

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO PROFISSIONAL EM INOVAÇÃO BIOFARMACÊUTICA

MARIANA FLÁVIA DE OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DE EFEITOS CARDIOVASCULARES DA COMBINAÇÃO DE UM
INIBIDOR DE RENINA COM ANGIOTENSINA-(1-7) EM RATOS TGR(mREN2)²⁷

BELO HORIZONTE

2014

MARIANA FLÁVIA DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DE EFEITOS CARDIOVASCULARES DA COMBINAÇÃO DE UM
INIBIDOR DE RENINA COM ANGIOTENSINA-(1-7) EM RATOS TGR(mREN2)27**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Biofarmacêutica, Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre na área de Ensaios Pré-Clínicos.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Robson Augusto Souza dos Santos

CO-ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Maria José Campagnole-Santos

BELO HORIZONTE

2014

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me proteger e iluminar meu caminho.

Aos meus pais, cujo apoio de sempre foi fundamental durante todo o meu trajeto.

Ao Wanderson, por me apoiar, me ajudar muito e pelo carinho.

Agradeço os meus orientadores, Robson e Maria José, pelo apoio, confiança e paciência de sempre, a quem eu tenho grande respeito e admiração.

À Marcela, Paula e Aninha, que estavam sempre ao meu lado, mesmo que às vezes de longe.

Aos animais utilizados, sem os quais não teria sido possível a realização desse trabalho.

Agradeço à Priscila, que sempre tão prestativa me ajudou muito durante todo o mestrado e se tornou uma amiga muito querida.

Às amigas Nathália Teodoro, Fernanda, Nádia, Dani, Marilene e Gisele Etelvino, pela ajuda, carinho e diversão de sempre.

Ao Zezé pelo carinho e grande ajuda, pois operou todos os meus animais da telemetria.

À Cynthia, secretária do mestrado profissional, pela grande ajuda.

Aos demais colegas de laboratório, pela boa convivência.

"O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza de seus sonhos."

Eleanor Roosevelt

RESUMO

O sistema renina-angiotensina pode ser inibido em vários pontos, incluindo a renina, que leva à redução da conversão do angiotensinogênio em Angiotensina I, diminuindo os níveis de Angiotensina II (Ang II). No entanto, essa inibição também causa redução dos níveis de Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)], que possui ações frequentemente opostas àquelas atribuídas à Ang II. Assim, nesse estudo foi investigado o efeito da combinação de um inibidor de renina com o composto de inclusão formado por Hidroxipropil β -ciclodextrina (HP β CD)/Ang-(1-7) na redução da PA e lesões em órgãos-alvo. Ratos hipertensos transgênicos heterozigotos TGR(mRen2)²⁷ foram tratados durante 15 dias em três protocolos diferentes: Grupo PEP: tratado com pepstatina A (inibidor de renina) via subcutânea, na dose de 5 μ g/Kg/dia; Grupo A7: tratado com o composto HP β CD/Ang-(1-7) por via oral, na dose de 30 μ g/Kg/dia; e Grupo PEPA7: tratado com ambos os compostos simultaneamente, nas mesmas doses e vias de administração. A pressão arterial média (PAM), sistólica (PAS), diastólica (PAD) e a frequência cardíaca (FC) foram mensuradas através de sistema de telemetria. Após o período de tratamento, os animais foram eutanasiados para retirada de sangue, coração e rim. Nossos dados mostram que os três tratamentos promoveram uma redução da PAM, PAS e PAD durante o dia e a noite, sendo mais proeminente no 2º e 1º dia de tratamento, respectivamente. No entanto, a PA foi retornando gradativamente ao valor basal, antes do final do tratamento. A FC não sofreu alteração na maior parte do tratamento durante o dia e durante a noite foi reduzida do 2º ao 15º dia nos três grupos. Não houve diferença estatística entre os tratamentos, indicando a ausência de um efeito aditivo/sinérgico entre eles. Com o retorno da PA, foi investigado o papel do tônus cardíaco simpático, que mostrou estar reduzido no grupo PEP, e parassimpático, que está aumentado no grupo PEPA7, ambos reduzindo a relação simpático/parassimpático. Mesmo com a PA nos níveis basais, houve reversão da deposição de colágeno perivascular no ventrículo esquerdo dos animais de todos os grupos em comparação com o controle. Houve redução do diâmetro dos cardiomiócitos somente dos animais do grupo A7. A atividade da renina plasmática foi reduzida, como esperado, nos grupos tratados com pepstatina. Surpreendentemente, também foi reduzida no grupo A7. Esses dados sugerem que

a ausência de um efeito sinérgico dos tratamentos pode ser devido à inibição da liberação e/ou síntese de renina pela Ang-(1-7).

Palavras-chave: Angiotensina-(1-7); inibidor de renina; pepstatina A; hipertensão.

ABSTRACT

The renin-angiotensin system (RAS) can be inhibited at various points, including the renin, which will lead to a reduction of the conversion of the angiotensinogen to Angiotensin I, decreasing Angiotensin II (Ang II) levels. However, this inhibition also causes reduction of Angiotensin-(1-7) [Ang-(1-7)] levels, whose actions are often opposite to those attributed to Ang II. Thus, in this study we investigated the efficacy of the combination of a renin inhibitor with Hydroxypropyl β -cyclodextrin (HP β CD) / Ang-(1-7) inclusion compound in reducing high blood pressure and end-organ damage. Hypertensive heterozygous TGR(mRen2)27 rats were treated during 15 days according to three different protocols: PEP group: treated with pepstatin A (renin inhibitor) through osmotic mini-pumps, 5 μ g/Kg/day; A7 group: oral administration of HP β CD-Ang-(1-7), 30 μ g/Kg/day; and PEPA7 group: both treatments simultaneously, in the same doses. The mean arterial pressure (MAP), systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP) and heart rate (HR) were measured by a radiotelemetry system in unanesthetized rats. After the treatment period, the animals were euthanized to remove blood, heart and kidney. The three treatments reduced MAP, SBP and DBP during light and dark periods, which were maximally reduced in 2nd and 1st treatment day, respectively. However, the arterial pressure progressively returned to baseline values, before the end of the treatment. The HR was not altered by any treatment in the light period, while in the dark period it was reduced from the 2nd to the 15th day of treatment by all three treatments. No statistical difference were detected between the treatments, indicating the absence of additive/synergic effects between them. At the 15th day of treatment, we investigated the cardiac sympathetic tonus, which was reduced in the PEP group, and the parasympathetic, which was increased in the PEPA7 group, both reducing sympathetic/parasympathetic ratio. Even though arterial pressure tends to return to baseline, there was a reversal of the perivascular collagen deposition in the left ventricle with all treatments, compared to control. There was a reduction of the cardiomyocytes diameter only in the animals of the A7 group. The plasma renin activity was reduced, as expected, in the pepstatin-treated groups. Strikingly, it was also reduced in the A7 group. These data suggest that absence of additive/synergic

effects of pepstatin and Ang-(1-7) may be related to the inhibition of the renin release and/or synthesis by Ang-(1-7).

Key-words: Angiotensin-(1-7); renin inhibitor; pepstatin A; hypertension.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Vias metabólicas do SRA	19
Figura 2	Fórmula estrutural das ciclodextrina naturais: α -CD, β -CD e γ -CD	22
Figura 3	Estrutura da β -ciclodextrina	23
Figura 4	Estrutura da Pepstatina A	27
Figura 5	Esquema da padronização da dose da Angiotensina-(1-7)	38
Figura 6	Esquema da padronização da dose da pepstatina A	39
Figura 7	Transmissor utilizado na telemetria	41
Figura 8	Transmissor implantado na aorta abdominal	42
Figura 9	Esquema mostrando a transmissão de dados na telemetria	43
Figura 10	Procedimento de gavagem em animal de experimentação	44
Figura 11	Esquema de tratamento	45
Figura 12	Variação da Pressão Arterial Média e Frequência Cardíaca em ratos submetidos à administração oral de Angiotensina-(1-7)/HP β CD nas doses de 30 e 100 μ g/Kg	54
Figura 13	Variação da Pressão Arterial Média e Frequência Cardíaca em ratos submetidos à infusão i.v. de 5; 10; 20 e 40 μ g/Kg de Pepstatina	56

Figura 14	Pressão Arterial Média durante cinco dias de gavagem com água deionizada, antes do início do tratamento	57
Figura 15	Pressão Arterial Média durante o dia e a noite e Frequência Cardíaca durante o dia e a noite de ratos TGR(mRen2)27	59
Figura 16	Pressão Arterial Sistólica durante o dia e a noite e Pressão Arterial Diastólica durante o dia e a noite de ratos TGR(mRen2)27	60
Figura 17	Tônus autonômico cardíaco de ratos TGR(mRen2)27	64
Figura 18	Variação da Pressão Arterial Média de ratos TGR(mRen2)27	65
Figura 19	Atividade da renina plasmática	66
Figura 20	Peso do ventrículo esquerdo corrigido pelo comprimento da tíbia esquerda de ratos TGR(mRen2)27	68
Figura 21	Diâmetro dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo de ratos TGR(mRen2)27	69
Figura 22	Deposição de colágeno perivascular no ventrículo esquerdo de ratos TGR(mRen2)27	70
Figura 23	Deposição de colágeno perivascular no rim esquerdo de ratos TGR(mRen2)27	70
Figura 24	Mecanismo da liberação de renina promovido pelo aumento da concentração de cálcio extracelular	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Varição da Pressão Arterial Média (PAM) e Frequência cardíaca (FC) de ratos submetidos a administração oral de Ang-(1-7)	55
Tabela 2	Varição da Pressão Arterial Média (A) e Frequência Cardíaca (B) de ratos submetidos à infusão i.v. de diferentes doses de Pepstatina A	56
Tabela 3	Pressão Arterial Média durante o dia dos três grupos de tratamento durante a gavagem com água deionizada, cinco dias antes do início do tratamento	58
Tabela 4	Pressão Arterial Média (PAM), Frequência cardíaca (FC), Pressão Arterial Sistólica (PAS) e Pressão Arterial Diastólica (PAD) durante o dia de ratos TGR(mRen2) ²⁷	61
Tabela 5	Pressão Arterial Média (PAM), Frequência cardíaca (FC), Pressão Arterial Sistólica (PAS) e Pressão Arterial Diastólica (PAD) durante a noite de ratos TGR(mRen2) ²⁷	62
Tabela 6	Tônus Cardíaco Simpático e Parassimpático, Índice Simpático/Parassimpático, frequência cardíaca intrínseca, basal e PAM de ratos TGR(mRen2) ²⁷	65
Tabela 7	Atividade da renina plasmática	67
Tabela 8	Peso do ventrículo esquerdo (VE) (g/mm), diâmetro dos cardiomiócitos (µm) e deposição de colágeno perivascular (% colágeno na área corada) no VE e rim de ratos TGR(mRen2) ²⁷	71

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
Ang-(1-7)	Angiotensina-(1-7)
Ang-(1-9)	Angiotensina-(1-9)
ARP	Atividade da renina plasmática
AT ₁	Receptor tipo AT1 da angiotensina II
AT ₂	Receptor tipo AT2 da angiotensina II
BRA	Bloqueadores do receptor AT ₁ de angiotensina
[Ca ²⁺]	Concentração de Cálcio
CaSR	Receptores sensíveis ao cálcio
CD	Ciclodextrina
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
ECA2	Enzima Conversora de Angiotensina 2
EMEA	European Medicines Agency
FC	Frequência cardíaca
FDA	Federal Drug Administration
HPβCD	Hidroxi-propil- β-ciclodextrina
Ieca	Inibidores da ECA
i.p.	Intraperitoneal
IP ₃	Trifosfato de Inositol
i.v.	Intravenosa
i.m.	Intramuscular
JG	Justaglomerulares
LD ₅₀	Dose letal capaz de matar 50% da população
mRen	TGR(mRen2) ²⁷
μl	Microlitro
μm	Micrômetro
s.c.	Sub-cutâneo
SD	Sprague-Dawley
PA	Pressão arterial

PAD	Pressão arterial diastólica
PAM	Pressão arterial média
PAS	Pressão arterial sistólica
RIE	Radioimunoensaio
SNS	Sistema Nervoso Simpático
SRA	Sistema renina angiotensina
VE	Ventrículo esquerdo
v.o	Via oral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Hipertensão Arterial	17
1.2 Sistema Renina-Angiotensina	18
1.2.1 Angiotensina-(1-7)	20
1.2.2 Angiotensina-(1-7) e Ciclodextrina	22
1.3 Inibidores do SRA	24
1.3.1 Alisquireno	25
1.3.2 Pepstatina A	27
1.4 Modelo animal utilizado	28
1.5 Justificativa	28
2 OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo geral	31
2.2 Objetivos específicos	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1 Animais	33
3.2 Drogas e reagentes	34
3.3 Materiais e equipamentos	35
3.4 Padronização das doses de Angiotensina-(1-7)	37
3.4.1 Implantação de cânulas na Artéria e Veia femoral	37
3.4.2 Registros	37
3.5 Grupos experimentais	39
3.6 Telemetria	40
3.6.1 Procedimento cirúrgico	40
3.6.2 Acomodação dos animais	42
3.6.3 Coleta de dados	43
3.7 Tratamento	44
3.7.1 Implantação da bomba osmótica	45
3.8 Eutanásia	45
3.9 Avaliação do Tônus Autonômico Cardíaco	47

3.10 Efeito do bloqueio ganglionar	48
3.11 Avaliação da Atividade da Renina Plasmática por RIE	49
3.12 Histologia do Ventrículo Esquerdo	49
3.12.1 Conteúdo de colágeno perivascular	50
3.12.2 Diâmetro dos cardiomiócitos	50
3.13 Histologia do Rim	51
3.14 Análise Estatística	51
4 RESULTADOS	53
4.1 Padronização das doses da Ang-(1-7) e Pepstatina	53
4.2 Efeito do tratamento na Pressão Arterial e Frequência Cardíaca	57
4.3 Tônus Autonômico Cardíaco	63
4.4 Efeito do bloqueio ganglionar	65
4.5 Atividade da Renina Plasmática	66
4.6 Efeito do tratamento na morfologia do VE e rim	68
5 DISCUSSÃO	73
6 SUMÁRIO E CONCLUSÕES	82
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hipertensão arterial

Hipertensão é uma disfunção fisiológica que acarreta elevação da pressão arterial (PA) fora dos padrões da homeostase, impondo uma sobrecarga crônica ao sistema cardiovascular. Quando não tratada, a hipertensão pode resultar em insuficiência cardíaca, infarto do miocárdio (McARDLE; KATCH; KATCH, 1998; HUA *et al.*, 2009), alterações precoces na função renal, tendência para intolerância à glicose e resistência à insulina, hipertrofia ventricular esquerda com alteração da função diastólica do ventrículo esquerdo, diminuição da complacência arterial e várias outras consequências (RIBEIRO, 1997; ANDRADE & NOBRE, 2010). A maioria das alterações cardiovasculares decorrentes da hipertensão é desencadeada por mecanismos compensatórios provocados diretamente pela pressão elevada, como a hipertrofia ventricular, ou provocados indiretamente devido à lesão causada nos vasos, como a aterosclerose (CAMPAGNOLE-SANTOS & HAIBARA, 2001).

A hipertensão é um dos fatores mais importantes para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Cerca de 7,6 milhões de mortes no mundo foram atribuídas à elevação da PA (54% por acidente vascular encefálico e 46% por doença isquêmica do coração) no ano de 2001. No Brasil, tem sido a principal causa de morte (ANDRADE & NOBRE, 2010).

A hipertensão pode ser classificada como *primária* e *secundária*. A *primária*, ou *essencial*, representa o maior número de casos. Sua origem é multifatorial, por isso não é possível identificar uma causa responsável pela elevação da pressão arterial (NOBRE *et al.*, 2013). A *secundária* tem baixa prevalência (3% a 5%) e consiste na elevação da pressão como consequência de algum distúrbio. Suas principais causas são o hiperaldosteronismo primário, hipotireoidismo, hipertireoidismo, acromegalia, hipertensão renovascular, doença renal crônica, dentre outras (ANDRADE & NOBRE, 2010).

1.2 Sistema Renina-Angiotensina

O Sistema Renina-Angiotensina (SRA) é um dos principais sistemas reguladores da PA e do equilíbrio hidro-eletrolítico.

Quando a PA é reduzida, a pressão de perfusão renal também diminui, causando a estimulação dos barorreceptores localizados nas arteríolas aferentes e estimulando, conseqüentemente, a secreção de renina pelas células justaglomerulares renais. A renina atua hidrolisando o Angiotensinogênio, produzido principalmente pelo fígado, no decapeptídeo Angiotensina I (Ang I) (*Asp-Arg-Val-Tir-Ile-His-Pro-Fen-His-Leu*). A remoção de dois aminoácidos da porção carboxi-terminal pela Enzima Conversora de Angiotensina (ECA), presente em vários tecidos, gera o octapeptídeo Angiotensina II (Ang II) (*Asp-Arg-Val-Tir-Ile-His-Pro-Fen*), como mostrado na figura 1.

A Ang II, que é considerada o principal peptídeo desse sistema, atua induzindo diversas respostas, principalmente através do seu receptor do tipo 1 (AT₁), tal como a estimulação da secreção de aldosterona pelo córtex adrenal – que aumenta a reabsorção de Na⁺ pelos rins; estimulação da sede, secreção da vasopressina e vasoconstrição arteriolar. Todas essas respostas induzem à menor excreção de sódio e conseqüentemente água pelos rins, maior ingestão de água e aumento da resistência periférica, levando ao aumento da PA (BERNE & LEVY, 2009; KEIDAR *et al.*; 2007; UNGER *et al.*; 2011). A Ang II, quando atua através do receptor AT₂ expresso principalmente em tecidos fetais, inibe o crescimento celular, promove vasodilatação e proteção contra isquemia, dentre outros efeitos (ZAMAN *et al.*; 2002).

Outra via importante desse sistema resulta na formação do heptapeptídeo Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] (*Asp-Arg-Val-Tir-Ile-His-Pro*). Ao mesmo tempo em que a Ang I pode ser hidrolisada pela ECA gerando Ang II, ela também pode ser

hidrolisada pela Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ECA2) (TIPNIS *et al.*, 2000; DONOGUE *et al.*; 2000) gerando a Angiotensina-(1-9) [Ang-(1-9)] (DONOGUE *et al.*; 2000), um peptídeo que já foi descrito como tendo importante efeito anti-hipertrófico cardíaco (OCARANZA *et al.*; 2010). A Ang-(1-9), ao ser clivada pela ECA, gera a Ang-(1-7). Além disso, a ECA2, algumas carboxipeptidases e endopeptidases possuem alta capacidade de hidrolisar a Ang II e também formar Ang-(1-7) (SCHINDLER *et al.*; 2007), que exerce uma série de ações mediadas pelo receptor Mas (SANTOS *et al.*, 2003; KEIDAR *et al.*; 2007) e na maioria das vezes são opostas à Ang II, tais como vasodilatação e ação antiproliferativa (SANTOS *et al.*; 2000), entre várias outras funções.

Além do cérebro, os componentes do SRA foram identificados em vários órgãos, tais como coração, pâncreas, tecido adiposo, sistema reprodutor e nos vasos sanguíneos (SIMÕES E SILVA & FLYNN; 2011).

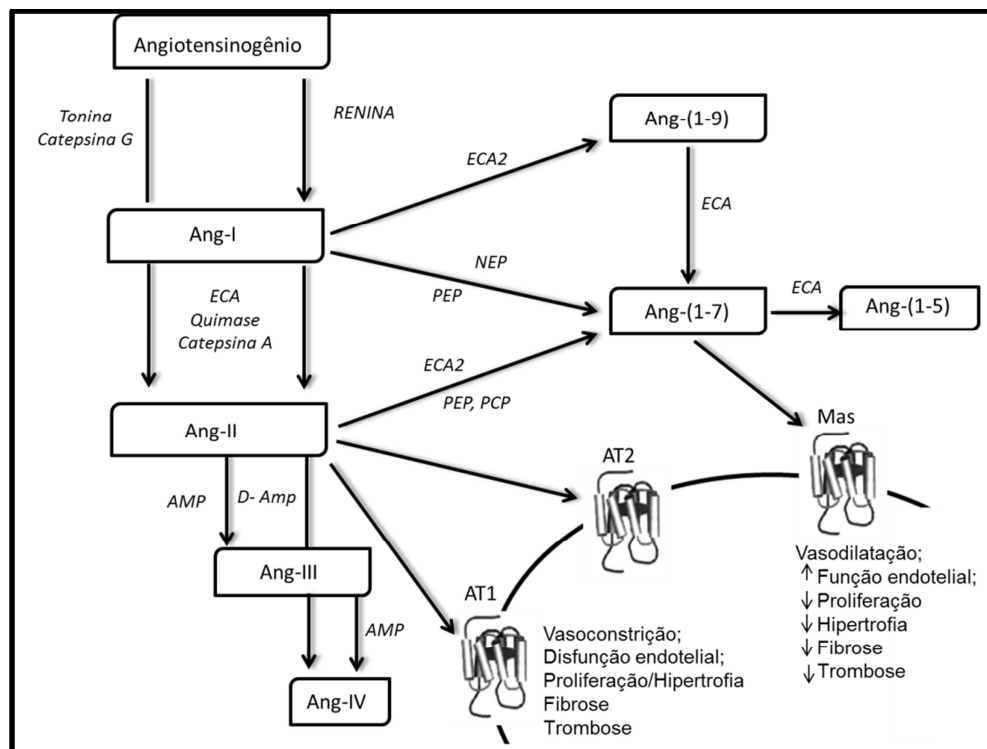


Figura 1 – Vias metabólicas do SRA. ECA: Enzima Conversora de Angiotensina; AMP: Aminopeptidase; Ang: Angiotensina; AT: receptores de angiotensina II; Mas: receptor de Ang-(1-7); NEP: endopeptidase neutra; PCP: prolil-carboxipeptidase; PEP: prolil-endopeptidase. *Modificado de SANTOS & FERREIRA, 2007.*

1.2.1 Angiotensina-(1-7)

Como descrito anteriormente, a Ang-(1-7) pode ser formada a partir da clivagem da Ang I por endopeptidases ou através da Ang-(1-9) por ação de endopeptidases e da ECA ou pode também ser originada diretamente da Ang II através de endopeptidases e da ECA2 (SANTOS & FERREIRA, 2007).

Os 26 anos de pesquisas intensas sobre a Ang-(1-7) (SANTOS *et al.*, 2013 *d*; SANTOS *et al.*, 1988) revelaram várias ações benéficas desse peptídeo no organismo, que, hoje em dia, tem sido avaliado como um potente alvo terapêutico para várias doenças, não somente das cardiovasculares e renais.

A Ang-(1-7) está presente no cérebro, em áreas como hipotálamo, hipocampo e amígdala (XU *et al.*, 2011). Atuando através do receptor Mas, possui efeito dilatador e simpato-inibitório, por aumentar os níveis de óxido nítrico (ZIMMERMAN, 2011). Desde as primeiras infusões centrais de Ang-(1-7) mostrando redução da PA e FC (CAMPAGNOLE-SANTOS *et al.*, 1989) e melhora do baroreflexo (CAMPAGNOLE-SANTOS *et al.*, 1992), vários outros trabalhos foram desenvolvidos desde então mostrando diversos efeitos benéficos desse peptídeo, entre eles a reversão do comportamento de ansiedade (KANGUSSU *et al.*, 2013) e atenuação das alterações metabólicas induzidas por dieta rica em frutose (GUIMARAES *et al.*, 2014). A Ang-(1-7) também parece prevenir a síndrome metabólica, aumentar a captação de glicose e proteger as células contra o estresse oxidativo, que pode induzir a resistência à insulina (PASSOS-SILVA *et al.*, 2013).

No coração, a Ang-(1-7) parece prevenir ou reduzir a hipertrofia ocasionada pela Ang II através do receptor AT₁ (GROBE *et al.*, 2007; SANTOS & FERREIRA, 2007) e estimular a atividade da óxido nítrico sintase (COSTA *et al.*, 2010), além de ter efeitos anti-arritmogênicos (SANTOS & FERREIRA, 2007). Além disso, existem evidências do grande papel da Ang-(1-7) na fibrose cardíaca. Esse peptídeo foi

descrito como sendo capaz de reverter essa fibrose, por provocar apoptose de células precursoras dos fibroblastos, que produzem colágeno, inibir a proliferação e diminuir a secreção de colágeno (WANG *et al.*, 2012; PASSOS-SILVA *et al.*, 2013). Além disso, parece reduzir a fibrose também nos rins, pulmão e fígado (PASSOS-SILVA *et al.*, 2013).

Nos rins, a Ang-(1-7) parece ter um papel de proteção renal, por inibir a fosforilação induzida pela Ang II nas células tubulares proximais (SANTOS & FERREIRA, 2007). Possui efeito diurético e natriurético, associado com o aumento da taxa de filtração glomerular, estimulação da liberação de prostaglandinas (SCHINDLER *et al.*, 2007; FERRARIO *et al.*, 1998) e relaxamento arteriolar aferente (SCHINDLER *et al.*, 2007). De forma contrária, animais com deleção do gene para o receptor Mas possuem retenção de sódio e água, microalbuminúria e fibrose renal (DILAURO & BURNS, 2009; PINHEIRO *et al.*, 2009). Além disso, os elevados índices de excreção da Ang-(1-7) em humanos indica que esse peptídeo, produzido localmente, parece estar relacionado com a função renal (FERRARIO *et al.*, 1998; SCHINDLER *et al.*, 2007). Estudo recente realizado em humanos demonstra que a infusão de Ang-(1-7) nos rins promove vasodilatação renal (TWIST *et al.*, 2013).

Nos leitos vasculares, o endotélio é o principal alvo das ações desse peptídeo (SANTOS & FERREIRA, 2007). Promove vasodilatação (SCHINDLER *et al.*, 2007; KEIDAR *et al.*, 2007), como consequência da estimulação da liberação de prostaglandinas dilatadoras, óxido nítrico e potencialização dos efeitos dilatadores produzidos pela bradicinina (SCHINDLER *et al.*, 2007; SANTOS & FERREIRA, 2007).

Outros trabalhos mostram a importância da Ang-(1-7) no processo ovulatório, na produção de testosterona e na modulação da espermatogênese. Além disso, mostram também efeitos anti-proliferativos e anti-angiogênicos, podendo ser alvo no tratamento do câncer (PASSOS-SILVA *et al.*, 2013).

1.2.2 Angiotensina-(1-7) e Ciclodextrina

Diversos sistemas de administração de fármacos têm surgido com a finalidade de melhorar a liberação, absorção e estabilidade do fármaco, tal como as ciclodextrinas (CD's). Esses sistemas surgiram da necessidade de reduzir os problemas com as vias de administração tradicionais, tal como a administração oral de medicamentos, em que a destruição parcial do princípio ativo pelo trato gastrointestinal diminui significativamente a biodisponibilidade e atividade do mesmo (DUCHÊNE *et al.*; 1999).

As CD's são oligossacarídeos na forma de estruturas cônicas que possuem grupos hidrofílicos voltados para o exterior e grupos hidrofóbicos voltados para o interior de sua cavidade, o que permite encapsular moléculas hidrofóbicas de forma reversível e ser solúvel em meio aquoso. As CD's naturais possuem seis, sete e oito unidades de glicose e são denominadas α -ciclodextrina (α -CD), β -ciclodextrina (β -CD) e γ -ciclodextrina (γ -CD), respectivamente (CUNHA-FILHO & SÁ-BARRETO; 2007) (figuras 2 e 3).

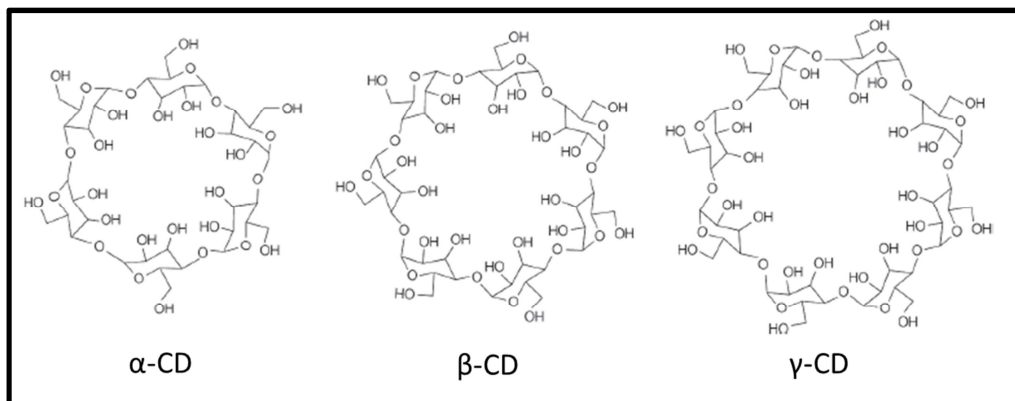


Figura 2 - Fórmula estrutural das ciclodextrinas naturais: α -CD, β -CD e γ -CD. Modificado de OLIVEIRA *et al.*; 2009.

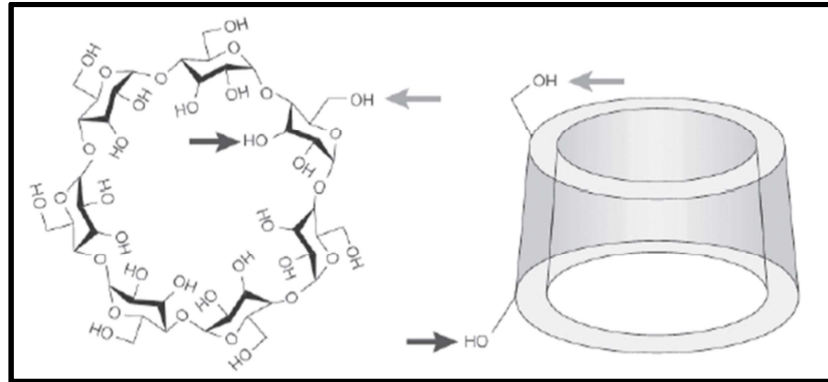


Figura 3 - Estrutura da β -ciclodextrina. Modificado de OLIVEIRA *et al.*; 2009.

Além das CD's naturais, têm sido desenvolvidos vários derivados semi-sintéticos das CD's através da introdução de grupos funcionais, com a finalidade de aumentar o reconhecimento molecular, a capacidade de complexação e a solubilidade (CUNHA-FILHO & SÁ-BARRETO; 2007; OLIVEIRA *et al.*; 2009). Alguns exemplos incluem a hidroxipropil- β -CD (HP β CD), a hidroxipropil- γ -CD (HP γ CD), a sulfo-butil-éter- β -CD (SB β CD) e a metil- β -CD randomizada (RM β CD) (CUNHA-FILHO & SÁ-BARRETO; 2007). A HP β CD é utilizada para inibir a taxa de cristalização de fármacos pouco hidrossolúveis durante seu armazenamento e melhorar a absorção de fármacos através das membranas celulares (OLIVEIRA *et al.*; 2009), sendo amplamente utilizada nas formulações farmacêuticas. Ela também se difere das outras por apresentar características como pureza, capacidade de inclusão de fármacos e preço excelentes (CUNHA-FILHO & SÁ-BARRETO; 2007).

A Ang-(1-7) incluída em Hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD) possui a vantagem de ser administrada por via oral sem prejuízos em suas ações sistêmicas. Trabalhos realizados com esse composto mostraram uma melhora no metabolismo lipídico quando associado com atenolol (SANTOS *et al.*, 2013 a), a redução do peso e massa adiposa no fígado, diminuição do colesterol plasmático total e triglicérides (FELTENBERGER *et al.*, 2013), diminuição de citocinas pró-inflamatórias no fígado e a prevenção da obesidade (SANTOS *et al.*; 2013b). Além disso, esse composto também se mostrou capaz de prevenir a hiperglicemia no diabetes (SANTOS *et al.*, 2013 c), reverter danos no corpo cavernoso (FRAGA-SILVA *et al.*, 2013), atenuar o

remodelamento causado pelo infarto do miocárdio (MARQUES *et al.*; 2012) e atuar como um cardioprotetor, demonstrando que esse composto é uma alternativa viável para a administração oral de Ang-(1-7) (MARQUES *et al.*; 2011).

1.3 Inibidores do SRA

A alteração da atividade do SRA, tal como sua ativação crônica, possui fator importante no desenvolvimento da hipertensão arterial, disfunção cardíaca e doenças renais (ISRAILI *et al.*; 2010). Há aproximadamente 20 anos, o tratamento da hipertensão arterial é feito principalmente por meio de fármacos bloqueadores do SRA (GEBRU *et al.*; 2013), que possuem melhores efeitos clínicos comprovados na redução da PA e na diminuição das lesões dos órgãos-alvo. As drogas utilizadas mais comumente incluem agentes que inibem a ECA (OIGMAN & FRITSCH, 1998; ANDRADE & NOBRE, 2010), que são antagonistas do receptor AT₁ da Ang II (OIGMAN & FRITSCH, 1998; ANDRADE & NOBRE, 2010) e que inibem a renina (ANDRADE & NOBRE, 2010).

Os inibidores da ECA (iECA) atuam ligando-se ao sítio ativo dessa enzima e impedindo a ligação da mesma em seus substratos, Ang I e bradicinina. Dessa forma, a Ang I não é clivada em Ang II e a bradicinina, que normalmente é convertida em metabólitos inativos pela ECA, permanece intacta nos fluidos biológicos (ZAMAN *et al.*; 2002). A redução dos níveis de Ang II e o aumento dos efeitos vasodilatadores ocasionados pela bradicinina são os principais fatores que levam à queda da PA em pacientes hipertensos. Essa classe de inibidores também tem sido eficaz em atenuar o remodelamento cardíaco e melhorar a função ventricular em pacientes com disfunção cardíaca e infarto do miocárdio (SHEARER *et al.*; 2013).

Os bloqueadores do receptor AT₁ de angiotensina (BRA) ocupam o sítio de ligação no receptor, impedindo a ligação da Ang II e, conseqüentemente, reduzindo as

respostas ocasionadas por essa ligação (ZAMAN *et al.*; 2002). Como não há acúmulo de bradicinina, não ocorre tosse como efeito adverso, fazendo com que esse tipo de fármaco possa ser mais bem tolerado que os inibidores da ECA (SHEARER *et al.*; 2013).

Os variados inibidores e bloqueadores diferem em regiões específicas de sua estrutura, resultando em diferentes tempos de inibição, meia-vida, absorção e metabolismo (ZAMAN *et al.*; 2002).

Os inibidores de renina compõem uma recente classe de inibidores do SRA. Eles atuam bloqueando o sítio ativo da renina e impedindo a clivagem do angiotensinogênio. Dessa forma, como pouca renina ativa está disponível, baixos níveis de Ang I e conseqüentemente Ang II são formados (GEBRU *et al.*; 2013; OPARIL, 2007).

Os inibidores de renina foram considerados uma ótima alternativa no tratamento da hipertensão arterial e proteção dos órgãos-alvo. Além de inibirem completamente o SRA (já que a clivagem do angiotensinogênio pela renina é um passo chave para o restante da cascata), eles mantêm baixa a atividade da renina, diferente das outras classes de inibidores, onde ocorre uma contra regulação à inibição do sistema e um conseqüente aumento dos níveis de renina, que pode limitar sua eficácia (FRIEDRICH & SCHMIEDER; 2013).

1.3.1 Alisquireno

O Alisquireno é um composto não peptídico que foi o primeiro fármaco representante da classe de inibidores de renina a ser licenciado pela Federal Drug Administration (FDA) nos EUA e pela European Medicines Agency (EMA) na Europa em 2007 (GEBRU *et al.*; 2013; FRIEDRICH & SCHMIEDER; 2013). Possui alto peso

molecular e alta afinidade pelo sítio ativo da renina. O composto absorvido quase não é metabolizado e é excretado lentamente, o que confere uma meia-vida longa de até 40h ao ser administrado por via oral (GEBRU *et al.*, 2013), mantendo a pressão controlada por aproximadamente 24h (SEN *et al.*, 2013). A dose máxima que promove reduções na pressão arterial média (PAM) é de 300mg, e ainda assim esse composto é bem tolerado pela população hipertensa, incluindo pacientes idosos. Os efeitos adversos mais comuns são dor de cabeça, tonteira e diarreia, que ocorrem em baixa incidência, em valores similares às outras classes (SEN *et al.*, 2013). Além disso, não apresenta diferenças no tratamento relacionadas com o sexo, peso corporal ou raça (TRIMARCHI, 2011).

Estudos clínicos mostram efeitos benéficos na associação do Alisquireno com outras classes de fármacos, principalmente com BRA's. Por exemplo, na combinação com losartan, apresentou redução da albuminúria e redução da massa ventricular esquerda, sem aumento dos efeitos adversos (FRIEDRICH & SCHMIEDER; 2013). Também reduziu a excreção de proteína em pacientes com nefropatia diabética (LIZAKOWSKI; 2013). Em combinação com o ramipril (iECA), produziu melhor efeito na PA em comparação com os tratamentos isolados (SEN *et al.*, 2013).

No entanto, o estudo ALTITUDE (*Aliskiren Trial in Type 2 Diabetes Using Cardio-Renal Endpoints*) apontou efeitos adversos muito graves. Esse estudo foi realizado com mais de 8.000 pacientes com diabetes tipo 2 que tinham alto risco de desenvolver complicações cardiovasculares e renais, em que recebiam 300mg de Alisquireno diariamente juntamente com outra classe, iECA ou BRA (SHEARER *et al.*; 2013; FRIEDRICH & SCHMIEDER; 2013). Em dezembro de 2011 esse estudo foi interrompido por ocasionar disfunção renal aguda, hipercalemia e hipotensão em parte dos pacientes participantes (LIZAKOWSKI; 2013).

1.3.2 Pepstatina A

Pepstatina A é um potente e específico inibidor de aspartil proteases (HELM *et al.*, 1989; UMEZAWA *et al.*, 1970). Foi descoberta em 1970 em extratos de culturas de várias espécies de bactérias do gênero *Actinomycetes*, e desde então tem sido sintetizada e se mostrado capaz de inibir várias proteases, como pepsina humana e suína, renina, catepsina D, quimosina bovina, gastricsina humana e protease B (de *Aspergillus niger*) (MARCINISZYN *et al.*; 1976). Com baixo peso molecular (685,9), é caracterizada quimicamente como um hexapeptídeo (*Isoleucina-valina-L-valina-L-valina-estatina-L-alanina-estatina*) que contém dois resíduos de um incomum aminoácido, a estatina [ácido (3*S*,4*S*)-4-amino-3-hidroxi-6-metileptanóico] (UMEZAWA *et al.*; 1970; MARCINISZYN *et al.*; 1976; EVIN *et al.*; 2001).

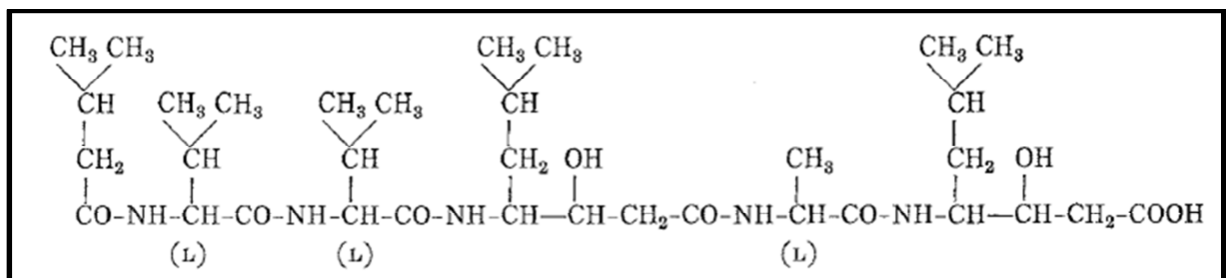


Figura 4 – Estrutura da pepstatina A. Fonte: UMEZAWA *et al.*; 1970.

A pepstatina possui baixíssima toxicidade. Doses intraperitoneais capazes de matar 50% da população amostrada (LD₅₀) são de 1.090mg/Kg para camundongos, 875mg/Kg de ratos, 820mg/Kg para coelhos e 450mg/Kg para cachorros (UMEZAWA *et al.*, 1970; GROSS, 1971). Por via oral, a LD₅₀ é maior que 2.000mg/Kg para todas essas espécies. Ratos tratados com dose diária de 250mg/Kg por via oral durante 180 dias não apresentaram sinais de toxicidade (UMEZAWA *et al.*; 1970).

Poucos trabalhos envolvendo pepstatina são realizados *in vivo*. A maior parte deles é realizada *in vitro*, devido à sua conhecida ação na inibição de proteases (JUNAID *et al.*; 2000; HELM *et al.*; 1989; LOH; 1988).

1.4 Modelo animal utilizado

Dentre os modelos experimentais utilizados no estudo e tratamento da hipertensão, a linhagem de animais hipertensos transgênicos TGR(mRen2)²⁷ é bastante utilizada. Esses ratos, desenvolvidos por Mullins e colaboradores (MULLINS *et al.*; 1990), expressam um gene adicional de renina, o gene murino *Ren-2*, que foi adicionado ao genoma de ratos Sprague-Dawley (SD) para gerar essa nova linhagem (PETERS *et al.*; 1993; BADER *et al.*; 1992). Com isso, esses animais desenvolvem hipertensão acentuada por terem elevada expressão de renina e um concomitante aumento de Ang II. A maior expressão da renina foi encontrada na glândula adrenal, seguida por timo, cérebro, partes do sistema gastrointestinal, genital e pulmão (BADER *et al.*; 1992; WILSON *et al.*; 1996; LANGHEINRICH *et al.*, 1996).

Os elevados índices de mortalidade de animais homozigotos estão associados aos elevados níveis de PA (290mmHg em machos e 250mmHg em fêmeas), fazendo com que os ratos heterozigotos, ou seja, que contem cópia do transgene em somente um cromossomo sejam os mais utilizados (BADER *et al.*; 1992; LEE *et al.*; 1996). A hipertensão já está evidente em ratos heterozigotos entre 4 e 5 semanas de idade, chegando aos seus valores máximos (240mmHg em machos 200mmHg em fêmeas) entre 8 e 9 semanas de idade (LEE *et al.*; 1996).

1.5 Justificativa

Um inibidor de renina, além de inibir a formação de Ang II, também reduz os níveis de Ang-(1-7), que como é sabido possui efeitos contra-reguladores aos da Ang II, como vasodilatação periférica e coronariana, ação celular antiproliferativa, melhora do barorreflexo, aumento do fluxo sanguíneo renal, modulação do tônus simpático, ação anti-hipertrofica e antiarrítmica (SANTOS *et al.*; 2000; SANTOS *et al.*; 2008 *b*, SIMÕES E SILVA & FLYNN; 2011). Inibindo as diversas vias do SRA, a Ang-(1-7)

estará também impedida de desempenhar suas funções benéficas para o sistema cardiovascular, já que possui papel importante na regulação e redução da PA. Dessa forma, nossa proposta foi avaliar os efeitos cardiovasculares da associação do inibidor de renina, a pepstatina A (GROSS *et al.*; 1971), com a Ang-(1-7) em ratos hipertensos. Essa combinação possibilitaria o bloqueio do SRA sem impedir as ações benéficas da Ang-(1-7).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da combinação de um inibidor de renina com o composto de inclusão formulado por Hidroxi-propil- β -ciclodextrina (HP β CD) e Ang-(1-7) nos níveis de PA de ratos hipertensos TGR(mRen2)27.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar as doses de Pepstatina e Ang-(1-7)/ HP β CD a serem utilizadas no tratamento;
- Avaliar os efeitos cardiovasculares, pressão arterial média (PAM), pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC), produzidos pelo tratamento com Pepstatina, Pepstatina + Ang-(1-7) e Ang-(1-7);
- Determinar o efeito dos tratamentos sobre a atividade da renina plasmática (ARP);
- Avaliar o efeito dos tratamentos sobre o tônus autonômico cardíaco e o bloqueio ganglionar;
- Avaliar o efeito dos tratamentos sobre o grau de hipertrofia cardíaca, a deposição de colágeno no ventrículo esquerdo e no rim.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Esse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Hipertensão - Departamento de Fisiologia e Biofísica / ICB – UFMG e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal – CETEA da mesma instituição, protocolo nº 293/2012.

3.1 Animais

Foram utilizados ratos transgênicos TGR(mRen2)²⁷ heterozigotos, com idade entre 3 e 5 meses de idade, obtidos do Biotério de Animais Transgênicos do Laboratório de Hipertensão. Esses animais foram mantidos em um ciclo claro-escuro de 12-12h, com temperatura e umidade controladas e livre acesso à água e comida.

3.2 Drogas e reagentes

Ácido Pícrico;

Água deionizada;

Álcool etílico 70%;

Ang-(1-7) incluída em Hidroxipropil- β -ciclodextrina 1:1 – preparado pelo Departamento de Química da UFMG e diluída em água deionizada;

Atropine Methyl nitrate - Sigma Chemical, diluída em solução de cloreto de sódio 0,9% estéril;

Cloreto de sódio (NaCl) 0,9% estéril;

Cloridrato de Xilazina 2% e Quetamina 10% - Syntec;

Coquetel de inibidores de proteases – na proporção de 140 μ l/ml sangue, preparado com p-hidroximercuribenzoato (POOH - 1mM), Fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF - 1mM), Etilendinitrilo tetrassigra ve diidrato (EDTA – 7,5%), 1,1 monohidrato de fenantrolina (30mM) e pepstatina (1mM).

DL- Propranolol HCl - Sigma Aldrich, diluído em solução de cloreto de sódio 0,9% estéril;

EDTA 7,5% – na proporção de 50 μ l/ml de sangue;

Formaldeído 37% - Synth – diluído em água deionizada;

Glutaraldeído 25% - Merck – diluído em água deionizada;

Hexametônio – diluído em solução de cloreto de sódio 0,9% estéril;

Hidroxipropil- β -ciclodextrina – CERESTAR – diluída em água deionizada;

Pentabiótico veterinário - Fort Dodge[®];

Pepstatina A – Sigma Aldrich – diluída em álcool etílico absoluto (na proporção de 5%) e cloreto de sódio estéril (95%);

Sirius Red – Sigma Aldrich;

Tiopental sódico – Cristália;

2,2,2 Tribromoetanol - Sigma Aldrich;

3.3 Materiais e equipamentos

Agulhas e seringas;

Agulha intragástrica de metal (de gavagem) para ratos;

Algodão, gaze, linha de algodão, *cordonet*, bastões plásticos com extremidades revestidas de algodão;

Autoclave vertical – UPV-50;

Balança de precisão – Denver Instrument;

Balança para pesagem de tecidos – Shimadzu;

Bomba de infusão - Harvard apparatus;

Bomba osmótica - Alzet® - Modelos 2002, 1002 e 2004 – infusão de 5µg/Kg/dia;

Centrífuga refrigerada - CR21E – Hitachi;

Cola cirúrgica de uso veterinário - 3M Vetbond™;

Gel biocompatível – Data Science;

Gelo seco;

Ímã e rádio portátil;

Microscópio Axio Vision – Zeiss;

Microscópio BX41 - Olympus;

Sonicador – Ultrasonic Cleaner by Branson;

Tesouras, pinças, pinça hemostática, agulha de sutura e bisturi;

Transmissores para registro por telemetria – TA – PAC40 - Data Science;

Tubos de polietileno (PE-50 e PE-10) – Becton Dickinson;.

Vidrarias em geral;

Vórtex – Genie 2 – VWR Scientific Products;

Papel de celulose - DSI™;

Paquímetro – Vernier Calipers;

Pipetas de volumes variáveis – Gilson;

Placa receptora para telemetria – Data Science;

3.4 Padronização das doses de Ang-(1-7) e Pepstatina

3.4.1 Implantação de cânulas na Artéria e Veia femoral

Os ratos foram submetidos a um processo cirúrgico para implantação de uma cânula feita a partir de dois tubos de polietileno (PE-50 e PE-10) na artéria e veia femoral. Todas as cânulas possuíam aproximadamente 18cm de PE-50. As de veia tinham mais 2cm de PE-10 e as cânulas de artéria tinham mais 4cm de PE-10.

Após os animais terem sido anestesiados com o anestésico geral Tribromoetanol na dose de 2,5mg/Kg (via i.p), foi realizada tricotomia e uma pequena incisão na virilha do lado esquerdo do rato, para implantação das cânulas. A implantação na artéria foi realizada para o registro contínuo e direto da PA, enquanto a implantação da cânula na veia funcionou como a via de entrada das drogas ministradas.

Após a cirurgia, os animais foram acomodados individualmente e submetidos a um período de recuperação que variou entre 18 e 24h.

3.4.2 Registros

Após o período de recuperação, a PA e a FC foram mensuradas continuamente com o auxílio de um sistema de aquisição de dados (Biopac Systems, Inc.)

Após o registro de no mínimo 30 minutos para a coleta dos valores basais, 05 animais receberam Ang-(1-7) incluída em HP β CD por via oral na dose de 30 μ g/Kg. O registro foi contínuo durante 6h após a administração do composto, para verificar o efeito da dose sobre a PA e FC.

No outro dia após o registro com 30 μ g/Kg, os animais foram registrados novamente: foi realizada a coleta dos valores basais por o mínimo 30 minutos e eles receberam Ang-(1-7) incluída em HP β CD por via oral na dose de 100 μ g/Kg. Da mesma forma, o registro foi contínuo durante 6h após a administração do composto, como mostrado no esquema da figura 5. Os dados foram expressos como variação, ou seja, os valores ponto a ponto (10 em 10 minutos) menos o valor basal.

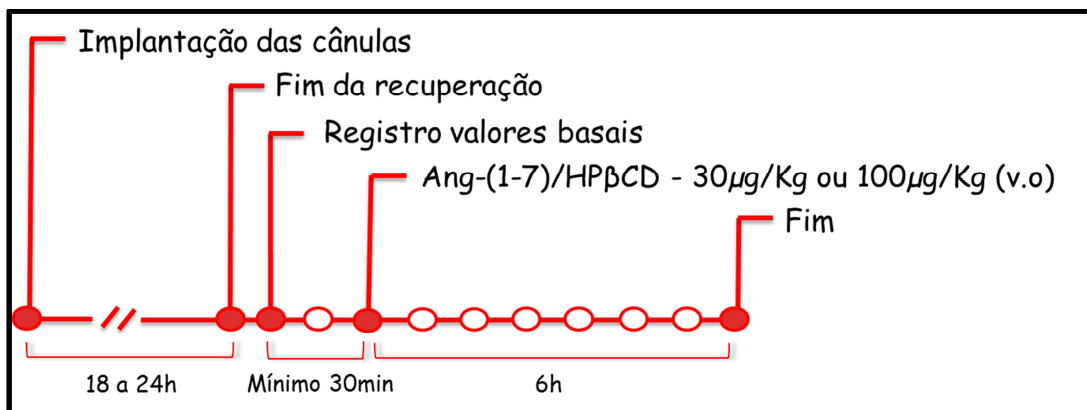


Figura 5 - Esquema da padronização da dose da Angiotensina-(1-7). v.o: via oral.

Outros ratos (n=5) foram submetidos à implantação das cânulas na artéria e veia femoral para testar as doses de 5; 10; 20 e 40 μ g/Kg/dia da Pepstatina A.

Para isso, após a recuperação da cirurgia, os valores basais também foram coletados por no mínimo 30 minutos e então as doses foram administradas por via intravenosa, em ordem crescente de concentração e intervalo de 1h entre cada dose, com o auxílio de uma bomba de infusão. Cada dose foi infundida durante 30 minutos em taxa contínua de 600 μ l/hora. Esse protocolo está resumido na figura 6. Novamente, os dados foram expressos como variação, ou seja, os valores de 30 minutos de infusão de cada dose menos o valor basal.

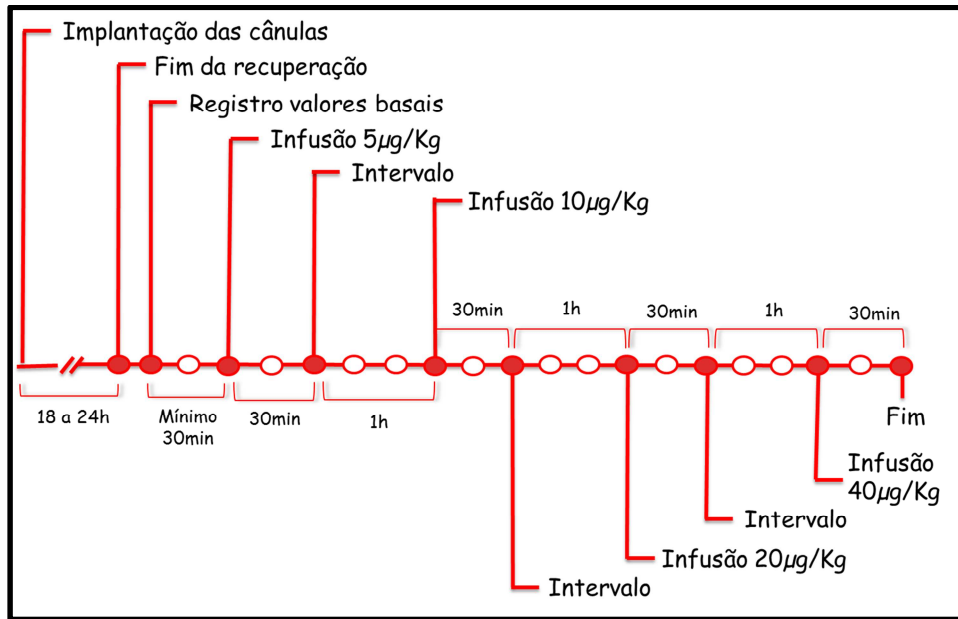


Figura 6 - Esquema da padronização da dose da Pepstatina A. Foram injetadas 4 doses crescentes de pepstatina A (5µg/Kg, 10µg/Kg, 20µg/Kg e 40µg/Kg) por via intravenosa durante 30 minutos na taxa de 600µl/hora, com intervalo de 1h entre cada dose.

3.5 Grupos experimentais

Os animais foram divididos, então, em 03 grupos experimentais:

- Grupo Pepstatina (**PEP**): tratado com Pepstatina A, 5µg/Kg/dia, via subcutânea e com o veículo HPβCD (46µg/Kg/dia).
- Grupo Pepstatina + o composto Ang-(1-7) / HPβCD (**PEPA7**): tratado com 5µg/Kg/dia da pepstatina A (via subcutânea) e com 30µg/Kg/dia do composto (via oral) simultaneamente;
- Grupo Ang-(1-7) / HPβCD (**A7**): tratado somente com 30µg/Kg/dia desse composto por via oral.

É importante ressaltar que a dose de Ang-(1-7) refere-se somente a esse peptídeo, desconsiderando o veículo. Assim, para que os animais fossem tratados com 30µg de Ang-(1-7), foi administrado 76µg/Kg do composto de inclusão formado por Ang-

(1-7)/HP β CD, uma vez que desse total, 46 μ g são referentes à HP β CD e 30 μ g ao peptídeo.

3.6 Telemetria

Para a avaliação do efeito do tratamento sobre a PAS, PAM, PAD e FC dos animais, a pressão arterial pulsátil (PAP) foi registrada, continuamente, de 10 em 10 minutos por 24 horas, consistindo em um transmissor de radiofrequência e de um sistema de aquisição de dados.

3.6.1 Procedimento cirúrgico

Os ratos foram mantidos em jejum por 24h antes da cirurgia, para facilitar a visualização da aorta abdominal. Todos os materiais utilizados na cirurgia foram previamente autoclavados e secos, com exceção das pinças e tesouras, que ficaram imersos em solução de álcool etílico 70% durante todo o procedimento. Os transmissores (figura 7) foram imersos 24h antes da cirurgia em solução de glutaraldeído 2% e imediatamente antes da implantação, cada transmissor foi mergulhado em solução salina (NaCl 0,9%) estéril. As cirurgias foram realizadas pelo técnico cirurgião do laboratório juntamente com um auxiliar.

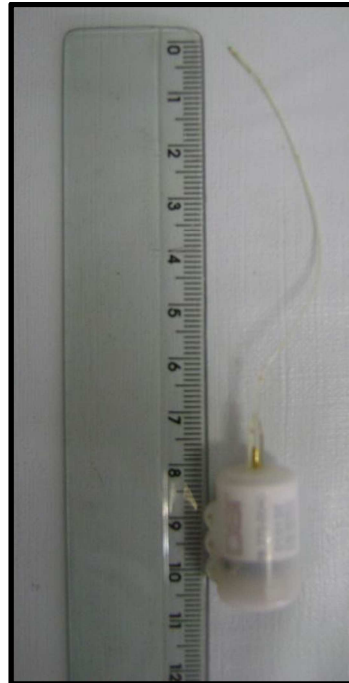


Figura 7 – Transmissor utilizado na telemetria.

Para a implantação do transmissor, o rato foi anestesiado com Tribromoetanol na dose de 2,5 mg/Kg de peso corpóreo, via i.p. Foi realizada tricotomia na região abdominal do rato, assepsia com solução de álcool 70% e uma incisão longitudinal à partir da região pubiana.

Os órgãos foram afastados, a artéria aorta foi dissecada e levemente elevada com auxílio de um *cordonet*. Com a ajuda de uma agulha (em ângulo de 90°), o cateter ligado ao transmissor foi introduzido na aorta abdominal, abaixo da bifurcação das artérias renais, e fixada com um pequeno pedaço de papel de celulose e cola cirúrgica de uso veterinário (*Modificado de GUIOL et al., 1992; RUBINI et al., 1993; BUUSE, 1994*) (figura 8). A extremidade do cateter foi preenchida com um gel biocompatível, para facilitar o sinal do transmissor. Após a verificação de que não havia nenhum foco de sangramento, o transmissor foi fixado ao músculo abdominal por sutura. Imediatamente após a cirurgia, 48h depois e no sétimo dia consecutivo foi administrada uma associação anti-infecciosa polivalente (pentabiótico) de uso veterinário na dose de 0,1ml/Kg, via intramuscular.

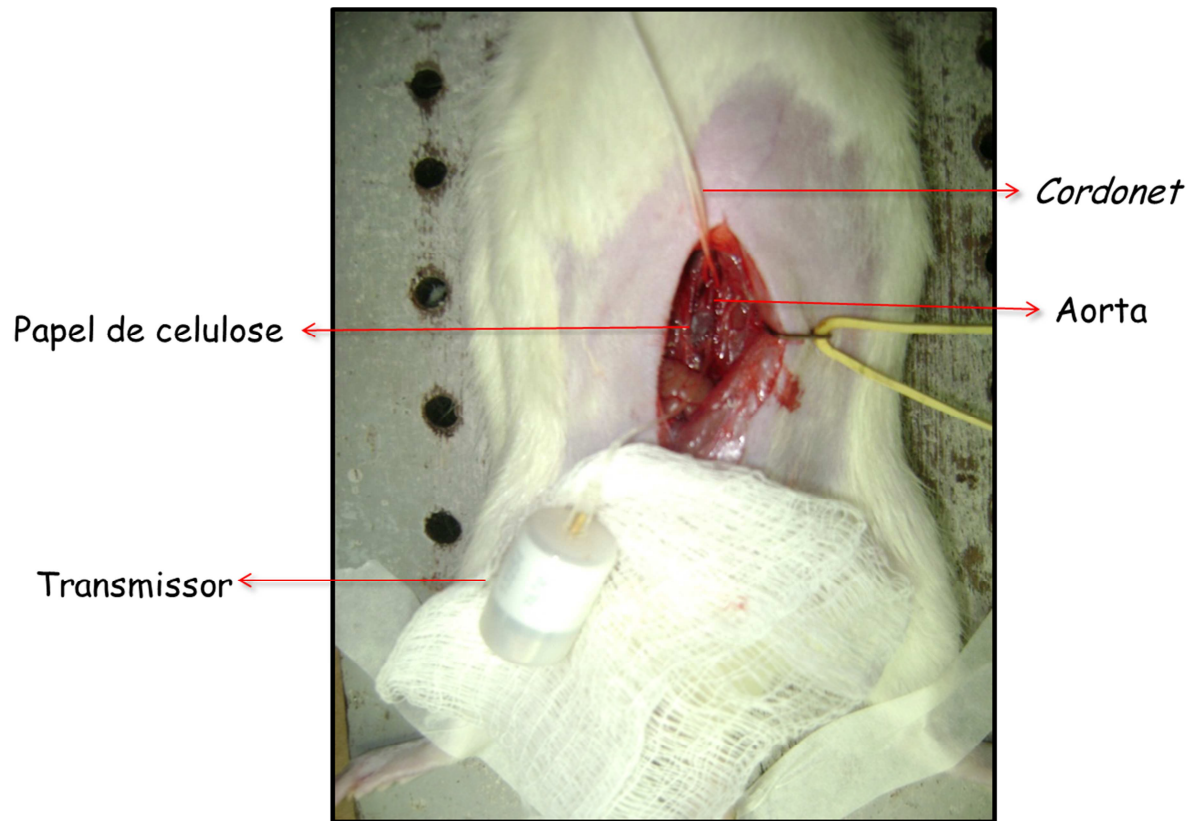


Figura 8 – Transmissor implantado na aorta abdominal.

3.6.2 Acomodação dos animais

Após a cirurgia, os ratos foram acomodados individualmente (em uma sala onde permaneceram até o fim do experimento) e foram submetidos a um período de recuperação de aproximadamente 10 dias.

Essa sala é isolada e exclusiva aos ratos que estiverem fazendo parte desse experimento. A limpeza da sala e da caixa dos animais, juntamente com a troca da água e reposição da comida era realizada uma vez por semana, sempre no mesmo dia e aproximadamente no mesmo horário.

3.6.3 Coleta de dados

Após o período de recuperação, os transmissores foram ligados com auxílio de um ímã e um rádio portátil (para verificar o sinal) e os registros de PAP, PAS, PAM, PAD e FC dos animais foram coletados de 10 em 10 minutos, através de sistema de aquisição e análise de dados (Dataquest A.R.T. – Gold 2.2). Cada caixa de rato é colocada em cima de uma placa que capta os dados do transmissor e está ligada a uma matriz, que envia todos os dados para o sistema no computador, como esquematizado na figura 9.

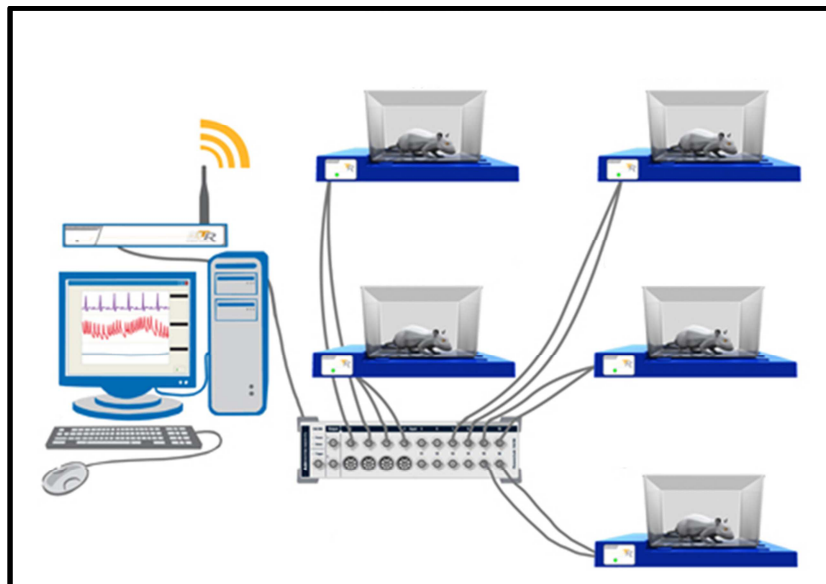


Figura 9 – Esquema mostrando a transmissão de dados na telemetria.

Fonte: joomlaquery.com/joomla-solved-the-timezone-could-not-be-found-in-the-database/

Os dados foram coletados no programa Dataquest, porém foram simplificados no programa Web Telemetry, programado especialmente para a telemetria. Esse programa é capaz de calcular as médias de 24h de registro ou só do dia ou noite de todas as variáveis: PAM, PAS, PAD e FC. Dessa forma, as médias do dia (06:00 às 17:50h) e da noite (18:00 às 05:50h do dia seguinte) de cada rato foram coletadas para análise estatística. Para analisar os dados de PA basal, foi feita a média dos 3 dias de coleta.

3.7 Tratamento

As medidas controle foram avaliadas em cada animal, antes do mesmo ser submetido ao tratamento, a fim de diminuir o número de animais utilizados. As coletas dos valores basais foram realizadas durante 03 dias. Nos próximos 05 dias, os ratos foram submetidos à gavagem com água deionizada, para que eles acostumassem com esse procedimento, que seria realizado durante todo o tratamento. Gavagem é um método de introdução de líquidos no esôfago do animal através de uma agulha específica, sem o risco de perda pela administração oral (figura 10). Dessa forma, nós certificamos de que as alterações ocorridas nos parâmetros avaliados não foram em decorrência da administração em si.

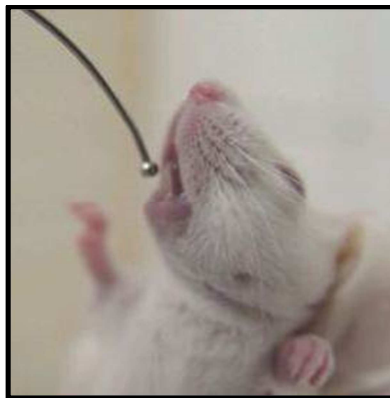


Figura 10 – Procedimento de gavagem em animal de experimentação.

Fonte: fcfar.unesp.br/laboratorio_christiane_pienna_soares/int_galeria_de_fotos.php

Os animais foram tratados em dose única diária por 15 dias seguidos. No primeiro dia, as bombas osmóticas (contendo pepstatina – grupos PEP e PEPA7; salina e álcool etílico – grupo A7) foram implantadas em todos os animais. Assim que eles se recuperaram da anestesia geral, foi realizada a administração das drogas por via oral (HP β CD para o grupo PEP e Ang-(1-7)/HP β CD para os grupos PEPA7 e A7).

O tratamento nos outros dias foi realizado através da gavagem, sempre em horário aproximado. A diluição das drogas ministradas era realizada imediatamente antes do procedimento. O esquema do tratamento é ilustrado na figura 11.

3.7.1 Implantação da bomba osmótica

A pepstatina A foi administrada nos animais através de bomba osmótica durante 15 dias. Essa bomba foi totalmente preenchida com uma solução da pepstatina A (grupo PEP e PEPA7) ou solução salina e etanol absoluto (a 5%) (grupo A7) e foi implantada no tecido subcutâneo interescapular do rato, que foi anestesiado com tribromoetanol (2,5 mg/Kg). Cada bomba libera seu conteúdo por um período e uma taxa de infusão pré-determinada, mas sempre totalizando uma concentração de $5\mu\text{g/Kg/dia}$, durante 15 dias.

As bombas eram preenchidas no dia anterior à implantação e permaneciam em solução salina estéril, à temperatura ambiente.

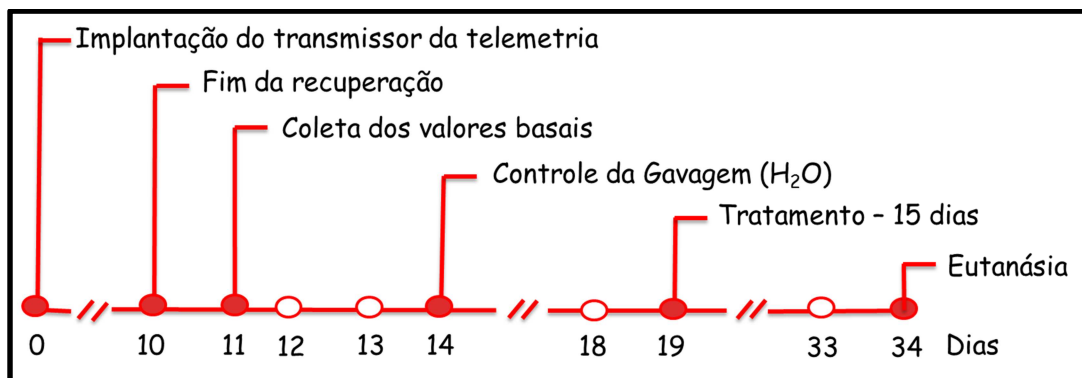


Figura 11 - Esquema de tratamento. Os ratos foram submetidos à cirurgia para implantação do transmissor e recuperaram por um período de 10 dias. Depois, os dados basais foram coletados por 3 dias e foi realizada gavagem com água deionizada por 5 dias, para aclimação. No 19º dia, as bombas osmóticas foram implantadas e o tratamento foi iniciado. Após 15 dias, os animais foram submetidos à eutanásia para coleta de sangue e tecidos.

3.8 Eutanásia

No dia seguinte ao fim do tratamento, ou seja, no 16º dia, os transmissores foram desligados e os animais foram submetidos à eutanásia, com o auxílio de guilhotina. De cada rato, foi retirado:

- **Sangue:** foram coletados aproximadamente 5ml em 3 alíquotas diferentes (com anticoagulante EDTA, com um coquetel de inibidores de proteases e sem anticoagulante). Ao final da eutanásia, foram centrifugadas a 3.000 rpm/20min em centrífuga refrigerada e o plasma foi separado e armazenado em freezer -80°C;
- **Ventrículo esquerdo (VE):** o coração foi rapidamente retirado e mergulhado em solução salina (NaCl 0,9%), para remover a maior parte do sangue acumulado em seu interior. Em seguida, foi levemente secado em papel filtro e o ventrículo direito foi removido. O VE, então, foi pesado, dividido em 03 fragmentos. Dois desses foram congelados em gelo seco, para posterior armazenamento em freezer -80°C e o outro fragmento foi mergulhado em solução de formaldeído 10% e armazenado em temperatura ambiente, para posterior realização de cortes histológicos;
- **Rins:** os rins direito e esquerdo foram rapidamente retirados e limpos de qualquer gordura superficial. O rim direito foi cortado longitudinalmente e o esquerdo foi cortado transversalmente para análise histológica. As fatias foram acondicionadas em recipientes diferentes e congeladas em gelo seco, para posterior armazenamento em freezer -80°C. A metade destinada à histologia foi mergulhada em solução de formaldeído 10% e armazenada em temperatura ambiente, para posterior realização de cortes;
- **Pata esquerda:** a pata esquerda de cada animal foi retirada e armazenada em freezer -20°C, para posterior medição do comprimento da tíbia esquerda com auxílio de um paquímetro;
- **Transmissor:** o transmissor foi retirado e posteriormente limpo, para que pudesse ser implantado em outro animal;
- **Bomba osmótica:** a bomba osmótica foi retirada para posterior verificação de seu volume restante.

3.9 Avaliação do Tônus Autonômico Cardíaco

Para a verificação do tônus autonômico cardíaco, 20 ratos foram enquadrados nos grupos PEP, PEPA7, A7 ou CTL (controle). Os animais foram submetidos à gavagem com água deionizada durante 05 dias e, então, tratados com as respectivas drogas durante 15 dias, da mesma forma como citado anteriormente. Os animais do grupo CTL não foram submetidos à gavagem com água nem a algum tratamento. Porém, no dia da implantação da bomba osmótica (1º dia de tratamento para os outros grupos), o grupo CTL também foi submetido à anestesia geral, uma pequena incisão no dorso e à sutura do mesmo, como adotado nos outros grupos.

No 13º dia de tratamento, os animais foram submetidos à implantação da cânula na artéria e veia femoral, como citado em item anterior, porém foram anestesiados com uma solução à base de Xilazina e Ketamina, nas doses de 10 e 80mg/Kg, respectivamente. Os animais foram acondicionados individualmente e passaram por um período de recuperação de 18 a 24h.

No 14º dia, aproximadamente 30 minutos após a administração das drogas do tratamento, a PA e a FC foram mensuradas continuamente com o auxílio de um sistema de aquisição de dados (Biopac Systems, Inc.). Os valores basais foram coletados entre 30min e 1h. Após essa coleta, foi injetado Metil-atropina na dose de 3mg/Kg e a resposta foi acompanhada durante 15min. Em seguida, foi injetado Propranolol na dose de 4mg/Kg, cuja resposta foi acompanhada por mais 15min. A metil-atropina é um antagonista de receptores muscarínicos, bloqueando o efeito parassimpático (BERNE & LEVY, 2009). O propranolol é um antagonista dos receptores β -adrenérgicos, que bloqueia o efeito simpático (BERNE & LEVY, 2009).

No 15º dia de tratamento, também aproximadamente 30min após a gavagem, os ratos foram novamente conectados ao sistema de aquisição de dados da PA e FC. Após coleta de 30min a 1h dos valores basais, foi injetado Propranolol (4mg/Kg) e,

após 15 min, injetado Metil-atropina (3mg/Kg), que foi acompanhada durante 15min. Em seguida, o animal foi desconectado do sistema e mantido no mesmo local.

Como no 1º dia foi injetado metil-atropina, o efeito vagal foi bloqueado, tendo então a FC máxima, ou seja, só com o efeito simpático. Em seguida, foi injetado propranolol, para que com o bloqueio vagal e simpático a FC intrínseca pudesse ser obtida. No 2º dia a ordem foi invertida: injetou-se primeiramente o propranolol para bloquear o efeito simpático e assim determinar a FC mínima, ou seja, só com a influência parassimpática. Depois, foi injetado metil-atropina para ter o bloqueio duplo simpático/vagal e assim determinar a FC intrínseca.

Depois de determinados esses valores, foram realizados cálculos. O tônus simpático foi calculado a partir da FC máxima menos a média da FC intrínseca e o tônus parassimpático foi calculado pela diferença entre a média da FC intrínseca e a FC mínima.

3.10 Efeito do bloqueio ganglionar

No fim do 15º dia de tratamento, no mínimo 7h de intervalo após a avaliação do tônus cardíaco, os ratos foram conectados ao sistema de aquisição de dados e os valores basais foram coletados (aproximadamente 20min). Foi injetado hexametônio na dose de 20mg/Kg, via intravenosa e a resposta foi observada durante 30min. O hexametônio é um bloqueador dos receptores nicotínicos, presentes na junção entre os neurônios pré e pós-ganglionares. Assim, a transmissão pós-ganglionar simpática estaria bloqueada com a administração dessa droga (BERNE & LEVY, 2009).

Após o registro, os animais foram submetidos à eutanásia através da sobredose de anestésico Tiopental sódico, via i.v. O delta foi calculado a partir da diferença entre o

menor valor de pressão após a injeção de hexametônio e o valor basal, mostrando o quanto a PA foi reduzida.

3.11 Avaliação da Atividade da Renina Plasmática por Radioimunoensaio (RIE)

Para cada amostra, foram feitos dois ensaios compostos por alíquotas de plasma, tampão de Ang I, 8-OH-quinoleína (48mM) e PMSF (16,1mM), que foram incubados durante 2h. Um ensaio foi incubado no gelo e o outro incubado a uma temperatura de 37°C, simultaneamente. Depois, as reações foram interrompidas e uma alíquota desses ensaios foi incubada novamente com vários outros tampões, inclusive com o anticorpo para Ang I, para depois serem lidos no contador gama (BOTELHO *et al.*, 1994).

Esse ensaio detecta a quantidade de Ang I na amostra. Através de cálculos, é possível ter uma medida indireta da atividade da renina plasmática, pela diferença entre o valor da amostra incubada a 37° e o valor do gelo. Os dados foram expressos em ng/ml/h.

3.12 Histologia do Ventrículo Esquerdo

As fatias centrais dos ventrículos, que estavam fixados em solução formol 10%, foram incluídas em parafina e cortadas no micrótomo em fatias de 6µm de espessura. Foram montadas duas lâminas por rato, onde cada uma delas continha 03 cortes, com um intervalo de 40µm entre cada corte (FERREIRA *et al.*, 2007).

Uma lâmina foi corada com Hematoxilina-Eosina (HE) e a outra foi corada com Picrosirius red. A inclusão na parafina, a montagem das lâminas e a coloração com

HE foi realizada pela técnica do Laboratório de Apoio Didático do Departamento de Morfologia / ICB / UFMG.

O Picrosirius red é formado a partir de uma solução de Sirius Red e de uma solução de Ácido Pícrico saturada, que cora colágeno no tecido.

3.12.1 Conteúdo de colágeno perivascular

As fibras de colágeno foram visualizadas sobre luz polarizada, na objetiva de 40x (Microscópio Olympus, BX41). Imagens de todos os vasos dos três cortes (com aproximadamente o mesmo diâmetro) foram captadas através de uma câmera acoplada ao microscópio (Spot Insight Color – modelo 3.2.0), com o auxílio do programa Spot Basic. Para verificação do conteúdo de colágeno perivascular, as imagens foram analisadas no programa Image J (TAMARAPPOO *et al.*, 2012).

3.12.2 Diâmetro dos cardiomiócitos

Para a mensuração do diâmetro dos cardiomiócitos, foram captadas aproximadamente 10 imagens de cada corte, distantes entre si, totalizando 30 imagens por tecido animal. As imagens foram captadas na objetiva de 40x (Microscópio Axio Vision – Zeiss), com o auxílio do programa Axio Vision Release 4.8. Foram utilizados somente cardiomiócitos cortados longitudinalmente com núcleo e limites celulares visíveis. A mensuração do diâmetro foi realizada na região do núcleo em 100 cardiomiócitos, através do programa Image Pró Plus (SAVERGNINI *et al.*; 2013).

3.13 Histologia do Rim

A metade superior do rim esquerdo dos animais, que estavam fixadas em solução formol 10%, foram incluídas em parafina e cortados no micrótomo em fatias de 5 μ m (KUSUNOKI *et al.*; 2013), com intervalo de 50 μ m. Todo o procedimento restante foi igual ao adotado para a histologia do ventrículo esquerdo, descrita no item 3.12.

3.14 Análise Estatística

Foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA) em todos os testes. Quando apropriado, foi utilizado One-Way ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls ou Two-Way ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni, utilizando Prisma 5.0 como software. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Padronização das doses da Ang-(1-7) e Pepstatina

Para determinar a dose da Ang-(1-7), ratos TGR(mRen2)²⁷ foram submetidos a registro contínuo da PA e FC durante 6h após a administração oral do composto de inclusão Ang-(1-7)/HP β CD nas doses de 30 e 100 μ g/Kg.

A figura 12 e a Tabela 1 mostram a variação da PAM e da FC. A dose de 30 μ g/Kg promoveu uma maior queda da PAM comparado com a dose de 100 μ g/Kg (figura 12A) ($-16,8 \pm 1,2$ vs $-7,5 \pm 0,9$ mmHg). Já a variação da FC não foi diferente entre as duas doses (figura 12B) ($-20,3 \pm 2,5$ vs $-16,7 \pm 2,5$ bpm). Por isso, a dose de Ang-(1-7) utilizada no tratamento foi de 30 μ g/Kg.

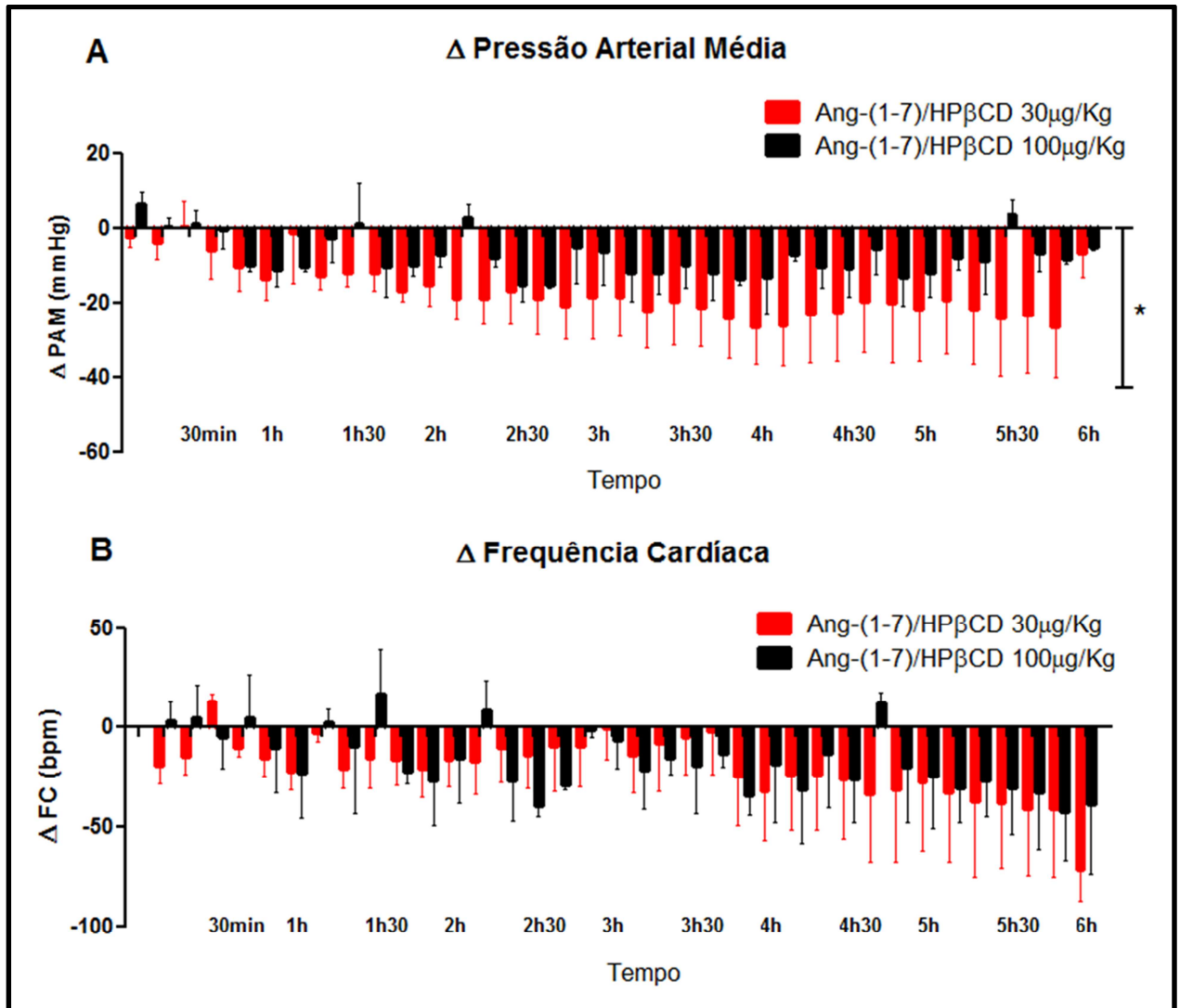


Figura 12 – Variação da Pressão Arterial Média (A) e Frequência cardíaca (B) em ratos submetidos a administração oral de Ang-(1-7)/HP β CD nas doses de 30 μ g/Kg (n=5) e 100 μ g/Kg (n=3), durante 6h após a administração. * p < 0,05 em relação à dose de 100 μ g/Kg (Two-Way ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni).

Tabela 1 – Variação da Pressão Arterial Média (PAM) e Frequência cardíaca (FC) de ratos submetidos a administração oral de Ang-(1-7). Valores expressos como média \pm erro padrão.

Tempo após gavagem	Δ PAM (mmHg)		Δ FC (bpm)	
	30 μ g/Kg (n=5)	100 μ g/Kg (n=3)	30 μ g/Kg (n=5)	100 μ g/Kg (n=3)
Média do tempo total	-16,8 \pm 1,2 *	-7,5 \pm 0,9	-20,3 \pm 2,5	-16,7 \pm 2,5
30min	0,27 \pm 6,6	1,0 \pm 3,5	12,8 \pm 3,7	-5,2 \pm 15,7
1h	-13,8 \pm 5,7	-11,2 \pm 4,4	-22,0 \pm 9,6	-23,3 \pm 22,5
1h30	-12,2 \pm 3,4	0,9 \pm 11,0	-15,2 \pm 15,5	16,7 \pm 22,3
2h	-15,1 \pm 5,8	-7,1 \pm 3,2	-16,4 \pm 13,7	-15,1 \pm 22,6
2h30	-17,1 \pm 8,8	-15,2 \pm 4,7	-14,0 \pm 16,6	-39,4 \pm 5,2
3h	-18,6 \pm 11,1	-6,4 \pm 9,0	-0,4 \pm 16,1	-6,5 \pm 14,6
3h30	-19,7 \pm 11,5	-9,9 \pm 6,1	-4,7 \pm 19,0	-18,9 \pm 24,5
4h	-26,7 \pm 9,8	-13,1 \pm 9,8	-31,6 \pm 25,2	-18,5 \pm 29,1
4h30	-22,3 \pm 13,5	-10,8 \pm 7,8	-25,6 \pm 30,2	-26,2 \pm 22,0
5h	-21,7 \pm 13,8	-12,1 \pm 6,5	-27,2 \pm 34,6	-24,7 \pm 26,2
5h30	-24,0 \pm 15,8	3,6 \pm 3,9	-37,9 \pm 33,0	-30,6 \pm 23,3
6h	-6,9 \pm 6,3	-5,4 \pm 0,7	-71,5 \pm 16,1	-38,8 \pm 35,5

*p<0,05 em relação à dose de 100 μ g/Kg (Two-Way ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni).

Para determinar a dose da pepstatina, doses crescentes (5; 10; 20 e 40 μ g/Kg) foram infundidas nos animais com intervalo de 1h entre cada uma. A figura 13 (A e B) e a tabela 2 mostram que não há diferença significativa entre as quatro doses, em relação à variação da PAM e FC durante 30 minutos de infusão. Dessa forma, a dose de pepstatina estabelecida para o tratamento foi de 5 μ g/Kg.

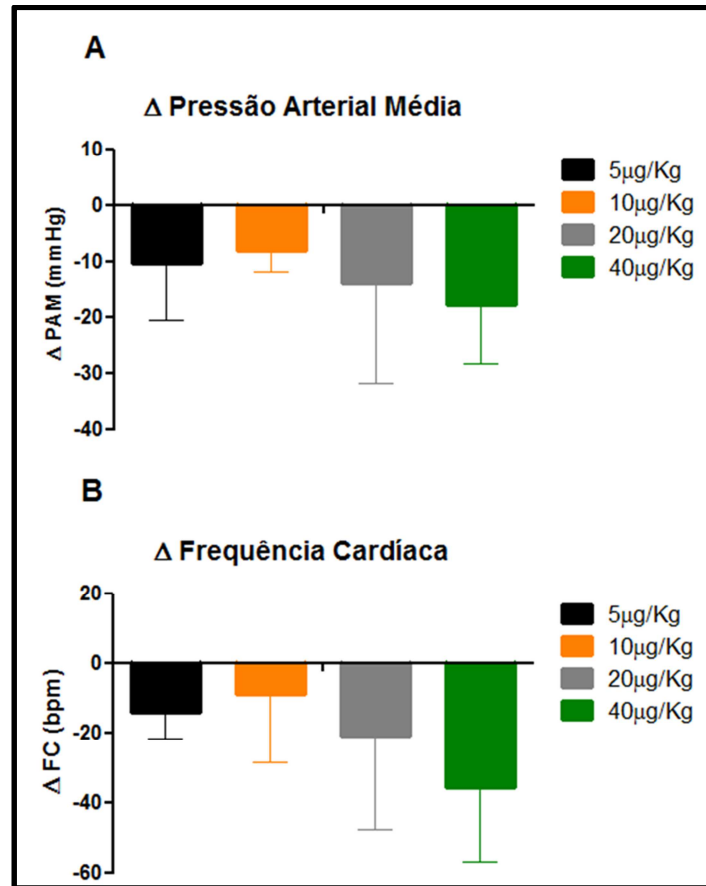


Figura 13 – Variação da Pressão Arterial Média (A) (n=5) e Frequência Cardíaca (B) (n=5) em ratos submetidos à infusão i.v. de 5; 10; 20 e 40µg/Kg de Pepstatina A durante 30 minutos, na taxa de 600µl/hora. One-Way ANOVA, seguido do pós-teste de Newman-Keuls.

Tabela 2 – Variação da Pressão Arterial Média (A) e Frequência Cardíaca (B) de ratos submetidos à infusão i.v. de diferentes doses de Pepstatina A. Valores expressos como média ± erro padrão.

Doses	Variáveis	
	Δ PAM (mmHg)	Δ FC (bpm)
5µg/Kg	-10,4 ± 5,0	-14,1 ± 7,7
10µg/Kg	-8,1 ± 1,9	-8,8 ± 19,6
20µg/Kg	-13,7 ± 9,0	-20,9 ± 26,6
40µg/Kg	-17,7 ± 5,3	-35,8 ± 21,1

One-Way ANOVA, seguido do pós-teste de Newman-Keuls.

4.2 Efeito do tratamento na Pressão Arterial e Frequência Cardíaca

Para avaliar o efeito do tratamento na PAM, PAS, PAD e FC os animais foram monitorados através do sistema de telemetria.

A figura 14 e a tabela 3 mostram que a gavagem com água deionizada não promoveu alteração da PAM durante os cinco dias anteriores ao início do tratamento, mostrando que o estresse da gavagem não induz alteração significativa na PAM.

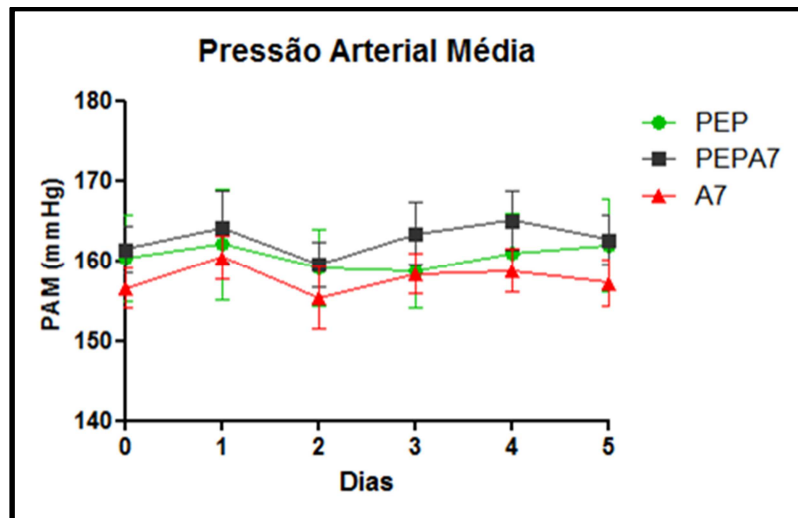


Figura 14 – Pressão Arterial Média durante cinco dias de gavagem com água deionizada, antes do início do tratamento (n=9/grupo). Two-Way ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni.

Tabela 3 – Valores da Pressão Arterial Média durante o dia dos três grupos de tratamento durante a gavagem com água deionizada, cinco dias antes do início do tratamento. Valores expressos como média \pm erro padrão.

Dias	PEP	PEPA7	A7
0	160,3 \pm 5,4	161,4 \pm 2,9	156,5 \pm 2,4
1	162,1 \pm 6,8	164,2 \pm 4,4	160,4 \pm 2,7
2	159,1 \pm 4,8	159,6 \pm 2,7	155,4 \pm 3,8
3	158,7 \pm 4,6	163,4 \pm 3,8	158,4 \pm 2,5
4	161,0 \pm 4,9	165,0 \pm 3,6	158,8 \pm 2,6
5	161,9 \pm 5,8	162,6 \pm 3,1	157,2 \pm 2,9

Two-Way ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni

O tratamento com o inibidor de renina (pepstatina – PEP) ou com a combinação (PEPA7) promoveu uma redução na PAM do 2º ao 10º dia de tratamento, e o grupo tratado com a Ang-(1-7) incluída em HP β CD (A7) reduziu a PAM do 2º ao 7º dia de tratamento durante o período diurno (figura 15A). Durante o período da noite, o grupo PEP reduziu a PAM do 1º ao 9º dia de tratamento, enquanto os grupos PEPA7 e A7 reduziram do 1º ao 7º dia de tratamento, sem apresentar diferença estatística entre os grupos (figura 15B).

A FC foi aumentada durante o 1º dia de tratamento pelos três grupos, retornando aos valores basais a partir do 2º dia, no período diurno (figura 15C). Durante a noite, a FC foi reduzida pelos três grupos a partir do 2º dia, mantendo-se mais baixa durante o restante do tratamento (figura 15D).

A figura 16 mostra a PAS durante o dia (A) e durante a noite (B). Durante o dia, os três grupos reduziram a PAS do 2º ao 7º dia de tratamento. Já durante a noite, reduziram do 1º ao 9º dia de tratamento, sem diferença entre os grupos.

A PAD apresentou-se menor do 2º ao 7º dia de tratamento durante o período diurno (figura 16C) de forma semelhante em todos os grupos. Durante a noite e também sem diferença entre os grupos, a PAD foi reduzida do 1º ao 8º dia de tratamento (16D).

As tabelas mostram os valores agrupados por dia (Tabela 4) e noite (Tabela 5) da PAM, FC, PAS e PAD.

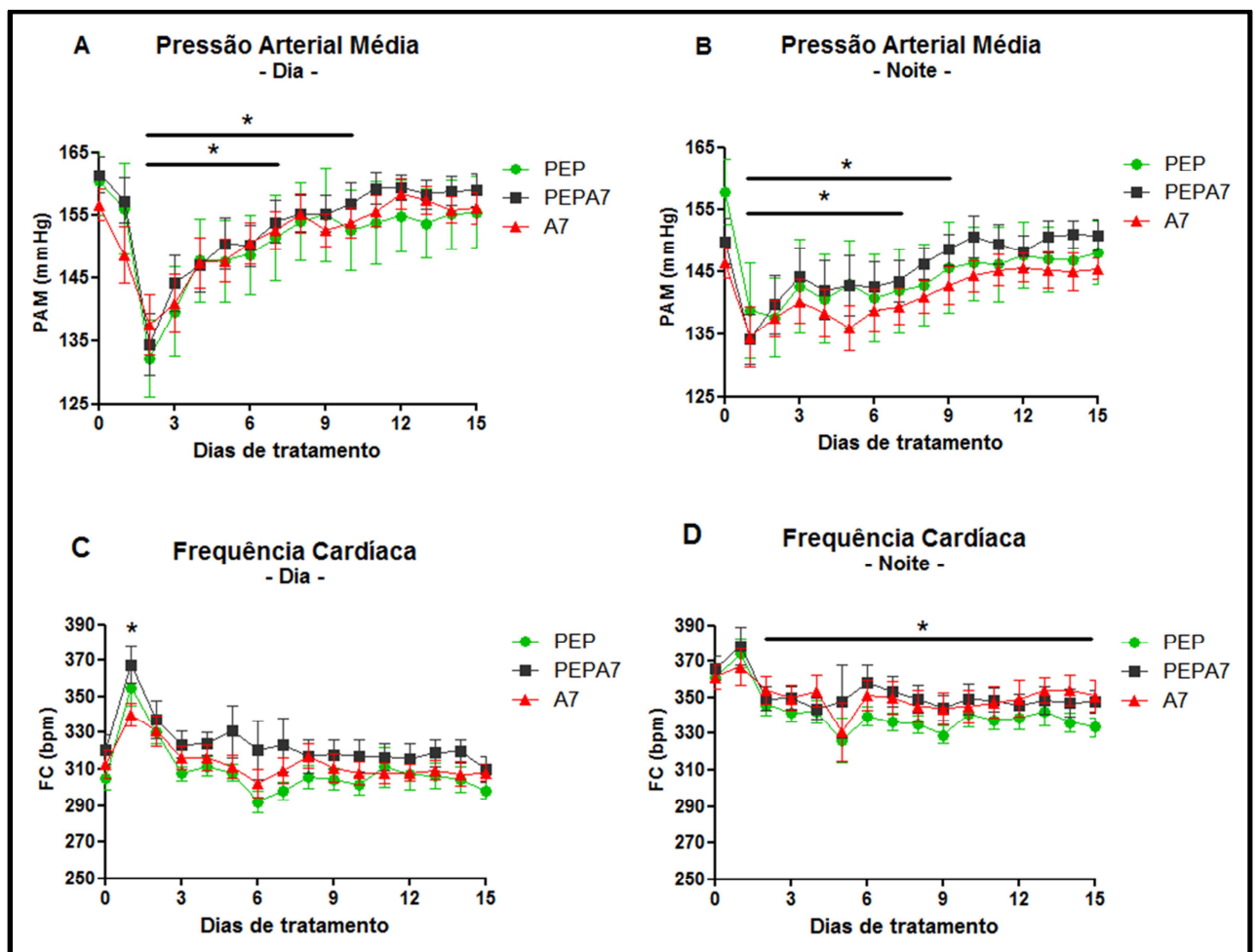


Figura 15 – Pressão Arterial Média (PAM) durante o dia (A) e a noite (B) e Frequência Cardíaca (FC) durante o dia (C) e a noite (D) de ratos TGR(mRen2)27 tratados com pepstatina (PEP, n=9), com pepstatina+Ang-(1-7) (PEPA7, n=9) e com Ang-(1-7) (A7, n=9) durante 15 dias. PAM reduzida no período diurno do 2º ao 10º dia pelos grupos PEP e PEPA7 e do 2º ao 7º dia pelo grupo A7. Durante a noite, a PAM foi reduzida do 1º ao 9º dia de tratamento pelo grupo PEP e do 1º ao 7º dia pelos grupos PEPA7 e A7. A FC foi aumentada no 1º dia pelos três grupos durante o período diurno e à noite foi reduzida do 2º ao 15º dia de tratamento. * p<0,05 em relação ao valor basal, representado como dia 0 (Two-Way ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni).

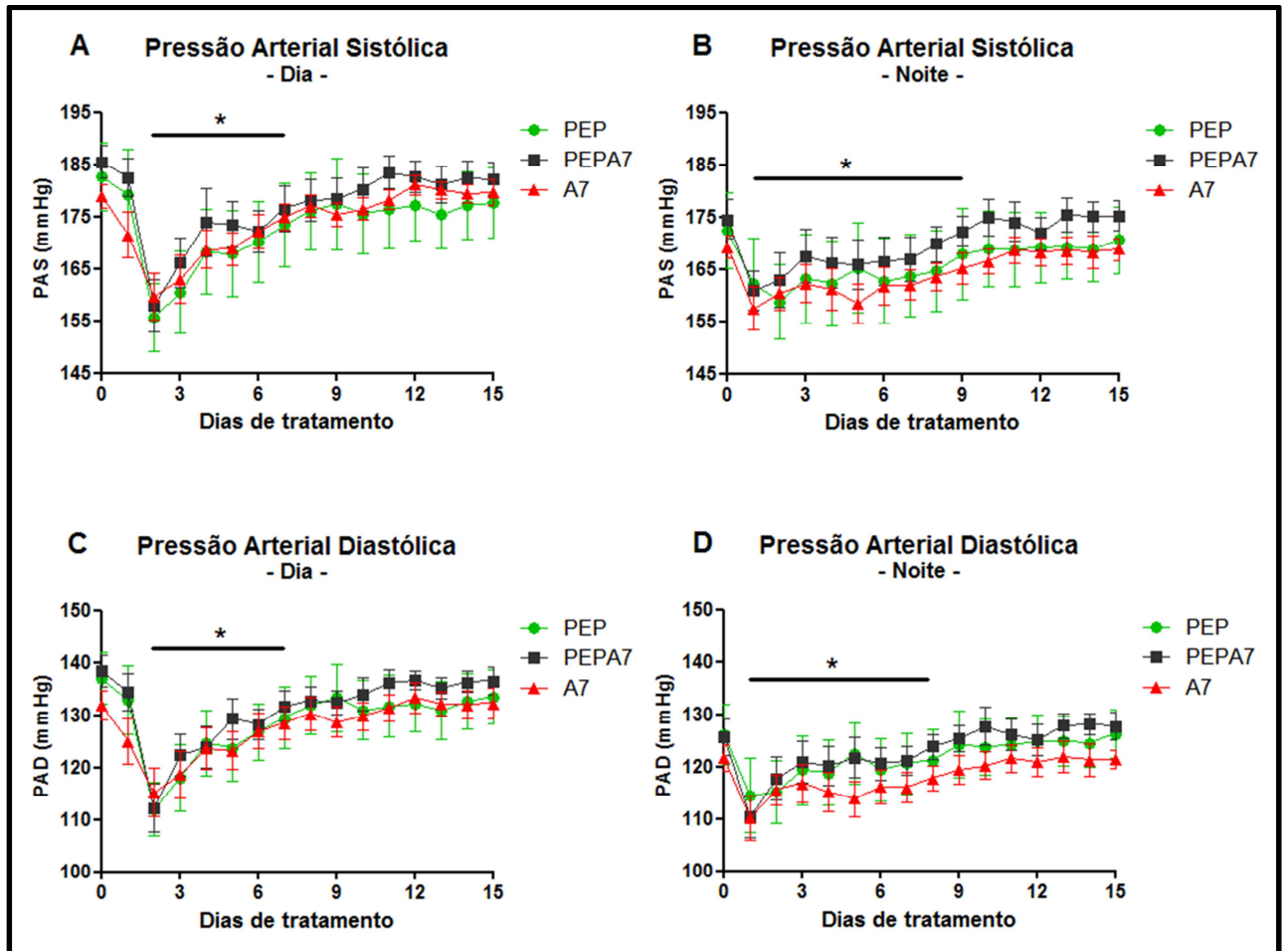


Figura 16 – Pressão Arterial Sistólica (PAS) durante o dia (A) e a noite (B) e Pressão Arterial Diastólica (PAD) durante o dia (C) e a noite (D) de ratos TGR(mRen2)27 tratados com pepstatina (PEP, n=9), com pepstatina+Ang-(1-7) (PEPA7, n=9) e com Ang-(1-7) (A7, n=9) durante 15 dias. A PAS diurna foi reduzida pelos três grupos do 2^o ao 7^o dia e durante a noite foi reduzida do 1^o ao 9^o dia de tratamento. A PAD diurna foi reduzida do 2^o ao 7^o dia, enquanto a noturna foi reduzida do 1^o ao 8^o dia de tratamento. * $p < 0,05$ em relação ao valor basal, representado como dia 0 (Two-Way ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni).

Tabela 4 – Valores da Pressão Arterial Média (PAM), Frequência cardíaca (FC), Pressão Arterial Sistólica (PAS) e Pressão Arterial Diastólica (PAD) durante o dia de ratos TGR(mRen2)27 tratados com pepstatina (PEP, n=9), com pepstatina+Ang-(1-7) (PEPA7, n=9) e com Ang-(1-7) (A7, n=9) durante 15 dias. Valores expressos como média \pm erro padrão.

Dias	DIA					
	PAM			FC		
	PEP	PEPA7	A7	PEP	PEPA7	A7
0	160,3 \pm 5,4	161,4 \pm 2,9	156,5 \pm 2,4	305,1 \pm 6,4	320,6 \pm 7,7	312,8 \pm 7,6
1	156,0 \pm 7,2	157,2 \pm 3,6	148,6 \pm 4,4	355,1 \pm 10,3*	367,7 \pm 10,3*	339,9 \pm 6,5*
2	132,2 \pm 6,0*	134,3 \pm 4,8*	137,4 \pm 4,8*	330,2 \pm 6,5	337,1 \pm 10,2	330,9 \pm 8,6
3	139,6 \pm 7,0*	144,1 \pm 4,3*	140,9 \pm 4,6*	307,6 \pm 3,8	323,4 \pm 7,5	315,9 \pm 6,4
4	147,7 \pm 6,6*	147,0 \pm 4,3*	147,4 \pm 4,0*	311,5 \pm 5,3	323,8 \pm 6,2	316,1 \pm 7,1
5	147,6 \pm 6,5*	150,4 \pm 4,1*	147,6 \pm 3,3*	308,1 \pm 4,5	330,7 \pm 14,3	311,1 \pm 6,2
6	148,6 \pm 6,2*	150,1 \pm 3,3*	150,5 \pm 3,3*	292,0 \pm 5,7	320,4 \pm 16,3	302,4 \pm 7,6
7	151,3 \pm 6,7*	153,8 \pm 3,3*	152,5 \pm 3,0*	298,0 \pm 4,5	323,1 \pm 14,5	309,3 \pm 6,8
8	154,0 \pm 6,1*	155,2 \pm 2,8*	155,2 \pm 3,0	305,7 \pm 6,1	316,9 \pm 9,0	317,0 \pm 6,5
9	155,0 \pm 7,5*	155,2 \pm 2,9*	152,5 \pm 2,6	304,6 \pm 6,2	317,9 \pm 7,7	310,5 \pm 7,4
10	152,5 \pm 6,4*	156,7 \pm 3,3*	153,7 \pm 2,4	301,3 \pm 5,2	317,1 \pm 8,6	307,8 \pm 6,4
11	153,8 \pm 6,5	159,2 \pm 2,5	155,6 \pm 2,4	311,1 \pm 10,7	316,6 \pm 7,2	307,8 \pm 5,5
12	154,8 \pm 5,6	159,4 \pm 1,9	158,3 \pm 2,3	307,1 \pm 8,4	315,8 \pm 8,0	308,0 \pm 4,7
13	153,6 \pm 5,5	158,2 \pm 2,3	157,3 \pm 2,1	306,3 \pm 6,8	318,9 \pm 7,3	309,5 \pm 5,4
14	155,0 \pm 5,5	158,7 \pm 2,3	155,8 \pm 2,1	304,1 \pm 7,1	319,7 \pm 6,0	307,2 \pm 6,5
15	155,4 \pm 5,6	158,9 \pm 2,6	156,1 \pm 2,5	298,2 \pm 4,2	309,6 \pm 6,9	308,0 \pm 4,4

Dias	PAS					
	PAS			PAD		
	PEP	PEPA7	A7	PEP	PEPA7	A7
0	182,7 \pm 6,4	185,5 \pm 3,1	178,8 \pm 2,2	136,9 \pm 4,8	138,4 \pm 2,9	131,8 \pm 2,8
1	179,2 \pm 8,7	182,5 \pm 3,7	171,5 \pm 4,4	132,8 \pm 6,5	134,5 \pm 3,4	125,0 \pm 4,3
2	155,6 \pm 6,5*	157,9 \pm 5,0*	159,7 \pm 4,4*	112,0 \pm 5,0*	112,2 \pm 4,5*	115,2 \pm 4,7*
3	160,4 \pm 7,9*	166,2 \pm 4,7*	162,9 \pm 4,6*	118,0 \pm 6,4*	122,3 \pm 3,9*	118,7 \pm 4,5*
4	168,2 \pm 8,1*	174,0 \pm 6,5*	168,7 \pm 3,7*	124,6 \pm 6,2*	133,3 \pm 10,0*	123,7 \pm 3,9*
5	167,9 \pm 8,2*	173,5 \pm 4,3*	168,8 \pm 3,1*	123,8 \pm 6,3*	129,3 \pm 3,8*	123,2 \pm 3,6*
6	170,1 \pm 7,7*	172,1 \pm 4,0*	172,2 \pm 3,2*	126,8 \pm 5,4*	128,3 \pm 2,8*	126,9 \pm 3,3*
7	173,3 \pm 8,0*	176,5 \pm 4,3*	174,9 \pm 2,5*	129,5 \pm 5,9*	131,7 \pm 2,9*	128,5 \pm 3,1*
8	176,0 \pm 7,4	178,1 \pm 3,9	177,0 \pm 2,1	131,8 \pm 5,5	132,8 \pm 2,6	130,3 \pm 3,0
9	177,4 \pm 8,8	178,4 \pm 4,0	175,4 \pm 2,2	133,3 \pm 6,4	132,4 \pm 2,1	128,7 \pm 2,8
10	175,5 \pm 7,6	180,3 \pm 4,2	176,5 \pm 2,1	131,0 \pm 5,5	134,0 \pm 3,1	129,8 \pm 2,6
11	176,5 \pm 7,5	183,4 \pm 3,1	178,2 \pm 1,7	131,7 \pm 5,8	136,2 \pm 2,4	131,4 \pm 2,5
12	177,1 \pm 6,6	182,7 \pm 2,9	181,0 \pm 1,8	132,1 \pm 5,1	136,6 \pm 1,7	133,3 \pm 2,8
13	175,4 \pm 6,5	181,1 \pm 3,4	180,1 \pm 1,5	130,8 \pm 5,4	135,1 \pm 2,0	132,1 \pm 2,3
14	177,1 \pm 6,5	182,5 \pm 3,0	179,3 \pm 1,7	132,7 \pm 5,2	136,3 \pm 1,9	132,0 \pm 2,7
15	177,7 \pm 6,6	182,2 \pm 3,1	179,6 \pm 2,4	133,5 \pm 5,0	136,5 \pm 2,5	132,3 \pm 2,8

* $p < 0,05$ em relação ao valor basal, representado como dia 0 (Two-Way ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni).

Tabela 5 – Valores da Pressão Arterial Média (PAM), Frequência cardíaca (FC), Pressão Arterial Sistólica (PAS) e Pressão Arterial Diastólica (PAD) durante a noite de ratos TGR(mRen2)27 tratados com pepstatina (PEP, n=9), com pepstatina+Ang-(1-7) (PEPA7, n=9) e com Ang-(1-7) (A7, n=9) durante 15 dias. Valores expressos como média \pm erro padrão.

NOITE						
Dias	PAM			FC		
	PEP	PEPA7	A7	PEP	PEPA7	A7
0	157,8 \pm 5,3	149,8 \pm 3,6	146,3 \pm 2,3	360,9 \pm 6,0	366,1 \pm 6,5	361,3 \pm 6,6
1	138,7 \pm 7,5*	134,1 \pm 4,0*	134,4 \pm 4,8*	374,4 \pm 8,1	378,7 \pm 10,4	367,0 \pm 10,0
2	137,6 \pm 6,3*	139,6 \pm 4,6*	137,4 \pm 2,9*	346,0 \pm 5,9*	349,3 \pm 6,5*	353,9 \pm 7,9*
3	142,6 \pm 7,4*	144,1 \pm 4,5*	140,2 \pm 3,4*	341,6 \pm 5,2*	349,8 \pm 6,6*	349,5 \pm 7,0*
4	140,6 \pm 7,1*	142,0 \pm 4,7*	138,2 \pm 3,8*	342,1 \pm 6,3*	343,5 \pm 5,9*	353,4 \pm 8,7*
5	142,9 \pm 6,9*	142,7 \pm 4,7*	135,9 \pm 3,5*	326,1 \pm 12,1*	347,7 \pm 20,0*	330,9 \pm 15,9*
6	140,6 \pm 6,9*	142,6 \pm 3,8*	138,7 \pm 3,4*	339,4 \pm 5,3*	358,0 \pm 9,9*	351,2 \pm 8,1*
7	141,9 \pm 6,7*	143,4 \pm 3,3*	139,4 \pm 2,9*	336,5 \pm 5,1*	353,3 \pm 8,6*	349,7 \pm 9,1*
8	142,8 \pm 6,5*	146,2 \pm 2,5	140,9 \pm 2,5	334,9 \pm 4,9*	348,9 \pm 7,5*	345,1 \pm 8,7*
9	145,6 \pm 7,3*	148,5 \pm 2,4	142,6 \pm 3,0	329,2 \pm 4,9*	344,3 \pm 6,9*	343,9 \pm 8,8*
10	146,3 \pm 5,9	150,5 \pm 3,3	144,3 \pm 2,4	340,4 \pm 6,5*	349,1 \pm 8,1*	344,9 \pm 9,2*
11	146,1 \pm 5,9	149,3 \pm 3,1	145,2 \pm 2,4	337,4 \pm 4,9*	348,5 \pm 6,5*	347,1 \pm 8,5*
12	147,5 \pm 5,3	148,1 \pm 2,6	145,6 \pm 2,3	338,4 \pm 6,3*	345,6 \pm 6,2*	349,1 \pm 10,1*
13	146,9 \pm 5,1	150,5 \pm 2,5	145,1 \pm 2,9	342,3 \pm 7,7*	348,3 \pm 7,4*	354,0 \pm 6,8*
14	146,8 \pm 4,9	150,8 \pm 2,2	144,9 \pm 3,0	336,1 \pm 5,3*	346,9 \pm 7,9*	353,9 \pm 8,2*
15	147,9 \pm 5,1	150,8 \pm 2,4	145,3 \pm 1,6	333,5 \pm 5,3*	347,7 \pm 6,2*	350,8 \pm 8,5*

Dias	PAS			PAD		
	PEP	PEPA7	A7	PEP	PEPA7	A7
0	172,3 \pm 7,1	174,5 \pm 3,7	169,3 \pm 2,1	126,1 \pm 5,6	125,7 \pm 3,5	121,7 \pm 2,5
1	162,1 \pm 8,7*	160,9 \pm 3,7*	157,5 \pm 4,1*	114,5 \pm 7,0*	110,3 \pm 3,9*	110,2 \pm 4,2*
2	158,8 \pm 7,1*	163,0 \pm 5,2*	160,3 \pm 3,1*	115,2 \pm 5,9*	117,7 \pm 4,1*	115,5 \pm 2,8*
3	163,1 \pm 8,5*	167,4 \pm 5,1*	162,2 \pm 3,6*	119,4 \pm 6,6*	121,0 \pm 4,0*	116,8 \pm 3,5*
4	162,3 \pm 8,1*	166,2 \pm 4,8*	161,1 \pm 4,0*	118,8 \pm 6,2*	120,2 \pm 3,7*	115,2 \pm 3,7*
5	165,2 \pm 8,5*	165,9 \pm 4,6*	158,4 \pm 3,8*	122,5 \pm 5,9*	121,7 \pm 3,9*	113,8 \pm 3,3*
6	162,7 \pm 8,1*	166,5 \pm 4,7*	161,8 \pm 3,6*	119,4 \pm 6,0*	120,6 \pm 3,1*	116,1 \pm 3,2*
7	163,7 \pm 7,9*	166,9 \pm 4,2*	162,0 \pm 2,8*	120,6 \pm 5,8*	121,1 \pm 2,8*	116,0 \pm 2,9*
8	164,7 \pm 7,7*	169,8 \pm 3,3*	163,5 \pm 2,5*	121,3 \pm 5,8*	123,8 \pm 2,3*	117,8 \pm 2,3*
9	167,9 \pm 8,7*	172,2 \pm 2,8*	165,1 \pm 3,0*	124,2 \pm 6,3	125,4 \pm 2,4	119,4 \pm 2,6
10	168,9 \pm 7,2	175,0 \pm 3,4	166,5 \pm 2,3	123,8 \pm 5,2	127,7 \pm 3,6	120,1 \pm 2,6
11	168,8 \pm 7,1	174,0 \pm 3,7	168,6 \pm 2,4	124,1 \pm 5,2	126,1 \pm 2,9	121,6 \pm 2,6
12	169,1 \pm 6,7	171,8 \pm 3,1	168,3 \pm 2,6	124,9 \pm 4,8	125,2 \pm 2,9	120,9 \pm 2,7
13	169,3 \pm 6,1	175,3 \pm 3,1	168,5 \pm 2,7	124,9 \pm 4,6	127,8 \pm 2,3	121,9 \pm 3,0
14	168,9 \pm 6,2	175,1 \pm 2,8	168,3 \pm 3,0	124,5 \pm 4,5	128,2 \pm 2,0	121,3 \pm 3,1
15	170,6 \pm 6,3	175,2 \pm 2,8	168,8 \pm 2,1	126,3 \pm 4,6	127,8 \pm 2,5	121,4 \pm 1,6

* p<0,05 em relação ao valor basal, representado como dia 0 (Two-Way ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni)

4.3 Tônus Autonômico Cardíaco

O Tônus autonômico cardíaco foi mensurado através do bloqueio farmacológico de receptores muscarínicos e β -adrenérgicos, para determinar a FC máxima, mínima e intrínseca. A partir disso, foi calculado o tônus cardíaco simpático, parassimpático e o índice simpático/parassimpático.

A figura 17A mostra que os animais tratados durante 15 dias com pepstatina apresentaram um menor tônus cardíaco simpático do que os animais controle (sem tratamento). Os outros grupos de tratamento não apresentaram diferença estatística. O tônus cardíaco parassimpático apresentou um aumento significativo promovido pelo grupo PEPA7. Os grupos PEP e A7 não apresentaram diferença estatística do controle (figura 17B). Assim, a relação Simpático/Parassimpático cardíaco (figura 17C) dos grupos PEP e PEPA7 foram menores em comparação ao controle. O grupo A7 apresentou redução, porém não estatisticamente diferente em comparação com o controle.

Os grupos tratados não apresentaram diferença em relação ao controle quanto à FC intrínseca, FC basal e PAM (figura 17D, E e F, respectivamente). A tabela 6 apresenta o resumo desses dados.

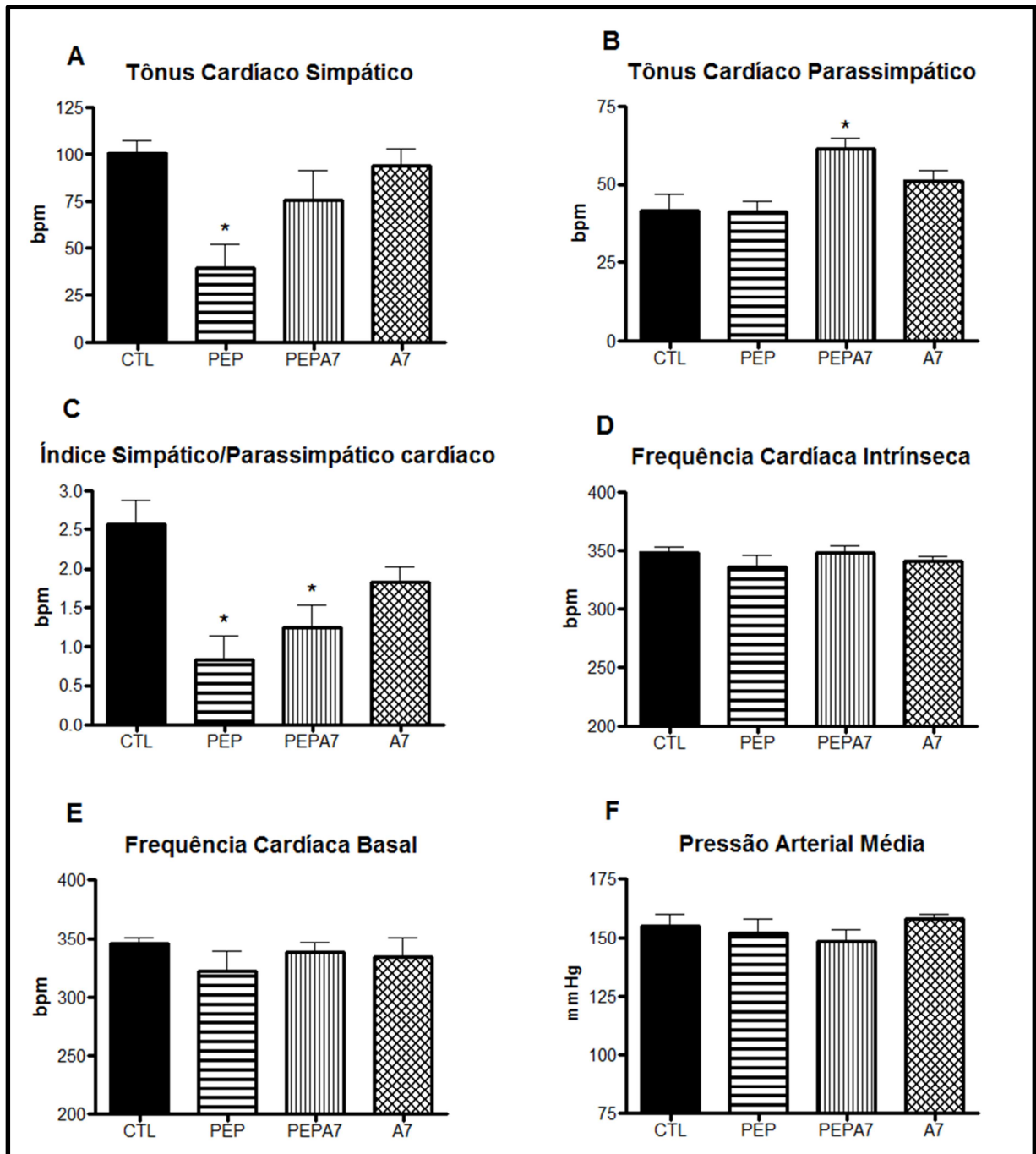


Figura 17 – Tônus Autonômico Cardíaco de ratos TGR(mRen2)27 controle (CTL, n=5), tratados com pepstatina (PEP, n=3), com pepstatina+Ang-(1-7) (PEPA7, n=4) e com Ang-(1-7) (A7, n=4) durante 15 dias. * $p < 0,05$ em relação ao grupo CTL (One-Way ANOVA, seguido do pós-teste de Newman-Keuls).

Tabela 6 – Valores do Tônus Cardíaco Simpático e Parassimpático, Índice Simpático/Parassimpático, frequência cardíaca intrínseca, basal e PAM média de ratos TGR(mRen2)27 controle (CTL, n=5), tratados com pepstatina (PEP, n=3), com pepstatina+Ang-(1-7) (PEPA7, n=4) e com Ang-(1-7) (A7, n=4) durante 15 dias. Valores expressos como média \pm erro padrão.

	Tônus Cardíaco			Frequência cardíaca		
	Simp. (S) (bpm)	Paras. (P) (bpm)	Índice S/P (bpm)	Intrínseca (bpm)	Basal (bpm)	PAM (mmHg)
CTL	100,7 \pm 7,1	41,7 \pm 5,3	2,5 \pm 0,3	348,6 \pm 4,2	346,2 \pm 4,6	155,2 \pm 4,6
PEP	39,4 \pm 12,6*	41,4 \pm 3,2	0,8 \pm 0,3*	336,7 \pm 9,5	322,3 \pm 17,1	152,0 \pm 6,2
PEPA7	75,5 \pm 15,6	61,4 \pm 3,2*	1,2 \pm 0,2*	348,2 \pm 5,9	337,8 \pm 9,6	148,8 \pm 4,5
A7	93,5 \pm 9,5	51,2 \pm 3,1	1,8 \pm 0,1	341,3 \pm 3,9	334,3 \pm 16,2	158,0 \pm 1,7

*p<0,05 em relação ao grupo CTL (One-Way ANOVA, seguido do pós-teste de Newman-Keuls).

4.4 Efeito do bloqueio ganglionar

O bloqueio dos receptores nicotínicos pelo hexametônio foi realizado para verificar a influência do tônus autonômico periférico sobre a PA. Os três grupos de tratamento, PEP (-77,25 \pm 2,6), PEPA7 (-79,86 \pm 6,2) e A7 (-78,46 \pm 5,6) não apresentaram variação da PAM estatisticamente diferente do grupo CTL (-85,17 \pm 5,5), como mostrado na figura 18.

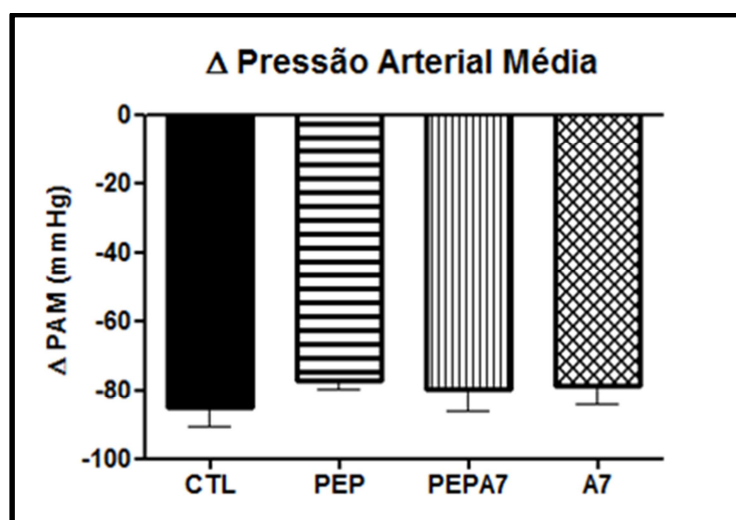


Figura 18 – Variação da Pressão Arterial Média de ratos TGR(mRen2)27 controle (CTL, n=5), tratados com pepstatina (PEP, n=5), com pepstatina+Ang-(1-7) (PEPA7, n=5) e com Ang-(1-7) (A7, n=5) durante 15 dias. One-Way ANOVA, seguido do pós-teste de Newman-Keuls.

4.5 Atividade da Renina Plasmática (ARP)

A ARP foi mensurada por radioimunoensaio nos grupos controles SD e TGR(mRen2)27, e no 2º e 7º dias de tratamento.

A figura 19 e a tabela 7 mostram que os ratos TGR(mRen2)27 sem tratamento apresentam, como esperado, uma ARP aumentada em relação ao grupo normotenso SD. No 2º dia de tratamento, apenas os grupos PEP e PEPA7 apresentaram uma ARP reduzida em relação ao grupo não tratado mRen. Já no 7º dia de tratamento, os três grupos apresentaram redução da ARP em comparação com o controle mRen.

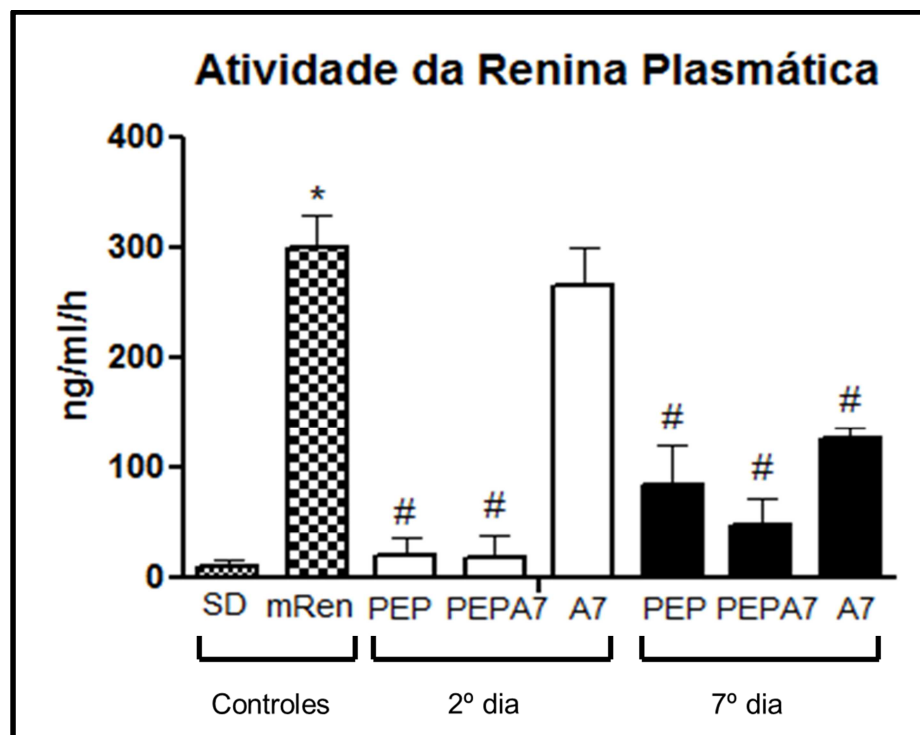


Figura 19 – Atividade da renina plasmática de ratos SD controle (SD, n=4), TGR(mRen2)27 controle (mRen, n=2), tratados durante 2 dias com pepstatina (PEP, n=3), com pepstatina+Ang-(1-7) (PEPA7, n=2) e com Ang-(1-7) (A7, n=2); e tratados durante 7 dias com pepstatina (PEP, n=3), com pepstatina+Ang-(1-7) (PEPA7, n=3) e com Ang-(1-7) (A7, n=2). * p<0,05 em relação ao grupo SD; # p<0,05 em relação ao grupo mRen (One-Way ANOVA, seguido do pós-teste de Newman-Keuls).

Tabela 7 – Valores da atividade da renina plasmática de ratos SD controle (SD, n=4), TGR(mRen2)27 controle (mRen, n=2), tratados durante 2 dias com pepstatina (PEP, n=3), com pepstatina+Ang-(1-7) (PEPA7, n=2) e com Ang-(1-7) (A7, n=2); e tratados durante 7 dias com pepstatina (PEP, n=3), com pepstatina+Ang-(1-7) (PEPA7, n=3) e com Ang-(1-7) (A7, n=2). Valores expressos como média \pm erro padrão.

Grupos	Controle	2º dia	7º dia
SD	9,8 \pm 3,1	-	-
TGR(mRen2)27	300,4 \pm 21,0 *	-	-
PEP	-	20,7 \pm 8,7 #	85,1 \pm 20,3 #
PEPA7	-	18,3 \pm 13,6 #	48,7 \pm 13,7 #
A7	-	266,3 \pm 23,3	125,8 \pm 7,3 #

* $p < 0,05$ em relação ao grupo SD; # $p < 0,05$ em relação ao grupo TGR(mRen2)27 (One-Way ANOVA, seguido do pós-teste de Newman-Keuls).

4.6 Efeito do tratamento na morfologia do Ventrículo Esquerdo (VE) e Rim

O tratamento com o inibidor de renina (grupo PEP) promoveu uma redução do peso do VE em relação ao controle, o que não ocorreu com os outros grupos de tratamento (figura 20).

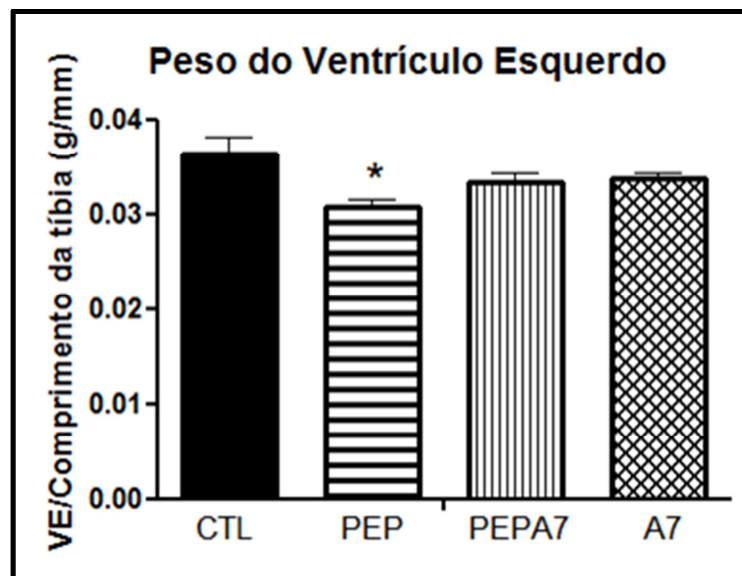


Figura 20 – Peso do ventrículo esquerdo corrigido pelo comprimento da tíbia esquerda de ratos TGR(mRen2)27 controle (CTL, n=4), tratados com pepstatina (PEP, n=8), com pepstatina+Ang-(1-7) (PEPA7, n=8) e com Ang-(1-7) (A7, n=8) durante 15 dias. * $p < 0,05$ em relação ao grupo CTL (One-Way ANOVA, seguido do pós-teste de Newman-Keuls).

Outro aspecto avaliado foi a hipertrofia dos cardiomiócitos do VE. O grupo A7 promoveu uma redução do diâmetro dessas células em comparação com todos os outros grupos avaliados (figura 21). Os grupos PEP e PEPA7 não apresentaram diferença em relação ao grupo controle, como mostrado na figura 21.

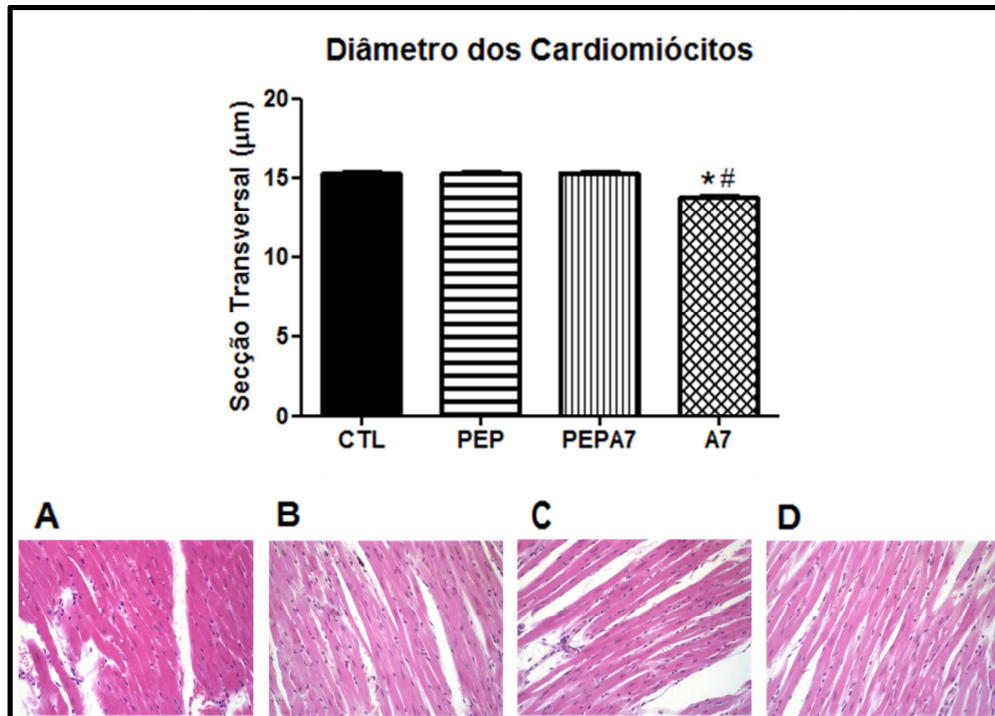


Figura 21 – Diâmetro dos cardiomiócitos do VE de ratos TGR(mRen2)27 controle (CTL, A, n=6), tratados com pepstatina (PEP, B, n=6), com pepstatina+Ang-(1-7) (PEPA7, C, n=8) e com Ang-(1-7) (A7, D, n=7) durante 15 dias. * $p < 0,05$ em relação ao grupo CTL; # $p < 0,05$ em relação aos outros grupos (One-Way ANOVA, seguido do pós-teste de Newman-Keuls).

Lesões pré-fibróticas no VE, representada pela deposição de colágeno perivascular, estão mostradas na figura 22. Ao final dos 15 dias de tratamento, os três grupos reduziram a deposição de colágeno em comparação ao grupo controle, não tratado.

A figura 23 mostra a deposição de colágeno perivascular no rim esquerdo dos animais. Não houve diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo controle no fim dos 15 dias de tratamento.

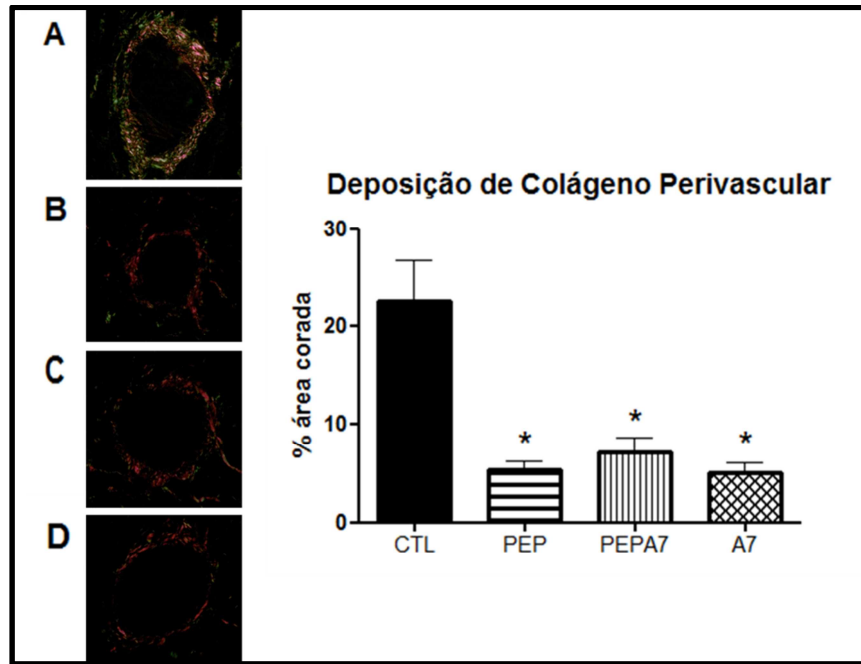


Figura 22 – Deposição de colágeno perivascular no VE de ratos TGR(mRen2)27 controle (A - CTL, n=5), tratados com pepstatina (B - PEP, n=6), com pepstatina+Ang-(1-7) (C - PEPA7, n=7) e com Ang-(1-7) (D - A7, n=9) durante 15 dias, representados como a porcentagem da área corada pelo Picrosirius red. * $p < 0,05$ em relação ao grupo CTL (One-Way ANOVA, seguido do pós teste de Newman-Keuls).

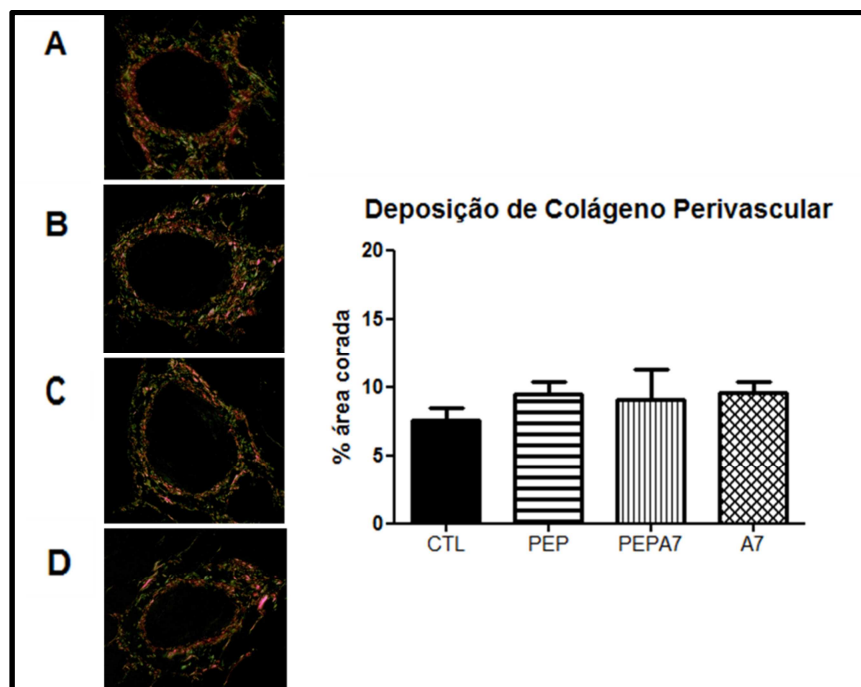


Figura 23 – Deposição de colágeno perivascular no rim esquerdo de ratos TGR(mRen2)27 controle (A - CTL, n=5), tratados com pepstatina (B - PEP, n=4), com pepstatina+Ang-(1-7) (C - PEPA7, n=4) e com Ang-(1-7) (D - A7, n=4) durante 15 dias, representados como a porcentagem da área corada pelo Picrosirius red. One-Way ANOVA, seguido do pós-teste de Newman-Keuls.

A tabela 8 apresenta os valores do peso do VE, diâmetro dos cardiomiócitos e deposição de colágeno no VE e rim.

Tabela 8 – Peso do ventrículo esquerdo (VE) (g/mm), diâmetro dos cardiomiócitos (μm) e deposição de colágeno perivascular (% colágeno na área corada) no VE e rim de ratos TGR(mRen2)27 controle (CTL), tratados com pepstatina (PEP), com pepstatina+Ang-(1-7) (PEPA7) e com Ang-(1-7) (A7) durante 15 dias. Valores expressos como média \pm erro padrão.

Grupos	Peso VE (g/mm)	Diâmetro (μm)	Deposição de colágeno - VE (%)	Deposição de colágeno – Rim (%)
CTL	0,0363 \pm 0,0017	15,27 \pm 0,09	22,5 \pm 4,2	7,5 \pm 0,9
PEP	0,0306 \pm 0,0009 *	15,29 \pm 0,08	5,3 \pm 0,9 *	9,4 \pm 0,9
PEPA7	0,0332 \pm 0,0011	15,31 \pm 0,07	7,1 \pm 1,5 *	9,0 \pm 2,2
A7	0,0336 \pm 0,0007	13,74 \pm 0,07*#	5,0 \pm 1,0 *	9,5 \pm 0,7

* $p < 0,05$ em comparação ao grupo CTL; # $p < 0,05$ em comparação com os outros grupos (One-Way ANOVA, seguido de pós-teste de Newman-Keuls).

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Nesse estudo mostramos que o tratamento com pepstatina ou Ang-(1-7), isoladamente ou em associação produziram a queda similar da PA, que não se manteve durante o período de tratamento, retornando aos valores basais; a alteração da PA é acompanhada por redução da FC durante o período da noite; redução da deposição de colágeno perivascular no VE e ausência de efeito aditivo entre os tratamentos. Além disso, mostramos redução da razão simpático/parassimpático nos grupos PEP e PEPA7 e a inibição da ARP pelo grupo A7 no 7º dia, além dos grupos tratados com pepstatina.

Como mostrado nos resultados de padronização das doses, utilizamos a dose de 30µg/Kg/dia de Ang-(1-7) incluída em HPβCD por apresentar um efeito agudo na PA mais pronunciado do que a dose de 100µg/Kg/dia. Apesar da dose utilizada ter-se baseado em administração aguda, outros trabalhos envolvendo o tratamento crônico com a Ang-(1-7) (SANTOS, 2008 a; BERTAGNOLLI, 2013) mostraram que a dose de 30µg produz efeito hipotensor significativo, melhora da função cardíaca em corações infartados (MARQUES, 2011), diminuição do tônus simpático cardíaco e melhora do tônus parassimpático cardíaco em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (BERTAGNOLLI, 2013). Além disso, estudo anterior do nosso laboratório mostrou que a dose de 30µg/Kg de Ang-(1-7) induziu efeito anti-trombótico (FRAGA-SILVA, 2011).

A pepstatina A é um peptídeo sintético que não é muito utilizado em estudos *in vivo*. Por isso, pela falta de dados na literatura sobre a melhor dose a ser utilizada, foi realizado experimento prévio para verificar o efeito agudo de doses crescentes no mesmo modelo animal em que seria realizado o tratamento. Como mostrado na figura 13, não houve diferença estatística entre as doses de 5; 10; 20 e 40µg/Kg testadas na PAM ou FC. Por isso, optamos por utilizar a menor dose, 5µg/Kg, já que uma dose menor reduz as chances de reações adversas no organismo. Por outro lado, como a pepstatina não é específica para a renina e atua sobre outras

proteases (MARCINISZYN *et al.*; 1976), o uso de uma dose menor reduz a possibilidade do efeito estar relacionado à inibição de outras proteases, ou ainda, efeitos indesejados induzidos pela inibição dessas enzimas. Além disso, como a renina está presente em grande quantidade, aumenta a chance da sua inibição pela pepstatina.

O tratamento com o inibidor de renina ou com a Ang-(1-7) isoladamente ou com a associação de ambos ocasionou uma queda na PA, tanto média quanto sistólica e diastólica, que foi gradativamente retornando ao valor basal, de forma que no 15º dia os valores já estavam similares àqueles observados antes do tratamento. A maior queda foi observada no 2º dia de tratamento no período diurno e no 1º dia de tratamento no período noturno. A ausência de diferença entre os grupos mostra que não há efeito aditivo ou sinérgico entre os tratamentos, ou seja, que a associação entre o inibidor de renina e a Ang-(1-7) não promove um efeito mais pronunciado que os dois tratamentos isolados. Estranhamente, o efeito hipotensor produzido pelos três tratamentos não se manteve ao longo do período de tratamento, sugerindo que outros mecanismos ou vias estejam compensando a queda da PA. Se esse fato está relacionado apenas a animais transgênicos com excesso de renina [TGR(mRen2)27] ou a outros modelos de hipertensão arterial, ainda precisam ser investigados. Outra possibilidade seria que o efeito hipotensor observado estivesse relacionado à administração do veículo HPβCD. No entanto, estudos anteriores mostraram que esse veículo não ocasiona efeito na PA ou FC (SANTOS, 2008 a).

Quanto à FC durante o dia, os três grupos elevaram a frequência no 1º dia de tratamento, retornando ao valor basal nos próximos dias. Esse breve aumento da FC pode estar relacionado, provavelmente, ao efeito do estresse da cirurgia para implantação da bomba osmótica que continha a pepstatina, uma vez que ocorreu apenas no 1º dia de tratamento. Durante a noite, a FC foi reduzida do 2º ao 15º dia de tratamento nos três grupos. Embora não tenha ocorrido diferença entre os tratamentos, é interessante observar que a alteração de FC ocorreu no período de vigília do animal e que a PA tenha se normalizado independentemente da queda da FC.

É interessante notar que durante a noite, ou seja, no período de vigília, há uma predominância do tônus simpático e redução do tônus parassimpático, que é mais pronunciado no período de sono. Os tratamentos podem ter promovido a redução do tônus simpático ou aumentado o tônus parassimpático durante a noite, reduzindo conseqüentemente a FC durante a maior parte do tratamento. Corroborando com essa hipótese, verificamos que o grupo PEP reduziu o tônus simpático para o coração (figura 17A) e o grupo PEPA7 aumentou o tônus parassimpático (figura 17B), reduzindo então a relação simpático/parassimpático desses grupos.

Dados mostram que na hipertensão humana primária, o sistema nervoso simpático (SNS) está ativado no coração, rins e musculatura vascular, principalmente em pacientes jovens (ESLER, 2000). O aumento do SNS cardíaco possui um efeito pró-arrítmico e trófico, talvez contribuindo para a hipertrofia ventricular esquerda (MANN *et al.*, 1992). A redução da quantidade de colágeno perivascular (figura 22) e a redução do peso do ventrículo esquerdo (figura 20) estão provavelmente relacionadas com a redução do tônus simpático cardíaco no grupo PEP.

Dados na literatura mostram que esse modelo de rato hipertenso apresenta ciclo circadiano invertido para a PA, sendo mais alta durante o período de sono e mais baixa durante o período de vigília. A explicação para essa inversão ainda não está definida, mas o que os autores acreditam é que seja devido ao aumento da atividade simpática (LEMMER, 2005; SCHIFFER, 2001; LEMMER, 2000; LEMMER, 1993). Os tratamentos não normalizaram essa inversão, pois talvez 15 dias não tenha sido suficiente para reverter essa alteração.

O aumento do tônus parassimpático promovido pelo tratamento com a combinação (grupo PEPA7) deve-se provavelmente ao efeito da Ang-(1-7). Alguns trabalhos na literatura mostram que a Ang-(1-7) melhora o tônus parassimpático (BERTAGNOLLI *et al.*, 2014; GARCIA-ESPINOSA *et al.*, 2012), inclusive quando administrada por via oral (BERTAGNOLLI *et al.*, 2014), o que poderia explicar esse aumento. Estranhamente, o grupo A7, no entanto, apresentou um pequeno aumento no tônus

parassimpático e redução da relação simpático/parassimpático, que não foi estatisticamente significativa.

Para testar se o tônus simpático não estaria aumentado na periferia dos animais tratados em comparação com o grupo controle, levando a um efeito vasoconstritor crônico, um bloqueador ganglionar foi infundido nos animais. O hexametônio aboliu a atividade do SNS pós-ganglionar, resultando em vasodilatação aguda dos vasos sanguíneos, redução na resistência vascular sistêmica e queda da PA (SEALS & DINENNO, 2004). Uma maior queda na PA representaria uma maior influência do SNS, o que não ocorreu, mostrando que todos os grupos possuem a mesma influência que o controle (figura 18).

O RIE mostrou que o tratamento com a pepstatina foi eficaz na inibição da renina. Os grupos PEP e PEPA7 apresentaram ARP reduzida em relação ao grupo mRen no 2º e no 7º dia de tratamento. O grupo A7 não apresentou alteração da ARP no 2º dia em comparação com o mRen sem tratamento. No entanto, interessante o tratamento com Ang-(1-7) isolado induziu redução da ARP no 7º dia de tratamento, em comparação com o mRen. Esse efeito pode estar relacionado à ação da Ang-(1-7) sobre o mecanismo de liberação de renina.

A renina é sintetizada, armazenada e secretada nas células Justaglomerulares (JG), localizadas na arteríola aferente renal. Na maioria das células secretórias, a secreção é estimulada pelo aumento da concentração de cálcio ($[Ca^{2+}]$) intracelular. Nas células JG ocorre o contrário: qualquer fator que reduza a $[Ca^{2+}]$ intracelular, estimulará a atividade de adenilil ciclases, aumentando a síntese do monofostato de adenosina cíclico (AMPc) e estimulando a fusão dos grânulos contendo renina na membrana plasmática (BERNE & LEVY, 2009; ATCHISON & BEIERWALTES, 2013; ORTIZ-CAPISANO *et al.*, 2013).

De forma contrária, qualquer fator que aumente a $[Ca^{2+}]$ extracelular estimulará os receptores acoplados à proteína G que são sensíveis ao cálcio (CaSR), localizados na membrana dessas células. A ativação desses receptores provocará a estimulação da fosfolipase C (PLC), gerando o trifosfato de inositol (IP_3). O IP_3 irá se ligar ao seu receptor localizado na parede do retículo endoplasmático abrindo os canais de cálcio e liberando o estoque intracelular desse íon, resposta que pode ser potencializada pelo receptor de rianodina, que aumenta a liberação de cálcio. Essa elevação na $[Ca^{2+}]$ intracelular reduzirá a atividade da adenilil ciclase (AC), diminuindo a síntese e aumentando a degradação do AMPc, diminuindo a secreção de renina (BERNE & LEVY, 2009; ATCHISON & BEIERWALTES, 2013; ORTIZ-CAPISANO *et al.*, 2013). A figura 24 mostra um esquema desse mecanismo.

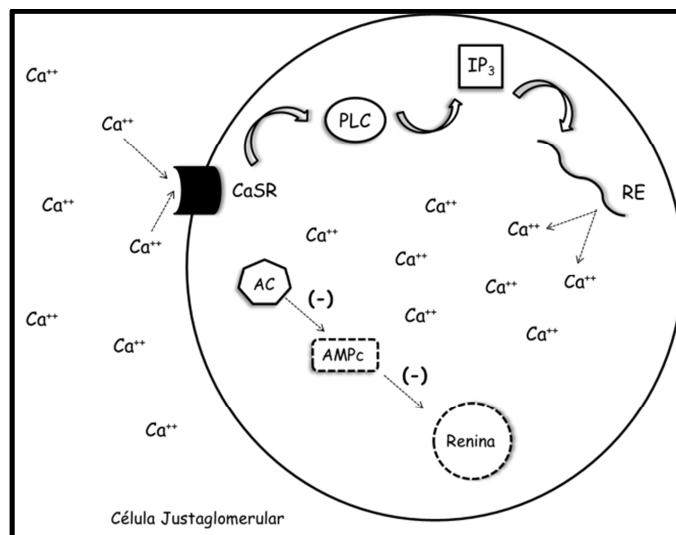


Figura 24 – Mecanismo da liberação de renina promovido pelo aumento da concentração de cálcio extracelular. CaSR: receptor sensível ao cálcio; PLC: fosfolipase C; IP_3 : trifosfato de inositol; RE: retículo endoplasmático; AC: adenilil ciclase; AMPc: monofosfato de adenosina cíclico. *Modificado de ATCHISON & BEIERWALTES, 2013.*

Em 2012, Liu e colaboradores mostraram que em células tubulares renais caninas MDCK (Madin-Darby Canine Kidney), que são modelo de pesquisa renal, a Ang-(1-7) promove aumento da concentração de cálcio intracelular, por aumentar a entrada do Ca^{2+} extracelular nessas células e por estimular a liberação desse íon do retículo endoplasmático (principal estoque de Ca^{2+} das células MDCK), através da ativação da fosfolipase C.

Dessa forma, podemos sugerir que nas células JG, a Ang-(1-7) esteja promovendo o mesmo efeito. Como o aumento da $[Ca^{2+}]$ intracelular das células JG resulta na inibição da liberação da renina, a Ang-(1-7) poderia estar provocando esse aumento e inibindo a liberação dessa enzima. Além disso, ela pode estar atuando em outras células responsáveis pela liberação de renina nesse modelo animal e ainda poderia atuar na transcrição do transgene. Isso explicaria o resultado encontrado no RIE, onde os animais tratados somente com Ang-(1-7) apresentaram redução da atividade da renina. Além disso, a inibição da ARP pela Ang-(1-7) pode explicar a ausência de efeito sinérgico dos tratamentos sobre a PA. No entanto, experimentos adicionais serão necessários para elucidar esse mecanismo.

Mesmo tendo a PA retornado aos valores basais ao final do tratamento, foi investigado o efeito dos tratamentos sobre o ventrículo esquerdo e o rim dos animais. Para um tratamento mais eficaz da hipertensão, é necessário tanto o controle da PA quanto a redução dos danos aos órgãos-alvo. Tecidos como cérebro, vasos sanguíneos, olhos, rins e coração são sensíveis ao aumento da pressão (HEGGERMONT & HEYMANS, 2012; SCHMIEDER, 2010).

Ressalta-se que apenas os animais que foram tratados somente com Ang-(1-7) (grupo A7) apresentaram redução do diâmetro dos cardiomiócitos do VE comparado ao grupo sem tratamento, sugerindo que esse efeito seja independente de alteração da carga pressórica. A Ang-(1-7) é conhecida por seus efeitos cardioprotetores, tais como redução da hipertrofia ocasionada pela Ang II (GROBE *et al.*, 2007; SANTOS & FERREIRA, 2007) ou pelo isoproterenol (MARQUES *et al.*, 2011), redução de arritmias (SANTOS & FERREIRA, 2007), estimulação da atividade da óxido nítrico sintase (COSTA *et al.*, 2010) e redução da fibrose cardíaca (WANG *et al.*, 2012; PASSOS-SILVA *et al.*, 2013).

Um fato intrigante é que os animais tratados somente com a Ang-(1-7) apresentaram redução do diâmetro, porém os animais tratados com a combinação (que continha a mesma dose desse peptídeo na mesma via de administração) não apresentaram a

mesma resposta. Os resultados apontam uma possível interação entre esses compostos, anulando, de alguma forma, o efeito da Ang-(1-7) na presença da pepstatina quanto ao diâmetro dessas células. De qualquer forma, mais experimentos são necessários para esclarecer essa interação.

Em relação à fibrose cardíaca, os três grupos de tratamento reduziram significativamente a deposição de colágeno perivascular no VE, comparado com o grupo controle. Interessantemente, essa resposta foi alcançada independente de uma redução mais prolongada na PA, já que a avaliação morfológica foi realizada com 15 dias de tratamento, período em que a PA já tinha retornado aos níveis basais. Trabalhos mostram uma dissociação da redução da PA e a melhora nos órgãos-alvo, ou seja, em que há uma melhora de parâmetros cardiovasculares e/ou renais independente de um efeito na PA (ROTHERMUND *et al.*, 2003; WAGNER *et al.*, 1997; MELLO *et al.*, 2012).

Nossos dados estão de acordo com estudo de Mello e colaboradores (2012), que trataram durante oito semanas ratos da linhagem TGR(mRen2)27 com o inibidor de renina Alisquireno, com uma dose que não alterou a PA. No entanto, houve uma redução da fibrose perivascular no VE desses animais (MELLO *et al.*, 2012), semelhante ao que foi encontrado em nosso estudo.

Ratos TGR(mRen2)27 apresentam elevados níveis de Ang II, levando não somente à hipertensão, mas também ao estresse oxidativo, inflamação, hipertrofia e fibrose cardíacas (XU *et al.*, 2010). O estiramento mecânico por si só já é capaz de aumentar a expressão dos genes do angiotensinogênio, renina e ECA nos cardiomiócitos, aumentando a produção cardíaca (local) de Ang II (MALHOTRA *et al.*, 1999). É possível que os três tratamentos tenham reduzido a fibrose perivascular por um efeito local no coração. Assim, os tratamentos poderiam inibir o SRA tecidual no coração, diminuindo os níveis de Ang II e assim reduzindo a deposição de colágeno. Evidências dessa hipótese são encontradas no trabalho de Mello e colaboradores (2012), onde o tratamento com o inibidor de renina também reduziu

os níveis de Ang II no ventrículo esquerdo, sem, no entanto, reduzir os níveis plasmáticos desse peptídeo. Mendes *et al.* (2005) também mostraram que o tratamento com Ang-(1-7) reduz os níveis de Ang II no coração.

Apesar da grande redução do colágeno perivascular do ventrículo esquerdo e redução da hipertrofia pela Ang-(1-7), essa redução não refletiu na diminuição do peso do VE nos grupos PEPA7 e A7. Uma hipótese para tal fato é que o colágeno intersticial, que não foi avaliado, não tenha sido reduzido, fazendo com que o peso do VE também não diminuísse.

Os tratamentos não alteraram a deposição de colágeno perivascular no rim dos animais. É possível que o tempo de tratamento (15 dias) não tenha sido suficiente para reverter essas alterações.

Estudos futuros serão necessários para investigar o efeito dos tratamentos sobre os níveis plasmáticos de outros peptídeos, esclarecer a influência dos tratamentos na inervação simpática e elucidar o mecanismo de atuação da Ang-(1-7) sobre a inibição da renina.

SUMÁRIO E CONCLUSÕES

6 SUMÁRIO E CONCLUSÕES

- A dose de 30µg/Kg de Angiotensina-(1-7)/HPβCD apresentou maior efeito hipotensor e foi utilizada no tratamento;
- A dose de 5µg/Kg da Pepstatina A apresentou resposta similar a doses maiores e por isso foi utilizada no tratamento;
- Os três tratamentos reduziram a PAM, PAS e PAD durante o dia e a noite, que foi retornando ao valor basal antes do fim do tratamento;
- Os tratamentos reduziram a FC durante a noite do 2^o ao 15^o dia de tratamento;
- Não houve efeito aditivo entre os tratamentos;
- O grupo PEP apresentou redução do tônus cardíaco simpático, enquanto o grupo PEPA7 apresentou melhora do tônus cardíaco parassimpático, ambos reduzindo o índice simpático/parassimpático cardíaco;
- Não houve diferença entre os grupos tratados e o controle quanto ao tônus autonômico periférico;
- O grupo tratado somente com a Ang-(1-7) também apresentou redução da atividade da renina plasmática;
- Somente o grupo PEP apresentou redução do peso do ventrículo esquerdo;
- Somente o grupo A7 apresentou redução do diâmetro dos cardiomiócitos;
- Os três tratamentos apresentaram redução da deposição de colágeno perivascular no ventrículo esquerdo, comparado ao controle;
- Não houve alteração na deposição de colágeno perivascular no rim dos animais tratados, comparado com o controle.

Podemos concluir que não houve efeito aditivo/sinérgico dos tratamentos, provavelmente pela inibição da liberação e/ou síntese de renina pelo grupo que recebeu só Ang-(1-7). Além disso, os tratamentos não mantiveram a PA reduzida por todo o período de 15 dias, provavelmente por um efeito compensatório dos animais, que ainda necessita ser esclarecido. Mesmo assim, os três tratamentos reduziram a deposição de colágeno perivascular no ventrículo esquerdo dos animais, no período em que a PA já tinha retornado ao valor basal. Esses dados também sugerem que tanto a Ang-(1-7) quanto a pepstatina produzem efeitos benéficos no coração, que pareceu independente da redução da PA. Foi obtida também evidência de que os efeitos cardiovasculares da Ang-(1-7) podem estar relacionados à redução da síntese e liberação de renina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, J. P.; NOBRE, F. Sociedade Brasileira de Cardiologia/Sociedade Brasileira de Hipertensão/Sociedade Brasileira de Nefrologia. *VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão*. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, 95(1): 1-51, 2010.

ATCHISON, D. K.; BEIERWALTES, W. H. *The influence of extracellular and intracellular calcium on the secretion of renin*. Pflugers Arch – European Journal of Physiology, 465(1): 59-69, 2013.

BADER, M.; ZHAO, Y.; SANDER, M.; LEE, M. A.; BACHMANN, J.; BOHM, M.; DJAVIDANI, B.; PETERS, J.; MULLINS, J. J.; GANTEN, D. *Role of tissue renin in the pathophysiology of hypertension in TGR(mREN2)27 rats*. Hypertension, 19(6): 681-685, 1992.

BERNE, R. M.; LEVY, M. N. *Fisiologia*. Tradução da 6ª edição. Tradução: Adriana Pitella Sudré. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

BERTAGNOLLI, M.; CASALI, K. R.; SOUSA, F. B.; RIGATTO, K.; BECKER, L.; SANTOS, S. H.; DIAS, L. D.; PINTO, G.; DARTORA, D. R.; SCHAAN, D. R.; MILAN, R. D.; IRIGOYEN, M. C.; SANTOS, R. A. *An orally active angiotensin-(1-7) inclusion compound and exercise training produce similar cardiovascular effects in spontaneously hypertensive rats*. Peptides, 51: 65-73, 2013.

BOTELHO, L. M. O.; BLOCK, C. H.; KHOSLA, M. C.; SANTOS, R. A. S. *Plasma Angiotensin(1-7) immunoreactivity is increased by salt load, water deprivation, and hemorrhage*. Peptides, 15(4): 723-729, 1994.

BUUSE, M. V. D. *Circadian rhythms of blood pressure, heart rate and locomotor activity in spontaneously hypertensive rats as measured with radio-telemetry*. Physiology & Behavior, 55(4): 783-787, 1994.

CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; DIZ, D.; SANTOS, R. A.; KHOSLA, M. C.; BROSNIHAN, K. B.; FERRARIO, C. M. *Cardiovascular effects of angiotensin-(1-7) injected into the dorsal medulla of rats*. American Journal Physiology – Heart and Circulatory Physiology, 257: 324-329, 1989.

CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; HERINGER, S. B.; BATISTA, E. N.; KHOSLA, M. C.; SANTOS, R. A. *Differential baroreceptor reflex modulation by centrally infused angiotensin peptides*. American Journal Physiology, 263: 89-94, 1992.

CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; HAIBARA, A. S. *Reflexos cardiovasculares e hipertensão arterial*. Revista Brasileira de Hipertensão, Belo Horizonte, 8(1): 30-40, 2001.

COSTA, M. A.; LOPEZ, V. M. A.; GOMEZ, K. A.; NAKAGAWA, P.; PEÑA, C.; ARRANZ, C.; GIRONACCI, M. M. *Angiotensin-(1-7) upregulates cardiac nitric oxide*

synthase in spontaneously hypertensive rats. American Journal Physiology – Heart and Circulatory Physiology, 299(4): 1205-1211, 2010.

CUNHA-FILHO, M. S. S.; SÁ-BARRETO, L. C. L. *Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico*. Revista de Ciência Farmacêutica Básica Aplicada, 28(1): 1-9, 2007.

DILAURO, M.; BURNS, K. D. *Angiotensin-(1-7) and its effects in the kidney*. The Scientific World Journal, 9: 522-535, 2009.

DUCHÊNE, D., PONCHEL, G., WOUESSIDJEW, D. *Cyclodextrins in targeting application to nanoparticles*. Advanced Drug Delivery Reviews, 36: 29-40, 1999.
DONOGUE, M.; HSIEH, F.; BARONAS, E.; GODBOUT, K.; GOSSELIN, M.; STAGLIANO, N.; DONOVAN, M.; WOOLF, B.; ROBISON, K.; JEYASEELAN, R.; BREITBART, R. E.; ACTON, S. *A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9*. Circulation Research, 87: 1-9, 2000.

ESLER, M. *The sympathetic system and hypertension*. American Journal of Hypertension. 13: 995-1055, 2000.

EVIN, G.; SHARPLES, R. A.; WEIDERMANN, A.; REINHARD, F. B. M.; CARBONE, V.; CULVENOR, J. G.; HOLSINGER, R. M. D.; SERNEE, M. F.; BEYREUTHER, K.; MASTERS, C. L. *Aspartyl protease inhibitor pepstatin binds to the Presenilins of Alzheimer's disease*. Biochemistry, 40: 8359-8368, 2001.

FELTENBERGER, J. D.; ANDRADE, J. M.; PARAÍSO, A.; BARROS, L. O.; FILHO, A. B.; SINISTERRA, R. D.; SOUZA, F. B.; GUIMARÃES, A. L.; PAULA, A. M.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; QURESHI, M.; SANTOS, R. A. S.; SANTOS, S. H. *Oral formulation of angiotensin-(1-7) improves lipid metabolism and prevents high-fat diet-induced hepatic steatosis and inflammation in mice*. Hypertension, 62(2): 324-330, 2013.

FERRARIO, C. M.; CHAPPELL, M.; DEAN, R. H.; IYER, S. N. *Novel angiotensin peptides regulate blood pressure, endothelial function, and natriuresis*. Journal of the American Society of Nephrology, 09: 1716-1722, 1998.

FERREIRA, A. J.; OLIVEIRA, T. L.; CASTRO, M. C. M.; ALMEIDA, A. P.; CASTRO, C. H.; CALIARI, M. V.; GAVA, E.; KITTEN, G. T.; SANTOS, R. A. S. *Isoproterenol-induced impairment of heart function and remodeling are attenuated by the nonpeptide angiotensin-(1-7) analogue AVE 0991*. Life Sciences, 81: 916-923, 2007.

FRAGA-SILVA, R. A.; COSTA-FRAGA, F. P.; SOUSA, F. B.; ALENINA, N.; BADER, M.; SINISTERRA, R. D.; SANTOS, R. A. S. *An orally active formulation of angiotensin-(1-7) produces an antithrombotic effect*. Clinics, 66(5): 837-841, 2011.

FRAGA-SILVA, R. A.; COSTA-FRAGA, F. P.; SAVERGNINI, S. Q.; SOUZA, F. B.; MONTECUCCO, F.; SILVA, D.; SINISTERRA, R. D.; MACH, F.; STERGIOPULOS, N.; SILVA, R. F.; SANTOS, R. A. S. *An oral formulation of angiotensin-(1-7) reverses*

corpus cavernosum damages induced by hypercholesterolemia. Journal of Sexual Medicine, 10(10): 2430-2442, 2013.

FRIEDRICH, S.; SCHMIEDER, R. E. *Review of direct renin inhibitor by aliskiren.* Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System, 14(3): 193-196, 2013.

GARCIA-ESPINOSA, M. A.; SHALTOUT, H. A.; GALLAGHER, P. E.; CHAPPEL, M. C.; DIZ, D. I. *In vivo expression of angiotensin-(1-7) lowers blood pressure and improves baroreflex function in transgenic (mRen2)27 rats.* Journal of Cardiovascular Pharmacology, 60(2): 150-157, 2012.

GEBRU, Y.; DIAO, T. Y.; PAN, H.; MUKWAYA, E.; ZHANG, Y. *Potential of RAS inhibition to improve metabolic bone disorders.* BioMed Research International, 1-6, 2013.

GROBE, J. L.; MECCA, A. P.; LINGIS, M.; SHENOY, V.; BOLTON, T. A.; MACHADO, J. M.; SPETH, R. C.; RAIZADA, M. K.; KATOVICH, M. J. *Prevention of angiotensin II-induced cardiac remodeling by angiotensin-(1-7).* American Journal Physiology – Heart and Circulatory Physiology, 292: 736-742, 2007.

GROSS, F.; LAZAR, J.; ORTH, H. *Inhibition of the renin-angiotensinogen reaction by pepstatin.* Science, 175, 1971.

GUIMARAES, P. S.; OLIVEIRA, M. F.; BRAGA, J. F.; NADU, A. P.; SCHREIHOFER, A.; SANTOS, R. A.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. *Increasing angiotensin-(1-7) levels in the brain attenuates metabolic syndrome-related risks in fructose-fed rats.* Hypertension, 0: 00-00, 2014.

GUIOL, C.; LEDOUSSAL, C.; SURGE, J. M. *A radiotelemetry system for chronic measurement of blood pressure and heart rate in the unrestrained rat validation of the method.* Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 28: 99-105, 1992.

HEGGERMONT, W. A.; HEYMANS, S. *MicroRNAs are involved in end-organ damage during hypertension.* Hypertension, 60: 1088-1093, 2012.

HELM, K. V. D.; GIIRTLE, L.; EBERLE, J.; DEINHARDT, F. *Inhibition of HIV replication in cell culture by the specific aspartic protease inhibitor pepstatin A.* FEBS Letters, 247(2): 349-352, 1989.

HUA, L. P. T.; BROWN, C. A.; HAINS, S. J. M.; GODWIN, M.; PARLOW, J. L. *Effects of low-intensity exercise conditioning on blood pressure, heart rate, and autonomic modulation of heart rate in men and women with hypertension.* Biological Research, Kingston, 11(2): 129-143, 2009.

ISRAILI, Z. H.; VELASCO, M.; EDIN, F. R. C. P.; BERMÚDEZ, V. *Direct renin inhibitors as antihypertensive agents.* American Journal of Therapeutics, 17: 237–254, 2010.

JUNAID, M. A.; WU, G.; PULLARKAT, R. K. *Purification and characterization of bovine brain lysosomal pepstatin-insensitive proteinase, the gene product deficient in the human late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis*. *Journal of Neurochemistry*, 74: 287-294, 2000.

KANGUSSU, L. M.; ALMEIDA-SANTOS, A. F.; BADER, M.; ALENINA, N.; FONTES, M. A. P.; SANTOS, R. A. S.; AGUIAR, D. C.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. *Angiotensin-(1-7) attenuates the anxiety and depression-like behaviors in transgenic rats with low brain angiotensinogen*. *Behavioural Brain Research*, 257: 25– 30, 2013.

KEIDAR, S.; KAPLAN, M.; GAMLIEL-LAZAROVICH, A. *ACE2 of the heart: From angiotensin I to angiotensin (1–7)*. *Cardiovascular Research*, 73: 463-469, 2007.

KUSUNOKI, H.; TANIYAMA, Y.; RAKUGI, H.; MORISHITA, R. *Cardiac and renal protective effects of Irbesartan via peroxisome proliferator-activated receptor γ -hepatocyte growth factor pathway independent of angiotensin II type 1a receptor blockade in mouse model of salt-sensitive hypertension*. *Journal of the American Heart Association*, 2: 1-12, 2013.

LANGHEINRICH, M.; LEE, M. A.; BOHM, M.; PINTO, Y. M.; GANTEN, D.; PAUL, M. *The hypertensive Ren-2 transgenic rat TGR (mREN2)27 in hypertension research*. *American Journal of Hypertension*, 9(5): 506-512, 1996.

LEE, M. A.; BOHM, M.; BADER, M.; GANTEN, U.; GANTEN, D. *Physiological characterization of the hypertensive transgenic rat TGR(mREN2)27*. *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism*, 270: 919-929, 1996.

LEMMER, B.; MATTES, A.; BOHM, M.; GANTEN, D. *Circadian blood pressure variation in transgenic hypertensive rats*. *Hypertension*, 22: 97-101, 1993.

LEMMER, B.; WITTE, K.; SCHANZER, A.; FINDEISEN, A. *Circadian rhythms in the renin-angiotensin-system and adrenal steroids may contribute to the reverse blood pressure rhythm in hypertensive TGR(mRen-2)27 rats*. *Chronobiology International*, 17(5): 645-658, 2000.

LEMMER, B.; SCHIFFER, S.; WITTE, K.; GORBIEY, S. *Inverse blood pressure rhythm of transgenic Hypertensive TGR(mRen2)27 rats: role of norepinephrine and expression of tyrosine-hydroxylase and reuptake1-transporter*. *Chronobiology International*, 22(3): 473-488, 2005.

LIU, C. P.; CHOU, C. T.; CHI, C. C.; LIN, K. L.; CHENG, H. H.; LU, Y. C.; CHENG, J. S.; KUO, C. C.; LIANG, W. Z.; HUANG, F.; JAN, C. R. *Mechanism of $[Ca^{2+}]_i$ rise induced by angiotensin 1–7 in MDCK renal tubular cells*. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 32(6): 335-341, 2012.

LIZAKOWSKI, S.; TYLICKI, L.; RUTKOWSKI, B. *Direct renin inhibition – a promising strategy for renal protection?* *Medical Science Monitor*, 19: 451-457, 2013.

LOH, Y. P. *The effect of pepstatin A, an inhibitor of the pro-opiomelanocortin (POMC)-converting enzyme, on POMC processing in mouse intermediate pituitary.* FEBS Letters, 238(1): 142-146, 1988.

MALHOTRA, R.; SADOSHIMA, J.; BROSIUS III, F. C.; IZUMO, S. *Mechanical stretch and angiotensin II differentially upregulate the renin-angiotensin system in cardiac myocytes in vitro.* Circulation Research, 85: 137-146, 1999.

MANN, D. L.; KENT, R. L.; PARSONS B.; COOPER, G. *Adrenergic effects on the biology of the adult mammalian cardiocyte.* Circulation, 85: 790-804, 1992.

MARCINISZYN, J.; HARTSUCK, J. A.; TANG, J. *Mode of inhibition of acid proteases by pepstatin.* The Journal of Biological Chemistry, 251(22): 7088-7094, 1976.

MARQUES, F. D.; FERREIRA, A. J.; SINISTERRA, R. D. M.; JACOBY, B. A.; SOUSA, F. D.; CALIARI, M. V.; SILVA, G. A. B.; MELO, M. B.; NADU, A. P.; SOUZA, L. E.; IRIGOYEN, M. C. C.; ALMEIDA, A. P.; SANTOS, R. A. S. *An oral formulation of angiotensin-(1-7) produces cardioprotective effects in infarcted and isoproterenol-treated rats.* Hypertension, 57: 00-00, 2011.

MARQUES, F. D.; MELO, M. B.; SOUZA, L. E.; IRIGOYEN, M. C. C.; SINISTERRA, R. D.; SOUSA, F. B.; SAVERGNINI, S. Q.; BRAGA, V. B. A.; FERREIRA, A. J.; SANTOS, R. A. S. *Beneficial effects of long-term administration of an oral formulation of angiotensin-(1-7) in infarcted rats.* International Journal of Hypertension, 1-12, 2012.

McARDLE, W. D; KATCH, F. I; KATCH, V. L. *Fisiologia do exercício: energia, nutrição e desempenho.* 4ª edição. São Paulo: Guanabara Koogan, 1998.

MELLO, W.; RIVERA, M.; RABELL, A.; GERENA, Y. *Aliskiren, at low doses, reduces the electrical remodeling in the heart of the TGR(mRen2)27 rat independently of blood pressure.* Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System, 14(1): 23-33, 2012.

MENDES, A. C.; FERREIRA, A. J.; PINHEIRO, S. V.; SANTOS, R. A. S. *Chronic infusion of angiotensin-(1-7) reduces heart angiotensin II levels in rats.* Regulatory Peptides, 125(1-3): 29-34, 2005.

MERCURE, C.; YOGI, A.; CALLERA, G. E.; ARANHA, A. B.; BADER, M.; FERREIRA, A. J.; SANTOS, R. A. S.; WALTHER, T.; TOUYZ, R. M.; REUDELHUBER, T. L. *Angiotensin(1-7) blunts hypertensive cardiac remodeling by a direct effect on the heart.* Circulation Research, 103: 1319-1326, 2008.

MULLINS, J. J.; PETERS, J.; GANTEN, D. *Fulminant hypertension in transgenic rats harbouring the mouse REN-2 gene.* Nature, 344: 541-544, 1990.

NOBRE, F.; COELHO, E. B.; LOPES, C. L.; GELEILETE, T. J. M. *Hipertensão arterial sistêmica primária.* Medicina (Ribeirão Preto), 46(3): 256-272, 2013.

OCARANZA, M. P.; LAVANDERO, S.; JALIL, J. E.; MOYA, J.; PINTO, M.; NOVOA, U.; APABLAZA, F.; GONZALEZ, L.; HERNANDEZ, C.; VARAS, M.; LOPEZ, R.;

GODOY, I.; VERDEJO, H.; CHIONG, M. *Angiotensin-(1–9) regulates cardiac hypertrophy in vivo and in vitro*. *Journal of Hypertension*, 28: 1054–1064, 2010.

OIGMAN, W.; FRITISH, M. T. *Drogas que intervêm no sistema renina-angiotensina*. *HiperAtivo*, 5(2): 84-90, 1998.

OLIVEIRA, R.; SANTOS, D.; COELHO, P. *Ciclodextrinas: formação de complexos e sua aplicação farmacêutica*. *Revista da Faculdade de Ciências da Saúde*, 6: 70-83, 2009.

OPARIL, S.; YAROW, S. A.; PATEL, S.; FANG, H.; ZHANG, J.; SATLIN, J. *Efficacy and safety of combined use of aliskiren and valsartan in patients with hypertension: a randomised, double-blind trial*. *Lancet*, 370: 221-29, 2007.

ORTIZ-CAPISANO, C. C.; REDDY, M.; MENDEZ, M.; GARVIN, J. L.; BEIERWALTES, W. H. *Juxtaglomerular cell CaSR stimulation decreases renin release via activation of the PLC/IP3 pathway and the ryanodine receptor*. *American Journal Physiology – Renal Physiology*, 304: 248-256, 2013.

PASSOS-SILVA, D. G.; VERANO-BRAGA, T.; SANTOS, R. A.; S. *Angiotensin-(1–7): beyond the cardio-renal actions*. *Clinical Science*, 124: 443-456, 2013.

PETERS, J.; MUNTER, K.; BADER, M.; HACKENTHAL, E.; MULLINS, J. J.; GANTEN, D. *Increased adrenal renin in transgenic hypertensive rats, TGR(mREN2)27, and its regulation by cAMP, angiotensin II and calcium*. *Journal of Clinical Investigation*, 91: 742-747, 1993.

PINHEIRO, S. V.; FERREIRA, A. J.; KITTEN, G. T.; SILVEIRA, K. D.; SILVA, D. A.; SANTOS, S. H.; GAVA, E.; CASTRO, C. H.; MGALHAES, J. A.; MOTA, R. K.; BOTELHO-SANTOS, G. A.; BADER, M.; ALENINA, N.; SANTOS, R. A. S.; SIMOES E SILVA, A. C. *Genetic deletion of the angiotensin-(1-7) receptor Mas leads to glomerular hyperfiltration and microalbuminuria*. *Kidney International*, 75: 1184–1193, 2009.

RIBEIRO, A. B. *Hipertensão arterial como síndrome - o novo desafio da terapia antihipertensiva*. *Revista Associação Médica Brasil*, São Paulo, 43(3): 179. 1997.

ROTHERMUND, L.; KOSSMEHL, P.; NEUMAYER, H. H.; PAUL, M.; KREUTZ, R. *Renal damage is not improved by blockade of endothelin receptors in primary renin-dependent hypertension*. *Journal of Hypertension*, 21: 2389-2397, 2003.

RUBINI, R.; PORTA, A.; BASELLI, G.; CERUTTI, S.; PARO, M. *Power spectrum analysis of cardiovascular variability monitored by telemetry in conscious unrestrained rats*. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 45: 181-190, 1993.

SANTOS, R. A.; BROSNIHAN, K. B.; CHAPPELL, M. C.; PESQUERO, J.; CHERNICKY, C. L.; GREENE, L. J.; FERRARIO, C. M. *Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brainstem*. *Hypertension*, 11(2): 153-157, 1988.

SANTOS, R. A. S.; FAGUNDES-MOURA, C. R.; SILVA, A. C. S. *Efeitos cardiovasculares e renais do sistema renina-angiotensina*. Revista Brasileira de Hipertensão, 7(3): 227-236, 2000.

SANTOS, R. A. S.; SIMOES E SILVA, A. C.; MARIC, C.; SILVA, D. M. R.; MACHADO, R. P.; BUHR, I.; HERINGER-WALTHER, S.; PINHEIRO, S. V. B.; LOPES, M. T.; BADER, M.; MENDES, E. P.; LEMOS, V. S.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; SCHULTHEISS, H. P.; SPETH, R.; WALTHER, T. *Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas*. PNAS, 100(14): 8258-8263, 2003.

SANTOS, R. A. S.; FERREIRA, A. J.; NADU, A. P.; BRAGA, A. N.; ALMEIDA, A. P.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; BALTATU, O.; ILIESCU, R.; REUDELHUBER, T. L.; BADER, M. *Expression of an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein produces cardioprotective effects in rats*. Physiology Genomics, 17(3): 292-299, 2004.

SANTOS, R. A. S.; FERREIRA, A. J. *Angiotensin-(1-7) and the renin-angiotensin system*. Current Opinion in Nephrology and Hypertension, 16: 122-128, 2007.

SANTOS, C. F. F. *Efeitos cardiovasculares e metabólicos produzidos pela associação da angiotensina-(1-7) ativa por via oral e fármacos anti-hipertensivos*. 240 f. Tese (Doutorado em Fisiologia e Farmacologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008. a

SANTOS, R. A. S.; FERREIRA, A. J.; SILVA, A. C. S. *Recent advances in the angiotensin-converting enzyme²-angiotensin(1-7)-Mas axis*. Experimental Physiology, 93(5): 519-527, 2008. b

SANTOS, C. F. F.; SANTOS, S. H. S.; FERREIRA, A. V. M.; BOTION, L. M.; SANTOS, R. A. S.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. *Association of an oral formulation of angiotensin-(1-7) with atenolol improves lipid metabolism in hypertensive rats*. Peptides, 43: 155-159, 2013. a

SANTOS, S. H. S.; ANDRADE, J. M. O.; FERNANDES, L. R.; SINISTERRA, R. D.; SOUSA, F. B.; FELTENBERG, J. D.; LEITE, J. I. A.; SANTOS, R. A. S. *Oral Angiotensin-(1-7) prevented obesity and hepatic inflammation by inhibition of resistin/TLR4/MAPK/NF- κ B in rats fed with high-fat diet*. Peptides, 46: 47-52, 2013. b

SANTOS, S. H. S.; GIANI, J.; BURGUI, V.; MIQUET, J. G.; QADRI, F.; BRAGA, J. F.; TODIRAS, M.; KOTNIK, K.; ALENINA, N.; DOMINICI, F. P.; SANTOS, R. A. S.; BADER, M. *Oral administration of angiotensin-(1-7) ameliorates type 2 diabetes in rats*. Journal of Molecular Medicine, 0: 1-11, 2013. c

SANTOS, R. A. S.; FERREIRA, A. J.; VERANO-BRAGA, T.; BADER, M. *Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1-7) and Mas: new players of the renin-angiotensin system*. Journal of Endocrinology, 216(2): 1-17, 2013. d

SAVERGNINI, S. Q.; IANZER, D.; CARVALHO, M. B. L.; FERREIRA, A. J.; SILVA, G. A. B.; MARQUES, F. D.; PELUSO, A. A. B.; BEIMAN, M.; COJOCARU, G.; ALMEIDA, A. P.; ROTMAN, G.; SANTOS, R. A. S. *The novel Mas agonist, CGEN-*

856S, attenuates isoproterenol-induced cardiac remodeling and myocardial infarction injury in rats. *Plos One*, 8(3): 1-11, 2013.

SCHIFFER, S.; PUMMER, S.; WITTE, K.; LEMMER, B. *Cardiovascular regulation in TGR(mRen2)27 rats: 24h variation in plasma catecholamines, angiotensin peptides, and telemetric heart rate variability*. *Chronobiology International*, 18(3): 461–474, 2001.

SCHINDLER, C.; BRAMLAGE, P.; KIRCH, W.; FERRARIO, C. M. *Role of the vasodilator peptide angiotensin-(1–7) in cardiovascular drug therapy*. *Vascular Health and Risk Management*, 3(1): 125–137, 2007.

SCHMIEDER, R. E. *End organ damage in hypertension*. *Deutsches Ärzteblatt International*, 107(49): 866-73, 2010.

SEALS, D. R.; DINENNO, F. A. *Collateral damage: cardiovascular consequences of chronic sympathetic activation with human aging*. *American Journal Physiology – Heart and Circulatory Physiology*, 287: 1895-1905, 2004.

SEN, S.; SABIRLI, S.; OZYIGIT, T.; URESIN, Y. *Aliskiren: review of efficacy and safety data with focus on past and recent clinical trials*. *Therapeutic Advances in Chronic Disease*, 4(5): 232-241, 2013.

SHEARER, F.; LANG, C. C.; STRUTHERS, A. D. *Renin–angiotensin–aldosterone system inhibitors in heart failure*. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 94(4): 459-467, 2013.

SIMÕES E SILVA, A.C.; FLYNN, J. T. *The renin–angiotensin–aldosterone system in 2011: role in hypertension and chronic kidney disease*. *Pediatric Nephrology*, published online, 2011.

TAMARAPPOO, B. K.; JOHN, B. T.; REINIER, K.; TEODORESCU, C.; UY-EVANADO, A.; GUNSON, K.; JUI, J.; CHUGH, S. S. *Vulnerable myocardial interstitium in patients with isolated left ventricular hypertrophy and sudden cardiac death: A postmortem histological evaluation*. *Journal of the American Heart Association*, 1-9, 2012.

TIPNIS, S. R.; HOOPER, N. M.; HYDE, R.; KARRAN, E.; CHRISTIE, G.; TURNER, A. J. *A human homolog of angiotensin-converting enzyme: cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase*. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(43): 3238-33243, 2000.

TRIMARCHI, H. *Role of aliskiren in blood pressure control and renoprotection*. *International Journal of Nephrology and Renovascular Disease*, 4: 41–48, 2011.

TWIST, D. J. J. V.; HOUBEN, A. J. H. M.; HAAN, M. W.; MOSTARD, G. J. M.; KROON, A. A.; LEEUW, P. W. *Angiotensin-(1-7)-induced renal vasodilation in hypertensive humans is attenuated by low sodium intake and angiotensin II co-infusion*. *Hypertension*, 62: 00-00, 2013.

UMEZAWA, H.; AOYAGI, T.; MORISHIMA, H.; MATSUZAKI, M.; HAMADA, M.; TAKEUCHI, T. *Pepstatin, a new pepsin inhibitor produced by actinomycetes*. The Journal of Antibiotics, 23(5): 259-262, 1970.

UNGER, T.; PAULIS, L.; SICA, D. A. *Therapeutic perspectives in hypertension: novel means for renin–angiotensin–aldosterone system modulation and emerging device-based approaches*. European Heart Journal published online, 2011.

WAGNER, J.; KLOTZ, S.; HAUFE, C. C.; DANSER, J. A. H.; AMANN, K.; GANTEN, D.; RITZ, E. *Progression of renal failure after subtotal nephrectomy in transgenic rats carrying an additional renin gene [TGR(mRen2)27]*. Journal of Hypertension, 15: 441-449, 1997.

WANG, K.; HU, X.; DU, C.; TU, S.;ZHANG, F.; XIE, X. *Angiotensin-(1–7) suppresses the number and function of the circulating fibrocytes by upregulating endothelial nitric oxide synthase expression*. Molecular and Cellular Biochemistry, 365: 19-27, 2012.

WILSON, W.; VOIGT, P.; BADER, M.; MARSDEN, C. A.; FINK, H. *Behavior of the transgenic (mREN2)27 rat*. Brain Research, 729: 1-9, 1996.

XU, J.; CARRETERO, O. A.; LIAO, T. D.; PENG, H.; SHESELY, E. G.; XU, J.; LIU, T. S.; YANG, J. J.; REDELHUBER, T. L.; YANG, X. P. *Local angiotensin II aggravates cardiac remodeling in hypertension*. American Journal Physiology – Heart and Circulatory Physiology, 299(5): 1328-1338, 2010.

ZAMAN, M. A.; OPARIL, S.; CALHOUN, D. A. *Drugs targeting the renin-angiotensin-aldosterone system*. Nature reviews, 01: 621-636, 2002.

ZIMMERMAN, M. C. *Angiotensin II and Angiotensin-1-7 redox signaling in the central nervous system*. Current Opinion in Pharmacology, 11(2): 138-143, 2011.