de ECA 2 também resultou em efeitos protetores contra hipertrofia e fibrose cardíaca induzida pela infusão de Ang II em ratos Sprague-Dawley (HUENTELMAN et al., 2005).

Sendo a ECA 2 uma enzima chave no balanço entre os efeitos da Ang II e da Ang-(1-7), sua superexpressão resulta em efeitos protetores no sistema cardiovascular. Diferentes pesquisadores têm avaliado compostos capazes de ativar a ECA 2 endógena (FERREIRA et al., 2009, 2011; FRAGA-SILVA et al., 2010; HERNANDEZ PRADA et al., 2008). Hernandez Prada et al. (2008), pesquisaram e identificaram alguns compostos capazes de aumentar a atividade desta enzima. Um dos compostos identificados foi o 1-[(2-dimethylamino) ethylamino]-4-(hydroxymethyl)-7-[(4-methylphenyl) sulfonyloxy]-9H-xanthene-9-one (XNT), o qual bloqueou o aumento da pressão sistólica ventricular direita e da hipertrofia ventricular direita induzida por monocrotalina (FERREIRA et al., 2009) e reduziu o conteúdo de colágeno total em corações de ratos espontaneamente hipertensos (FERREIRA et al., 2011).

Outro composto capaz de ativar a ECA 2 é o aceturato de diminazeno (DIZE) (KULEMINA; OSTROV, 2011). Trabalhos prévios demonstraram que este composto foi capaz de reduzir a pressão arterial média de maneira dose dependente, a razão do peso do coração pelo peso corporal, e fibrose miocárdica (GJYMISHKA et al., 2010). O DIZE também atenuou a fibrose pulmonar induzida por bleomicina e o remodelamento cardíaco associado (GUPTA, D; SHENOY, V; KATOVICH, M; RAIZADA, 2012), além de diminuir a pressão sistólica ventricular direita e modulação simpática (RIGATTO et al., 2013). Recentemente, foi demonstrado que o tratamento com DIZE foi capaz de diminuir a área infartada e atenuar o remodelamento cardíaco após infarto do miocárdio (QI et al., 2013). Mecca et al. (2011) demonstraram as propriedades cerebroprotetoras da ativação do eixo ECA 2-Ang-(1-7)-Receptor Mas pelo DIZE no acidente vascular cerebral isquêmico, com diminuição da porcentagem de massa cinzenta infartada. A ativação desse eixo pelo DIZE também atenuou a reatividade cardíaca ao estresse emocional agudo (LIMA et al., 2013).

Assim, fármacos com capacidade de aumentar a atividade enzimática da ECA 2 tem surgido como uma estratégia para proteção contra doenças cardiovasculares,

uma vez que poderiam aumentar os níveis de Ang-(1-7) (peptídeo com efeito vasodilatador e anti-hipertrófico) e diminuir os níveis de Ang II (peptídeo com efeito vasoconstritor e pró-hipertrófico). Entretanto, faz-se necessário conhecer, não só os efeitos, mas os mecanismos pelos quais tais substâncias podem atuar na melhora do prognóstico das cardiopatias.

## **2- OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS**

### **Objetivo Geral:**

Avaliar os efeitos do DIZE sobre as alterações cardíacas induzidas pela sobrecarga pressórica, no modelo de coarctação de aorta abdominal, e os possíveis mecanismos intracelulares envolvidos nestes efeitos.

### **Objetivos Específicos:**

- Identificar os efeitos do DIZE na função ventricular esquerda e coronariana de ratos submetidos à sobrecarga pressórica.
- Avaliar o efeito do DIZE em anéis de aorta torácica isolada de ratos submetidos à sobrecarga pressórica.
- Avaliar o efeito do DIZE na hipertrofia induzida por sobrecarga pressórica.
- Identificar possíveis mecanismos envolvidos nos efeitos cardioprotetores da ativação da ECA 2 pelo DIZE.

### **3- MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1- Animais**

Foram utilizados ratos Wistar adultos, pesando entre 200-350 gramas, provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás. Foi fornecido acesso livre a água e comida aos animais. Eles foram alocados no Laboratório de Manutenção de Animais para Ensino e Pesquisa do Departamento de Ciências Fisiológicas/ICB/UFG com temperatura (20°C) e intensidade de luz controladas (12 horas claro/12 horas escuro). 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 057/12.

Os animais foram divididos em 4 grupos: grupo Sham; Coarctados (CAA); Coarctados tratados com acetato de diminazeno, DIZE (Sigma-aldrich), a 1mg/Kg, por gavagem (CAA+DIZE); e Coarctados tratados com DIZE, a 1mg/Kg, por gavagem, e A-779 (BACHEM), antagonista do receptor Mas, a 120 µg/dia, através de mini-bombas osmóticas (ALZET, Modelo 2004) (CAA+DIZE+A-779).

A dose do DIZE foi escolhida a partir de dados preliminares obtidos por nossos colaboradores, sendo que a menor dose efetiva para promover efeito hipotensor foi de 1 mg/Kg.

#### **3.2- Coarctação da aorta abdominal**

Para indução da hipertrofia cardíaca por sobrecarga pressórica, foi utilizado o modelo de coarctação de aorta abdominal. Os animais foram anestesiados com solução de quetamina (70 mg/kg) e xilazina (6 mg/kg) por via intraperitoneal e uma incisão na parede abdominal esquerda, a aproximadamente 1,5 cm da coluna vertebral, foi realizada. Após identificação da aorta, na porção cranial às duas artérias renais, uma linha cirúrgica foi passada sob a mesma, uma agulha 21G (0,8 mm de diâmetro) foi colocada sobre a aorta e um nó foi dado sobre a agulha e o vaso. A agulha foi retirada imediatamente deixando a aorta constricta com o seu diâmetro interno semelhante ao da agulha. Posteriormente, a parede abdominal e pele foram suturadas e os animais receberam administração intramuscular de uma

associação entre penicilinas e um aminoglicosídeo [Benzilpenicilina Benzatina (6.600 UI/kg), Benzilpenicilina Procaína (3.300 UI/kg), Benzilpenicilina Potássica (3.300 UI/kg) e Estreptomicina (5,5 mg/kg)] e um anti-inflamatório [Piroxicam (0,4 mg/kg)]. No grupo controle (*sham*), foi realizado um procedimento cirúrgico semelhante ao anterior, porém sem a constrição da aorta abdominal. Após o período de 21 dias, os animais foram eutanasiados por decapitação em guilhotina para a realização dos experimentos subsequentes.

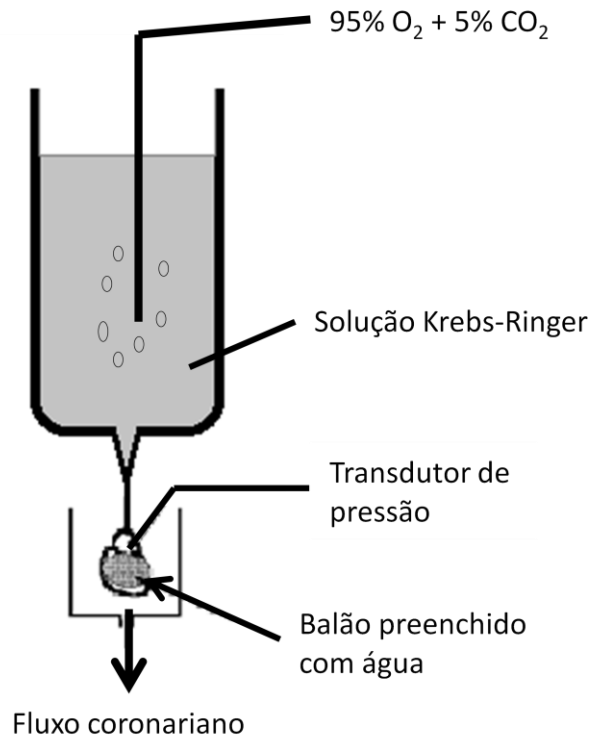
### **3.3- Registro da pressão arterial**

No dia anterior à eutanásia, foi realizada a canulação da artéria carótida dos animais para o registro da pressão arterial. Os animais foram anestesiados com solução de quetamina (70 mg/kg) e xilazina (6 mg/kg) por via intraperitoneal e uma incisão na altura da traqueia foi realizada. Após a dissecação da artéria carótida direita, esta foi cuidadosamente isolada do nervo vago e tecidos adjacentes. O fluxo sanguíneo da porção distal da artéria carótida foi interrompido com uma ligadura, enquanto o fluxo na porção proximal foi obstruído temporariamente com o auxílio de uma pinça. Foi realizado um corte na região medial da carótida e um cateter de polietileno heparinizado, confeccionado a partir de PE50 estirada, foi introduzido e devidamente fixado. Posteriormente, a pele foi suturada e o cateter foi exteriorizado para acesso pelo dorso do animal. Após 24 horas, a pressão arterial foi registrada por 30 minutos através da ligação do cateter a um transdutor de pressão ligado a um amplificador de sinais ETH-400 (CB Sciences, Inc.), por sua vez conectado a um conversor analógico digital PowerLab/400 (ADInstruments) acoplado ao software Labchart (ADInstruments), numa frequência de amostragem de 1000 Hz.

### **3.4- Avaliação da função ventricular esquerda**

Para a avaliação da função ventricular esquerda, foi realizada a técnica de Langendorff com pressão constante de 70 mmHg (Figura 5). A composição da solução nutritiva, mantida a 37°C, utilizada para a perfusão dos corações isolados (Solução de Krebs-Ringer) está detalhada na Tabela 1.

**Figura 5** - Ilustração da técnica de coração isolado (método de Langendorff).



Uma solução de Krebs-Ringer carbogenada (5% CO<sub>2</sub>, 95% O<sub>2</sub>) é aquecida a 37°C e perfunde o coração, o qual é submetido a pressão constante de 70 mmHg.

**Tabela 1** - Composição da solução de Krebs-Ringer.

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

Os animais foram eutanasiados por decapitação 10 minutos após serem heparinizados (400 UI de heparina). Uma vez exposta a cavidade torácica, o coração foi cuidadosamente retirado e a aorta ascendente foi canulada e conectada ao sistema de perfusão contendo a solução nutritora. Um balão preenchido com água foi introduzido no ventrículo esquerdo e conectado a um transdutor de pressão para análise das pressões intraventriculares (sistólica e diastólica). A aquisição dos dados foi realizada através do sistema Biopac Systems, Inc. (USA). A frequência cardíaca e as derivadas (+dP/dt e -dP/dt) foram calculadas a partir do registro de

pressão intraventricular. O fluxo coronariano foi medido a cada 5 minutos coletando-se o perfusato durante 1 minuto. Após um período de estabilização de aproximadamente 30 minutos, os corações foram perfundidos por um período adicional de 15 minutos para posterior análise.

### 3.5- Avaliação da reatividade vascular

Para a avaliação da reatividade vascular, anéis de aorta torácica descendente superior à constrição, livre de tecido adiposo e conectivo, foram montados em cubas contendo solução de Krebs-Henseleit gaseificada, a 37 °C fixados a hastes metálicas acopladas a transdutores de força. A composição da solução nutritora utilizada para o banho do anel de aorta isolada (Solução de Krebs-Hanseleit) está detalhada na Tabela 2.

**Tabela 2** - Composição da solução de Krebs-Henseleit.

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

Os animais foram eutanasiados por decapitação 10 minutos após serem heparinizados (400 UI de heparina). Uma vez exposta a cavidade torácica, a aorta torácica descendente foi retirada e dividida em anéis de 4 mm. Os anéis foram mantidos a uma tensão de 1,5 g por um período de estabilização de 1 hora. A presença de endotélio funcional foi avaliada pela porcentagem de relaxamento induzido pela acetilcolina (10 µM) nos vasos pré-contraídos com fenilefrina (0,1 µM). Os vasos foram considerados viáveis quando o relaxamento foi superior à 80 %. Curvas de concentração-resposta para acetilcolina (10<sup>-9</sup> à 10<sup>-5</sup> M) foram realizadas em anéis com endotélio pré-contraídos com fenilefrina (0,1 µM). Curvas de

concentração-resposta para nitroprussiato de sódio ( $10^{-11}$  a  $10^{-5}$  M) foram realizadas em anéis sem endotélio pré-contraídos com fenilefrina (0,1  $\mu$ M).

### 3.6- Análise morfométrica

O índice de massa ventricular foi avaliado pela relação do peso do ventrículo esquerdo, em gramas, pelo comprimento da tíbia do animal, em centímetros.

Para a análise morfométrica, os corações foram excisados e perfundidos com KCl 4 mM para o relaxamento total das fibras cardíacas. Partes dos ventrículos esquerdos foram fixados em Paraformaldeído 4% tamponado e incluídos em parafina para as análises histológicas. Após a montagem dos blocos, as amostras foram submetidas a microtomia em secções de 5  $\mu$ m e corados com hematoxilina e eosina, como detalhado na Tabela 3. Após a captura das imagens, o diâmetro dos cardiomiócitos foi avaliado em 3 cortes por animal usando um micromedidor ocular adaptado ao microscópio de luz (BX 60, Olympus) com 400x de magnificação. Somente cardiomiócitos cortados longitudinalmente com núcleo e limites celulares visíveis foram analisados (aproximadamente 100 cardiomiócitos por corte), obtendo-se a medida da Área de Secção Transversa (AST).

**Tabela 3** - Descrição dos procedimentos para a realização da coloração dos cortes histológicos com hematoxilina e eosina.

<b>Desparafinização:</b>	Xilol 1 (30 min, temperatura ambiente) Xilol 2 (15 min, temperatura ambiente) Xilol 3 (15 min, temperatura ambiente)
<b>Hidratação:</b>	Álcool absoluto 1 (2 min, temperatura ambiente) Álcool absoluto 2 (2 min, temperatura ambiente) Álcool absoluto 3 (2 min, temperatura ambiente) Álcool 90 % (2 min, temperatura ambiente) Álcool 80 % (2 min, temperatura ambiente) Álcool 70 % (2 min, temperatura ambiente)
<b>Lavagem das lâminas:</b>	Água corrente, 20 min, temperatura ambiente.
<b>Solução de Hematoxilina:</b>	1 min, temperatura ambiente
<b>Lavagem das lâminas:</b>	Água corrente, 20 min, temperatura ambiente.

<b>Solução de eosina:</b>	40 seg, temperatura ambiente
<b>Lavagem das lâminas:</b>	2 banhos rápidos em água corrente, temperatura ambiente
<b>Desidratação:</b>	Álcool 70 % (1 min, temperatura ambiente) Álcool 80 % (1 min, temperatura ambiente) Álcool 90 % (1 min, temperatura ambiente) Álcool 95 % (1 min, temperatura ambiente) Álcool absoluto 1 (1 min, temperatura ambiente) Álcool absoluto 2 (1 min, temperatura ambiente) Álcool absoluto 3 (1 min, temperatura ambiente)
<b>Desidratação:</b>	Xilol 1 (2 min, temperatura ambiente) Xilol 2 (2 min, temperatura ambiente) Xilol 3 (10 min, temperatura ambiente)

### 3.7- Análise da expressão de mRNA de marcadores hipertróficos

Um grupo exclusivo de animais foi tratado da mesma forma e eutanasiado. Um pedaço do ventrículo esquerdo foi cortado em pequenos pedaços, congelado em nitrogênio líquido e armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para a extração do mRNA, o tecido foi submetido a agitação vigorosa com pérolas de vidro (425-600  $\mu\text{m}$ -Sigma-Aldrich), por 5 ciclos de 30 segundos cada, em presença de Trizol (GIBCO™ Invitrogen Corporation), de acordo com instruções do fabricante. O cDNA foi sintetizado por transcrição reversa utilizando-se o kit *High capacity RNA-to-cDNA* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A especificidade de cada par de primer foi confirmada pela visualização de um único produto oriundo da reação em cadeia da polimerase (PCR) em eletroforese em gel de agarose 1,5% e por meio da curva de dissociação. O cDNA foi quantificado através de reação com transcriptase reversa seguida de PCR quantitativa (qRT-PCR), usando o kit *SYBR green PCR master mix* (Applied Biosystems no equipamento Step One Plus PCR System). A análise de qRT-PCR foi realizada em triplicatas oriundas de mistura de igual volume de cDNA de 3 amostras mais representativas de cada tratamento. Os dados foram normalizados usando o gene codificante GAPDH como controle endógeno,

amplificado em cada experimento de qRT-PCR, os quais foram apresentados como expressão relativa em comparação ao grupo Sham, ao qual foi atribuído o valor de 1. Curvas-padrão foram geradas pela diluição de 1:5 do cDNA. Os níveis de expressão relativa dos genes de interesse foram calculadas utilizando-se o método de curva-padrão de quantificação relativa (BOOKOUT et al., 2006). Os oligonucleotídeos específicos para *Rattus norvegicus* estão descritos a seguir: Peptídeo Natriurético Atrial (ANP), senso: GGATTTCAAGAACCTGCTAGA, antisenso: GCTTCATCGGTCTGCTCGC; Peptídeo Natriurético cerebral (BNP), senso: CTCTGGGACCACCTCTCAAG, antisenso: CAAGTTTGTGCTGGAAGATAAG; Fator de Transformação de Crescimento Beta 1 (TGF- $\beta$ ), senso: CGACATGGAGCTGGTGAAAC, antisenso: GTCGCGGGTGCTGTTGTAC.

### **3.8- Análise de proteínas de interesse por Western Blot**

Um grupo exclusivo de animais, não submetido a técnica de coração isolado, foi utilizado para as análises por Western Blot, sendo operados e tratados como nos grupos anteriores. Após eutanásia, amostras do ventrículo esquerdo foram coletadas e mantidas em nitrogênio líquido, sendo logo depois estocadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, foram lisadas [Tampão de lise: PBS (tampão fosfato-salino) 1X, 1% Nonidet P40, 0,5% deoxicolato de sódio, 0,1% SDS (dodecil sulfato de sódio), inibidor de protease 0,01%, água q.s.p.], sonicadas, e, após incubação em gelo por 30 minutos, foram centrifugadas a 12.000 RPM, por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi retirado e o extrato proteico foi quantificado pelo método de Bradford (Bradford, 1976), sendo depois congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, o volume de amostras correspondente a 40  $\mu\text{g}$  foi separado em tubo identificado, acrescentando-se 5  $\mu\text{L}$  de tampão de amostra (7 mL de Tris HCl/SDS, 3 mL de glicerol, 1 g de SDS, 0,6 mL de  $\beta$ -mercaptoetanol, 1,2 mg de azul de bromofenol, 10 mL de água q.s.p.) e água mili-Q até completar-se o volume de 30  $\mu\text{L}$ .

As amostras foram fracionadas por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida nas concentrações de 7,5, 10 ou 12%, dependendo do peso molecular da proteína de interesse, e corridas a 100 volts por 120 minutos. Posteriormente, foi realizada a transferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose

também a 100 volts por 120 minutos, a temperatura de 4°C. Em seguida, a membrana foi corada com Ponceau 0,5%, para a certificação da eficiência da corrida e da transferência, lavada com TBS-T (tampão tris-salino com tween) e incubada com leite a 5% por 1 hora, para diminuir a possibilidade de haver futuras ligações inespecíficas com o anticorpo usado para a detecção da proteína alvo. A membrana foi incubada com anticorpo primário de interesse por 24 horas e, posteriormente, com anticorpo secundário comercial conjugado com fosfatase alcalina por 1 hora e trinta minutos. A membrana foi revelada com solução de substrato cromogênico para fosfatase alcalina contendo BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) e NBT (nitro azul de tetrazol) (Invitrogen). As bandas foram analisadas pelo software Image J e a expressão das proteínas foi mostrada de forma relativa ao grupo controle (Sham), ao qual foi atribuído o valor de 1.

As proteínas analisadas por esta técnica e as respectivas concentrações dos anticorpos utilizados foram: AKT (CellSignaling) 1:2.000, Fosfo-AKT (CellSignaling) 1:500, catalase (LifespanBiosciences) 1:10.000, GATA-4 (NovusBiologicals) 1:375, mTOR (CellSignaling) 1:1.000, ERK1/2 (CellSignaling) 1:2.000, Fosfo-ERK1/2 (CellSignaling) 1:500, SOD (Santa Cruz Biotechnology) 1:2.000.

### **3.9- Análise estatística**

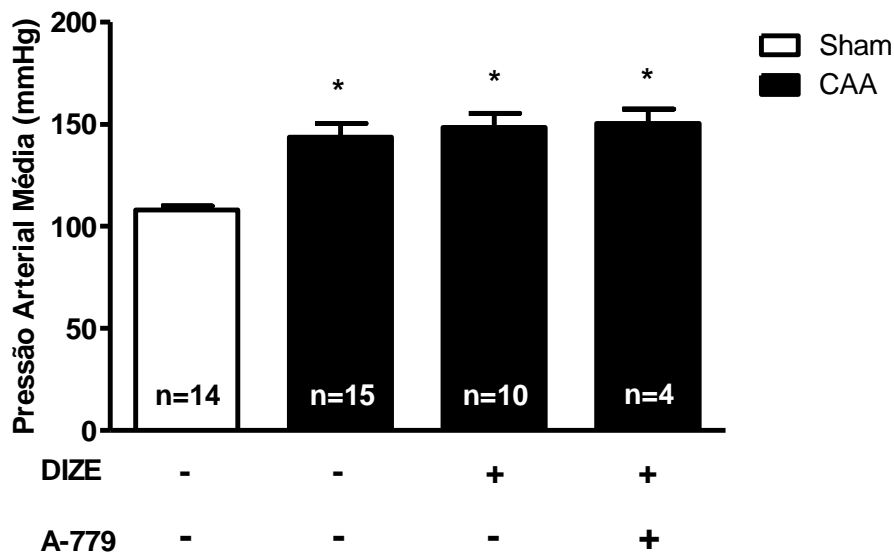
O software utilizado para o tratamento dos dados obtidos foi o GraphPadPrism 5.0<sup>®</sup>. Para a análise da morfometria, pressão arterial média, função ventricular esquerda e expressão proteica, foi realizado o teste One way ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls. Para a análise da reatividade vascular, foi feito o teste Two way ANOVA seguido do teste de Bonferroni. Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). As diferenças foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ .

## 4- RESULTADOS

### 4.1 – Avaliação da pressão arterial

Para confirmar a sobrecarga pressórica induzida pela coarctação, avaliamos a pressão arterial média (PAM) (Figura 6). Como esperado, a coarctação da aorta abdominal aumentou a PAM ( $108,0 \pm 1,9$  n=14 vs.  $143,6 \pm 6,8$  n=15 mmHg nos CAA,  $P<0,05$ ) e o tratamento crônico com DIZE não foi capaz de alterá-la ( $148,4 \pm 6,9$  n=10 vs.  $143,6 \pm 6,8$  mmHg n=15 nos CAA, NS). O tratamento com o antagonista do receptor Mas, o A-779, também não alterou o aumento da PAM induzido pela coarctação ( $150,4 \pm 6,9$  n=4 vs.  $143,6 \pm 6,8$  mmHg nos CAA,  $P<0,05$ ).

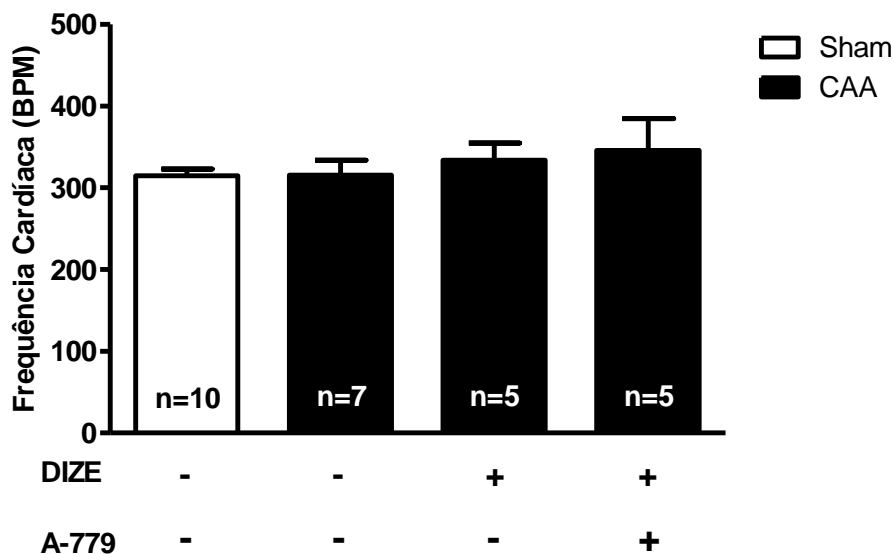
Figura 6 - Pressão arterial média dos animais dos respectivos grupos estudados.



Os dados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média e analisados por One way ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls. \* $P<0,05$  quando comparados aos animais Sham. CAA: coarctação de aorta abdominal.

A frequência cardíaca dos animais estudados não foi alterada por nenhum dos tratamentos (Sham:  $314,9 \pm 8,3$  BPM n=10; CAA:  $315,8 \pm 17,8$  BPM n=7; CAA+DIZE:  $334,1 \pm 20,6$  BPM n=5; CAA+DIZE+A-779:  $345,6 \pm 39,3$  n=5; NS) (Figura 7).

**Figura 7** - Frequência cardíaca dos animais dos respectivos grupos estudados.



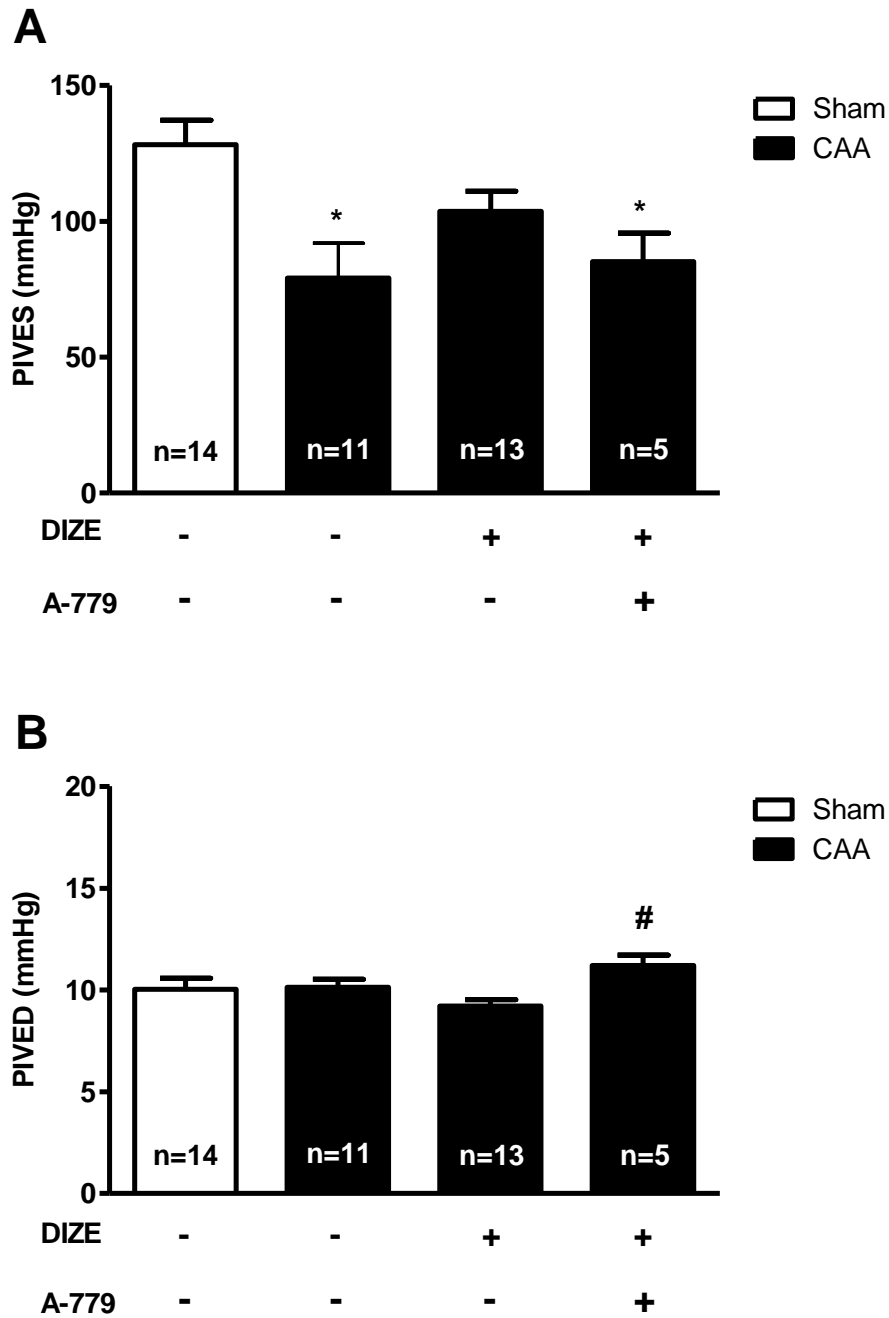
Os dados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média e analisados por One way ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls. CAA: coarctação de aorta abdominal.

#### 4.2- Avaliação da função ventricular esquerda

A avaliação da função ventricular esquerda foi feita pela técnica de coração isolado (método de Langendorff) com pressão constante. Como esperado, os corações submetidos à sobrecarga pressórica apresentaram prejuízo na função contrátil ventricular, o que pode ser observado pela menor pressão intraventricular esquerda ao final da sístole (PIVES) nos corações dos animais CAA ( $128,1 \pm 9,0$  n=9 vs.  $79,1 \pm 12,8$  mmHg n=7 em CAA,  $P < 0,05$ ). Este efeito foi atenuado pela ativação da ECA 2 ( $103,7 \pm 7,4$  n=8 vs.  $128,1 \pm 9,0$  mmHg n=9 em Sham, NS). O efeito do DIZE foi atenuado pelo tratamento com A-779 ( $103,7 \pm 7,4$  n=8 vs  $85,2 \pm 10,5$  mmHg n=5 em CoA+DIZE+A-779, NS) (ver Figura 8).

A pressão intraventricular esquerda ao final da diástole (PIVED) não foi alterada pela coarctação ou com o tratamento com DIZE (Sham:  $10,0 \pm 0,5$  mmHg n=9; CAA:  $10,1 \pm 0,4$  mmHg n=7; CAA+DIZE:  $9,2 \pm 0,3$  mmHg n=8, NS), mas o bloqueio do receptor Mas aumentou este parâmetro (CAA+DIZE:  $9,2 \pm 0,3$  n=8 vs CAA+DIZE+A-779:  $11,2 \pm 0,5$  mmHg n=9,  $P < 0,05$ ).

**Figura 8** - Pressão intraventricular esquerda ao final da sístole (A) e da diástole (B) dos corações isolados de ratos.

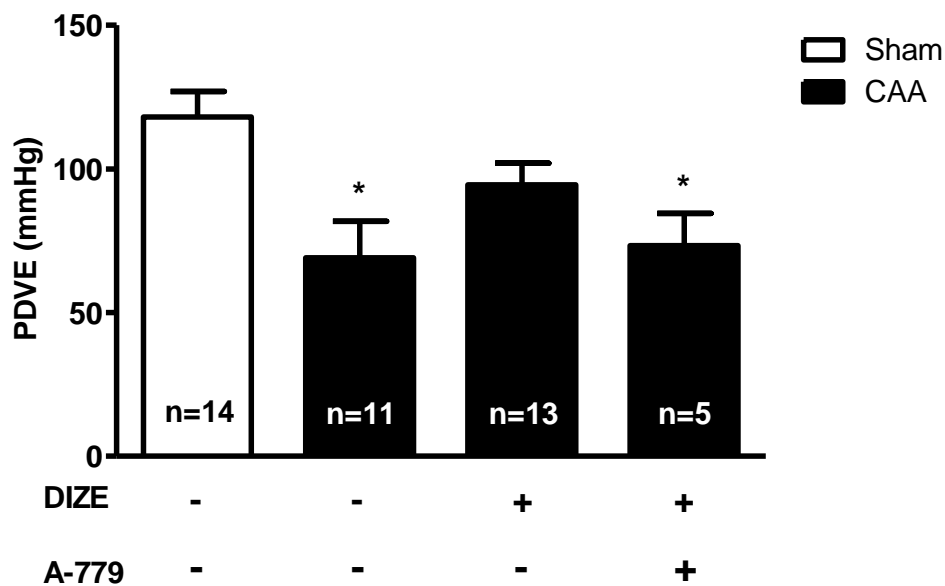


Os dados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média e analisados por One way ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls. \* $P < 0,05$  quando comparados aos animais Sham. # $P < 0,05$  quando comparados ao grupo CAA+DIZE. CAA: coarctação de aorta abdominal. PIVES: pressão intraventricular esquerda ao final da sístole. PIVED: pressão intraventricular esquerda ao final da diástole.

A Figura 9 mostra a pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PDVE), analisada através da diferença entre a PIVES e a PIVED, de corações isolados de

ratos dos respectivos grupos estudados. Como na PIVES, a PDVE foi menor nos animais coarctados ( $118,1 \pm 8,9$  n=9 vs  $69,0 \pm 12,7$  mmHg n=7 nos CAA,  $P < 0,05$ ) e a ativação da ECA 2 pelo DIZE atenuou o prejuízo causado pela sobrecarga pressórica ( $94,4 \pm 7,5$  n=8 vs  $69,0 \pm 12,7$  mmHg n=7 nos CAA, NS). Novamente, o bloqueio do Receptor Mas atenuou o efeito do DIZE ( $94,4 \pm 7,5$  n=8 vs  $69,0 \pm 12,7$  mmHg n=7 nos CAA, NS).

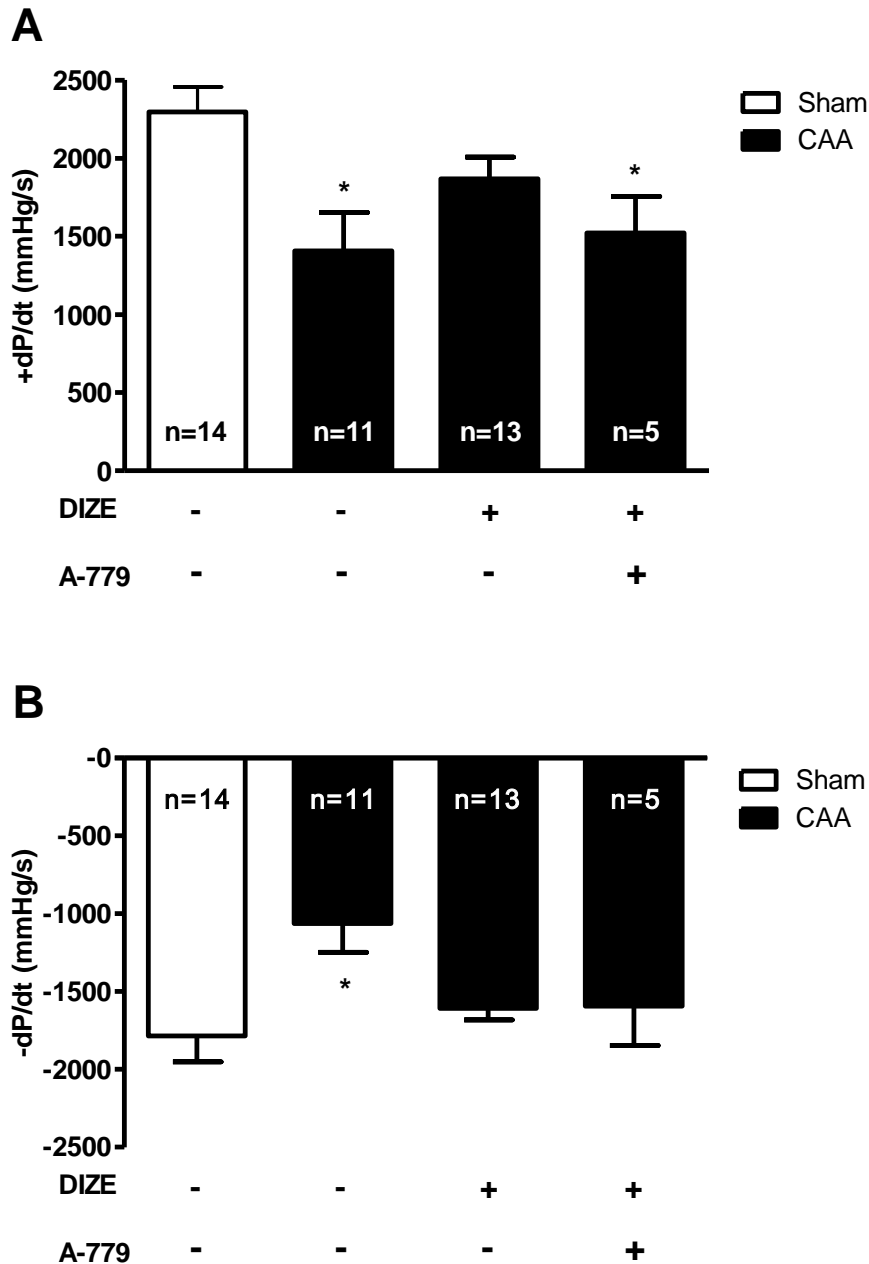
**Figura 9.** Pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo de corações isolados de ratos.



Os dados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média e analisados por One way ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls. \* $P < 0,05$  quando comparados ao grupo Sham. CAA: coarctação de aorta abdominal. PVDE: pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo.

A  $+dP/dt$  (derivada que reflete a velocidade de contração) foi menor nos corações dos animais submetidos a coarctação ( $2295,0 \pm 161,8$  n=9 vs  $1406,0 \pm 246,5$  mmHg/s n=7 nos CAA,  $P < 0,05$ ) (Figura 10A). O tratamento com DIZE atenuou esse efeito ( $1868,0 \pm 140,3$  n=8 vs  $1406,0 \pm 246,5$  mmHg/s n=7 nos CAA, NS) e o bloqueio do receptor Mas atenuou essa melhora ( $1868,0 \pm 140,3$  n=8 vs  $1522,0 \pm 232,6$  mmHg/s n=5 nos CAA+DIZE+A-779, NS). O mesmo comportamento foi observado em relação ao relaxamento ventricular ( $-dP/dt$ ), exceto pelo fato de que a infusão de A-779 não atenuou os efeitos do DIZE ( $1609,0 \pm 73,0$  n=7 vs  $1594,0 \pm 253,1$  mmHg/s n=5 nos CAA+DIZE+A-779, NS) (Figura 10B).

**Figura 10** - Velocidades de contração (A) e relaxamento (B) de corações isolados de ratos.

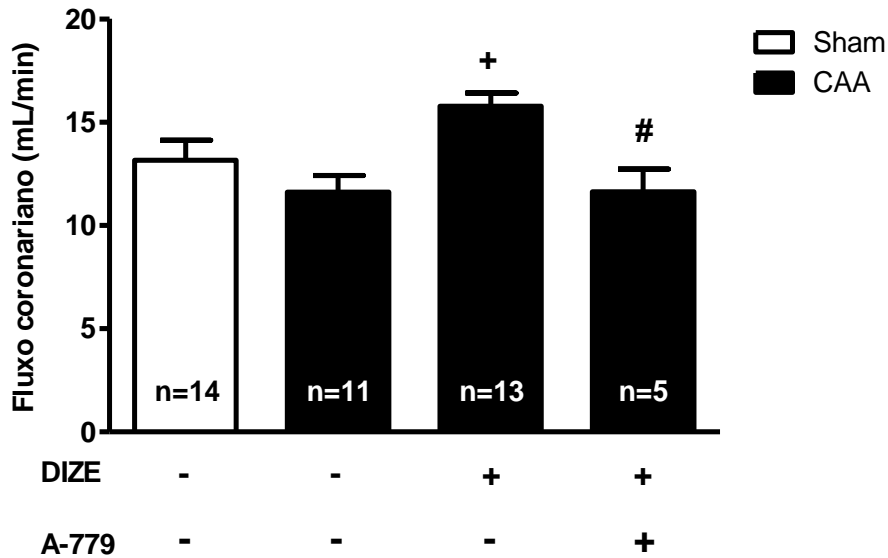


Os dados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média e analisados por One way ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls. \* $P < 0,05$  quando comparados ao grupo Sham. CAA: coarctação de aorta abdominal. +dP/dt: derivada positiva da pressão ventricular pelo tempo, velocidade de contração intraventricular. -dP/dt: derivada negativa da pressão ventricular pelo tempo, velocidade de relaxamento intraventricular.

Já o fluxo coronariano não foi alterado pela sobrecarga pressórica ( $13,16 \pm 0,96$  n=9 vs  $11,61 \pm 0,80$  mL/min n=7 nos CAA, NS), mas os animais tratados com DIZE apresentaram maior fluxo coronariano que os animais coarctados ( $15,77 \pm 0,64$  n=8 vs  $11,61 \pm 0,80$  mL/min n=7 nos CAA,  $P < 0,05$ ). O bloqueio do receptor Mas

aboliu esse aumento ( $15,77 \pm 0,64$  n=8 vs  $11,62 \pm 1,10$  mL/min n=5 nos CAA+DIZE+A-779,  $P < 0,05$ ) (Figura 11).

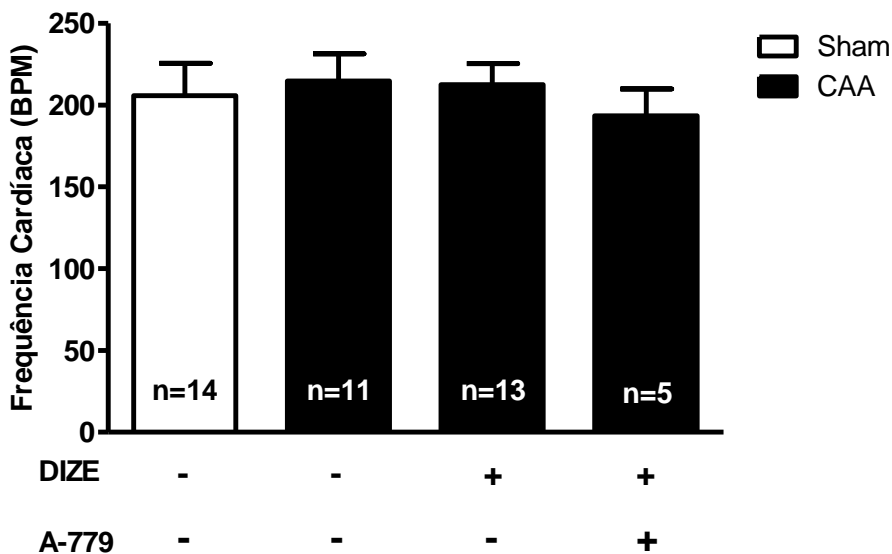
**Figura 11** - Fluxo coronariano de corações isolados de ratos.



Os dados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média e analisados por One way ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls. <sup>+</sup> $P < 0,05$  quando comparados ao grupo CAA. <sup>#</sup> $P < 0,05$  quando comparados ao grupo CAA+DIZE. CAA: coarctação de aorta abdominal.

Com relação a frequência cardíaca dos corações isolados, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nos respectivos grupos estudados (Sham:  $205,9 \pm 19,6$  BPM n=9; CAA:  $214,8 \pm 16,6$  BPM n=7; CAA+DIZE:  $212,5 \pm 12,8$  BPM n=10; CAA+DIZE+A-779:  $193,5 \pm 16,4$  n=6; NS) (Figura 12).

**Figura 12.** Frequência cardíaca de corações isolados de ratos.

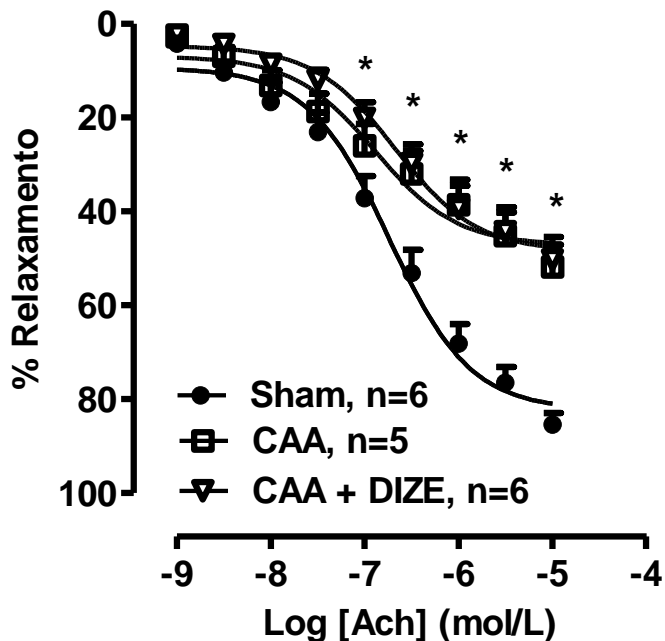


Os dados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média e analisados por One Way ANOVA seguido por pós-teste de Newman Keuls. CAA: coarctação de aorta abdominal.

#### 4.3- Análise da reatividade vascular em anéis de aorta torácica isolada

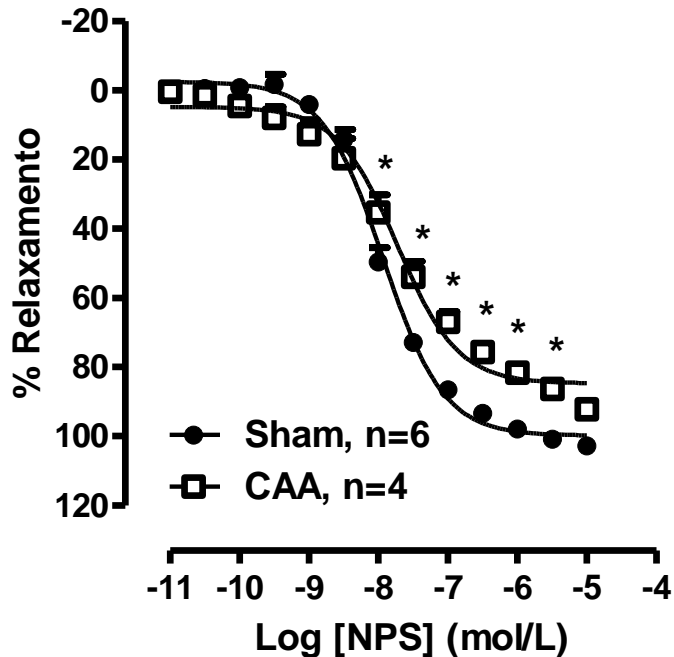
Sabendo que a sobrecarga pressórica é um fator causador de disfunção endotelial e que o tratamento com DIZE melhorou o fluxo coronariano, avaliamos a reatividade vascular dos animais envolvidos no estudo. A sobrecarga pressórica diminuiu o relaxamento induzido por acetilcolina e o tratamento com DIZE não foi capaz de melhorá-lo nos anéis de aorta dos animais coarctados (Figura 13). Além disso, a sobrecarga pressórica também promoveu uma leve redução no relaxamento induzido por nitroprussiato de sódio (vasodilatador independente do endotélio) em anéis de aorta torácica sem endotélio (Figura 14).

**Figura 13** - Relaxamento de anéis de aorta torácica com endotélio dos ratos sham, coarctados (CAA) e coarctados tratados com DIZE (CAA + DIZE) frente a concentrações crescentes de acetilcolina após pré-constricção com fenilefrina.



O vasorrelaxamento a partir de cada concentração foi calculado como porcentagem da vasoconstrição máxima. Os dados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média e analisados por Two Way ANOVA seguido teste de Bonferroni. \*P < 0,05 quando comparados aos animais Sham. CAA: coarctação de aorta abdominal. Ach: acetilcolina.

**Figura 14** - Relaxamento de anéis de aorta torácica sem endotélio dos ratos sham e coarctados (CAA) frente a concentrações crescentes de nitroprussiato de sódio após pré-constricção com fenilefrina.



O vasorrelaxamento a partir de cada concentração foi calculado como porcentagem da vasoconstricção máxima. Os dados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média e analisados por Two Way ANOVA seguido teste de Bonferroni. \* $P < 0,05$  quando comparados aos animais Sham. CAA: coarctação de aorta abdominal. NPS: nitroprussiato de sódio.

#### 4.4- Avaliação da hipertrofia ventricular esquerda

Para avaliação da hipertrofia ventricular esquerda, foram analisados parâmetros morfométricos como índice de massa ventricular esquerda (IMV) e a área de secção transversa dos cardiomiócitos (AST), como pode ser visto na Tabela 4. A coarctação da aorta abdominal levou à hipertrofia cardíaca, o que pode ser visto claramente pelo significativo aumento do IMV e da AST. O tratamento com DIZE atenuou o aumento do IMV, mas reverteu completamente o aumento da AST provocado pela coarctação. Já o bloqueio do receptor Mas, através do tratamento crônico com A-779, anulou completamente o efeito anti-hipertrofico do DIZE.

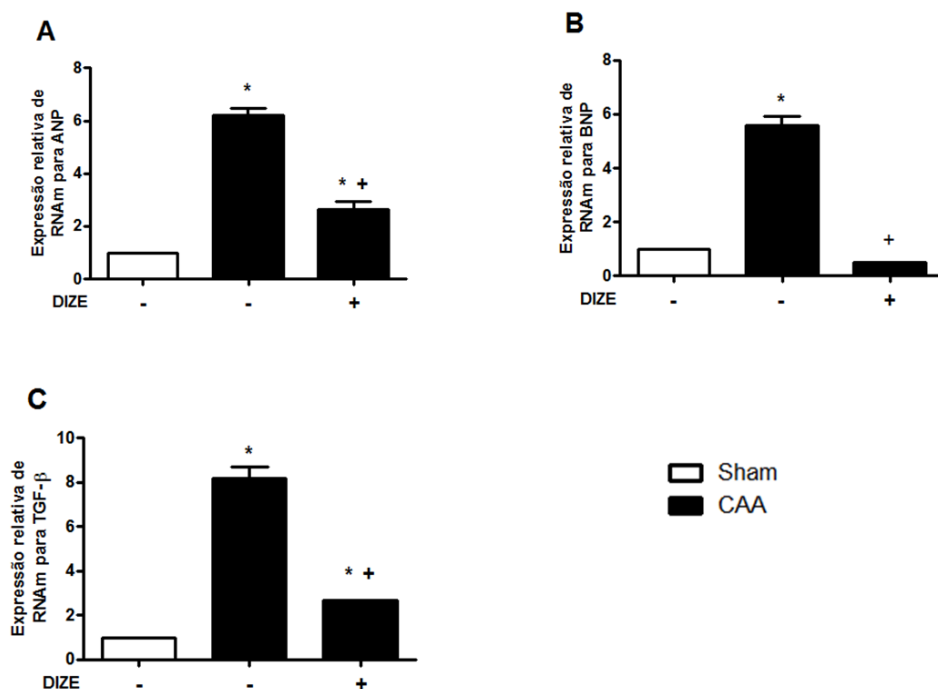
**Tabela 4** - Parâmetros morfométricos dos animais Sham, Coarctados, Coarctados tratados com DIZE e Coarctados tratados com DIZE e A-779.

	Sham	CAA	CAA + DIZE	CAA + DIZE + A-779
<b>PC (g)</b>	277,9±7,2	267,3±12,9	274,8±7,9	278,7±25,3
<b>PCor (g)</b>	0,840±0,023	0,976±0,046*	0,924±0,035	1,302±0,095 <sup>†</sup> ##
<b>PVE (g)</b>	0,613±0,017	0,774±0,042*	0,684±0,026 <sup>†</sup>	0,986±0,063 <sup>†</sup> ##
<b>IMV (g/cm)</b>	0,172±0,005	0,206±0,010*	0,188±0,007	0,263±0,012 <sup>†</sup> ##
<b>AST (µm)</b>	9,376±0,551	10,720±0,271*	9,253±0,230 <sup>†</sup>	---

Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média e analisados por One Way ANOVA seguido de pós-teste de Newman-Keuls. \*P<0,05 quando comparados aos animais Sham; <sup>†</sup>P<0,05 quando comparados aos animais CAA; <sup>#</sup>P<0,05 quando comparados aos animais CAA+DIZE. n=4-14. VE: ventrículo esquerdo; IMV: índice de massa ventricular esquerda; AST: área de secção transversa do cardiomiócito. CAA: coarctação de aorta abdominal. PC: peso corporal. PCor: peso do coração. PVE: peso do ventrículo esquerdo.

O efeito anti-hipertrófico do DIZE também foi confirmado por meio da análise dos níveis de mRNA para ANP, BNP e TGF-β. É bem estabelecido na literatura que tais proteínas encontram-se aumentadas durante o processo hipertrófico. Assim, a sobrecarga pressórica aumentou os níveis do transcrito desses marcadores, mas o tratamento com DIZE reverteu essa elevação (Figura 15).

**Figura 15** - Análise da expressão de mRNA dos genes codificantes para ANP (A), BNP (B) e TGF- $\beta$  (C) em amostras de coração de ratos.



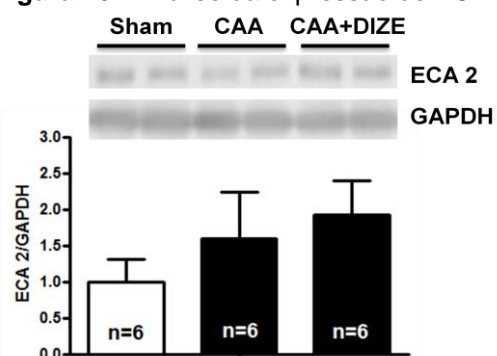
As análises foram realizadas em triplicatas oriundas de mistura de igual volume de cDNA de 3 amostras mais representativas de cada tratamento. Os dados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média e analisados por One Way ANOVA seguido de pós-teste de Newman-Keuls.  $P < 0.05$  vs Sham.  $^+P < 0.05$  vs CAA. ANP: Peptídeo Natriurético Atrial. BNP: Peptídeo Natriurético Cerebral. CAA: coarctação de aorta abdominal. TGF- $\beta$ : Fator de Transformação de Crescimento Beta 1.

#### 4.5 – Investigação da expressão de proteínas sinalizadoras envolvidas em vias pró-hipertroóficas

Para a investigação de possíveis vias de sinalização envolvidas no efeito anti-hipertroófico produzido pelo DIZE, a expressão de algumas proteínas foi avaliada através da técnica de Western Blot.

Uma das proteínas avaliadas foi a ECA 2, que poderia estar diferencialmente expressa pelo tratamento com DIZE. Entretanto, sua expressão não foi alterada nem pela sobrecarga pressórica nem pelo tratamento com o ativador da ECA 2 (Figura 16).

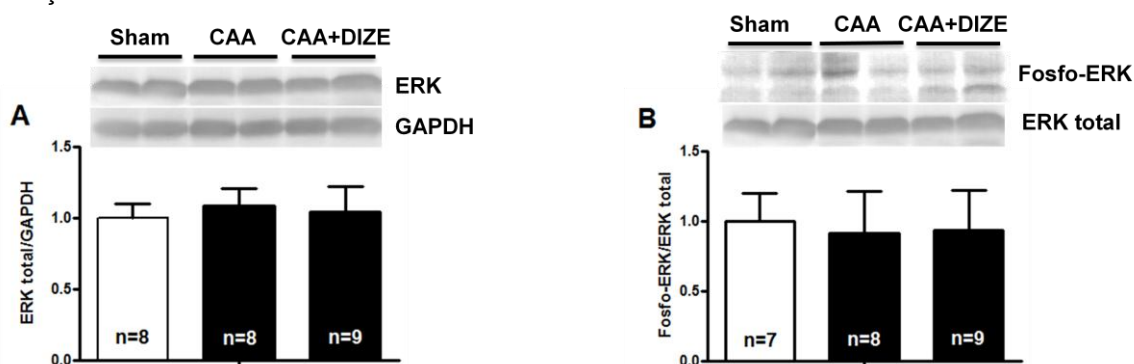
**Figura 16** - Análise da expressão de ECA 2 em amostras de corações de ratos.



A expressão das proteínas é relativa ao grupo controle (Sham), ao qual foi atribuído o valor de 1. Os dados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média e analisados por One Way ANOVA seguido de pós-teste de Newman-Keuls. Não houve diferenças significativas. CAA: coarctação de aorta abdominal. ECA 2, Enzima Conversora de Angiotensina 2.

Para avaliar a participação de MAPKs no efeito anti-hipertrófico do DIZE, a expressão de ERK1/2 total e ERK1/2 fosforilada foi avaliada (Figura 17). No entanto, não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos.

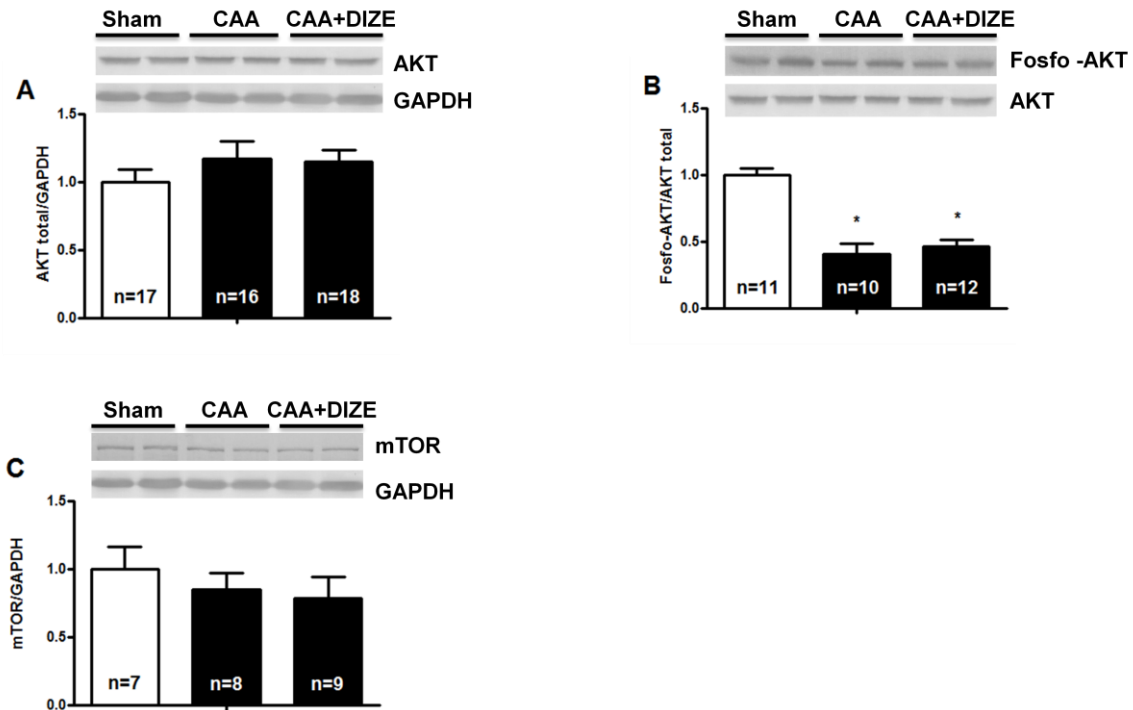
**Figura 17** - Análise da expressão de ERK1/2 total (A) e fosforilada (Fosfo-ERK) (B) em amostras de corações de ratos.



A expressão das proteínas é relativa ao grupo controle (Sham), ao qual foi atribuído o valor de 1. Os dados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média e analisados por One Way ANOVA seguido de pós-teste de Newman-Keuls. Não houve diferenças significativas. CAA: coarctação de aorta abdominal. ERK: Quinase reguladora de sinal extracelular. Fosfo-ERK: ERK fosforilada.

Sabendo-se que a ativação da via PI3K/AKT/mTOR é uma via envolvida nos processos hipertróficos, avaliamos a expressão das proteínas AKT total, AKT fosforilada e mTOR. Apenas foi observada diferença estatisticamente significativa na expressão de AKT fosforilada, sendo que a sobrecarga pressórica induziu diminuição dessa proteína e o tratamento com DIZE não alterou esse efeito (Figura 18).

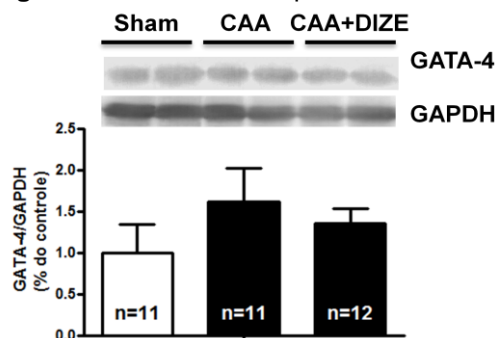
**Figura 18** - Análise da expressão de AKT total (A), AKT fosforilada (Fosfo-AKT) (B) e mTOR (C) em amostras de corações de ratos.



A expressão das proteínas é relativa ao grupo controle (Sham), ao qual foi atribuído o valor de 1. Os dados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média e analisados por One Way ANOVA seguido de pós-teste de Newman-Keuls. \* $P < 0,05$  quando comparados aos animais Sham.. AKT: Proteína quinase B CAA: coarctação de aorta abdominal. Fosfo-AKT: AKT fosforilada. mTOR: Alvo mamário da rapamicina.

Um importante fator de transcrição é o GATA-4, o qual controla vários genes que estão superexpressos na hipertrofia cardíaca (HAUTALA et al., 2001). A Figura 19 mostra que a expressão de GATA-4 nos grupos estudados não foi alterada.

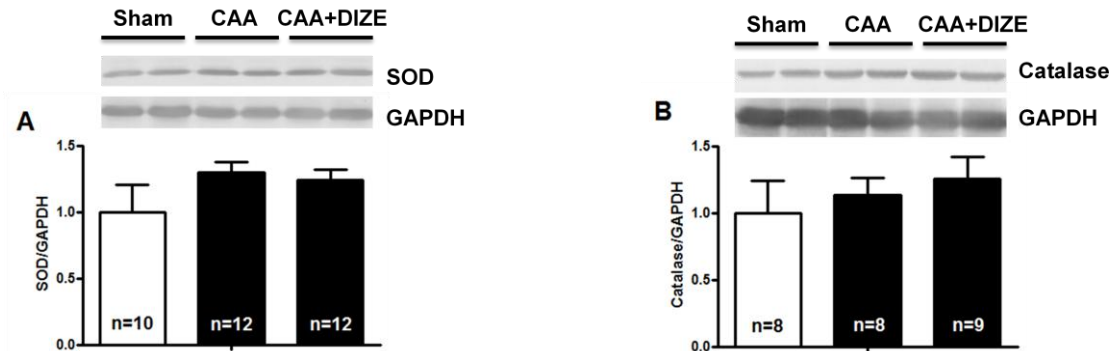
**Figura 19** - Análise da expressão de GATA-4 em amostras de corações de ratos.



A expressão das proteínas é relativa ao grupo controle (Sham), ao qual foi atribuído o valor de 1. Os dados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média e analisados por One Way ANOVA seguido de pós-teste de Newman-Keuls. Não houve diferenças significativas. CAA: coarctação de aorta abdominal.

O estresse oxidativo também pode estar envolvido na gênese da hipertrofia cardíaca. Assim, analisamos a expressão das enzimas antioxidantes SOD e catalase no tecido cardíaco. Entretanto, não houve diferenças na expressão dessas duas enzimas entre os grupos estudados (Figura 20).

**Figura 20** - Análise da expressão de SOD (A) e catalase (B) em amostras de corações de ratos.



A expressão das proteínas é relativa ao grupo controle (Sham), ao qual foi atribuído o valor de 1. Os dados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média e analisados por One Way ANOVA seguido de pós-teste de Newman-Keuls. Não houve diferenças significativas. CAA: coarctação de aorta abdominal. SOD: Superóxido dismutase.

## 5- DISCUSSÃO

Os resultados presentes neste trabalho demonstraram que o DIZE, administrado cronicamente, apresentou efeito cardioprotetor, pois foi capaz de atenuar a disfunção ventricular esquerda e prevenir a hipertrofia cardíaca induzida por sobrecarga pressórica. No entanto, o ativador da ECA 2 falhou em prevenir a disfunção endotelial aórtica neste modelo. Os mecanismos pelos quais este composto exerce seus efeitos ainda não estão bem elucidados, mas neste estudo foi visto que eles independem da expressão de proteínas pró-hipertroóficas como AKT, mTOR, GATA-4, ERK1/2 ou enzimas antioxidantes, como SOD e catalase.

A coarctação de aorta abdominal, técnica utilizada para promover a sobrecarga pressórica, promove a constrição da aorta. Um dos efeitos desse procedimento cirúrgico é a diminuição do fluxo renal que aumenta a liberação de renina, ativando o SRA e aumentando a síntese de Ang II, promovendo constrição periférica e aumento da PAM. Outro efeito observado é o aumento da pós carga oferecida ao coração, sendo este um efeito mecânico proveniente da própria constrição da aorta. Dessa forma, acima da constrição a PAM encontra-se mais alta devido a soma dos efeitos mecânico e hormonal. Por esse motivo, o registro da PAM foi feito através da canulação da artéria carótida e não da femoral, como comumente é realizada.

A ECA 2 é um importante regulador da pressão arterial, visto que, em ratos SHR propensos a acidente vascular cerebral, a superexpressão dessa enzima diminuiu este parâmetro e, mesmo depois da infusão de Ang II (LO et al., 2013), o aumento da expressão de ECA 2 conseguiu atenuar a resposta pressora (RENTZSCH et al., 2008). A ativação da ECA 2 pelo DIZE também apresenta efeitos hipotensores, reduzindo a pressão arterial tanto de ratos Wistars quanto de SHRs acordados de maneira dose-dependente (GJYMISHKA et al., 2010; MARIA; FERREIRA, 2011). Como esperado, o DIZE não foi capaz de reduzir a pressão arterial nos animais coarctados, uma vez que este modelo foi escolhido para se avaliar o efeito anti-hipertroófico deste composto independentemente de seu efeito hipotensor/anti-hipertensivo.

A diminuição da PIS, PDVE, +dP/dt e -dP/dt demonstram claro prejuízo na função ventricular esquerda, causado pela sobrecarga pressórica, sendo que esses parâmetros foram melhorados pelo tratamento com DIZE e possivelmente foram

resultado do aumento da atividade da ECA 2. O prejuízo causado pela sobrecarga pressórica pode ser resultado tanto do aumento da hipertrofia, e consequente dificuldade no transporte de nutrientes no tecido, quanto pelo aumento da fibrose, que diminui a capacidade de contração e relaxamento do músculo cardíaco. A literatura mostra que a superexpressão da ECA 2 pode melhorar a função cardíaca (DER SARKISSIAN et al., 2008; ZHAO et al., 2010) e a deficiência dessa proteína traz prejuízo na pressão arterial sistólica (BODIGA et al., 2011), na contratilidade e no relaxamento do ventrículo esquerdo (OUDIT; KASSIRI, 2007; YAMAMOTO et al., 2006). Análises por ecocardiografia mostraram prejuízo na função cardíaca de camundongos deficientes em ECA 2 quando infundidos com Ang II (ALGHAMRI et al., 2013). Em um modelo de cardiomiopatia diabética, a superexpressão de ECA 2 protegeu os ratos contra a disfunção ventricular esquerda típica dessa patologia (DONG et al., 2012). A Ang-(1-7) também pode estar envolvida nos efeitos do DIZE, já que a melhora da função ventricular esquerda promovida pelo composto foi anulada pelo bloqueio do receptor Mas. O papel benéfico desse heptapeptídeo na função cardíaca é bem conhecido e mostrado em diversos trabalhos. Recentemente, foi demonstrado que a superexpressão de Ang-(1-7) no coração aumentou significativamente a função contrátil do ventrículo esquerdo quando comparado com animais controle (FERREIRA et al., 2010). Este benefício também foi demonstrado em condições patológicas. A infusão de Ang-(1-7) foi capaz de prevenir a disfunção cardíaca em modelo de infarto do miocárdio, impedindo a diminuição da pressão sistólica e o aumento da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (LOOT et al., 2002). Em modelo de isquemia/reperfusão, a Ang-(1-7) melhorou a função contrátil miocárdica após o período de isquemia em corações isolados de ratos (FERREIRA; SANTOS; ALMEIDA, 2002). A Ang-(1-7) também atenuou a disfunção ventricular esquerda em ratos com cardiomiopatia dilatada induzida por adriamicina (LIU et al., 2012). Em ratos espontaneamente hipertensos, a Ang-(1-7) atenuou o desenvolvimento da hipertensão severa e melhorou o restabelecimento a função ventricular esquerda após 40 min de isquemia (BENTER et al., 2006).

A ECA 2 é também importante para a manutenção da função endotelial. Isso foi visto por Lovren et al. (2008), os quais mostraram que segmentos de aorta torácica de camundongos knockout para ECA 2 pré-constritos com fenilefrina apresentam prejuízo na resposta à acetilcolina (vasodilatador dependente do endotélio) quando comparados a camundongos selvagens. Por outro lado, a

superexpressão de ECA 2 humana aumentou o vasorrelaxamento frente a concentrações crescentes de carbacol, outro vasodilatador dependente de endotélio, em comparação com ratos espontaneamente hipertensos propensos a acidente vascular cerebral (RENTZSCH et al., 2008). Em nosso estudo, porém, o tratamento com DIZE a 1mg/kg não foi capaz de alterar o prejuízo endotelial causado pela sobrecarga pressórica e promoveu uma leve redução no relaxamento induzido por nitroprussiato de sódio, o que demonstra uma alteração no processo de relaxamento da musculatura lisa vascular. No entanto, o fluxo coronariano nos animais tratados com DIZE foi aumentado e este efeito foi bloqueado pelo A-779, reforçando a hipótese que o aumento da atividade da ECA 2 estaria estimulando a produção de Ang-(1-7), já que este é um potente vasodilatador. Suspeitando-se que a dose de 1 mg/kg não seja suficiente para alterar a resposta vasorrelaxante dos anéis de aorta submetidos a sobrecarga pressórica, nosso grupo de pesquisa já iniciou o tratamento de animais com uma dose maior deste composto para investigar se o aumento da atividade da ECA 2 é capaz de produzir melhora na função endotelial.

A ativação da ECA 2 produzida pelo DIZE foi capaz de prevenir completamente a hipertrofia dos cardiomiócitos induzida pela sobrecarga pressórica, como foi visto através da AST. Este é um dos primeiros trabalhos que avalia o efeito do DIZE na hipertrofia ventricular esquerda e busca investigar os possíveis mecanismos envolvidos. Esse efeito se deve a ação direta do DIZE nos mecanismos hipertróficos, já que ocorreu independentemente da mudança da pressão arterial. Além disso, o tratamento com A-779 bloqueou o efeito do DIZE, demonstrando que o aceturato de diminazeno provavelmente exerce seus efeitos através do receptor Mas. Este dado está de acordo com estudos prévios que mostram que a superexpressão de ECA 2 e consequente aumento da síntese de Ang-(1-7) melhora o remodelamento cardíaco em modelos de infarto do miocárdio através da ligadura permanente da artéria coronária descendente anterior esquerda em ratos Sprague-Dawley (DER SARKISSIAN et al., 2008) e em Wistar (ZHAO et al., 2010). A hipertrofia cardíaca induzida por infusão de Ang II também foi prevenida pela superexpressão de ECA 2 em ratos Sprague-Dawley (HUENTELMAN et al., 2005). Também em ratos Sprague-Dawley, a hipertrofia ventricular direita induzida por bleomicina foi menor nos ratos que superexpressaram Ang-(1-7) ou ECA 2 (SHENOY et al., 2010). Por outro lado, a deleção do gene da ECA 2 impede que tais efeitos benéficos se manifestem em modelos de estudo de cardiopatias. Foi visto,

por exemplo, que a deleção do gene que expressa essa enzima em camundongos provocou aumento da hipertrofia e dilatação cardíaca após indução de sobrecarga pressórica através da coarctação da aorta transversa (YAMAMOTO et al., 2006). Este trabalho compara camundongos selvagens e deficientes em ECA 2, e sugere que, sem essa enzima, o tempo de transição entre a hipertrofia cardíaca compensada e a falência cardíaca induzidas pela sobrecarga pressórica é acelerado. Dessa forma, a ECA 2 é considerada como um regulador negativo do SRA, já que sua ausência promove a ativação desse sistema, que pode ser evidenciado pelo aumento dos níveis de Ang II e diminuição dos níveis de Ang-(1-7) (BODIGA et al., 2011; KASSIRI et al., 2009; PATEL et al., 2012).

Como o efeito anti-hipertrófico do DIZE, um ativador da ECA 2, foi anulado pelo bloqueio do receptor Mas através da infusão de A-779, presume-se o notável papel deste receptor e, conseqüentemente, do seu agonista, a Ang-(1-7) na reversão da hipertrofia, já que este é o principal peptídeo formado pela enzima. Essa hipótese é reforçada pela recente publicação de um estudo que avaliou o papel protetor do DIZE em glaucoma induzido por ácido hialurônico (FOUREAUX et al., 2013). Nele, o DIZE foi administrado a 1 mg/kg por 4 semanas e foi visto um aumento da expressão da ECA 2 nas retinas dos animais através de imunohistoquímica. Além disso, o efeito antiglaucomatoso do DIZE também foi bloqueado pelo tratamento com A-779. Sugerindo-se que a ação do DIZE se dá através do aumento da expressão da ECA 2, que aumenta a geração de Ang-(1-7), a diminuição da hipertrofia ventricular esquerda condiz com vários artigos publicados na literatura, os quais descrevem este peptídeo como anti-hipertrófico. Recentemente, foi demonstrado que o tratamento com DIZE previne a hipertrofia induzida por infarto do miocárdio através do aumento e da expressão da ECA 2, sendo este efeito anulado pelo tratamento com C-16, um inibidor da ECA 2 (QI et al., 2013). Em nosso estudo, porém, a expressão proteica de ECA 2 não foi alterada, provavelmente pelo tempo do tratamento (21 dias), pelo modelo utilizado ou pelo método de western blot não ter captado uma mudança significativa nos níveis dessa proteína. Também foi visto que a administração crônica de Ang-(1-7) atenuou a hipertrofia cardíaca em ratos submetidos a coarctação de aorta abdominal, mesmo modelo utilizado neste trabalho (WANG et al., 2005). A Ang-(1-7) também foi capaz de diminuir o aumento da AST de cardiomiócitos de animais tratados com Ang II (MCCOLLUM; GALLAGHER; ANN TALLANT, 2012). Da mesma forma,

camundongos que superexpressaram Ang-(1-7) tiveram menor AST do que aqueles que superexpressaram tanto Ang II quanto Ang-(1-7) quando infundidos com Ang II (MERCURE et al., 2008). Com relação ao envolvimento do receptor Mas na diminuição da hipertrofia, foi demonstrado por Ferreira et al. (2007) que um agonista não peptídico deste receptor, o AVE 0991, reduziu a hipertrofia induzida por isoproterenol, demonstrando que o efeito anti-hipertrofico é inerente a ação do receptor.

Estudos em modelos animais tem mostrado importantes vias de sinalização que contribuem para a hipertrofia cardíaca, tais como as vias das MAPKs, do cálcio-calceurina e PI3K/AKT/mTOR (HEINEKE; MOLKENTIN, 2006). Assim, buscou-se investigar quais vias estariam envolvidas na proteção oferecida pelo DIZE contra a hipertrofia cardíaca induzida pela sobrecarga pressórica.

As MAPKs, dentre elas a ERK1/2, são conhecidas como mediadoras da hipertrofia cardíaca e consideradas como possíveis alvos terapêuticos (RUPPERT et al., 2013). Isso porque a literatura tem demonstrado seu estreito envolvimento no fenótipo hipertrofico. Como exemplo, camundongos com superexpressão de MEK1, um dos componentes da via das MAPKs, demonstraram aumento da ativação da ERK1/2 e profunda hipertrofia concêntrica quando submetidos a sobrecarga pressórica (BUENO et al., 2000), o que mostra que as MAPKs tem forte influência na gênese da hipertrofia. Reforçando essa relação, camundongos com prejuízo na fosforilação de ERK1/2 apresentaram atenuação na hipertrofia induzida por sobrecarga de pressão (RUPPERT et al., 2013). O envolvimento da ECA 2 na modulação da via das MAPKs pode ser notado em animais transgênicos em que o gene que codifica essa proteína é desligado ou superexpresso. Na ausência de ECA 2, a fosforilação de ERK1/2 é aumentada (OUDIT; KASSIRI, 2007; PATEL et al., 2012; YAMAMOTO et al., 2006), enquanto que a administração de ECA 2 recombinante inibi sua fosforilação induzida por Ang II (LO et al., 2013). Neste trabalho, porém, não foram encontradas diferenças significativas na expressão de ERK1/2 em nenhum dos grupos estudados.

A via PI3K/AKT/mTOR tem sido frequentemente relacionada a hipertrofia cardíaca fisiológica (DORN; FORCE, 2005; MCMULLEN et al., 2003; SHIOI et al., 2000). Reforçando essa relação, DeBosch et al. (2006) demonstraram que camundongos deficientes em AKT não desenvolveram hipertrofia cardíaca quando submetidos a exercício físico, mas após constrição da aorta, os corações tornaram-

se hipertrofiados. Isso demonstra que a AKT é requerida na hipertrofia induzida por exercício, mas provavelmente não participa do mecanismo hipertrófico relacionado a sobrecarga pressórica. Com relação a participação da ECA 2 nesse processo, Patel *et al.* em 2012 demonstraram que camundongos com deficiência de ECA 2, submetidos a sobrecarga pressórica, apresentaram aumento na fosforilação de AKT, sugerindo uma possível regulação da ECA 2 nessa via. Nossos resultados demonstraram, no entanto, que a coarctação diminuiu a fosforilação da AKT, mas o tratamento com DIZE não foi capaz de alterar sua expressão. Quanto a expressão proteica de AKT total e mTOR, não foram achadas diferenças estatisticamente significativas em relação a nenhum dos respectivos grupos.

Vários genes que estão superexpressos durante a hipertrofia são controlados pelo fator de transcrição GATA-4 (MABLY; LIEW, 1996). Trabalhos mostraram que os locais de ligação do GATA-4 parecem ser necessários para a ativação da expressão de  $\beta$ -MHC e do receptor AT1 em resposta a hipertrofia cardíaca patológica (AZAKIE; FINEMAN; HE, 2006; PIKKARAINEN *et al.*, 2003, 2004). Sabendo disso, buscou-se investigar se a expressão desse fator de transcrição estaria alterada nos grupos estudados, mas não foram encontradas alterações significativas.

Outro mecanismo gerador de hipertrofia tem como fonte a produção excessiva de EROs (TAKIMOTO; KASS, 2007). A sobrecarga pressórica gera hipertrofia cardíaca, a qual resulta em número aumentado de organelas intracelulares, entre elas, a mitocôndria. Esta além de ser a principal fonte geradora de energia da célula, através da respiração celular, também é o principal mecanismo gerador de EROs na célula (KINDO *et al.*, 2012). Além da mitocôndria, outros mecanismos geradores de EROs estão relacionados com o remodelamento cardíaco, como é o caso das NADPH oxidases, já abordadas anteriormente. As EROs ativam uma grande variedade de quinases e fatores de transcrição que levam a hipertrofia (SABRI; HUGHIE; LUCCHESI, 2003). As proteínas SOD e catalase são consideradas antioxidantes, sendo responsáveis pela degradação das EROs, diminuindo sua ação hipertrófica (TAKIMOTO; KASS, 2007). Estudos mostram que a ECA 2 é capaz de modular a produção de EROs, através da regulação da NADPH oxidase (BODIGA *et al.*, 2011; OUDIT; KASSIRI, 2007; PATEL *et al.*, 2012). Neste trabalho, o ativador da ECA 2, DIZE, não foi capaz de alterar a expressão das proteínas SOD e catalase.

Como não foram encontradas alterações na expressão de tais proteínas, os mecanismos pelos quais o DIZE diminuiu os índices hipertróficos podem não estar relacionados a nenhuma dessas vias de sinalização. Ainda é necessário investigar, por exemplo, se a atenuação da hipertrofia induzida pelo DIZE está relacionada à via do cálcio-calcineurina, já que a ativação desta tem causado aumento no tamanho do coração, além de os cardiomiócitos apresentarem aumento na AST, desorganização sarcomérica, deposição de colágeno e ativação de genes fetais (MOLKENTIN et al., 1998). A importância dessa via se mostra quando a inibição de proteínas relacionadas a ela causa diminuição da hipertrofia cardíaca induzida por sobrecarga pressórica (BOURAJJAJ et al., 2008; BUENO et al., 2002; WILKINS et al., 2002).

Em suma, os resultados mostram que o DIZE foi capaz de reverter a hipertrofia ventricular esquerda sem alteração da pressão arterial. Além disso, o DIZE apresentou melhora na função ventricular esquerda frente ao prejuízo causado pela sobrecarga pressórica, atenuando a disfunção cardíaca. Neste trabalho, foram encontradas alterações na expressão apenas de AKT fosforilada, causadas pela coarctação, mas não houve alteração de proteínas como ECA 2, AKT total, mTOR, GATA-4, ERK1/2, SOD e catalase, sendo necessários mais estudos para a investigação dos possíveis mecanismos pelos quais o DIZE exerce seus efeitos. Estes efeitos indicam um importante potencial terapêutico do DIZE no tratamento das doenças cardiovasculares.

## 6- CONCLUSÕES

- O DIZE aumentou o fluxo coronariano e apresentou efeito cardioprotetor na disfunção ventricular esquerda induzida por sobrecarga pressórica.
- O DIZE não alterou a disfunção endotelial causada pela sobrecarga pressórica.
- O DIZE diminuiu a hipertrofia causada pela sobrecarga pressórica.
- Os efeitos do DIZE na sobrecarga pressórica não alteraram a expressão de ECA 2, ERK1/2, AKT, mTOR, GATA-4, SOD e catalase.

Assim, os resultados mostram que o DIZE possui efeitos cardioprotetores na disfunção cardíaca induzida por sobrecarga pressórica, diminuindo a hipertrofia ventricular esquerda sem alterações na expressão das proteínas ECA 2, ERK1/2, AKT, mTOR, GATA-4, SOD e catalase. Estes dados sugerem que o DIZE apresenta potencial terapêutico frente às doenças cardiovasculares.

## 7- REFERÊNCIAS

- AKERS, W. S. et al. Renin-angiotensin system and sympathetic nervous system in cardiac pressure-overload hypertrophy. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 279, n. 6, p. H2797–806, 2000.
- ALGHAMRI, M. S. et al. Enhanced angiotensin II-induced cardiac and aortic remodeling in ACE2 knockout mice. **J Cardiovasc Pharmacol Ther**, v. 18, n. 2, p. 138–151, 2013.
- AMBUHL, P.; FELIX, D.; KHOSLA, M. C. [7-D-ALA]-angiotensin-(1-7): selective antagonism of angiotensin-(1-7) in the rat paraventricular nucleus. **Brain Res Bull**, v. 35, n. 4, p. 289–291, 1994.
- AZAKIE, A.; FINEMAN, J. R.; HE, Y. Myocardial transcription factors are modulated during pathologic cardiac hypertrophy in vivo. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 132, p. 1262–1271, 2006.
- BAKER, K. M. et al. Renin-angiotensin system involvement in pressure-overload cardiac hypertrophy in rats. **Am J Physiol**, v. 259, n. 2 Pt 2, p. H324–32, 1990.
- BARAUNA, V. G. et al. Shear stress-induced Ang II AT1 receptor activation: G-protein dependent and independent mechanisms. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 434, n. 3, p. 647–652, 2013.
- BARRY, S. P.; DAVIDSON, S. M.; TOWNSEND, P. A. Molecular regulation of cardiac hypertrophy. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 40, n. 10, p. 2023–2039, 2008.
- BENDALL, J. K. et al. Pivotal role of a gp91(phox)-containing NADPH oxidase in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in mice. **Circulation**, v. 105, n. 3, p. 293–296, 2002.
- BENTER, I. F. et al. Angiotensin-(1-7) prevents development of severe hypertension and end-organ damage in spontaneously hypertensive rats treated with L-NAME. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 290, n. 2, p. H684–91, 2006.
- BERNARDO, B. C. et al. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. **Pharmacol Ther**, v. 128, n. 1, p. 191–227, 2010.
- BODIGA, S. et al. Enhanced susceptibility to biomechanical stress in ACE2 null mice is prevented by loss of the p47(phox) NADPH oxidase subunit. **Cardiovasc Res**, v. 91, n. 1, p. 151–161, 2011.
- BOOKOUT, A. L. et al. High-throughput real-time quantitative reverse transcription PCR. **Current protocols in molecular biology / edited by Frederick M. Ausubel ... [et al.]**, v. Chapter 15, p. Unit 15.8, 2006.

BOTELHO-SANTOS, G. A. et al. Expression of an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein in rats induced marked changes in regional vascular resistance. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 292, n. 5, p. H2485–90, 2007.

BOURAJJAJ, M. et al. NFATc2 is a necessary mediator of calcineurin-dependent cardiac hypertrophy and heart failure. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, p. 22295–22303, 2008.

BUENO, O. F. et al. The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. **the The European Molecular Biology Organization Journal**, v. 19, p. 6341–50, 2000.

BUENO, O. F. et al. Impaired cardiac hypertrophic response in Calcineurin Abeta - deficient mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, p. 4586–4591, 2002.

BYRNE, J. A. et al. Contrasting roles of NADPH oxidase isoforms in pressure-overload versus angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. **Circ Res**, v. 93, n. 9, p. 802–805, 2003.

CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. et al. Cardiovascular effects of angiotensin-(1-7) injected into the dorsal medulla of rats. **Am J Physiol**, v. 257, n. 1 Pt 2, p. H324–9, 1989.

CAMPBELL, D. J. et al. Evidence against a major role for angiotensin converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) in angiotensin peptide metabolism in the human coronary circulation. **J Hypertens**, v. 22, n. 10, p. 1971–1976, 2004.

CAMPBELL, D. J. et al. Activity assays and immunoassays for plasma renin and prorenin: information provided and precautions necessary for accurate measurement. **Clinical ...**, v. 55, n. 5, p. 867–77, maio 2009.

CANTLEY, L. C. The phosphoinositide 3-kinase pathway. **Science**, v. 296, n. 5573, p. 1655–1657, 2002.

CARTWRIGHT, E. J. Ca<sup>2+</sup> signalling in cardiovascular disease: the role of the plasma membrane calcium pumps. **Sci China Life Sci**, v. 54, n. 8, p. 691–698, 2011.

CASTRO, C. H. et al. Evidence for a functional interaction of the angiotensin-(1-7) receptor Mas with AT1 and AT2 receptors in the mouse heart. **Hypertension**, v. 46, n. 4, p. 937–942, 2005.

CASTRO, C. H. et al. Effects of genetic deletion of angiotensin-(1-7) receptor Mas on cardiac function during ischemia/reperfusion in the isolated perfused mouse heart. **Life Sci**, v. 80, n. 3, p. 264–268, 2006.

CHAPPELL, M. C. et al. Metabolism of angiotensin-(1-7) by angiotensin-converting enzyme. **Hypertension**, v. 31, n. 1 Pt 2, p. 362–367, 1998.

CHAPPELL, M. C. et al. Release of angiotensin-(1-7) from the rat hindlimb: influence of angiotensin-converting enzyme inhibition. **Hypertension**, v. 35, n. 1 Pt 2, p. 348–352, 2000.

CHEN, Z. et al. MAP kinases. **Chem Rev**, v. 101, n. 8, p. 2449–2476, 2001.

CRACKOWER, M. A. et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. **Nature**, v. 417, n. 6891, p. 822–828, 2002a.

CRACKOWER, M. A. et al. Regulation of myocardial contractility and cell size by distinct PI3K-PTEN signaling pathways. **Cell**, v. 110, n. 6, p. 737–749, 2002b.

DEBOSCH, B. et al. Akt1 is required for physiological cardiac growth. **Circulation**, v. 113, p. 2097–2104, 2006.

DER SARKISSIAN, S. et al. Cardiac overexpression of angiotensin converting enzyme 2 protects the heart from ischemia-induced pathophysiology. **Hypertension**, v. 51, n. 3, p. 712–718, 2008.

DHALLA, N. S. et al. Cardiac remodeling and subcellular defects in heart failure due to myocardial infarction and aging. **Heart Fail Rev**, v. 17, n. 4-5, p. 671–681, 2012.

DIAS-PEIXOTO, M. F. et al. Molecular mechanisms involved in the angiotensin-(1-7)/Mas signaling pathway in cardiomyocytes. **Hypertension**, v. 52, n. 3, p. 542–548, 2008.

DINIZ, G. P.; CARNEIRO-RAMOS, M. S.; BARRETO-CHAVES, M. L. Angiotensin type 1 receptor mediates thyroid hormone-induced cardiomyocyte hypertrophy through the Akt/GSK-3beta/mTOR signaling pathway. **Basic Res Cardiol**, v. 104, n. 6, p. 653–667, 2009.

DONG, B. et al. Angiotensin-converting enzyme-2 overexpression improves left ventricular remodeling and function in a rat model of diabetic cardiomyopathy. **J Am Coll Cardiol**, v. 59, n. 8, p. 739–747, 2012.

DONOGHUE, M. et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. **Circ Res**, v. 87, n. 5, p. E1–9, 2000.

DORN, G. W.; FORCE, T. Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, p. 527–537, 2005.

FEOLDE, E.; VIGNE, P.; FRELIN, C. Angiotensin AT1 receptors mediate a positive inotropic effect of angiotensin II in guinea pig atria. **Eur J Pharmacol**, v. 245, n. 1, p. 63–66, 1993.

FERRARIO, C. M. et al. Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7). **Hypertension**, v. 30, n. 3 Pt 2, p. 535–541, 1997.

- FERREIRA, A. J. et al. Isoproterenol-induced impairment of heart function and remodeling are attenuated by the nonpeptide angiotensin-(1-7) analogue AVE 0991. **Life Sci**, v. 81, n. 11, p. 916–923, 2007.
- FERREIRA, A. J. et al. Evidence for angiotensin-converting enzyme 2 as a therapeutic target for the prevention of pulmonary hypertension. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 179, n. 11, p. 1048–1054, 2009.
- FERREIRA, A. J. et al. Attenuation of isoproterenol-induced cardiac fibrosis in transgenic rats harboring an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein in the heart. **Ther Adv Cardiovasc Dis**, v. 4, n. 2, p. 83–96, 2010.
- FERREIRA, A. J. et al. Angiotensin-converting enzyme 2 activation protects against hypertension-induced cardiac fibrosis involving extracellular signal-regulated kinases. **Exp Physiol**, v. 96, n. 3, p. 287–294, 2011.
- FERREIRA, A. J.; SANTOS, R. A.; ALMEIDA, A. P. Angiotensin-(1-7) improves the post-ischemic function in isolated perfused rat hearts. **Braz J Med Biol Res**, v. 35, n. 9, p. 1083–1090, 2002.
- FOUREAUX, G. et al. Antiglaucomatous effects of the activation of intrinsic Angiotensin-converting enzyme 2. **Investigative ophthalmology visual science**, v. 54, p. 4296–306, 2013.
- FRAGA-SILVA, R. A. et al. ACE2 activation promotes antithrombotic activity. **Mol Med**, v. 16, n. 5-6, p. 210–215, 2010.
- FREY, N.; OLSON, E. N. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. **Annu Rev Physiol**, v. 65, p. 45–79, 2003.
- GARDNER, D. G. Natriuretic peptides: markers or modulators of cardiac hypertrophy? **Trends Endocrinol Metab**, v. 14, n. 9, p. 411–416, 2003.
- GARDNER, D. G. et al. Molecular biology of the natriuretic peptide system: implications for physiology and hypertension. **Hypertension**, v. 49, n. 3, p. 419–426, 2007.
- GEISZT, M.; LETO, T. L. The Nox family of NAD(P)H oxidases: host defense and beyond. **J Biol Chem**, v. 279, n. 50, p. 51715–51718, 2004.
- GJYMISHKA, A. et al. Diminazene aceturate is an ACE2 activator and a novel antihypertensive drug. **FASEB J**, v. 24, p. 1032.3, 2010.
- GOMES, E. R. et al. Angiotensin-(1-7) prevents cardiomyocyte pathological remodeling through a nitric oxide/guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent pathway. **Hypertension**, v. 55, n. 1, p. 153–160, 2010.
- GROBE, J. L. et al. Prevention of angiotensin II-induced cardiac remodeling by angiotensin-(1-7). **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 292, n. 2, p. H736–42, 2007.

GROSSMAN, W.; JONES, D.; MCLAURIN, L. P. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. **J Clin Invest**, v. 56, n. 1, p. 56–64, 1975.

GUPTA, D; SHENOY, V; KATOVICH, M; RAIZADA, M. Effect of Dize, An Ace2 Activator on Cardiopulmonary Fibrosis and Apoptosis. **Critical Care Medicine**, v. 40, n. 12, p. 203, 2012.

HABER, P. K. et al. Angiotensin-Converting Enzyme 2-Independent Action of Presumed Angiotensin-Converting Enzyme 2 Activators: Studies In Vivo, Ex Vivo, and In Vitro. **Hypertension**, 20 jan. 2014.

HAUTALA, N. et al. Pressure overload increases GATA4 binding activity via endothelin-1. **Circulation**, v. 103, n. 5, p. 730–735, 2001.

HEINEKE, J.; MOLKENTIN, J. D. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 7, p. 589–600, 2006.

HEITSCH, H. et al. Angiotensin-(1-7)-Stimulated Nitric Oxide and Superoxide Release From Endothelial Cells. **Hypertension**, v. 37, n. 1, p. 72–76, 2001.

HERNANDEZ PRADA, J. A. et al. Structure-based identification of small-molecule angiotensin-converting enzyme 2 activators as novel antihypertensive agents. **Hypertension**, v. 51, n. 5, p. 1312–1317, 2008.

HUENTELMAN, M. J. et al. Protection from angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and fibrosis by systemic lentiviral delivery of ACE2 in rats. **Exp Physiol**, v. 90, n. 5, p. 783–790, 2005.

IZUMO, S. et al. Myosin heavy chain messenger RNA and protein isoform transitions during cardiac hypertrophy. Interaction between hemodynamic and thyroid hormone-induced signals. **J Clin Invest**, v. 79, n. 3, p. 970–977, 1987.

JANKOWSKI, V. et al. Mass-spectrometric identification of a novel angiotensin peptide in human plasma. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 27, p. 297–302, 2007.

KASSIRI, Z. et al. Loss of angiotensin-converting enzyme 2 accelerates maladaptive left ventricular remodeling in response to myocardial infarction. **Circ Heart Fail**, v. 2, n. 5, p. 446–455, 2009.

KEHAT, I.; MOLKENTIN, J. D. Molecular pathways underlying cardiac remodeling during pathophysiological stimulation. **Circulation**, v. 122, p. 2727–2735, 2010.

KINDO, M. et al. Pressure overload-induced mild cardiac hypertrophy reduces left ventricular transmural differences in mitochondrial respiratory chain activity and increases oxidative stress. **Frontiers in physiology**, v. 3, p. 332, 2012.

KONDO, T. et al. Diphosphorylated but not monophosphorylated myosin II regulatory light chain localizes to the midzone without its heavy chain during cytokinesis. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 417, n. 2, p. 686–691, 2012.

KULEMINA, L. V; OSTROV, D. A. Prediction of off-target effects on Angiotensin-converting enzyme 2. **Journal of biomolecular screening the official journal of the Society for Biomolecular Screening**, v. 16, p. 878–885, 2011.

LAL, H. et al. Stretch-induced MAP kinase activation in cardiac myocytes: differential regulation through beta1-integrin and focal adhesion kinase. **J Mol Cell Cardiol**, v. 43, n. 2, p. 137–147, 2007.

LAUTNER, R. Q. et al. Discovery and characterization of alamandine: a novel component of the Renin-Angiotensin system. **Circulation research**, v. 112, p. 1104–11, 2013.

LEVY, D. et al. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. **N Engl J Med**, v. 322, n. 22, p. 1561–1566, 1990.

LIMA, A. M. et al. Activation of angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin-(1-7)/Mas axis attenuates the cardiac reactivity to acute emotional stress. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 305, n. 7, p. H1057–67, 1 out. 2013.

LIU, H. et al. Angiotensin(1-7) attenuates left ventricular dysfunction and myocardial apoptosis on rat model of adriamycin-induced dilated cardiomyopathy. **Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi**, v. 40, n. 3, p. 219–224, 2012.

LIU, J. C. et al. The inhibitory effect of trilinolein on norepinephrine-induced beta-myosin heavy chain promoter activity, reactive oxygen species generation, and extracellular signal-regulated kinase phosphorylation in neonatal rat cardiomyocytes. **J Biomed Sci**, v. 11, n. 1, p. 11–18, 2004.

LO, J. et al. Angiotensin-converting enzyme 2 antagonizes angiotensin II-induced pressor response and NADPH oxidase activation in Wistar-Kyoto rats and spontaneously hypertensive rats. **Exp Physiol**, v. 98, n. 1, p. 109–122, 2013.

LOOT, A. E. et al. Angiotensin-(1-7) attenuates the development of heart failure after myocardial infarction in rats. **Circulation**, v. 105, n. 13, p. 1548–1550, 2002.

LORELL, B. H.; CARABELLO, B. A. Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. **Circulation**, v. 102, n. 4, p. 470–479, 2000.

LOVREN, F. et al. Angiotensin converting enzyme-2 confers endothelial protection and attenuates atherosclerosis. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 295, n. 4, p. H1377–84, 2008.

LOWES, B. D. et al. Changes in gene expression in the intact human heart. Downregulation of alpha-myosin heavy chain in hypertrophied, failing ventricular myocardium. **J Clin Invest**, v. 100, n. 9, p. 2315–2324, 1997.

MABLY, J. D.; LIEW, C. C. Factors involved in cardiogenesis and the regulation of cardiac-specific gene expression. **Circulation Research**, v. 79, p. 4–13, 1996.

MARIA, M. L. A.; FERREIRA, D. A. J. **Avaliação dos Efeitos do Ativador da Enzima Conversora de Angiotensina 2 (DIZE) na Pressão Arterial de ratos**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.

MASAKI, H. et al. Cardiac-specific overexpression of angiotensin II AT2 receptor causes attenuated response to AT1 receptor-mediated pressor and chronotropic effects. **J Clin Invest**, v. 101, n. 3, p. 527–535, 1998.

MCCOLLUM, L. T.; GALLAGHER, P. E.; ANN TALLANT, E. Angiotensin-(1-7) attenuates angiotensin II-induced cardiac remodeling associated with upregulation of dual-specificity phosphatase 1. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 302, n. 3, p. H801–10, 2012.

MCMULLEN, J. R. et al. Phosphoinositide 3-kinase(p110 $\alpha$ ) plays a critical role for the induction of physiological, but not pathological, cardiac hypertrophy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, p. 12355–12360, 2003.

MCMURRAY, J. et al. Evidence of oxidative stress in chronic heart failure in humans. **European Heart Journal**, v. 14, p. 1493–1498, 1993.

MECCA, A. P. et al. Cerebroprotection by angiotensin-(1-7) in endothelin-1-induced ischaemic stroke. **Exp Physiol**, v. 96, n. 10, p. 1084–1096, 2011.

MEHTA, P. K.; GRIENDLING, K. K. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 292, n. 1, p. C82–97, 2007.

MERCURE, C. et al. Angiotensin(1-7) blunts hypertensive cardiac remodeling by a direct effect on the heart. **Circ Res**, v. 103, n. 11, p. 1319–1326, 2008.

MEZZANO, S. A.; RUIZ-ORTEGA, M.; EGIDO, J. Angiotensin II and renal fibrosis. **Hypertension**, v. 38, n. 3 Pt 2, p. 635–638, 2001.

MOLKENTIN, J. D. et al. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. **Cell**, v. 93, p. 215–228, 1998.

MURDOCH, C. E. et al. NADPH oxidase-dependent redox signalling in cardiac hypertrophy, remodelling and failure. **Cardiovasc Res**, v. 71, n. 2, p. 208–215, 2006.

NAG, A. C. Study of non-muscle cells of the adult mammalian heart: a fine structural analysis and distribution. **Cytobios**, v. 28, n. 109, p. 41–61, 1980.

NISHIKIMI, T.; MAEDA, N.; MATSUOKA, H. The role of natriuretic peptides in cardioprotection. **Cardiovasc Res**, v. 69, n. 2, p. 318–328, 2006.

OUDIT, G. Y. et al. The role of phosphoinositide-3 kinase and PTEN in cardiovascular physiology and disease. **J Mol Cell Cardiol**, v. 37, n. 2, p. 449–471, 2004.

OUDIT, G. Y.; KASSIRI, Z. Role of PI3 kinase gamma in excitation-contraction coupling and heart disease. **Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets**, v. 7, n. 4, p. 295–304, 2007.

OU DOT, A. et al. Pharmacological concentration of angiotensin-(1-7) activates NADPH oxidase after ischemia-reperfusion in rat heart through AT1 receptor stimulation. **Regul Pept**, v. 127, n. 1-3, p. 101–110, 2005.

PATEL, V. B. et al. Cardioprotective effects mediated by angiotensin II type 1 receptor blockade and enhancing angiotensin 1-7 in experimental heart failure in angiotensin-converting enzyme 2-null mice. **Hypertension**, v. 59, n. 6, p. 1195–1203, 2012.

PHUNG, T. L. et al. Pathological angiogenesis is induced by sustained Akt signaling and inhibited by rapamycin. **Cancer Cell**, v. 10, n. 2, p. 159–170, 2006.

PIKKARAINEN, S. et al. GATA-4 is a nuclear mediator of mechanical stretch-activated hypertrophic program. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 23807–23816, 2003.

PIKKARAINEN, S. et al. **GATA transcription factors in the developing and adult heart. Cardiovascular Research**, 2004.

PLUIM, B. M. et al. The athlete's heart. A meta-analysis of cardiac structure and function. **Circulation**, v. 101, n. 3, p. 336–344, 2000.

POLIZIO, A. H. et al. Angiotensin-(1-7) blocks the angiotensin II-stimulated superoxide production. **Pharmacol Res**, v. 56, n. 1, p. 86–90, 2007.

QI, Y. et al. Diminazene aceturate enhances angiotensin-converting enzyme 2 activity and attenuates ischemia-induced cardiac pathophysiology. **Hypertension**, v. 62, p. 746–52, 2013.

RENTZSCH, B. et al. Transgenic angiotensin-converting enzyme 2 overexpression in vessels of SHRSP rats reduces blood pressure and improves endothelial function. **Hypertension**, v. 52, n. 5, p. 967–973, 2008.

RICE, G. I. et al. Evaluation of angiotensin-converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism. **Biochem J**, v. 383, n. Pt 1, p. 45–51, 2004.

RIGATTO, K. et al. Diminazene aceturate improves autonomic modulation in pulmonary hypertension. **Eur J Pharmacol**, v. 713, n. 1-3, p. 89–93, 2013.

- RUPPERT, C. et al. Interference with ERKThr188 phosphorylation impairs pathological but not physiological cardiac hypertrophy. **PNAS**, v. 110, n. 18, p. 7440–7445, 2013.
- RUWHOF, C.; VAN DER LAARSE, A. Mechanical stress-induced cardiac hypertrophy: mechanisms and signal transduction pathways. **Cardiovasc Res**, v. 47, n. 1, p. 23–37, 2000.
- SABRI, A.; HUGHIE, H. H.; LUCCHESI, P. A. Regulation of hypertrophic and apoptotic signaling pathways by reactive oxygen species in cardiac myocytes. **Antioxidants redox signaling**, v. 5, p. 731–740, 2003.
- SAFI-JR., J. Hipertrofia miocárdica e biologia molecular. **HiperAtivo**, v. 3, p. 154–160, 1998.
- SAMPAIO, W. O. et al. Angiotensin-(1-7) counterregulates angiotensin II signaling in human endothelial cells. **Hypertension**, v. 50, n. 6, p. 1093–1098, 2007.
- SAMPAIO, W. O.; NASCIMENTO, A. A.; SANTOS, R. A. Systemic and regional hemodynamic effects of angiotensin-(1-7) in rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 284, n. 6, p. H1985–94, 2003.
- SANTOS, R. A. et al. Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brainstem. **Hypertension**, v. 11, n. 2 Pt 2, p. I153–7, 1988.
- SANTOS, R. A. et al. Characterization of a new angiotensin antagonist selective for angiotensin-(1-7): evidence that the actions of angiotensin-(1-7) are mediated by specific angiotensin receptors. **Brain Res Bull**, v. 35, n. 4, p. 293–298, 1994.
- SANTOS, R. A. et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 14, p. 8258–8263, 2003.
- SANTOS, R. A. et al. Expression of an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein produces cardioprotective effects in rats. **Physiol Genomics**, v. 17, n. 3, p. 292–299, 2004.
- SANTOS, R. A. et al. Impairment of in vitro and in vivo heart function in angiotensin-(1-7) receptor MAS knockout mice. **Hypertension**, v. 47, n. 5, p. 996–1002, 2006.
- SANTOS, R. A.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; ANDRADE, S. P. Angiotensin-(1-7): an update. **Regul Pept**, v. 91, n. 1-3, p. 45–62, 2000.
- SARBASSOV, D. D.; ALI, S. M.; SABATINI, D. M. Growing roles for the mTOR pathway. **Curr Opin Cell Biol**, v. 17, n. 6, p. 596–603, 2005.
- SAVOIA, C. et al. Angiotensin II/AT2 receptor-induced vasodilation in stroke-prone spontaneously hypertensive rats involves nitric oxide and cGMP-dependent protein kinase. **J Hypertens**, v. 24, n. 12, p. 2417–2422, 2006.

- SCHIAVONE, M. T. et al. Release of vasopressin from the rat hypothalamo-neurohypophysial system by angiotensin-(1-7) heptapeptide. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 85, n. 11, p. 4095–4098, 1988.
- SHENOY, V. et al. The angiotensin-converting enzyme 2/angiogenesis-(1-7)/Mas axis confers cardiopulmonary protection against lung fibrosis and pulmonary hypertension. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 182, n. 8, p. 1065–1072, 2010.
- SHIOI, T. et al. The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice. **the The European Molecular Biology Organization Journal**, v. 19, p. 2537–2548, 2000.
- SHIOI, T. et al. Akt/protein kinase B promotes organ growth in transgenic mice. **Mol Cell Biol**, v. 22, n. 8, p. 2799–2809, 2002.
- SHIOJIMA, I. et al. Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis contributes to the transition to heart failure. **J Clin Invest**, v. 115, n. 8, p. 2108–2118, 2005.
- SHIOJIMA, I.; WALSH, K. Regulation of cardiac growth and coronary angiogenesis by the Akt/PKB signaling pathway. **Genes Dev**, v. 20, n. 24, p. 3347–3365, 2006.
- SOONPAA, M. H. et al. Cardiomyocyte DNA synthesis and binucleation during murine development. **Am J Physiol**, v. 271, n. 5 Pt 2, p. H2183–9, 1996.
- STANZIOLA, L.; GREENE, L. J.; SANTOS, R. A. Effect of chronic angiotensin converting enzyme inhibition on angiotensin I and bradykinin metabolism in rats. **Am J Hypertens**, v. 12, n. 10 Pt 1, p. 1021–1029, 1999.
- SWYNGHEDAUW, B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. **Physiol Rev**, v. 79, n. 1, p. 215–262, 1999.
- TAKIMOTO, E.; KASS, D. A. Role of Oxidative Stress in Cardiac Hypertrophy and Remodeling. **Hypertension**, v. 49, p. 241–248, 2007.
- TIPNIS, S. R. et al. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. **J Biol Chem**, v. 275, n. 43, p. 33238–33243, 2000.
- TOKER, A.; CANTLEY, L. C. Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. **Nature**, v. 387, n. 6634, p. 673–676, 1997.
- TOUYZ, R. M. Molecular and cellular mechanisms in vascular injury in hypertension: role of angiotensin II. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v. 14, n. 2, p. 125–131, 2005.
- TOUYZ, R. M.; SCHIFFRIN, E. L. Increased generation of superoxide by angiotensin II in smooth muscle cells from resistance arteries of hypertensive patients: role of phospholipase D-dependent NAD(P)H oxidase-sensitive pathways. **J Hypertens**, v. 19, n. 7, p. 1245–1254, 2001.

VICKERS, C. et al. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. **J Biol Chem**, v. 277, n. 17, p. 14838–14843, 2002.

WANG, L. et al. Chronic administration of angiotensin-(1-7) attenuates pressure-overload left ventricular hypertrophy and fibrosis in rats. **Di 1 jun yi da xue xue bao Academic journal of the first medical college of PLA**, v. 25, p. 481–487, 2005.

WHO, W. H. O. Cardiovascular Diseases (CVDs). 2013.

WILKINS, B. J. et al. Targeted disruption of NFATc3, but not NFATc4, reveals an intrinsic defect in calcineurin-mediated cardiac hypertrophic growth. **Molecular and Cellular Biology**, v. 22, p. 7603–7613, 2002.

WULLSCHLEGER, S.; LOEWITH, R.; HALL, M. N. TOR signaling in growth and metabolism. **Cell**, v. 124, n. 3, p. 471–484, 2006.

YAMAMOTO, K. et al. Deletion of angiotensin-converting enzyme 2 accelerates pressure overload-induced cardiac dysfunction by increasing local angiotensin II. **Hypertension**, v. 47, n. 4, p. 718–726, 2006.

YANG, R.; SMOLDERS, I.; DUPONT, A. G. Blood pressure and renal hemodynamic effects of angiotensin fragments. **Hypertension research official journal of the Japanese Society of Hypertension**, v. 34, p. 674–683, 2011.

ZAGO, A. S.; ZANESCO, A. Nitric oxide, cardiovascular disease and physical exercise. **Arq Bras Cardiol**, v. 87, n. 6, p. e264–70, 2006.

ZARAIN-HERZBERG, A.; FRAGOSO-MEDINA, J.; ESTRADA-AVILES, R. Calcium-regulated transcriptional pathways in the normal and pathologic heart. **IUBMB Life**, v. 63, n. 10, p. 847–855, 2011.

ZHANG, C. et al. Divergent roles of angiotensin II AT1 and AT2 receptors in modulating coronary microvascular function. **Circ Res**, v. 92, n. 3, p. 322–329, 2003.

ZHAO, Y. X. et al. ACE2 overexpression ameliorates left ventricular remodeling and dysfunction in a rat model of myocardial infarction. **Hum Gene Ther**, v. 21, n. 11, p. 1545–1554, 2010.

ZHU, Y. C. et al. Role of angiotensin AT1 and AT2 receptors in cardiac hypertrophy and cardiac remodelling. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 30, n. 12, p. 911–918, 2003.