

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Biológicas –
Fisiologia e Farmacologia

Amilton Cerqueira de Andrade

**Efeito potencializador da Angiotensina(1-7) sobre o
aumento da tensão sistólica induzida pelo
isoproterenol em corações isolados de ratos**

Belo Horizonte

2012

Amilton Cerqueira de Andrade

Efeito potencializador da Angiotensina(1-7) sobre o aumento da tensão sistólica induzida pelo isoproterenol em corações isolados de ratos

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Robson A. S.

Santos

Co-Orientador: Prof. Dr. Alvaír Pinto de Almeida

Belo Horizonte

2012

Dedicatória

Aos meus pais, que dedicaram suas vidas a mim e a meus irmãos.

A minha amada esposa, sem cujo apoio e encorajamento teria sido infrutífero o meu esforço.

Aos meus irmãos, pelo incentivo constante.

As minhas filhas e a meu neto que muito me ajudaram em diversos momentos.

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, por me conceder saúde e coragem.

A todos os meus colegas do Laboratório de Hipertensão, especialmente ao Dr. Denis Damasceno e Dr. Luciano Capetini, que me iniciaram, me incentivaram, me aconselharam nesta jornada.

À UFMG e ao ICB que me proporcionaram logística e materiais para o meu trabalho.

Aos Srs. Professores, especialmente Dra Maria José, dos quais recebi, todo o tempo, os ensinamentos necessários e toda boa-vontade.

À Dra Silvia Guatmosim e à sua doutoranda Cibele Rocha Rezende.

Ao Prof. Mauro Isoldi, da UFOP, e sua doutoranda Carolina Morais.

À Betinha e ao Zezé, técnicos do nosso laboratório, sempre solícitos e competentes.

Às funcionárias do Biotério.

Ao meu Co-Orientador, Dr Alvaír, que sempre esteve ao meu lado, com sua palavra, suas correções, me pegando sempre pela mão e me aconselhando.

Ao meu Orientador, Dr. Robson Santos, que com seu constante sorriso e paciência, teve a coragem de me dizer “sim”, quando procurei o Departamento pela primeira vez.

A todos, o meu eterno e incondicional muito obrigado.

Resumo

O estudo presente visou estabelecer a possível interação entre a angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] com o isoproterenol, um agonista β adrenérgico, na produção do aumento da contratilidade miocárdica de corações isolados de ratos adultos. Corações de ratos foram perfundidos de acordo com o Sistema de Langendorff. Foram inicialmente usados *bolus* de isoproterenol, aplicados lateralmente à fixação aórtica. Após um período de estabilização, foi então aplicada infusão de solução de Angiotensina(1-7) por 10 minutos e, então, novo *bolus* de Isoproterenol. Foram então registrados os dados de frequência cardíaca e força de contração, com intervalos de 15 segundos, em seis tomadas. Foi utilizado o programa do Biopac® System. Como já era esperado, de trabalhos anteriores de diversos autores, a aplicação da Ang-(1-7) isoladamente não produziu modificação significativa nos parâmetros contráteis ou da frequência cardíaca. Mas foi encontrado aumento proporcional da força de contração produzida pelo Isoproterenol após aplicação da Ang-(1-7). Para comparar a ação β adrenérgica, foi feito pre-tratamento com atenolol, um β -bloqueador, que bloqueou o aumento da força contrátil implementada pelo Isoproterenol. O A-779, um antagonista da Ang-(1-7), impediu os resultados de aumento da contratilidade observada após a infusão da Ang-(1-7). Houve aumento discreto da frequência cardíaca após o Isoproterenol, mas não houve diferença significativa após a aplicação da Ang-(1-7) mais o Isoproterenol.

Estes dados sugerem haver uma potencialização dos efeitos do isoproterenol sobre a força de contração miocárdica, pela Ang-(1-7) e, talvez, uma interação entre receptores β adrenérgicos e receptores Mas, específico para a Angiotensina(1-7).

Palavras-chave: Angiotensina(1-7); Sistema Renina-Angiotensina; Isoproterenol; Contratilidade miocárdica.

Abstract

The present study was designed to establish the possible interaction between the Angiotensin-(1-7) [Ang-(1-7)] with isoproterenol, β adrenergic agonist, in the production of increased myocardial contractility of isolated hearts of adult rats. Hearts were perfused according to Langendorff preparation. It was used first *bolus* of isoproterenol, laterally to the aortic clamp. After a stabilization period, it was then applied a infusion of a Angiotensin(1-7) solution, for 10 minutes, and than another *bolus* of Isoproterenol. The values of contraction force and heart rate were registered, each 15 seconds, in six samples. It was used the Biopac®System soffttware. As reported by many studies of other authors, the Ang-(1-7) alone does not produce important modification in force or heart rate values. But it was found proportional increase of contractil force induced by isoproterenol after Ang(1-7) application. To compare β adrenergic action, it was used pre-treatment with atenolol (β blocker), with prevention of the increased contraction force implemented by Isoproterenol. It was used A-779, a Ang-(1-7) antagonist. It prevented the isoproterenol action after Ang-(1-7). There was a discret increase in cardiac heart rate after isoproterenol treatment, but no significative difference was found with Ang(1-7) and Isoproterenol combination. These data suggest that Ang-(1-7) exerts a potentialization over the isoproterenol action by increasing the myocardial contraction force and, maybe, a interaction between β receptors and receptor Mas, the specific receptor for Angiotensin(1-7).

Keywords: Angiotensin (1-7); Renin-Angiotensin System; Isoproterenol; Myocardial Contractility.

Sumário

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E FÓRMULAS QUÍMICAS....	vi
1. Introdução.....	16
1.1 - O Sistema Renina-Angiotensina.....	18
1.2 – Papel da Ang II no coração.....	21
1.3 Angiotensina (1-7).....	23
1.4- A Ang-(1-7) e o coração.....	25
1.5 - Sistema Nervoso Autônomo	27
1.6- Isoproterenol.....	29
2. Objetivos.....	31
2.1 – Objetivos gerais.....	32
2.2 – Objetivos específicos.....	32
3. Material e métodos.....	33
3.1 – Animais.....	34
3.2 – Medidas de tensão sistólica em sistema de Langendorff para perfusão cardíaca.....	34
3.2.1 – Procedimentos de eutanásia e coleta do coração.....	34
3.2.2 – Montagem do coração no sistema de Langendorff..	36
3.2.3 – Registros de tensão sistólica.....	36
3.3 – Protocolo experimental.....	37
3.4 – Confocal.....	38
3.4.1 – Isolamento de miócitos ventriculares.....	38
3.4.2 – Transiente de Cálcio.....	38
3.5 Citometria de fluxo.....	39
3.5.1 Protocolos para realização de Culturas primárias de	

Células.....	39
A- Protocolo Preparação de DEMEN (pH 7,2).....	40
B- Protocolo de preparação de ADS 1X (pH 7,35).....	40
C- Protocolo para preparação de BRDU [10^{-2}] (Inibidor de fibroblasto), PM=307,11.....	41
D- Protocolo para preparação de meio de cultura, para 50 ml	41
E- Protocolo de preparação de gelatina 0,1%.....	42
F- Protocolo preparação da Solução Tampão de Digestão....	43
3.5.2- Protocolo de digestão e cultura primária dos cardiomiócitos de ratos e camundongos neonatos.....	43
3.5.3- Protocolo de Determinação do Ca^{2+} intracelular por Citometria de Fluxo.....	45
3.5.4- Protocolo: AMPc.....	45
4. Ecocardiograma.....	46
5. Análise Estatística.....	48
6. Resultados.....	49
7. Discussão.....	65
8. Conclusão.....	71
9. Referências Bibliográficas.....	72

Lista de figuras

Figura 1. Ilustração da cascata clássica (em azul) e moderna (em preto) do SRA. Pela via clássica, a renina, secretada normalmente em resposta a um aumento na perfusão renal, quebra o angiotensinogênio no decapeptídeo Ang I, o qual é convertido à Ang II por ação da enzima conversora de angiotensina (ECA) e da quimase. A Ang II, por sua vez, é metabolizada à Ang III e Ang IV por ação de aminopeptidases. Pela via moderna, surge a Ang-(1-9), um produto da clivagem da Ang I pela ECA2 e catepsina A. De forma essencial, surge a Ang-(1-7), originada a partir da clivagem da Ang II pela ECA2, PEP e PCP, a partir da clivagem da Ang-(1-9) pela ECA ou NEP, ou ainda a partir da clivagem da Ang I pela PEP e NEP. ECA: enzima conversora de angiotensina; Ang: angiotensina; PCP: prolilcarboxipeptidase; NEP: endopeptidase neutra; PEP: prolilendopeptidase ; AP: aminopeptidases (Santos *et al.*, 2005)

Figura 2 . Fórmula básica do Isoproterenol

Figura 3. Regulação β -adrenérgica da mobilização de cálcio em miócitos cardíacos. Gs: proteína G estimulatória; ATP: trifosfato de adenosina; PKA: proteína quinase A; PL: fosfolambam; RyR: receptor de rianodina. (Adaptado de PALMER, 2007 - <http://watcut.uwaterloo.ca/webnotes/Pharmacology/page-6.4.html>).

Figura 4. Ilustração de um coração isolado acoplado, pela aorta, a um sistema de Langendorff, em nosso laboratório.

Figura 5. Aspecto do registro das tensões durante o experimento e sua variação com a aplicação das drogas

Figura 6. Efeito da administração *in bolus* de isoproterenol nas concentrações de 10^{-12} M, 10^{-7} M e 10^{-5} M sobre a tensão sistólica em corações isolados de ratos SD. Os resultados foram expressos como percentual de aumento em relação ao estado basal e apresentados como média \pm EPM de 5 experimentos.

Figura 7. Efeito da administração *in bolus* de isoproterenol (Isso 10^{-5} M; 1 mL/min) sobre a frequência cardíaca em corações isolados de ratos SD. Os resultados foram expressos como percentual de aumento em relação ao estado basal e apresentados como média \pm EPM de 5 experimentos

Figura 8. Efeito do pré-tratamento com 0,22 nM Ang-(1-7) sobre os efeitos de 10^{-12} M de isoproterenol (Iso) na tensão sistólica em corações isolados de ratos SD. Os resultados foram expressos como percentual de aumento em relação ao estado basal e apresentados como média \pm EPM de 5 experimentos.

Figura 9. Efeito do pré-tratamento com 0,22 nM Ang-(1-7) sobre os efeitos de 10^{-7} M de isoproterenol (Iso) na tensão sistólica em corações isolados de ratos SD. Os resultados foram expressos como percentual de aumento em relação ao estado basal e apresentados como média±EPM de 5 experimentos.

Figura 10. Efeito do pré-tratamento com 0,22 nM Ang-(1-7) sobre os efeitos de 10^{-5} M de isoproterenol (Iso) na tensão sistólica em corações isolados de ratos SD. Os resultados foram expressos como percentual de aumento em relação ao estado basal e apresentados como média±EPM de 5 experimentos.

Figura 11. Efeito da administração de Ang-(1-7) 0,22 nM sobre a tensão sistólica em corações isolados de ratos SD. Os resultados foram expressos como percentual de aumento em relação ao estado basal e apresentados como média±EPM de 5 experimentos

Figura 12. Efeito do antagonismo dos receptores β 1-adrenérgicos com atenolol (infusão *in bolus* de 200 μ L(200 μ g) sobre a potencialização do efeito do isoproterenol (10^{-5} M) pela administração de Ang-(1-7) 0,22 nM em corações isolados de ratos SD. Os resultados foram expressos como percentual de aumento em relação ao estado basal e apresentados como média±EPM de 5 experimentos.

Figura 13. Efeito do antagonismo dos receptores Mas com o A779 (50 ng/ml, em Krebs-Ringer, em perfusão contínua) sobre o aumento da tensão sistólica induzida pelo isoproterenol (10^{-5} M) + Ang-(1-7) 0,22 nM em corações isolados de ratos SD. Os resultados foram expressos como percentual de aumento em relação ao estado basal e apresentados como média±EPM de 5 experimentos.

Figura 14. Efeito da administração *in bolus* de isoproterenol (Iso; 10^{-12} M) sobre a tensão sistólica em corações isolados de ratos SD e de ratos TGR(A1-7)3292 . Os resultados foram expressos como percentual de aumento em relação ao estado basal e apresentados como média±EPM de 5 experimentos.

Figura 15. Efeito da administração *in bolus* de isoproterenol (Iso; 10^{-7} M) sobre a tensão sistólica em corações isolados de ratos SD e de ratos TGR(A1-7)3292 . Os resultados foram expressos como percentual de aumento em relação ao estado basal e apresentados como média±EPM de 5 experimentos.

Figura 16. Efeito da administração *in bolus* de isoproterenol (Iso; 10^{-5} M) sobre a tensão sistólica em corações isolados de ratos SD e de ratos TGR(A1-7)3292 . Os resultados foram expressos como percentual de aumento em relação ao estado basal e apresentados como média±EPM de 5 experimentos.

Figura 17. Efeito de 0,22 nM de Ang-(1-7) sobre o aumento da tensão sistólica induzido por 10^{-12} M de isoproterenol em corações isolados de ratos TGR(A1-

7)3292. Os resultados foram expressos como percentual de aumento em relação ao estado basal e apresentados como média±EPM de 5 experimentos.

Figura 18. Efeito de 0,22 nM de Ang-(1-7) sobre o aumento da tensão sistólica induzido por 10^{-7} M de isoproterenol em corações isolados de ratos TGR(A1-7)3292. Os resultados foram expressos como percentual de aumento em relação ao estado basal e apresentados como média±EPM de 5 experimentos.

Figura 19. Efeito de 0,22 nM de Ang-(1-7) sobre o aumento da tensão sistólica induzido por 10^{-5} M de isoproterenol em corações isolados de ratos TGR(A1-7)3292. Os resultados foram expressos como percentual de aumento em relação ao estado basal e apresentados como média±EPM de 5 experimentos.

Figura 20. Efeito de 0,22 nM de Ang-(1-7) sobre o aumento da tensão sistólica induzido por 10^{-5} M de isoproterenol em corações isolados de ratos Wistar. Os resultados foram expressos como percentual de aumento em relação ao estado basal e apresentados como média±EPM de 5 experimentos.

Figura 21. Liberação de AMPc, após estímulos com isoproterenol e Ang-(1-7), em cardiomiócitos de ratos Sprague-Dawley recém-natos e TGR(A-1-7) 3292.

Figura 21. Liberação de AMPc, após estímulos com isoproterenol e Ang-(1-7), em cardiomiócitos de ratos Sprague-Dawley recém-natos e TGR(A-1-7) 3292.

Figura 23. Expressão da $[Ca^{++}]$ em cardiomiócitos de ratos TGR(A-1-7) 3292 recém-natos, com com a estimulação por isoproterenol em presença ou ausência de Angiotensina(1-7).

Figura 24. Mostra um exemplo típico do transiente de Ca^{++} obtido em células estimuladas em 1Hz, em diferentes condições (controle, com isoproterenol, com ang-(1-7) e iso após ang-(1-7)). Como esperado, o iso aumentou a amplitude e a velocidade de decaimento do transiente de cálcio. A ang-(1-7) não alterou estes parâmetros. O tratamento do cardiomiócito com a combinação de angio-(1-7) e iso apresentou valores similares ao do tratamento com iso isolado.

Figura 25. Variação da F. C., ao EcoCG, após injeção de iso-iso ou de angio-iso.

Figura 26. Variação do DC, ao EcoCG, após injeção de iso-iso ou de angio-iso.

Figura 27. Variação do Fração de Ejeção, ao EcoCG, após injeção de iso-iso ou de angio-iso.

Figura 28. Variação da Fração de Encurtamento, ao EcoCG, após injeção de iso-iso ou de angio-iso.

Figura 29. Variação do Volume de Ejeção, ao EcoCG, após injeção de iso-iso ou de angio-iso. O volume sistólico, à semelhança do DC, mostra maior aumento com a Angio, em relação ao iso, mas decai com o iso, na 2ª fase

Lista de tabelas

Tabela 1. Composição da solução de Krebs-Ringer.....	33
---	----

Lista de abreviaturas, símbolos e fórmulas químicas

μg	Micrograma
μL	Microlitros
μm	Micrômetros
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
Ang III	Angiotensina III ou Ang-(2-8)
Ang IV	Angiotensina IV ou Ang-(3-8)
Ang-(1-7)	Angiotensina (1-7)
ANOVA	Análise de variância
AT1	Receptor AT1 para a Ang II
AT2	Receptor AT2 para a Ang II
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ECA2	Enzima conversora de angiotensina 2
EDTA	Ácido etilenediaminotetracético
EPM	Erro padrão da media
HCl	Ácido clorídrico
KCl	Cloreto de potássio
Kg	Quilograma
KH_2PO_4	Fosfato de potássio monobásico
mg	Miligramma
MgCl_2	Cloreto de magnésio
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de magnésio heptahidratado
mL	Mililitros
mM	Milimolar
mm^2	Milímetro quadrado
Na_2HPO_4	Fosfato de sódio dibásico
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO_3	Bicarbonato de sódio

NEP	Endopeptidase neutra
°C	Graus centígrados
PAD	Pressão arterial diastólica
PAM	Pressão arterial média
PAS	Pressão arterial sistólica
PCP	Prolilcarboxipeptidase
PEP	Prolilendopeptidase
SRA	Sistema renina-angiotensina
TGR(A1-7)3292	Linhagem de ratos transgênicos que super-expressam a Ang-(1-7)

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O coração, como órgão central do sistema cardiovascular, é o responsável pela manutenção do fluxo sanguíneo a todos os tecidos do corpo humano. Logo, faz-se necessária uma rede extremamente complexa e organizada de controle da função cardíaca para que órgãos vitais não sofram os impactos diretos das constantes oscilações da pressão arterial sanguínea. Deficiências nos mecanismos de controle da contratilidade cardíaca estão diretamente relacionadas a uma série de patologias cardiovasculares como a hipertensão, o diabetes, a insuficiência cardíaca, dentre outras. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) revelam que só no ano de 2002, 140 mil pessoas morreram diretamente de doenças cardíacas no Brasil. Este número torna-se ainda mais alarmante em países como a Índia, onde mais de 1,5 milhão de pessoas morreram de problemas cardíacos no mesmo ano. Pesquisa

realizada por cientistas indianos e canadenses, e publicada na revista Lancet, mostram que doenças cardíacas são a maior causa de mortalidade em todo o mundo e foram responsáveis, em 2001, por 7,1 milhões de mortes - 80% delas em países em desenvolvimento (BBC-Brasil, 2001).

Doenças cardíacas e acidentes vasculares cerebrais, juntos, são responsáveis por aproximadamente 17 milhões de óbitos por ano no mundo. Estimativas ainda da OMS sugerem que este número suba para 20 milhões de óbitos em 2020 e 24 milhões de óbitos em 2030. Neste contexto, o entendimento dos complexos mecanismos da fisiopatologia cardíaca é crucial para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

Grande parte destas estratégias adotadas hoje na prática clínica para o tratamento de doenças como a hipertensão, a insuficiência renal e a insuficiência cardíaca envolve a utilização de drogas que atuam sobre o sistema renina-angiotensina e sobre o sistema nervoso simpático. Assim sendo, é de primordial importância o real entendimento de como estes sistemas regulam as várias vias determinantes da homeostasia e patologia cardiovasculares.

1.1 O Sistema Renina-Angiotensina

O sistema renina-angiotensina (SRA) desempenha um papel de fundamental importância na homeostase da pressão arterial, da perfusão tecidual e do volume extracelular. Suas funções devem-se basicamente a Ang II, a qual é formada por uma série de clivagens proteolíticas de seus precursores. Esta via é iniciada pela produção e liberação controlada de renina pelos rins. Apesar do descobrimento da renina há mais de um século, só nos últimos 30 anos o SRA foi reconhecido como sendo de

fundamental importância para a homeostase corporal, tendo em vista sua imensa participação no controle da função fisiológica e de desordens cardiovasculares e renais.

Em uma visão clássica, a renina (enzima armazenada na forma de grânulos e posteriormente liberada pelas células justaglomerulares renais) cliva o angiotensinogênio (globulina liberada pelo fígado) em um decapeptídeo, a angiotensina I (Ang I) que, por sua vez, é clivado em angiotensina II (Ang II) pela enzima conversora de angiotensina (ECA). A ECA é responsável pela remoção de um dipeptídeo C-terminal da Ang I para formar o octapeptídeo Ang II, biologicamente ativo. A ECA é uma exopeptidase ancorada à membrana celular de vários tipos celulares incluindo as células endoteliais (principalmente da circulação pulmonar), células epiteliais de microvilosidades e células neuro-epiteliais. Além da quebra da Ang I, a ECA também metaboliza outros peptídeos como a bradicinina e a kalidina. Outros peptídeos também são comumente formados pelo SRA, como a Ang III (Angio-(2-8)) e Ang IV (Angio-(3-8)), após clivagens da Ang II por aminopeptidases. A Ang IV (Ang-(3-8)) é um hexapeptídeo formado pela quebra da Ang III. Especula-se que os efeitos da Ang IV sejam sinérgicos aos efeitos da Ang II. Dentre os receptores descritos classicamente no SRA, destacam-se os receptores para a Ang II – receptores AT₁ e AT₂. Os receptores AT₁ são os receptores cujas funções são as mais bem estabelecidas. Os trabalhos na literatura demonstram que a maioria das ações fisiológicas e fisiopatológicas da Ang II são mediadas pelos receptores AT₁. Dentre estas ações, podem-se destacar: vasoconstrição, aumento na pressão arterial sistêmica, aumento na contratilidade cardíaca, ativação do sistema nervoso autônomo simpático e aumento da reabsorção tubular de sódio. Carey *et al.*, (2003).

Por uma visão atual o SRA é o principal agente regulador da pressão arterial basal sendo composto por peptídeos vasoativos com ações hipertensivas e anti-hipertensivas que agem de modo endócrino, parácrino e autócrino Santos *et al.*, (2000); Santos *et al.*, (2005); Silva *et al.*, (2007); Simões e Silva *et al.*, (1997) (**Figura 1**). Por esta visão mais

moderna, acredita-se que a pró-renina/renina, além de atuar na clivagem do angiotensinogênio a Ang I, atue via receptores de pró-renina/renina e ativando a via ERK1/2 Além disso, surgem outras vias de formação de Ang II independente da ECA, envolvendo a catepsina G, a tonina, a quimase, a enzima geradora de Ang II sensível à quimostatina (CAGE) e o ativador de plasminogênio tecidual (TPA) Contudo, surge, ainda, uma via que tem se mostrado de fundamental importância para a manutenção da homeostase cardiovascular – o eixo Ang-(1-7)-receptor Mas.

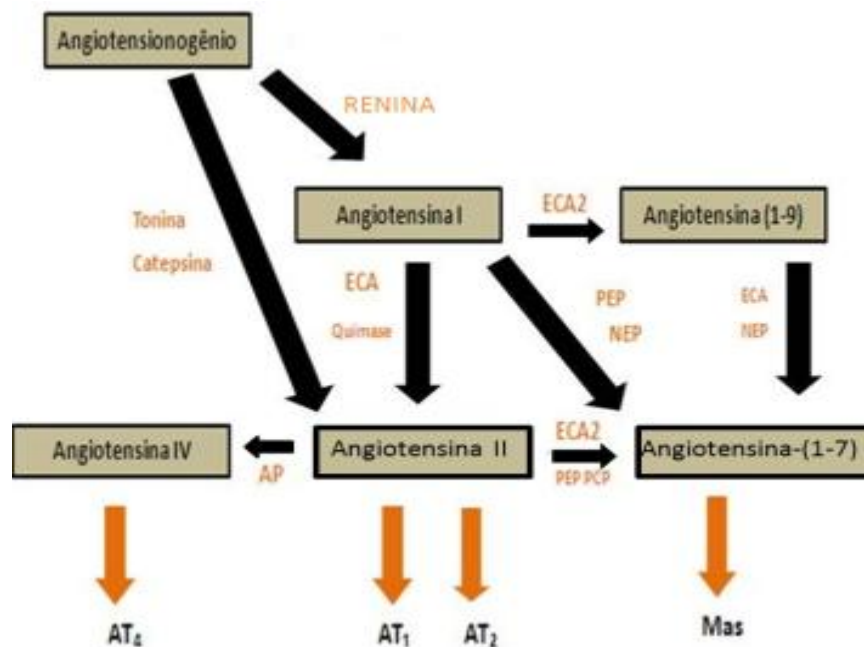


Figura 1. Ilustração da cascata clássica (em azul) e moderna (em preto) do SRA. Pela via clássica, a renina, secretada normalmente em resposta a uma série de estímulos, quebra o angiotensinogênio no decapeptídeo Ang I, o qual é convertido à Ang II por ação da enzima conversora de angiotensina (ECA) e da quimase. A Ang II, por sua vez, é metabolizada a Ang IV por ação de aminopeptidases. Pela via moderna, surge a Ang-(1-9), um produto da clivagem da Ang I pela ECA2. Surge então a Ang-(1-7), originada a partir da clivagem da Ang II pela ECA2, PEP e PCP, a partir da clivagem da Ang-(1-9) pela ECA ou NEP, ou ainda a partir da clivagem da Ang I pela PEP e NEP. ECA: enzima conversora de angiotensina; Ang: angiotensina; PCP: prolilcarboxipeptidase; NEP: endopeptidase neutra; PEP: prolilendopeptidase ; AP: aminopeptidases (Santos *et al.*, 2005).

A Ang-(1-7) não é originada pela ECA somática. Acredita-se que as principais vias de síntese da Ang-(1-7) sejam as endopeptidases (prolilendopeptidase – PEP; endopeptidase neutra - NEP) e, sobretudo, a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), enzima recentemente descoberta e parcialmente análoga à ECA. No sistema cardiovascular, a ECA2 é predominantemente expressa no endotélio vascular e no coração. É de responsabilidade da ECA2 grande parte da produção de Ang-(1-7) a partir da Ang II.

Muitos estudos mostraram que os efeitos da Ang-(1-7) não são abolidos pelo bloqueio dos receptores AT₁ e AT₂, sugerindo a existência de um receptor específico para a Ang-(1-7) Benter e cols, (1993); Porsti e cols, (1994); Brosnihan e cols, (1996).

Recentemente, a utilização de um antagonista sintético dos efeitos da Ang-(1-7), o D-[Ala⁷]-Ang-(1-7) (A-779), forneceu evidências da existência de um receptor para a Ang-(1-7), diferente dos receptores AT₁ e AT₂. Em 2003, Santos e cols identificaram este receptor como sendo o receptor Mas. Santos e cols, (1994); Tallant e cols, (1999). Estes resultados foram confirmados pela ausência dos efeitos da Ang-(1-7) em camundongos *knockout* para o receptor Mas.

1.2 Papel da Ang II no coração

Muito se tem estudado sobre os efeitos diretos da Ang II no coração. Trabalhos demonstram que a Ang II possui efeito hipertrófico sobre células musculares lisas vasculares (Sadoshima *et al.*, 1993b; Sadoshima *et al.*, 1993c; Zhang *et al.*, 2005), efeito indutor de proliferação de fibroblastos Higashi *et al.*, (2003); Mokni *et al.*; Sadoshima *et al.*, (1993b) além de induzir hipertrofia dos miócitos cardíacos através da ativação dos receptores AT₁ (Reiken *et al.*, (2003); Sadoshima *et al.*, 1993a; Sadoshima *et al.*, (1993b). Vários trabalhos demonstram que o aumento crônico dos níveis circulantes de Ang II aumenta de maneira considerável a concentração de colágeno

cardíaco, relacionando-se diretamente a uma perda na eficiência miocárdica. Comumente este efeito é inibido pelo antagonismo dos receptores AT₁. Além disso, a Ang II promove acentuada vasoconstrição coronariana, contribuindo para a instalação e severidade das arritmias cardíacas Ferreira *et al.*, (2001).

Dois tipos principais de receptores estão relacionados aos efeitos da Ang II: receptores AT₁ e AT₂, cuja distribuição é ampla e heterogênea. Sabe-se que os dois receptores são responsáveis por ações completamente diferentes desde os mecanismos de sinalização até seus efeitos biológicos finais (Ardaillou, (1998); Ardaillou *et al.*, (1999); Castro *et al.*, (2005); Chansel *et al.*, (1996).

O receptor AT₁ é um receptor acoplado a proteína G. Sua via de sinalização envolve as fosfolipases A, C e D, inositol fosfato, canais para cálcio e uma variedade de quinases Unger, (2002). O receptor AT₁ é encontrado em órgãos e tecidos envolvidos no balanço eletrolítico e regulação da pressão sanguínea, como glândulas adrenais, células do músculo liso vascular, rim e coração. É através da ligação ao receptor AT₁ que a Ang II exerce seus efeitos sobre o crescimento e proliferação de células do músculo liso vascular. Além disso, está implicado em várias doenças cardiovasculares, renais e cerebrais, tais como hipertrofia do ventrículo esquerdo, hipertrofia da camada média vascular, arritmias cardíacas, aterosclerose e glomerulosclerose Rosenstiel *et al.*, (2002); Unger, (2002).

O receptor AT₂ é também uma proteína transmembrana e possui certo grau de homologia com o receptor AT₁. Eles estão muito presentes nos tecidos durante o desenvolvimento fetal e sua expressão é reduzida em tecidos adultos. Nestes, estão expressos em maior concentração na medula adrenal, útero, ovários, endotélio vascular e áreas específicas do cérebro. Sua expressão está também elevada na insuficiência cardíaca, nos processos de reparo após infarto, em lesões de pele e no sistema nervoso. Logo, o receptor AT₂ parece estar envolvido no controle da proliferação e

diferenciação celular, angiogênese, regeneração tecidual e apoptose Rosentiel *et al.*, (2002); Unger, (2002).

1.3 Angiotensina (1-7)

A Ang-(1-7) é um heptapeptídeo, com a seguinte sequência de aminoácidos: **Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro**. As principais vias de síntese são as seguintes:

- Ação da endopeptidase neutra sobre a Ang I.
- Ação da prolil endopeptidase sobre a Ang I.
- Ação da enzima conversora da angiotensina sobre a Ang-(1-9).
- Ação da endopeptidase neutra sobre a Ang-(1-9).
- Ação da enzima conversora da angiotensina 2 sobre a Ang II.
- Ação da enzima prolilendopeptidase sobre a Ang II
- Ação da prolilcarboxipeptidase sobre a Ang II

A Ang-(1-7) é um dos mais recentes membros do SRA e reconhecido como dos mais importantes, visto que diversos estudos reconhecem possíveis ações terapêuticas. Santos R.A.S. *et. al.*, (2005). A liberação de óxido nítrico (NO) e prostaglandinas (PGI₂) levando a vasodilatação, a inibição da proliferação celular, em contrário à ação da Ang II, e a inibição da trombogênese, Rajendran S, *et.al.*, (2005; Kucharewicz I. *et. al.*, (2002) estão entre as suas propriedades.

A síntese da Ang-(1-7) é controlada por algumas enzimas que estão presentes na circulação e em alguns tecidos Welches *et al.*, (1991); Yamamoto *et al.*, (1992), como já comentado. Uma nova via de formação da Ang-(1-7), por ação da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA 2) Donoghue *et al.*, (2000); Crackower M.A. *et al.*, (2002) foi apresentada recentemente. A ECA 2 converte Ang I em angiotensina-(1-9), que pode ser posteriormente convertida em Ang-(1-7) por ação da ECA ou de outras peptidases Donoghue *et al.*,(2000). A Ang II também pode ser convertida em Ang-(1-7) através da ECA2 Vickers *et al.*, (2002). Normalmente as concentrações plasmáticas da Ang-(1-7) são similares às da Ang II. Santos *et al.*, (1996).

A Ang-(1-7) apresenta ações tanto centrais quanto periféricas podendo ser concordantes, opostas ou diferentes das induzidas pela Ang II. Santos *et al.*, (2000); Ferrario *et al.*, (1990).) O controle do balanço hidroeletrólítico Santos *et al.*, (1996) é um dos processos nos quais está envolvida a ang-(1-7). Promove ainda inibição da proliferação de células musculares lisas vasculares. Freeman *et al.*, (1996);, inibe também o crescimento de miócitos cardíacos, contrapondo-se à remodelação miocárdica. Tallant *et al.*,(2005).

A descoberta do receptor específico, mediando as ações da Ang-(1-7) *in vivo*, Receptor Mas, permitiu diversos experimentos, demonstrando muitas de suas ações, especialmente na função cardíaca. A Ang-(1-7) aumenta a sensibilidade do barorreceptor Campagnole-Santos e cols, (1992) e potencializa o efeito vasodilatador da bradicinina Paula e cols, (1995); Abbas e cols, (1997); Fernandes e cols, (2001) e do óxido nítrico. Porsti e cols, (1994); Brosnihan e cols, (1996); Machado e cols, (2001); Heitsch e cols, (2001). Em corações isolados de camundongos Knockout para Receptor Mas foram encontradas baixa tensão sistólica, maior resistência vascular coronariana e, ao EcoCG, significativa redução da fração de encurtamento (Santos et al, 2003).

A microinfusão de Ang-(1-7) na região da medula ventro lateral rostral (RVLM) reproduz aumento da pressão arterial e taquicardia. Porém, na região da medula ventro lateral caudal (CVLM), a Ang-(1-7) provoca queda da pressão arterial e da frequência cardíaca (Silva *et al.*, 1993).

1.4 A Ang-(1-7) e o coração

São conhecidos vários efeitos da Ang-(1-7) no coração. A Ang-(1-7) inibe os efeitos ritmogênicos e proliferativos da Ang II, reduz as arritmias cardíacas pós-isquemia/reperfusão e melhora a contratilidade cardíaca também pós-isquemia Ferreira *et al.*, (2001); Santos *et al.*, (2000); Santos *et al.*, (2006); Santos *et al.*, (2003). Além disso, a Ang-(1-7) retarda o processo de falência cardíaca pós-infarto do miocárdio. Apesar de muito se especular, não se sabe exatamente como a Ang-(1-7) antagoniza os efeitos da Ang II.

Acredita-se que a Ang-(1-7) promova uma potencialização da vasodilatação coronariana via bradicinina Almeida *et al.*, (2000), aumento da eficiência da contratilidade cardíaca. Ferreira *et al.*, (2001); Sampaio *et al.*, (2003), redução das concentrações de Ang II no miocárdio Zisman *et al.*, (2003b) e *down-regulation* dos receptores AT₁. Tallant e Cols (2005) demonstraram o efeito inibitório da Ang-(1-7) sobre o crescimento de cardiomiócitos. Tal efeito foi mediado pelo receptor Mas, o qual modulou a atividade das MAPKs envolvidas na hipertrofia cardíaca.

Tendo em vista a dificuldade de se diferenciar se as alterações em órgãos específicos como o coração eram decorrentes dos efeitos diretos dos peptídeos angiotensinérgicos

ou resultado de alterações hemodinâmicas, Methot *et al.*(1997) desenvolveram um novo método para o estudo do SRA. Conseguiram com que um determinado órgão funcionasse como produtor de determinado peptídeo do sistema, com liberação contínua na corrente sanguínea. Utilizando-se desta metodologia, Santos *et al.* (2004) criaram um animal que superexpressa a Ang-(1-7). A expressão do transgene para Ang-(1-7) nesses animais mostrou-se restrita aos testículos. Esse órgão passou a funcionar como uma fonte secretora localizada a qual está oferecendo uma contínua produção desse peptídeo.

Estes animais que superexpressam a Ang-(1-7) – [TGR A1-7(3292)] - apresentaram aumento de Ang-(1-7) nos testículos por volta de 4,5 vezes com um aumento dos níveis plasmáticos de aproximadamente 2,5 vezes sem diferença artério-venosa. Nos demais órgãos não houve aumento deste peptídeo Santos *et al.*, (2004). Estes animais tornaram-se uma importante ferramenta para o estudo dos efeitos crônicos da Ang-(1-7) em diversos órgãos e, principalmente no coração. Estes ratos demonstraram uma diminuição das arritmias de reperfusão em corações isolados, uma melhora na função cardíaca após isquemia-reperfusão e maior frequência cardíaca. Análises de telemetria demonstraram ausência de alterações na PAM, PAS e PAD, elevação da frequência cardíaca durante os períodos diurno e noturno Santos *et al.*, (2004).

Existem várias evidências de que a Ang-(1-7) desempenha um papel cardioprotetor. A maioria dos estudos para avaliação das ações da Ang-(1-7) sobre a contração cardíaca foram realizados associados ao aumento agudo desse peptídeo. Os ratos TGR (A1-7) 3292 representam uma ferramenta útil para o estudo dos efeitos do aumento crônico da Ang-(1-7) em distúrbios cardiovasculares.

1.6 Sistema Nervoso Autônomo

O sistema nervoso simpático desempenha um importante papel no controle da pressão arterial e da função cardiovascular como um todo, especialmente em situações de alteração da pressão arterial ou de disfunção miocárdica. Envolvidos em seus mecanismos de ação estão os receptores β adrenérgicos, que serão um dos alvos do nosso trabalho.

Os receptores β são subdivididos em $\beta 1$ adrenérgico ($\beta 1$ -AR), (prevalente no miocárdio e responsável pelo inotropismo e cronotropismo positivos) e $\beta 2$ adrenérgico ($\beta 2$ -AR) (prevalente nos músculos lisos e esqueléticos, responsável pelo relaxamento muscular). Esta classificação foi baseada em diferenças na potência dos agonistas adrenalina e noradrenalina. Estas catecolaminas têm potência semelhante na ativação de $\beta 1$ -AR, mas a adrenalina é mais potente do que a noradrenalina em ativar $\beta 2$ -AR. Sabe-se, atualmente, que já foram descritos e clonados outros subtipos de Receptores β . Lusiane M Bendhack (2006).

A sinalização β -adrenérgica é uma importante via envolvida na regulação da mobilização da $[Ca^{2+}]_i$ em miócitos cardíacos. Agonistas e antagonistas destes receptores têm sido comumente utilizados na terapia cardíaca. Receptores β -

adrenérgicos são receptores acoplados à proteína G. Sua ativação pode levar à ativação da enzima adenilato ciclase, que atua na conversão da molécula de trifosfato de adenosina (ATP) em monofosfato cíclico de adenosina (AMPc). Aumento nos níveis intracelulares de AMPc levam a ativação da proteína quinase A (PKA) que pode fosforilar tanto canais para cálcio quanto proteínas envolvidas no controle da liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático (RyR e fosfolambam), culminando em um aumento na $[Ca^{2+}]_i$.

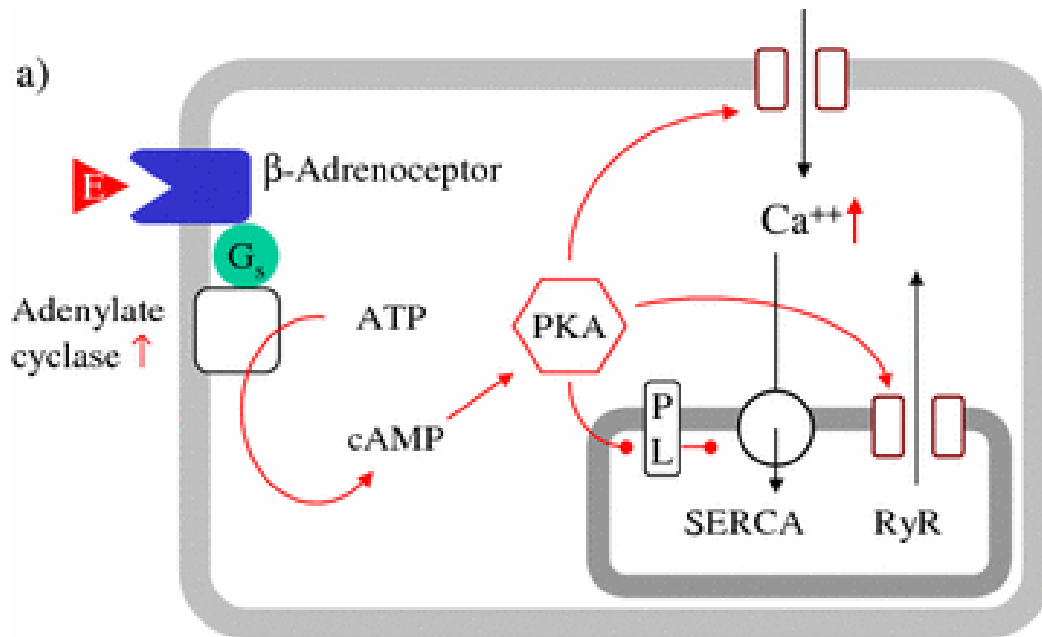


Figura 3. Regulação β–adrenérgica da mobilização de cálcio em miócitos cardíacos. G_s: proteína G estimulatória; ATP: trifosfato de adenosina; PKA: proteína quinase A; PL:

Os β-AR são ligados à proteína G e apresentam sete domínios transmembrana. Cada um dos sete resíduos hidrofóbicos de aminoácidos atravessa a membrana e a porção N-terminal do receptor é exposta na porção extracelular, enquanto a porção C-terminal é interna à membrana plasmática. Os β-AR, associados à proteína G, ativam a Adenilciclase, resultando na produção do AMPc. A proteína G faz parte de uma família de proteínas homólogas e triméricas, consistindo de três subunidades designadas alfa, beta e gama. Os receptores β1, especificamente, são os responsáveis pela sinalização

nas principais funções cardiovasculares, entre elas, aumento do débito cardíaco, através do aumento da frequência cardíaca e do aumento do volume sistólico (fração de ejeção), liberação de renina nas células justaglomerulares e lipólise no tecido adiposo.

Assim, neste trabalho objetivamos avaliar a interação entre o SRA e o SNS sobre o inotropismo cardíaco em ratos normais Sprague-Dawley, Wistar e ratos transgênicos TGR (A1-7)3292, que superexpressam Ang-(1-7).

1.5 Isoproterenol

O isoproterenol é um agonista β_1 e β_2 , promovendo aumento do volume de ejeção sistólica, do débito cardíaco e da frequência cardíaca, tendo pouco efeito na pressão arterial média.

O seu uso primário é nos bloqueios A-V ou nas bradicardias. Ativando os receptores β_1 cardíacos, tem efeitos cronotrópico, inotrópico e dromotrópico positivos. É um potente vasodilatador pulmonar e também broncodilatador.

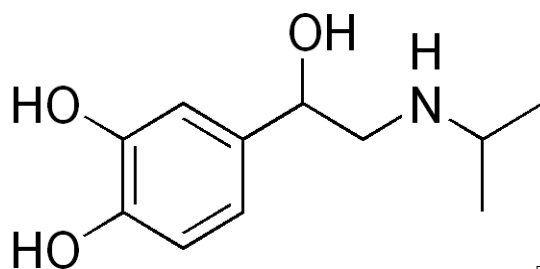


Figura. 2 – Fórmula básica do Isoproterenol

Agonista de ação direta, estimula predominantemente receptores β_1 e β_2 adrenérgicos; sua ação nos receptores alfa é insignificante. É muito utilizado nos trabalhos em que se usa modelos de hipertrofia miocárdica.

É metabolizado pela catecol-O-metiltransferase (COMT), mas não sofre ação da monoaminaoxidase (MAO), seu tempo de ação é rápida, pois quando administrado por via oral ou parenteral é rapidamente metabolizado pela enzima.

Aumenta a taxa de contração, aumenta a frequência cardíaca (efeito cronotrópico positivo), devido a permeabilidade para o influxo de sódio e cálcio, há um aumento na despolarização, a fase de repouso para células cardíacas está prolongado.

Atua sobre os receptores β_2 causando vasodilatação, a pressão diastólica cai, o débito cardíaco eleva-se em consequência do retorno venoso, o débito cardíaco é exacerbado pela ação inotrópica positiva e pela ação cronotrópica positiva.

Ativando β_2 causa relaxamento da musculatura lisa. Estimulando β_1 , ativa a lipase pela ação de AMPc, com degradação de triglicerídeos em glicerol mais ácido graxo. Glicogenólise no fígado aumento com estímulo de β_2 que determina a liberação de glicose na circulação, causando hiperglicemia.

O Isoproterenol é muito empregado em estudos de hipertrofia miocárdica. Os estudos de Framingham (Marcus Vinicius Simões, André Schmidt. Hipertensão arterial como fator de risco para doenças cardiovasculares. Medicina, Ribeirão Preto, 29: 214-219, abr./set. 1996.) conferiram à hipertrofia miocárdica papel de indicador de risco de morbimortalidade cardiovascular de grande relevância, talvez, até maior que os fatores de risco tradicionais, como tabagismo, dislipidemiase hipertensão arterial sistêmica. A hipertrofia miocárdica induzida pelo ISO não é homogênea. Alguns corações têm alterações pouco expressivas; outros têm comprometimento das funções sistólica e diastólica. A hipertrofia miocárdica reduz a capacidade de gerar força e aprimora a capacidade em variar pressão por aumento da relação massa/volume. Há também, comprometimento da complacência ventricular e da rigidez muscular. Paulo J.F.Tucci (2001).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar possível interação entre o SRA e o S. Adrenérgico na atividade cardiovascular de ratos Wistar e TGR(A1-7)3292.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito da Ang (1-7) sobre a tensão sistólica;
- Avaliar o efeito potencializador da Ang-(1-7) sobre o aumento da tensão sistólica em corações isolados de ratos Wistar tratados com Isoproterenol;
- Avaliar o efeito potencializador da Ang-(1-7) sobre o aumento da tensão sistólica em corações isolados de ratos TGR (A1-7)3292 que super-expressam Ang-(1-7) e tratados com Isoproterenol;
- Avaliar *in vivo* a interação entre a Ang-(1-7) e o Isoproterenol nas funções cardiovasculares, através do EcoCardiograma;
- Avaliar a interação da Ang-(1-7) e o Isoproterenol sobre a concentração intracelular de Calcio e de AMPc em cardiomiócitos de ratos recém-natos, através da citometria de fluxo;
- Avaliar a interação da Ang-(1-7) e o isoproterenol na concentração intracelular de cálcio em cardiomiócitos de ratos adultos, através da técnica do Confocal.

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar, provenientes do CEBIO, ratos Sprague Dawley (SD) e ratos transgênicos da linhagem [TGR(A1-7)3292, com idades de 12-14 semanas, pesando 280-300g, em grupos com N=5, provenientes do Biotério de Animais Transgênicos do Laboratório de Hipertensão - Departamento de Fisiologia e Biofísica – ICB-UFMG. Os ratos TGR(A1-7)3292 são caracterizados por apresentarem um aumento crônico nos níveis circulantes de Ang-(1-7). Santos et al, (2004). Os procedimentos utilizados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal – CETEA - UFMG.

3.2 Medidas da tensão sistólica em sistema de Langendorff para perfusão cardíaca

3.2.1 Procedimentos de eutanásia e coleta do coração

Foi administrada uma dose do anticoagulante heparina (100 UI/Kg) por via intraperitoneal, 10 minutos antes do sacrifício por decapitação em guilhotina. O bloco coração-pulmões foi exposto por toracotomia bilateral realizada através de secção das costelas bilateralmente. Após secção dos vasos da base do coração, o mesmo foi removido e colocado imediatamente em uma placa de Petri contendo solução de Krebs-Ringer (Tabela 1) a 4°C, aerada com mistura carbogênica (95% de O₂ + 5% de CO₂). A

redução da temperatura faz-se necessária para se reduzir o metabolismo cardíaco e o consumo de O_2 antes do procedimento de canulação.



Figura. 4 Ilustração de um coração isolado acoplado, pela aorta, a um sistema de Langendorff.

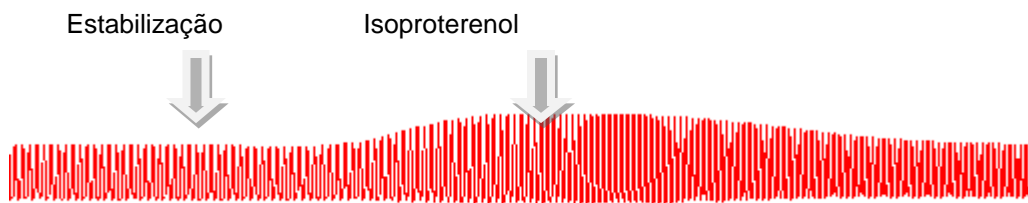


Figura 5. Aspecto do registro das tensões durante o experimento e sua variação com a aplicação das drogas.

TABELA 1. Composição da solução de Krebs-Ringer

agentes	Quantidade (g)	Concentração (mM)
NaCl	138,4	118,41
CaCl_2	7,0	4,69
K_2HPO_4	3,2	1,17
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5,8	1,17
$\text{NaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7,4	2,51
glicose anidra	2,1	11,65

NaHCO_3	2,2	26,24
água deionizada (q.s.p. ¹)	1000mL	

Fonte: Extraído de Ferreira, Dissertação de Mestrado, 2001.

3.2.2 Montagem do coração no sistema de Langendorff

O sistema de perfusão consiste em uma coluna de vidro (90 cm de altura e 12 mm de diâmetro interno) envolta por uma jaqueta de água aquecida a uma temperatura constante de $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$. A coluna de vidro interna foi acoplada a um reservatório de solução de Krebs-Ringer cujo ajuste gravimétrico proporcionava uma pressão de perfusão constante de 75 mmHg durante todo o período experimental. Além disso, durante todo o período experimental a solução utilizada na perfusão cardíaca foi aerada com mistura carbogênica. A perfusão cardíaca se deu de modo retrógrado, através da canulação da aorta proximal.

3.2.3 Registros da tensão sistólica

Após a canulação da aorta e montagem no sistema de Langendorff, foi utilizado um transdutor de tensão isométrica (Grass[®], modelo FT03) para registro da tensão sistólica. A conexão entre o transdutor de tensão e o ápice do coração se deu através de um sistema mecânico de roldanas (Fig.4). Os registros analógicos de tensão foram enviados a um sistema de amplificação e conversão analógico-digital (Biopac System[®], Santa Barbara, USA) acoplados a um computador. A aquisição dos dados e análise dos mesmos foi realizada pelo software Acknowledge[®]. Foi aplicada uma tensão diastólica basal de 1g, sendo permitidos 30 minutos para estabilização da preparação.

¹ q.s.p. – quantidade suficiente para.

3.3 Protocolo experimental

Após o período de estabilização, foram aplicadas diferentes drogas e o percentual de alteração na tensão sistólica foi avaliado. As drogas foram administradas *in bolus* através de uma cânula acoplada ao sistema de Langendorff, ou em infusão contínua, na solução de Krebs- Ringer. Os registros foram analisados a cada 15 segundos. (figura 5).

Isoproterenol: Aplicado *in bolus*, num volume de 200µl, diluído a 10⁻⁵M, em solução de Krebs-Ringer, lateralmente à canulação da aorta.

Ang-(1-7): Após a 1^a dose do isoproterenol, estabilização por 20 min. Inicia-se, então, infusão contínua de uma solução a 0.22nM de Ang-(1-7), por 10min. Após este tempo, aplica-se um 2^o *bolus* de isoproterenol.

A-779: Aplicado na diluição 50 ng/ml (0,057nM), em Krebs-Ringer, em perfusão contínua, inicialmente; depois de 15min, a mesma solução acrescentada da Ang-(1-7), a 0,22 nM.

Atenolol: *Bolus* de 200µl, (200µg), em solução de Krebs-Ringer, lateralmente, antes do 2^o *bolus* de isoproterenol.

3.4 Confocal

3.4.1 Isolamento de miócitos ventriculares

Cardiomiócitos ventriculares de ratos Wistar adultos foram isolados segundo Guatimosim *et al.*, (2001), com poucas modificações. Basicamente, o coração foi rapidamente removido e retro-perfundido via método de Langendorff com solução de Tyrode modificada livre de Ca^{2+} (em mM: NaCl, 130; KCl, 5,4; HEPES, 25; MgCl_2 , 1; NaH_2PO_4 , 0,33; ácido láctico, 1; piruvato de sódio, 3; glicose, 22, suplementada com 10U/L de insulina, pH 7,4) acrescida de EGTA 10mM. Posteriormente, o coração foi perfundido com solução Tyrode contendo 50 μM de CaCl_2 e colagenase (tipo 2 – 1mg/mL). Após a etapa de digestão química, o órgão foi submetido à digestão mecânica e filtrado para remoção do tecido não digerido. A concentração extracelular de Ca^{2+} foi aumentada após três ciclos de centrifugação e troca de tampão, chegando a 500 μM ao final do processo.

3.4.2 Transiente de Cálcio

A aquisição de imagens e medida da concentração intracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) no miócito cardíaco foi realizada utilizando o microscópio confocal Zeiss 510 Meta (CEMEL, ICB, UFMG), na configuração *line-scan*, com o intuito de obter informações sobre a amplitude e a cinética do transiente de Ca^{2+} , conforme descrito por Guatimosim *et al.*, (2001). O estímulo dado corresponde a 1,0 Hz, com um pulso quadrado de

duração de 5ms e 30V. Inicialmente, os cardiomiócitos foram incubados por 30 min com a sonda Fluor-4, AM, (5 μ mol/L), sensível à concentração de cálcio. Os cardiomiócitos devidamente aderidos a uma lamínula foram transferidos para um sistema de perfusão no microscópio confocal e mantidos em solução de Tyrode, à temperatura ambiente. O mesmo miócito cardíaco foi avaliado quanto ao seu transiente de Ca²⁺ na presença de isoproterenol (10nM), Ang-(1-7) (10nM) e das duas drogas em conjunto. Inicialmente, foi gravado o transiente do cardiomiócito em solução de Tyrode. Após perfusão por 2 min da solução de Isoproterenol (10nM), foi gravado novamente o transiente de Ca²⁺ dessa célula. A Ang-(1-7) foi perfundida nesse mesmo intervalo de tempo (2 min) e logo após foi avaliada a resposta da célula a esse peptídeo por meio do transiente. Por fim, foi perfundido uma solução contendo Isoproterenol e Ang-(1-7) por 2 min e novamente o transiente foi gravado.

3.5 Citometria de fluxo

3.5.1 Protocolos para realização de Culturas primárias de Células

Os ensaios foram realizados em triplicatas, com N=6, provenientes de diferentes culturas celulares. As culturas foram produzidas a partir de filhotes neonatos de um dia.

Na Citometria de Fluxo, temos um *N* de 30.000 células o que nos dá confiabilidade e significância altíssimas. Para controle positivo, utilizamos a taspigargina, que causa a depleção de todo o cálcio reticular.

Concentrações utilizadas por tratamento:

- Angiotensina (1-7) 10⁻⁵M
- Isoproterenol 10⁻⁵M

- Tapsigargina 10^{-5} M

Células provenientes de culturas primárias de animais Sprague-Dawley:

A- Protocolo de Preparação de DEMEN (pH 7,2):

Material necessário:

- 1 frasco de DEMEN
- 1,2g Bicarbonato de Sódio
- Água Milli-Q q.s.p. para 1L.

Para acertar o pH, utilizar HCl 1M e NaOH.1M.

Após preparação, filtrá-la à vácuo em filtro e membrana (0,22 μ) estéreis, dentro do Fluxo. Armazenar em recipiente estéril, a -4°C .

B - Protocolo de preparação de ADS 1X (pH 7,35):

Material necessário:

- 6,8 g de NaCl;
- 4,76g de Hepes;
- 0,138g de Na_2HPO_4 ;
- 1,0g de D-Glucose;
- 0,4g de KCl;
- 0,195g de MgSO_4 ;
- Água Milli-Q q.s.p. para 1,0 L de solução;
- Béquer 1,0 L;
- Proveta 1,0 L;

- Bastão de vidro;
- Vidro de tampa azul estéril.

Após preparação, filtrá-la à vácuo em filtro e membrana (0,22 μ) estéreis, dentro do Fluxo. Armazenar em recipiente estéril a - 4°C.

C - Protocolo para preparação de BRDU [10^{-2}] (Inibidor de fibroblasto), PM=307,11:

Material necessário:

- 0,5g de BRDU;
- 162,86 mL de água Milli-Q.
- Béquer 250,0 mL;
- Proveta 500,0 mL;
- Pipeta 1,0 mL;
- Falcon estéril.

Após preparação, filtrá-la à vácuo em filtro e membrana (0,22 μ) estéreis, dentro do Fluxo. Armazenar em recipiente estéril, a - 20°C.

D - Protocolo para preparação de meio de cultura, para 50,0 ml:

Material necessário:

- 42,5 mL de DEMEN;
- 5,0 mL de soro de cavalo (HS – 10%);
- 2,5 mL de soro fetal bovino (SFB – 5%);
- 50,0 μ L de BRDU (0,1 %);

- 0,5 mL de penicilina/estreptomicina
- Pipetas de 5,0 mL;
- Provetas 50,0 mL e 100,0 mL;
- Filtro 0,22 μ .

Após preparação, que será feita no próprio recipiente do filtro, filtrar a solução à vácuo em filtro e membrana estéreis, dentro do Fluxo. Armazenar em recipiente estéril, a -4°C.

E - Protocolo de preparação de gelatina 0,1%:

Usada para fixação (aderência das células na placa).

Material necessário:

- 0,25g de gelatina (incolor em pó);
- 250,0 mL de água milli-Q.
- Proveta 250,0 mL;
- Filtro de seringa 0,22 μ ;
- Placa 24 *wells*.

Aquecer a solução em banho-maria (40°C) até que a gelatina esteja dissolvida. Após a dissolução, dentro do Fluxo, recolher a solução com a seringa e filtrá-la diretamente na placa, três gotas por *well* (24 *wells*). Manter a placa devidamente fechada no Fluxo durante 24 horas para a secagem.

F - Protocolo preparação da Solução Tampão de Digestão:

Material necessário:

- 10,0 mg de Colagenase tipo II;
- 30,0 mg de Pancreatina;
- 50,0 ml de ADS 1X estéril;
- Falcons estéreis 50,0 mL;
- Filtro de seringa 0,22 μ .

Transferir para o Falcon os reagentes devidamente pesados, acrescentar ADS q.s.p. 50,0 ml. Filtrar a solução para outro Falcon, e mantê-la em banho-maria a 37°C até que seja utilizada no experimento.

Obs.: Esta solução deverá ser preparada no dia da utilização, pois não pode ser armazenada.

3.5.2 - Protocolo de digestão e cultura primária dos cardiomiócitos de ratos neonatos:

Material necessário:

- Tesoura e pinça estéreis
- ADS 1X
- Solução Tampão de digestão (Preparada no momento da extração)
- Falcons de 15,0 e 50,0 mL (estéreis)
- Soro Fetal Bovino

- Meio de cultura NORMAL (estéril)
- Meio de cultura NORMAL + tratamentos (se houver)
- Placas de petri (estéreis)
- Béquer
- Placa de cultura com gelatina previamente preparada
- Álcool 70%

Obs.: Todos os materiais devem estar estéreis, os meios e soluções também e, devem-se manter as soluções a 37°C, em banho-maria.

Procedimento:

1. Preparar a Solução Tampão de Digestão antes de iniciar o experimento.
2. No fluxo laminar, mergulhar os animais, um de cada vez, em álcool 70% para esterilização; em seguida decapitá-los com a tesoura, e, com a mesma, abrir o tórax para retirar o coração.
3. Transferir os corações para uma das placas de petri com ADS 1X. Cortar os ventrículos, os quais serão utilizados.
4. Após a retirada de todos os corações, transferi-los para um falcon contendo 6mL de tampão de digestão.
5. Agitar delicadamente durante 10 minutos em banho-maria 37°C, descartar o tampão.
6. Acrescentar mais 6 mL do mesmo tampão e agitar delicadamente durante 20 minutos em banho-maria 37°C, o sobrenadante deverá ser transferido para um falcon de 15 ml contendo 1ml de soro fetal bovino, que serve para paralisar a reação de digestão.
7. O procedimento 6 deverá ser realizado por três vezes.

8. Centrifugar os três falcons por 5 minutos à 1020 RPM; descartar o sobrenadante e ressuspender no meio de interesse e plaquear as células em placas de cultura com gelatina, colocar a cultura na estufa 37°C e CO₂ (5%).

9. As culturas devem crescer.

3.5.3 - Protocolo de Determinação do Ca²⁺ intracelular por Citometria de Fluxo

Material necessário:

- ADSX1
- Triplex (solução pronta para uso)
- Fluo-4AM (solução pronta para uso Invitrogen)

Procedimento:

1. Preparar as culturas conforme o protocolo padrão de digestão.
2. Após 48h de incubação, soltar as células da placa com triplex.
3. As células devem ser lavadas com 1,0 ml de ADS1X três vezes.
4. Transferi-las para falcons de 15mL e centrifugar a 1020rpm/10'.
5. Ressuspende-las em ADSX1 e dividi-las em eppendorfs (1,0 ml).
6. Adicionar a cada eppendorf 5µL de fluo-4 AM. Colocar os eppendorfs em banho maria 37°C/30 min, tempo necessário para incorporação da sonda.
7. Após 30min, centrifugar as células novamente e ressuspender em 1,5ml de ADSX1. Em seguida, transferi-las para os tubos de leitura.
8. Adicionar o tratamento imediatamente antes da leitura no citrômetro de fluxo – FACScalibur da BD.

3.5.4 - Protocolo: AMPc

A concentração de AMPc foi determinada com o uso de kits AMERSHAM (ensaio imunoenzimático de competição AMPc Biotrak EIA System, code: RPN225).

Dados AMPc

Os ensaios foram realizados em triplicatas, com N=6, provenientes de diferentes culturas celulares.

As culturas foram produzidas a partir de filhotes neonatos de um dia.

Concentrações utilizadas por tratamento:

- Angiotensina (1-7) 10^{-5} M
- Isoproterenol 10^{-5} M

4. ECOCARDIOGRAMA

Foram utilizados dois grupos de ratos Wistar, com pesos entre 200 e 250g, com 5 animais em cada grupo.

No 1º grupo foram aplicados, no momento 1, 100µl de salina, no momento 2, 100 µl de Isoproterenol e no momento 3, nova dose de Iso.

No grupo 2: no momento 1 – salina; no momento 2, 100 µl de Ang-(1-7) e no momento 3, 100µl de Iso.

Os animais foram submetidos a exame ecocardiográfico transtorácico sob anestesia, com Uretana (1,4 mg/Kg). A morfologia e função cardíaca in vivo foram avaliados

utilizando uma forma não invasiva, de alta frequência, o sistema de ecocardiografia de alta resolução, que consiste de uma máquina de ultra-som Vevo 2100 equipado com 16-40 MHz (Visual Sonics, Toronto, Canadá). Morfologia e função cardíaca foram avaliados utilizando ultrassonografia de alta resolução, com um sistema Vevo 2100 equipado com transdutores de 16 a 40 MHz (Visual Sonics, Toronto, Canadá). Após indução anestésica, os ratos foram colocados em posição supina em uma mesa equipada, onde foram submetidos a tricotomia do tórax e abdomen. A mesa está equipada com eletrodos para monitorização com eletrocardiograma e sistema de aquecimento para manutenção da temperatura corporal em 37 ° C. Imagens de alta resolução foram obtidos em posição paraesternal direita e esquerda e foram obtidas imagens do eixo longo, eixo curto e apicais. As imagens registradas e os cálculos foram realizados de acordo com as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia. As seguintes medidas foram realizadas em Modo-M: as dimensões internas do VE, em diástole e sístole (LVIDd e LVIDs respectivamente), espessura da parede posterior do VE (PPVE) e septo interventricular (SIV) na diástole e sístole. A partir dessas medidas foram calculados os volumes diastólico final e sistólico final (VDF e VSF), fração de encurtamento (FS), fração de ejeção (FE) do VE, o volume de ejeção (SV), o débito cardíaco (CO) foram derivados). Tempo de relaxamento isovolumétrico e tempo de ejeção aórtica foram adquiridas a partir do espectro Doppler do fluxo aórtico. Além disso, Foram avaliados utilizando software Vevostrain, a partir da imagem longitudinal, parasternal esquerda, velocidade, deslocamento, deformação e taxa de deformação em regiões específicas do miocárdio. Foi canulada a veia femoral e injetados 100µl de salina, no 1º momento, e registrados os parâmetros cardiovasculares. No 2º momento, no 1º grupo, foi injetado o isoproterenol e, novamente registrados os dados cardiovasculares. No 3º momento, ainda no 1º grupo, foi repetida a injeção de isoproterenol. Os intervalos foram de 5 minutos entre cada injeção. No 2º grupo: salina no 1º momento, ang-(1-7) no 2º momento e isoproterenol no 3º momento. *Bolus* de 100µl Ang-(1-7) na dose de 2,5nmol/Kg. *Bolus* de 100µl de Isoproterenol na concentração de 1µg/Kg. O efeito do Isoproterenol, na 2ª vez no 1º grupo ou após a

Ang-(1-7) no 2º grupo, foi observado por 15 min aproximadamente. Foram então registrados os dados cardiocirculatórios de cada animal, em cada momento.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média±EPM de pelo menos 5 experimentos diferentes. Os dados obtidos em cada tempo pré-determinado com os diferentes grupos foram expressos como percentual de aumento em relação ao período de estabilização. A análise estatística foi realizada utilizando-se o software GraphPad Prism® (versão 4.0). Os dados foram comparados pelo teste Two way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Foram considerados significativos os valores para $p < 0,05$.

Resultados

6. RESULTADOS

Após uma curva dose-resposta com o isoproterenol nas concentrações de 10^{-5}M , 10^{-7}M e 10^{-12}M escolheu-se a concentração de 10^{-5}M , por apresentar o melhor resultado. (**Figura 6**). Esta concentração induziu bom efeito inotrópico positivo, seguido de um efeito inotrópico negativo (**Figura 6**). As concentrações mais baixas não induziram alteração na frequência cardíaca (dados não mostrados).

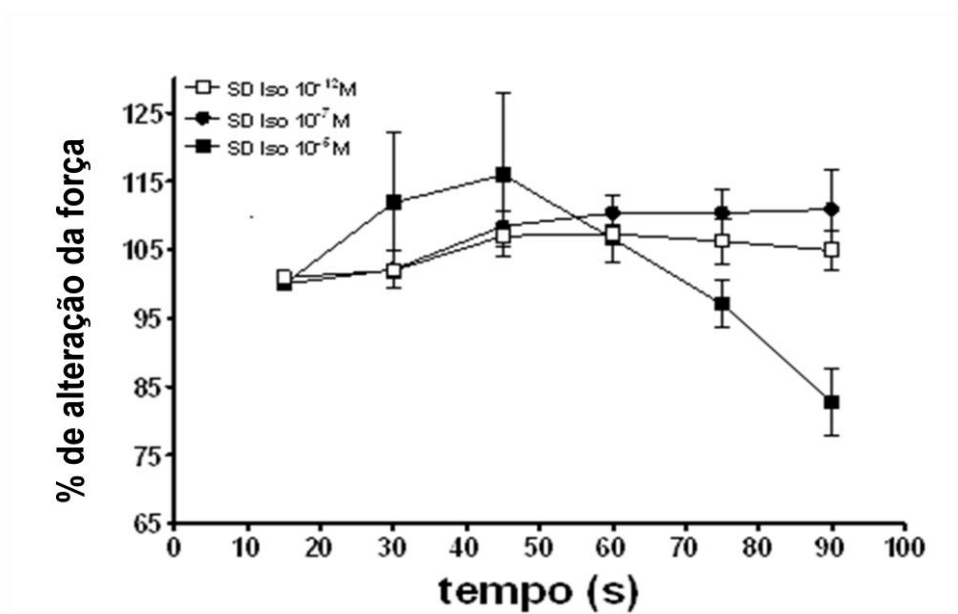


Figura 6. Efeito da administração *in bolus* de isoproterenol nas concentrações de 10^{-12}M , 10^{-7}M e 10^{-5}M sobre a tensão sistólica em corações isolados de ratos SD. Os resultados foram expressos como percentual de aumento em relação ao estado basal e apresentados como média \pm EPM de 5 experimentos.

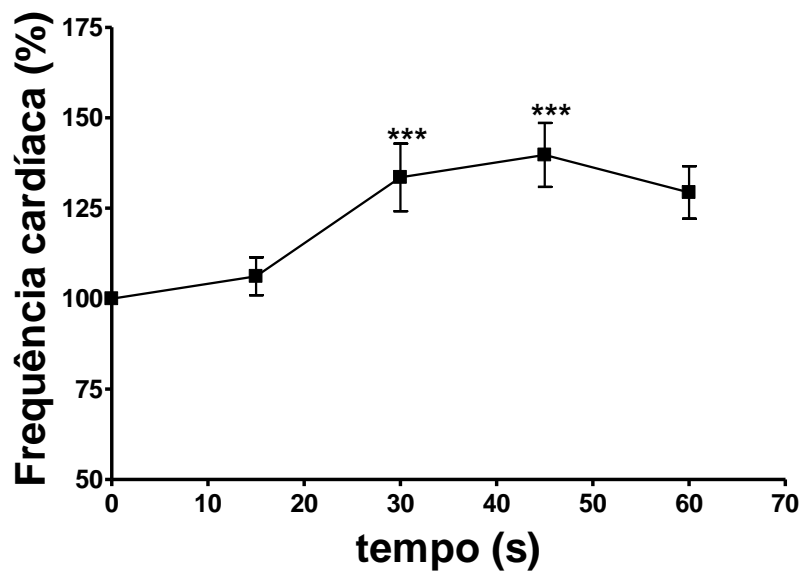


Figura 7. Efeito da administração *in bolus* de isoproterenol (Iso 10^{-5} M) sobre a frequência cardíaca em corações isolados de ratos Wistar. Os resultados foram expressos como percentual de aumento em relação ao estado basal e apresentados como média \pm EPM de 5 experimentos.

Vimos que a pré-infusão de Ang-(1-7) (0,22nM) potencializou o aumento da tensão sistólica induzida pelo isoproterenol nas concentrações de 10^{-12} M (**Figura 8**), 10^{-7} M (**Figura 9**) e, de maneira mais pronunciada, na concentração de 10^{-5} M (**Figura 10**). A infusão somente da Ang-(1-7) (0,22nM) não induziu qualquer alteração na tensão sistólica (**Figura 11**), sugerindo que a Ang-(1-7) apenas potencializa a estimulação β -adrenérgica pelo isoproterenol.

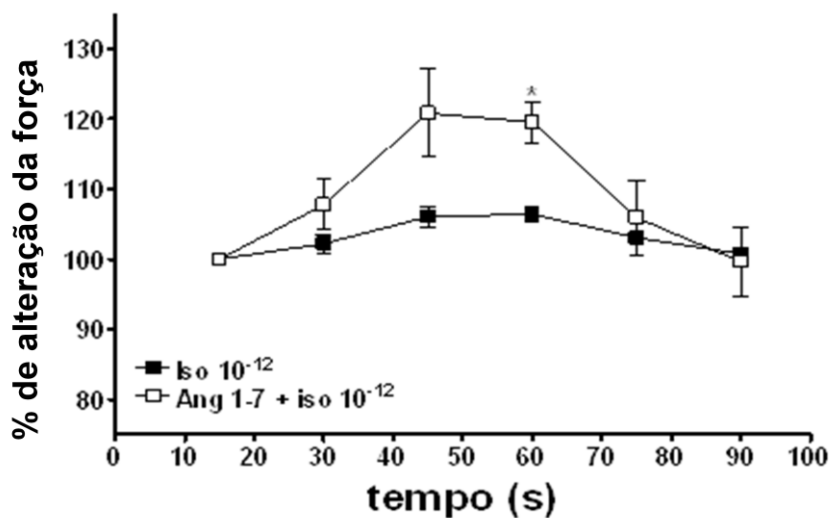


Figura 8. Efeito do pré-tratamento com 0,22 nM Ang-(1-7) sobre os efeitos de 10^{-12} M de isoproterenol (Iso) na tensão sistólica em corações isolados de ratos SD. Os resultados foram expressos como percentual de aumento em relação ao estado basal e apresentados como média \pm EPM de 5 experimentos.

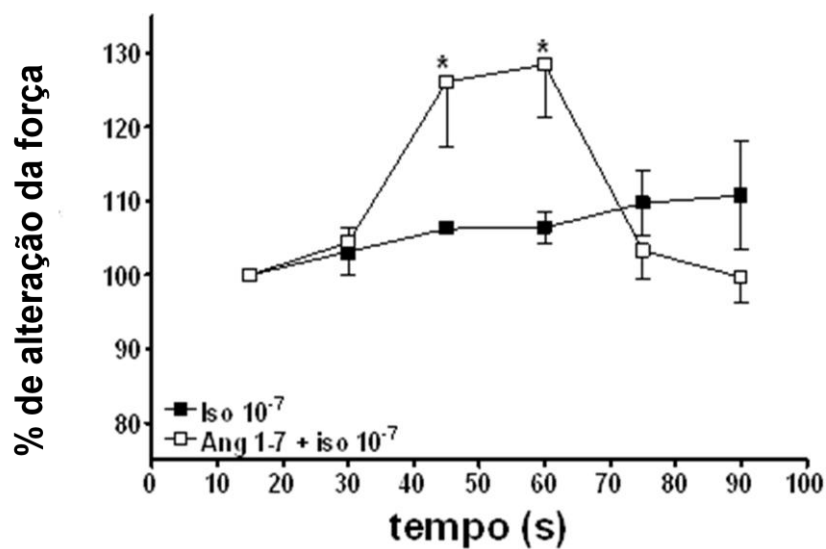


Figura 9. Efeito do pré-tratamento com 0,22 nM Ang-(1-7) sobre os efeitos de 10^{-7} M de isoproterenol (Iso) na tensão sistólica em corações isolados de ratos SD. Os resultados foram expressos como percentual de aumento em relação ao estado basal e apresentados como média \pm EPM de 5 experimentos.

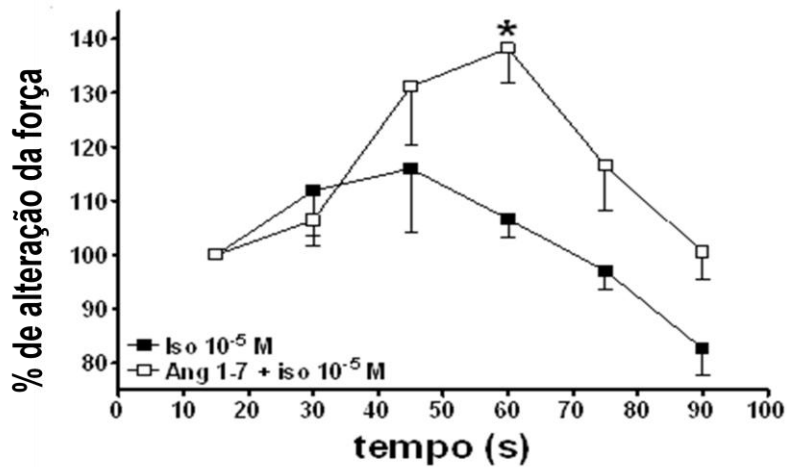


Figura 10. Efeito do pré-tratamento com 0,22 nM Ang-(1-7) sobre os efeitos de 10^{-5} M de isoproterenol (Iso) na tensão sistólica em corações isolados de ratos SD. Os resultados foram expressos como percentual de aumento em relação ao estado basal e apresentados como média±EPM de 5 experimentos.

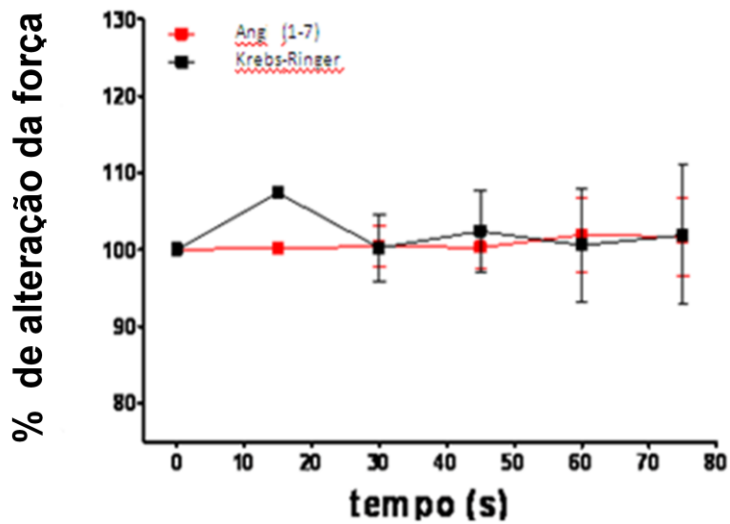


Figura 11. Efeito da administração de Ang-(1-7) 0,22 nM sobre a tensão sistólica em corações isolados de ratos SD. Os resultados foram expressos como percentual de aumento em relação ao estado basal e apresentados como média±EPM de 5 experimentos.

O bloqueio dos receptores β 1-adrenérgicos com o atenolol (infusão *in bolus* de 300 μ L de 3×10^{-5} M) impediu a potencialização do efeito do isoproterenol (10^{-5} M) pela Ang-(1-7) (**Figura 12**). Este dado sugere, mais uma vez, que há dependência da ativação β -adrenérgica no efeito potencializador da tensão sistólica pela Ang-(1-7).

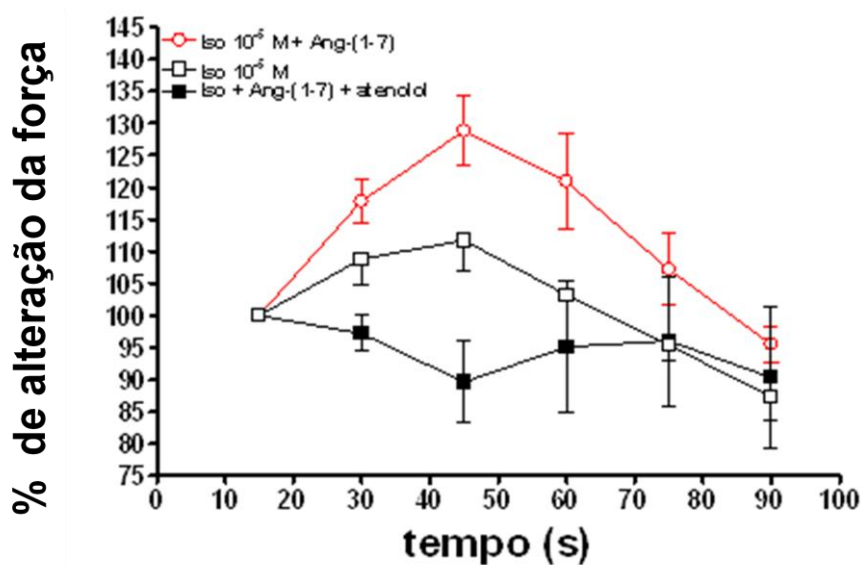


Figura 12. Efeito do antagonismo dos receptores β 1-adrenérgicos com atenolol (infusão *in bolus* de 200 μ L(200 μ g) sobre a potencialização do efeito do isoproterenol (10^{-5} M) pela administração de Ang-(1-7) 0,22 nM em corações isolados de ratos SD. Os resultados foram expressos como percentual de aumento em relação ao estado basal e apresentados como média \pm EPM de 5 experimentos.

Para se confirmar que o efeito potencializador da Ang-(1-7) sobre o aumento da tensão sistólica induzido pelo isoproterenol, foi utilizado o antagonista do receptor Mas, o A779. O A779 (2 nM) foi capaz de bloquear o efeito potencializador da Ang-(1-7) sobre o aumento da contração induzido pelo isoproterenol (**Figura 13**), sugerindo a participação do receptor Mas neste efeito.

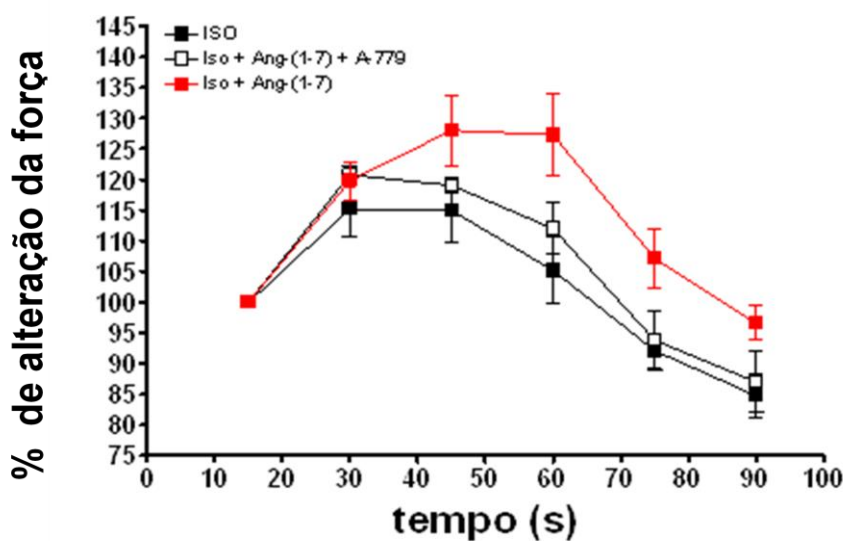


Figura 13. Efeito do antagonismo dos receptores Mas com o A779 (50 ng/ml, em Krebs-Ringer, em perfusão contínua) sobre o aumento da tensão sistólica induzida pelo isoproterenol (10^{-5} M) + Ang-(1-7) 0,22 nM em corações isolados de ratos SD. Os resultados foram expressos como percentual de aumento em relação ao estado basal e apresentados como média \pm EPM de 5 experimentos.

Os dados até o momento nos sugerem fortemente que a Ang-(1-7) potencializa o efeito inotrópico positivo do isoproterenol. Contudo, os resultados mostrados anteriormente nos fornecem informações apenas sobre os efeitos agudos da administração da Ang-(1-7). Os efeitos crônicos da Ang-(1-7) sobre a estimulação β -adrenérgica cardíaca não foram até então avaliados. Para tal, utilizamos corações isolados de ratos TGR (A1-7)3292, que super-expressam a Ang-(1-7).

Os corações isolados de ratos TGR (A1-7)3292 não apresentaram diferenças importantes no aumento da tensão sistólica induzida pelo isoproterenol quando comparados ao animais SD, em qualquer das concentrações estudadas.

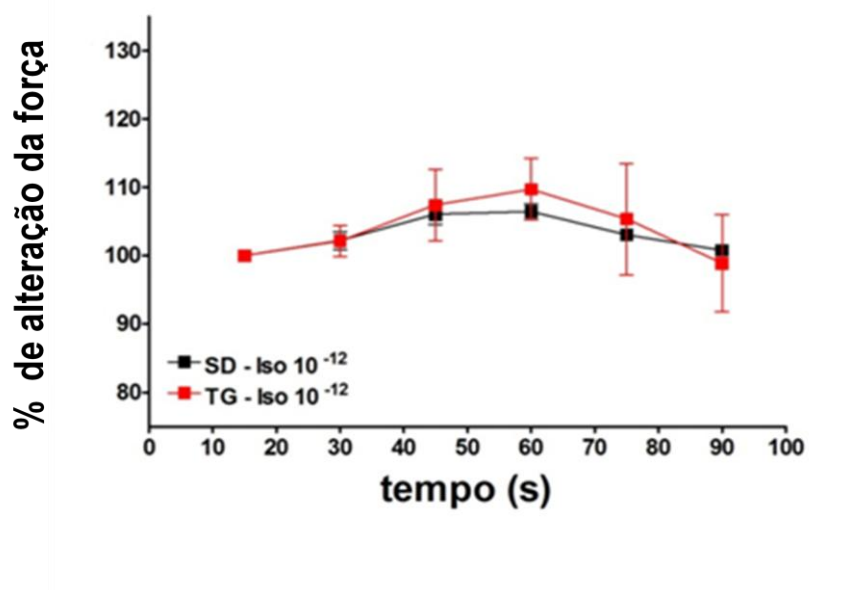


Figura 14. Efeito da administração *in bolus* de isoproterenol (Iso; 10^{-12} M) sobre a tensão sistólica em corações isolados de ratos SD e de ratos TGR(A1-7)3292 . Os resultados foram expressos como percentual de aumento em relação ao estado basal e apresentados como média±EPM de 5 experimentos.

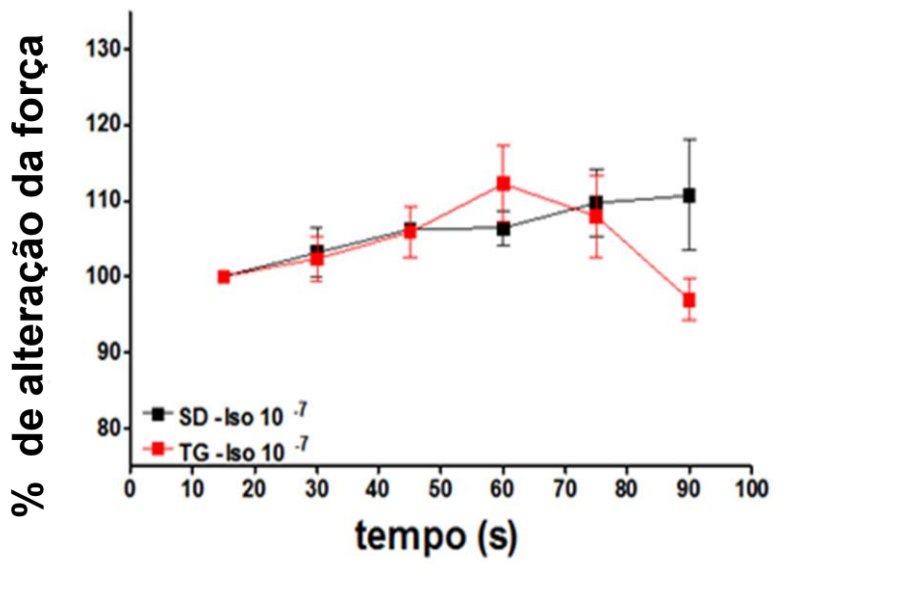


Figura 15. Efeito da administração *in bolus* de isoproterenol (Iso; 10^{-7} M) sobre a tensão sistólica em corações isolados de ratos SD e de ratos TGR(A1-7)3292 . Os resultados foram expressos como percentual de aumento em relação ao estado basal e apresentados como média±EPM de 5 experimentos.

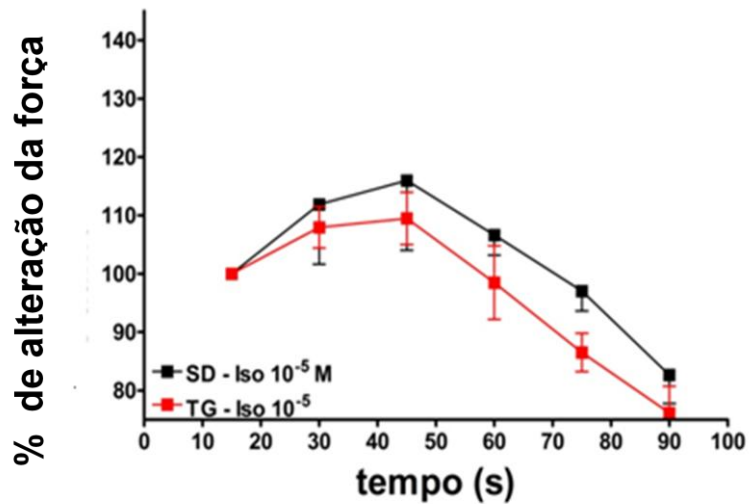


Figura 16. Efeito da administração *in bolus* de isoproterenol (Iso; 10^{-5} M) sobre a tensão sistólica em corações isolados de ratos SD e de ratos TGR(A1-7)3292 . Os resultados foram expressos como percentual de aumento em relação ao estado basal e apresentados como média \pm EPM de 5 experimentos.

Da mesma forma, a administração de 0,22nM de Ang-(1-7) nos corações dos ratos TGR(A1-7)3292 potencializa o efeito inotrópico positivo do isoproterenol nas concentrações de 10^{-12} M (**Figura 8**) e 10^{-7} M (**Figura 9**), tal qual a concentração de 10^{-5} M (**Figura 10**).

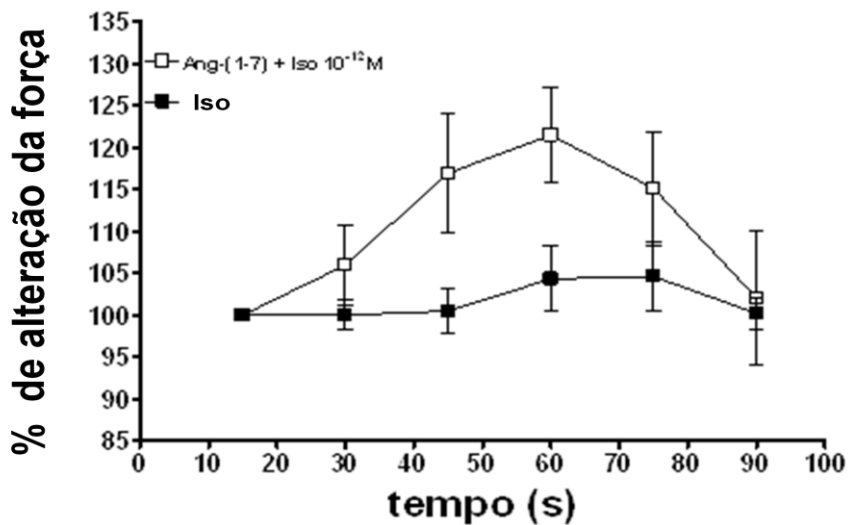


Figura 17. Efeito de 0,22 nM de Ang-(1-7) sobre o aumento da tensão sistólica induzido por 10^{-12} M de isoproterenol em corações isolados de ratos TGR(A1-7)3292. Os resultados foram expressos como percentual de aumento em relação ao estado basal e apresentados como média±EPM de 5 experimentos.

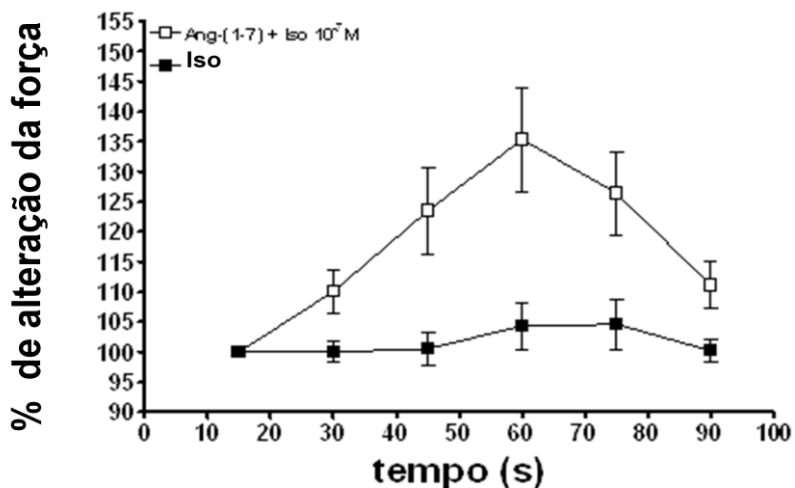


Figura 18. Efeito de 0,22 nM de Ang-(1-7) sobre o aumento da tensão sistólica induzido por 10^{-7} M de isoproterenol em corações isolados de ratos TGR(A1-7)3292. Os resultados foram expressos como percentual de aumento em relação ao estado basal e apresentados como média±EPM de 5 experimentos.

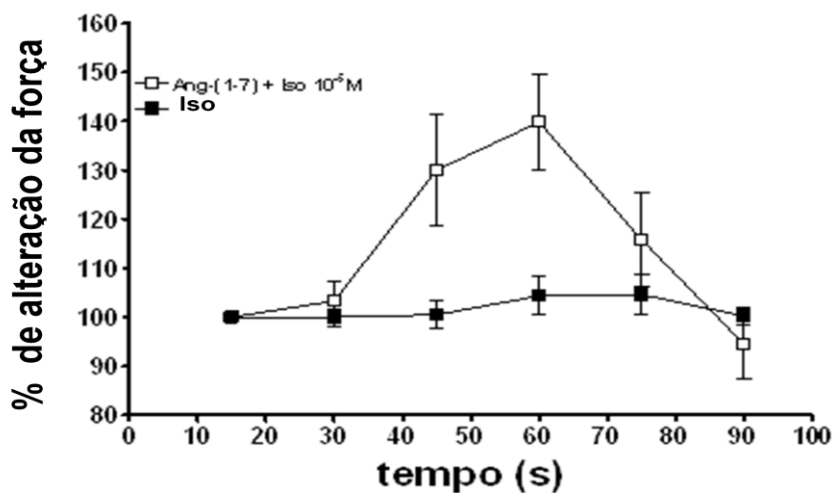


Figura 19. Efeito de 0,22 nM de Ang-(1-7) sobre o aumento da tensão sistólica induzido por 10^{-5} M de isoproterenol em corações isolados de ratos TGR(A1-7)3292. Os resultados foram expressos como percentual de aumento em relação ao estado basal e apresentados como média±EPM de 5 experimentos.

Em ratos Wistar

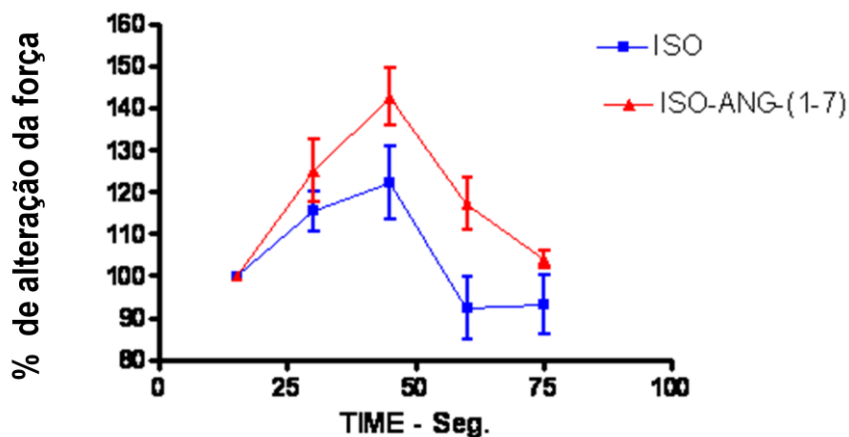
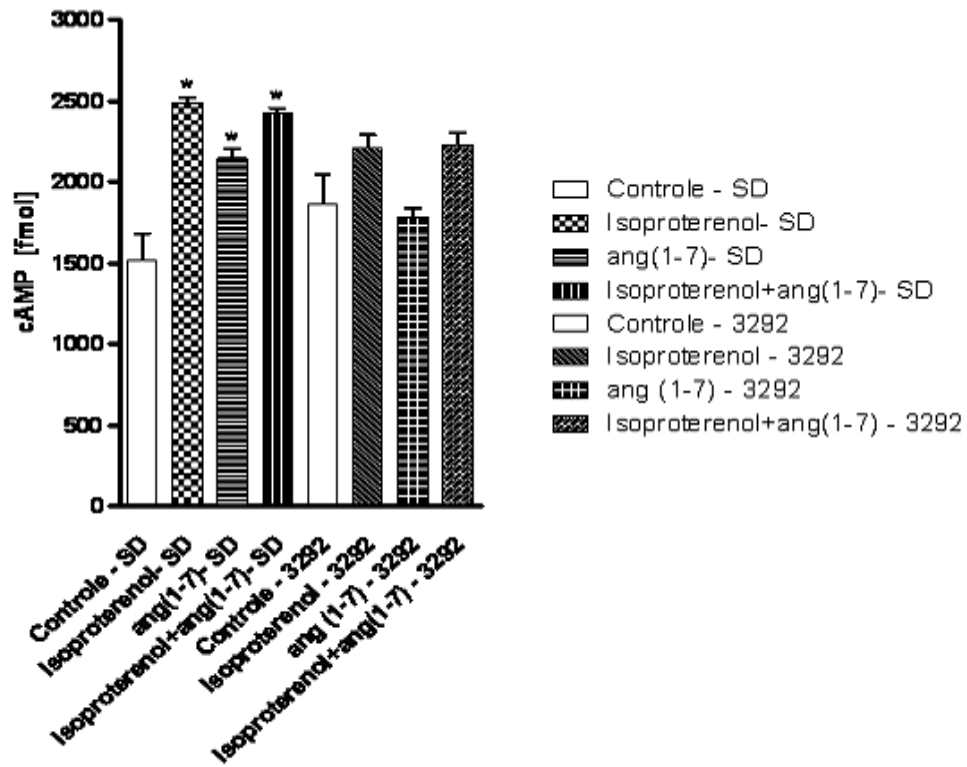


Figura 20. Efeito da Ang-(1-7) (0,22 nM) sobre o aumento da tensão sistólica induzido por isoproterenol (10^{-5} M) em corações isolados de ratos Wistar. Os resultados foram expressos como percentual de aumento em relação ao estado basal e apresentados como média±EPM de 5

experimentos. * $p < 0,05$. Observa-se, também aqui, incremento da força induzida pelo ISO em presença da Ang-(1-7).

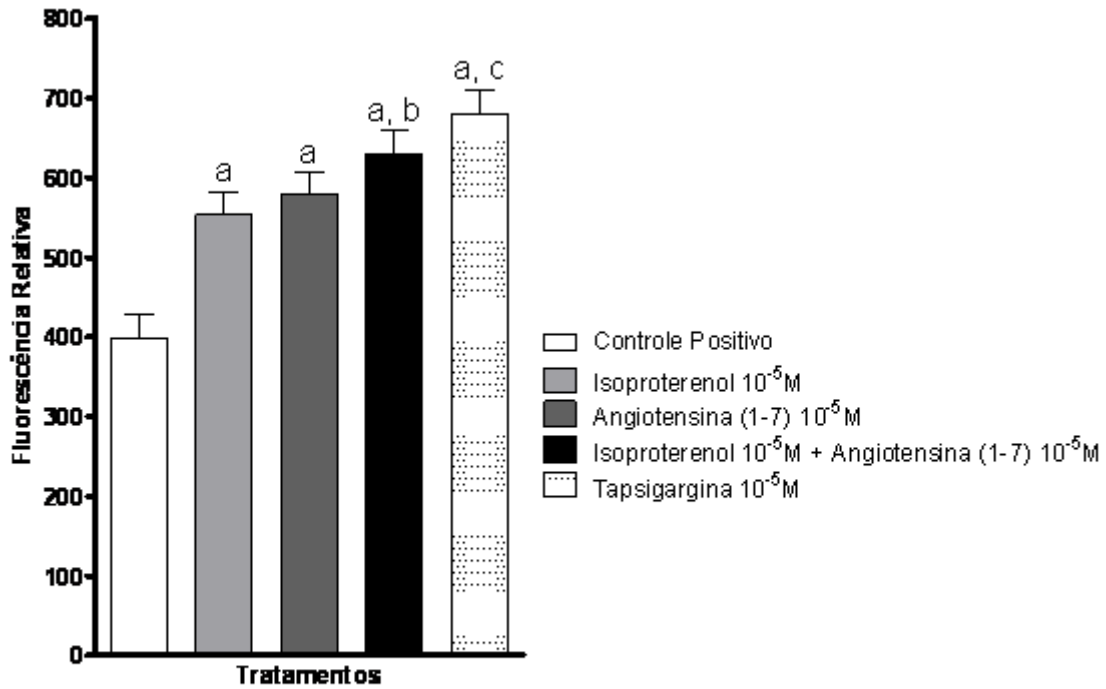
Expressão de AMPc



* : Estatisticamente diferente do controle SD . $P \leq 0,05$.

Figura 21. Liberação de AMPc, após estímulos com isoproterenol e Ang-(1-7), em cardiomiócitos de ratos Sprague-Dawley recém-natos e TGR(A-1-7) 3292.

Transientes da Cálcio em animais SD



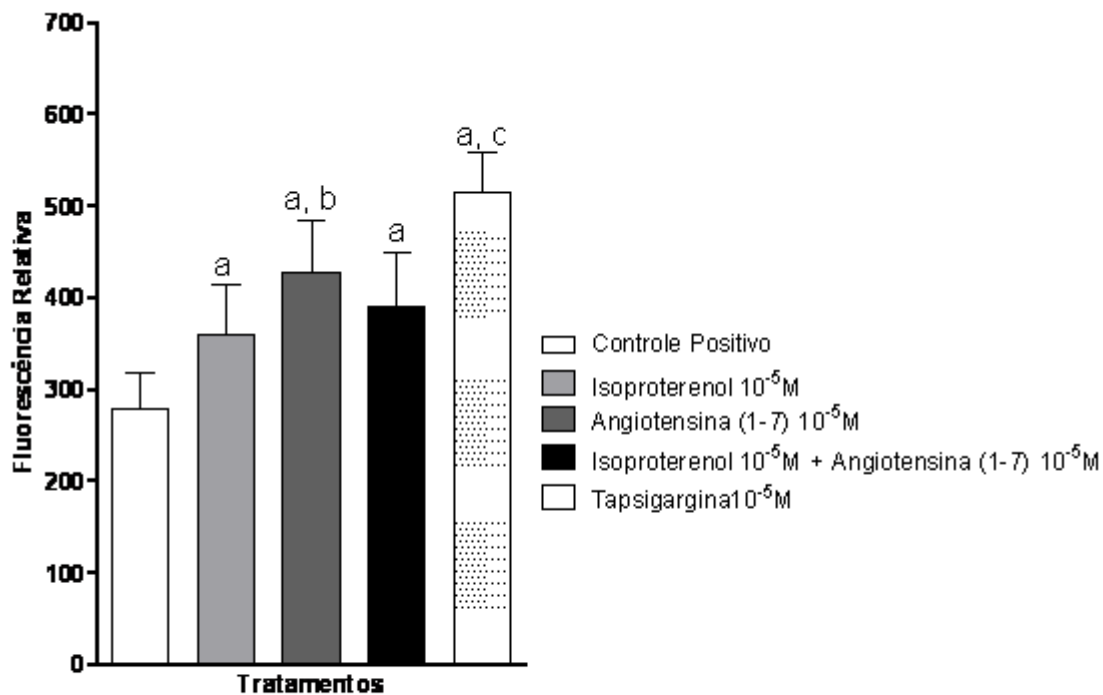
a= significativamente diferente dos controles

b= significativamente diferente dos tratados somente com Angiotensina 10^{-5} M e somente com Isoproterenol 10^{-5} M

c= significativamente diferente do controle e dos demais tratamentos.

Figura 22. Concentração de Ca^{2+} intracelular em cardiomiócitos de ratos Sprague-Dawley recém-natos, com a estimulação por isoproterenol em presença ou ausência de Angiotensina(1-7).

Transientes de Cálcio em animais Transgênicos



a= significativamente diferente dos controles

b= significativamente diferente dos tratados somente com Isoproterenol 10⁻⁵M

e Angiotensina 10⁻⁵M e Isoproterenol 10⁻⁵M

Figura 23. Expressão da $[Ca^{++}]$ em cardiomiócitos de ratos TGR(A-1-7) 3292 recém-natos, com a estimulação por isoproterenol em presença ou ausência de Angiotensina(1-7).

a) Células provenientes de culturas primárias de animais Sprague-Dawley

As células tratadas com isoproterenol + Ang(1-7) demonstraram maior liberação de cálcio, seguidas das células tratadas somente com Ang(1-7).

b) Células provenientes de culturas primárias de animais TGR(A1-7) 3292

As células tratadas com Ang(1-7) demonstraram maior liberação de cálcio, porém as tratadas com isoproterenol + Ang(1-7) , ou somente com isoproterenol, apenas se aproximam.

Com os resultados obtidos, podemos observar que as células dos animais SD podem explicar os resultados do ensaio de força de contração, mostrando um sinergismo de cálcio.

Em células de animais SD neonatos os resultados seguem um padrão sem maiores variações. Porém sugere-se que o apresentado para os animais 3292 possa ser explicado por um problema temporal. Os ensaios foram realizados com células de culturas primárias provenientes de animais neonatos de um dia, já nos ensaios de força de contração, os animais eram mais velhos o que pode ter levado a uma adaptação à condição de maior quantidade de Ang (1-7).

Talvez ensaios com culturas feitas com corações de animais mais velhos possam vir a resolver essa questão. De qualquer modo, os resultados obtidos para as linhagens feitas com animais SD explicam bem os resultados obtidos nos ensaios de força.

Um achado também interessante foi que o nível basal de cálcio na linhagem Sprague-Dawley é maior que na linhagem TGR(A1-7) 3292.

Transientes de cálcio pelo método Confocal

Ainda focando a possibilidade de explicar o aumento da contratilidade através do concentração do cálcio aumentada, nós investigamos o comportamento da concentração de cálcio intracelular, agora em miocárdio de ratos adultos, diante da estimulação com isoproterenol/Ang-(1-7), utilizando céls marcadas com Fúor 4 AM e a microscopia Confocal.

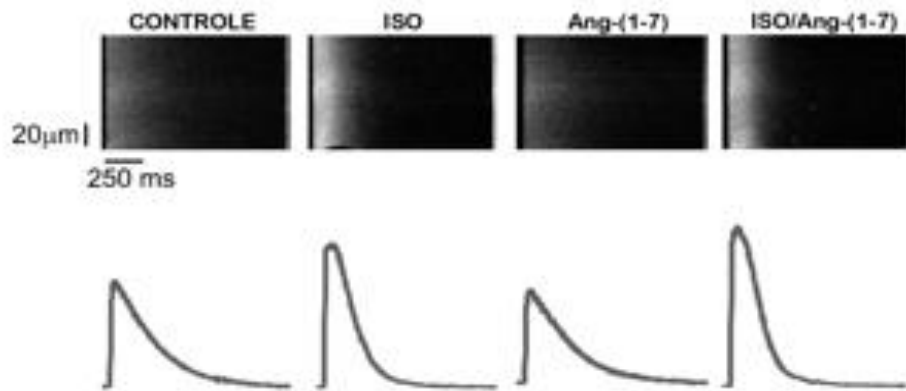


Figura 24. Mostra um exemplo típico do transiente de Ca^{++} obtido em células estimuladas em 1Hz, em diferentes condições (controle, com isoproterenol, com ang-(1-7) e iso após ang-(1-7)).

Como esperado, o iso aumentou a amplitude e a velocidade de decaimento do transiente de cálcio. A ang-(1-7) não alterou estes parâmetros. O tratamento do cardiomiócito com a combinação de angio-(1-7) e iso apresentou valores similares ao do tratamento com iso isolado, embora mostre discreta tendência de intensificação da ação do isoproterenol.

Ecocardiograma

1. Frequência Cardíaca

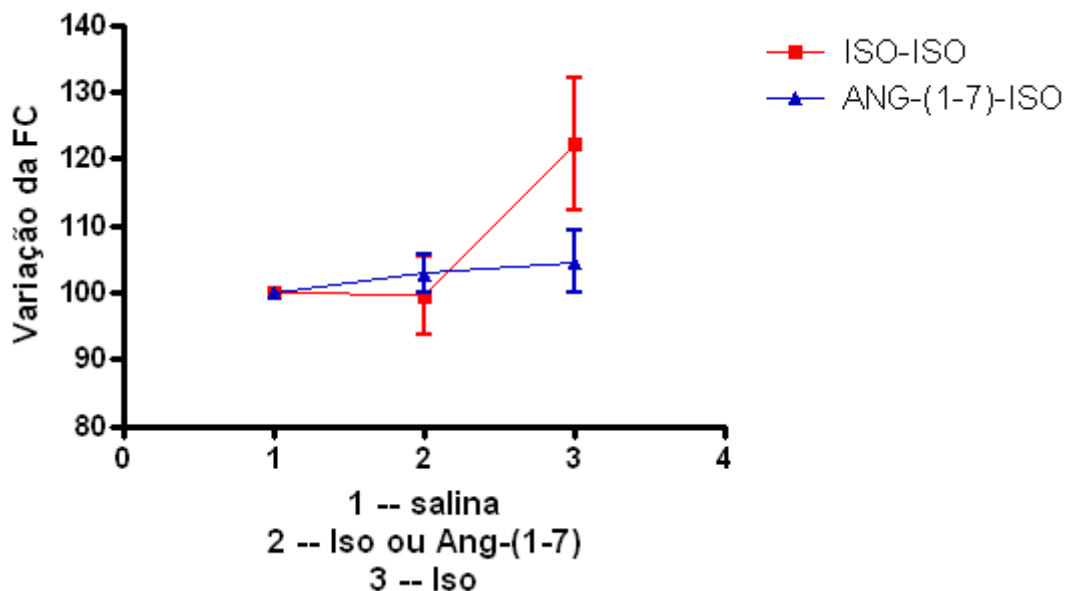


Figura 25. Variação da F. C., ao EcoCG, após injeção de iso-iso ou de Ang-(1-7)--iso. Obteve-se maior variação da FC com a 2ª dose de iso.

A aplicação da salina não apresentou alteração da FC. No 1º grupo, após a 1ª dose do Iso houve pequena alteração, o que não ocorreu com a Ang-(1-7) no 2º grupo. No 3º momento, no 1º grupo, com a nova dose de Iso, houve aumento significativo da FC, mas no 2º grupo, com o Iso, após a Ang-(1-7), não houve alteração expressiva da FC.

2. Débito Cardíaco

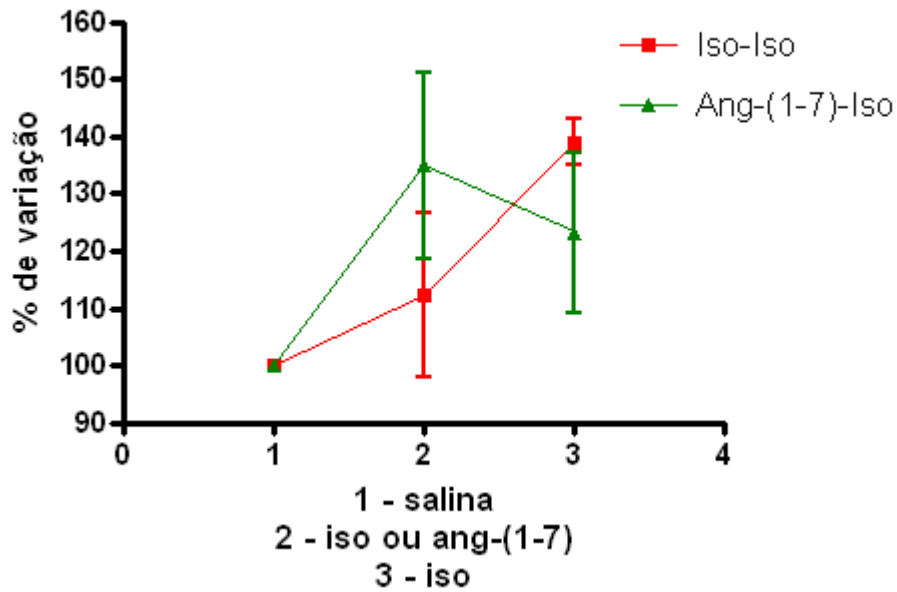


Figura 26. Variação do DC, ao EcoCG, após injeção de iso-iso ou de Ang-(1-7)-iso.o iso.

O DC não se alterou com a salina. No grupo 1, o DC aumentou com a 1ª dose do Iso e ainda mais com a 2ª dose.

No grupo 2, com a Ang-(1-7), houve incremento do DC ainda mais intenso que o apresentado pela 1ª dose do iso no grupo 1, mas com o Iso após a Ang-(1-7) houve queda do DC.

3. Fração de Ejeção

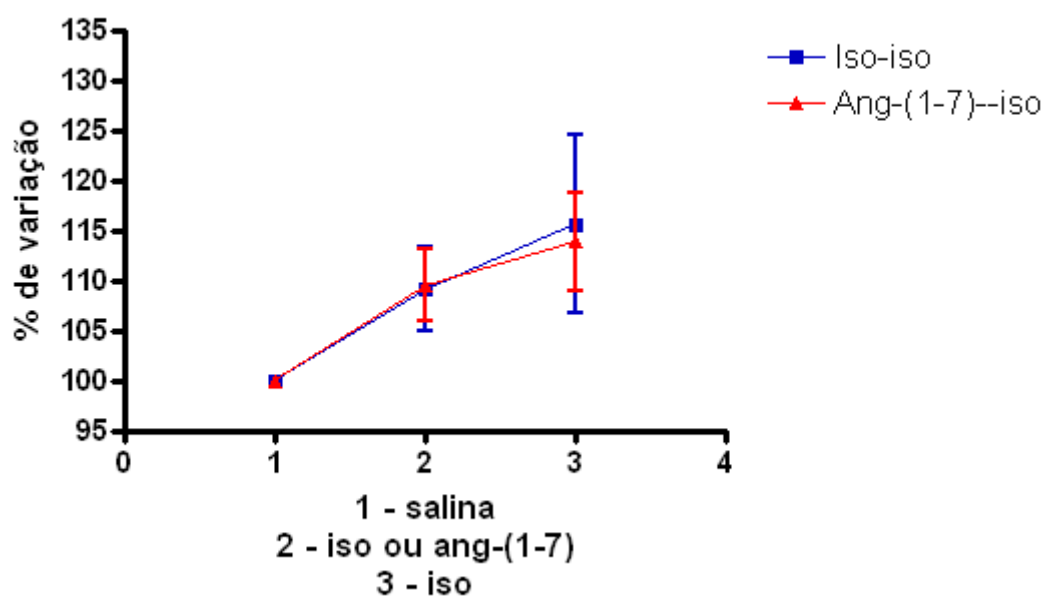


Figura 27. Variação do Fração de Ejeção, ao EcoCG, após injeção de iso-iso ou de Ang-(1-7)-iso.

A F.Ejeção apresentou aumentos semelhantes, tanto com o isoproterenol, em duas doses, como com o iso após a Ang-(1-7).

4. Fração de Encurtamento

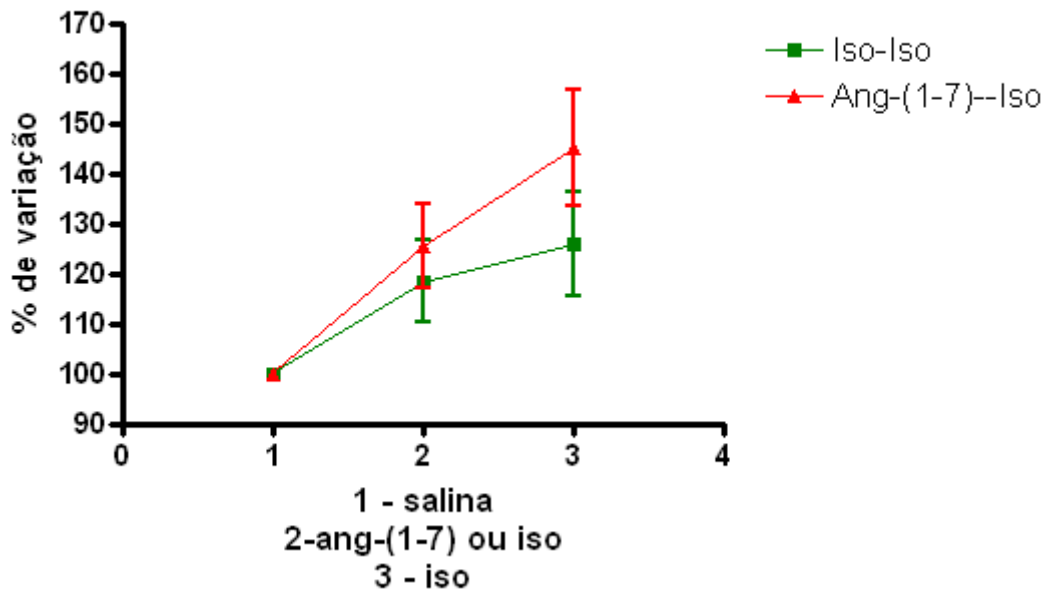


Figura 28. Variação da Fração de Encurtamento, ao EcoCG, após injeção de iso-iso ou de Ang-(1-7)-iso.

A Fração de Encurtamento apresentou comportamento interessante. No grupo 1, houve incremento com a 1ª dose do Iso e maior ainda com a 2ª dose .

No grupo 2, já com a Ang-(1-7), a exemplo do que se observou com o DC, houve maior aumento da F.Enc.que com o Iso, no grupo 1. Este aumento se intensificou com o Iso após a Ang-(1-7), no grupo 2.

5. Volume sistólico

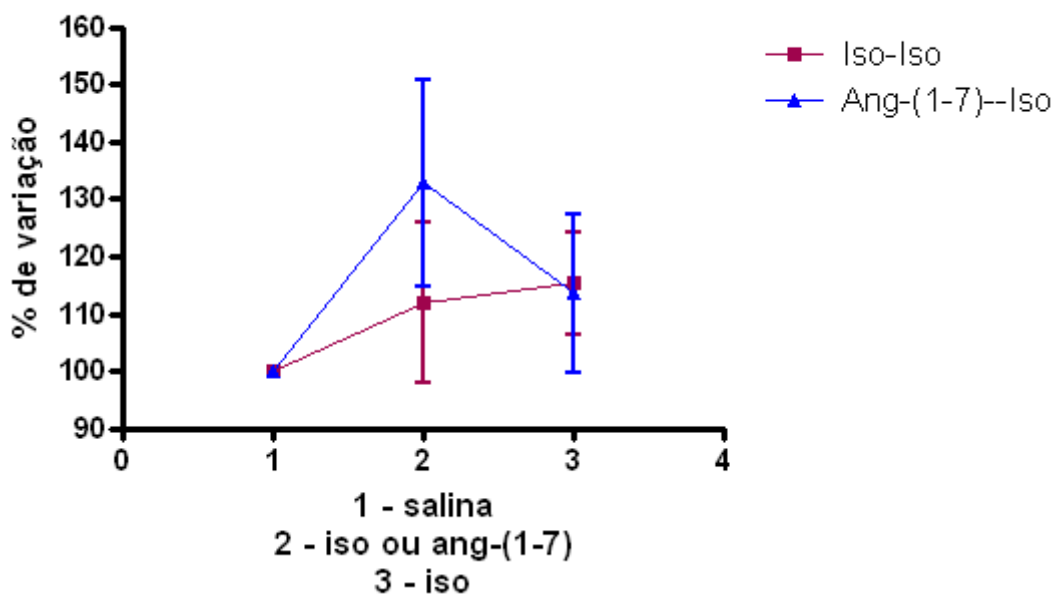


Figura 29. Variação do Volume de Ejeção, ao EcoCG, após injeção de iso-iso ou de Ang-(1-7)-iso.

Também o Vol. de Ejeção apresentou maior aumento só com a Ang-(1-7), no grupo 1, do que com a 1ª dose de Iso no grupo 2. Com a 2ª dose do Iso no grupo 1, intensificou-se o incremento. Mas no grupo 2, com o Iso após a Ang-(1-7), houve queda do Vol. de Ejeção.

DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

O presente trabalho procurou demonstrar que a Ang-(1-7) potencializa o aumento da tensão sistólica induzida pelo isoproterenol.

Muitos trabalhos na literatura demonstram as inúmeras interações exercidas pela Ang-(1-7) em diversos setores do organismo. Por ex., o papel cardioprotetor, de diversas formas, da Ang-(1-7). Já foi demonstrado que a ativação do receptor Mas tanto pela Ang-(1-7) quanto pelo agonista não peptídico, AVE-0991), reduz a incidência e duração das arritmias pós-eventos de isquemia e reperfusão cardíacas .Ferreira et al (2001), Castro *et al.*, (2005); Ferrario *et al.*, (2005); Oudot *et al.*, (2005); Tallant *et al.*, (2006), melhora a função cardíaca de corações isolados de camundongos. Castro *et al.*, (2006), previne o remodelamento cardíaco induzido pelo isoproterenol. Ferreira *et al.*, (2007); Trask *et al.*, (2007), além de melhorar o fluxo coronariano Wang *et al.*; Zisman *et al.*, (2003b).

Apesar dos conhecidos papéis do eixo Ang-(1-7)/Mas no controle da função vascular, trabalhos recentes apontam cada vez mais para um importante papel modulatório deste eixo diretamente no músculo cardíaco. Camundongos *knockout* para o receptor Mas (*Mas*^{-/-}) apresentam disfunção nas células endoteliais. Sampaio *et al.*, (2003); Tallant *et al.*, (1997), e, de maneira bastante importante, apresentam também uma disfunção cardíaca Castro *et al.*, (2006); Castro *et al.*, (2005); Santos *et al.*, (2006).

Estudos com cardiomiócitos isolados de camundongos *Mas*^{-/-} confirmam a importância da Ang-(1-7) na mobilização de cálcio miocárdico, uma vez que estes animais apresentam lentos e reduzidos picos do transiente de cálcio ($[Ca^{2+}]_i$) Dias-Peixoto *et al.*, (2008).

Neste trabalho, procuramos demonstrar que, apesar de não apresentar efeito direto sobre a contratilidade miocárdica, a Ang-(1-7) potencializa de forma considerável a contração induzida pelo isoproterenol, um agonista β -adrenérgico. Entretanto, este efeito pouco se altera se a exposição à Ang-(1-7) é aguda ou crônica, sugerindo uma interação β 1/Mas para que o efeito do isoproterenol seja potencializado. Mais do que isso, podemos ainda sugerir que a Ang-(1-7) promove uma facilitação ao processo de contratilidade miocárdica mediada pelos receptores β -adrenérgicos. Assim, poderia haver um *cross-talk* entre estas duas vias de sinalização, culminando em uma maior liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático, uma redução na recaptção de cálcio pela Ca^{2+} -ATPase (SERCA2a), uma ativação de RyR ou uma associação de ambos. Tal efeito poderia ser resultado de um aumento nos níveis intracelulares de AMPc ou um aumento da sensibilidade ao cálcio.

Com isso, mesmo em baixa intensidade, a ativação β -adrenérgica seria potencializada pelos níveis já aumentados de AMPc. Alguns trabalhos na literatura demonstram que a ativação do receptor Mas pode induzir aumento nos níveis de nucleotídeos cíclicos como o GMPc em células endoteliais e cardíacas Gironatti *et al.*, (2004); Gironatti *et al.*, (2004b); Gomes *et al.*(2003).; Lemos *et al.*, (2002). Entretanto, mais experimentos são necessários para se avaliar se a via AMPc/PKA está envolvida na potencialização do efeito contrátil do isoproterenol pela ativação do receptor Mas pela Ang-(1-7).

Numa tentativa de se explicitar possíveis mecanismos para esta interação, foram feitos experimentos para estudar o comportamento do AMPc e do Cálcio com a exposição das fibras miocárdicas à estimulação pelo isoproterenol na presença da Angio-(1-7).

Uma dúvida durante a realização do trabalho foi se a exposição crônica a elevados níveis de Ang-(1-7) potencializaria *per se* o efeito inotrópico do isoproterenol. Para tal, utilizamos os animais TGR(A1-7)3292, que super-expressam Ang-(1-7) (Ferreira *et al.*). Os animais TGR(A1-7)3292 não apresentaram modificação significativa no

aumento da contração induzido pelo isoproterenol, sugerindo que somente a exposição crônica a elevados níveis de Ang-(1-7) não é o suficiente para potencializar os efeitos do isoproterenol.

Estes resultados sugerem que as vias de controle da homeostase do cálcio nos cardiomiócitos dos animais expostos cronicamente a elevados níveis de Ang-(1-7) estão mais sensíveis à estimulação simultânea dos receptores β -adrenérgicos e Mas. Contudo, mais experimentos são necessários para que possamos propor um mecanismo envolvido neste efeito.

Os principais efeitos protetores da Ang-(1-7) sobre o sistema cardiovascular têm sido atribuídos às suas ações sobre vasos sanguíneos, rins e cérebro. Acredita-se que os efeitos hipotensores da Ang-(1-7) devam-se basicamente a ativação destes três eixos de controle pressórico. Entretanto, evidências mais recentes apontam para um efeito direto da Ang-(1-7) sobre o miocárdio, que vão além da proteção contra os efeitos do aumento crônico dos níveis de Ang II. Corroborando com dados da literatura, estamos sugerindo neste trabalho que a Ang-(1-7) exerce um importante papel sobre a mobilização de cálcio, modulando a via β -adrenérgica. Do ponto de vista de sinalização celular, propomos ainda uma possível nova via envolvida no controle do cálcio intracelular, o eixo Mas/Ang-(1-7)/receptores β -adrenérgicos.

Nos experimentos realizados com citometria de fluxo, podemos observar que as células dos animais SD podem explicar os resultados do ensaio de força de contração, mostrando um sinergismo de cálcio.

Em células de animais SD neonatos os resultados seguem um padrão sem maiores variações. Porém sugere-se que o apresentado para os animais 3292 possa ser explicado por um problema temporal. Os ensaios foram realizados com células de culturas primárias provenientes de animais neonatos de um dia, já nos ensaios de força de contração, os animais eram mais velhos o que pode ter levado a uma adaptação à condição de maior quantidade de Ang (1-7).

Talvez ensaios com culturas feitas com corações de animais mais velhos possam vir a resolver essa questão. De qualquer modo, os resultados obtidos para as linhagens feitas com animais SD explicam bem os resultados obtidos nos ensaios de força.

Um achado também interessante foi que o nível basal de cálcio na linhagem Sprague-Dawley é maior que na linhagem TGR(A1-7) 3292.

Observando os resultados dos experimentos com o método CONFOCAL , não se conseguiu correlação entre as respostas obtidas com corações isolados e os transientes de cálcio.

Mesmo com aumento da $[Ca^{++}]$ encontrada nos experimentos com ratos recém natos, já que a principal fonte de cálcio intracelular, neste caso, não é o sarcoplasma, mas o meio externo, ainda não temos um mecanismo para esta interação entre isoproterenol e angiotensina (1-7). Pode-se pensar num “cross-talk” entre β receptor e receptor Mas ou, talvez, num aumento de sensibilidade ao cálcio, em algum momento da Excitação-Contração. Naturalmente, mais experimentos são necessários.

Os experimentos realizados com EcoCG, com animais Wistar, anestesiados, em que foram injetados IV isoproterenol em dois momentos, num grupo, e ang-(1-7) e depois iso em outro grupo corroborou achado de Santos et al, (2005) no qual medidas ecocardiográficas, em camundongos *knockout* para ang-(1-7) mostraram, entre outras, redução da Fração de Encurtamento uma redução global da função ventricular. Mostraram ainda uma maior pressão de perfusão coronariana, sugerindo que a ang-(1-7) exerceria ações benéficas para a função miocárdica. Em nossos experimentos, os maiores aumentos do DC e do VS com a Ang-(1-7) em relação à 1ª dose de iso (1ª fase) poderiam ser devidos à redução da Resistência Periférica Total, pela indução da liberação de NO ou Bradicinina, pela Ang-(1-7).

Observa-se o aumento expressivo da Fração de Encurtamento com a sequência Ang-(1-7)-iso, o que estaria de acordo com os achados de nosso trabalho.

.

CONCLUSÃO

8. CONCLUSÃO

8.1 – Nossos experimentos sugerem interação entre Receptores Mas e $\beta 1$.

8.2 – Esta interação promove aumento da resposta contrátil do miocárdio ao isoproterenol em presença da Ang-(1-7).

8.3 – Não conseguimos demonstrar em definitivo aumento da $[Ca^{++}]$ ou $[AMPc]$ intracelular, nesta interação.

8.4– O EcoCG mostrou incremento da fração de encurtamento com esta interação

Nossos dados sugerem que a facilitação do efeito inotrópico positivo induzido pelo pelo estímulo $\beta 1$ adrenérgico pode contribuir para as ações cardiovasculares da Ang-(1-7), a curto prazo.

Este trabalho nos permite concluir que a ativação do receptor Mas pela Ang-(1-7) promove um aumento na tensão sistólica induzida pela estimulação β -adrenérgica em corações isolados de ratos. O aumento crônico dos níveis de Ang-(1-7) não induz, por si só, aumento na contratilidade induzida pelo isoproterenol.

Naturalmente novas pesquisas são necessárias para estabelecer os mecanismos desta interação.

REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A.P.; FRABREGAS, B.C.; MADUREIRA, M.M.; SANTOS, R.J.; CAMPAGNOLE SANTOS, M.J.; SANTOS, R.A. **Angiotensin-(1-7) potentiates the coronary vasodilatory effect of bradykinin in the isolated rat heart.** *Braz J. Med Biol Res* (2000) 33(6): 709-713.

ARDAILLOU, R. **Angiotensin II-complexities beyond AT1 and AT2 receptors.** *Nephrol Dial Transplant* (1998) 13(12): 2988-2990.

ARDAILLOU, R. Chansel; D., Chatziantoniou; C., Dussaule; JC. **Mesangial AT1 receptors: expression, signaling, and regulation.** *J Am Soc Nephrol* (1999) 10 Suppl 11: S40-46.

CAMPBELL. D. J. **Critical Review of Prorenin and (Pro) rennin Receptor Research.** *Hypertension*(2008). 51: 159-1264.

CAREY, R.M.; SIRAGY, H.M. **Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation.** *Endocr Rev* (2003) 24(3): 261-271.

CASTRO, C.H.; SANTOS, R.A.; FERREIRA, A.J.; BADER, M.; ALENINA, N.; ALMEIDA, A.P. **Effects of genetic deletion of angiotensin-(1-7) receptor Mas on cardiac function during ischemia/reperfusion in the isolated perfused mouse heart.** *Life Sci* (2006) 80(3): 264-268.

_____ **Evidence for a functional interaction of the angiotensin-(1-7) receptor Mas with AT1 and AT2 receptors in the mouse heart.** *Hypertension* (2005) 46(4): 937-942.

CHANSEL, D.; LLORENS-CORTES, C.; VANDERMEERSCH, S.; PHAM, P.; ARDAILLOU, R. **Regulation of angiotensin II receptor subtypes by dexamethasone in rat mesangial cells.** *Hypertension*(1996) 27(4): 867-874.

DIAS-PEIXOTO, M.F.; SANTOS, R.A.; GOMES, E.R.; ALVES, M.N.; ALMEIDA, P.W.; GRECO, L.; ROSA, M. Fauler.; BADER, M.; ALENINA, N.; GUATIMOSIM, S. **Molecular mechanisms involved in the angiotensin-(1-7)/Mas signaling pathway in cardiomyocytes.** *Hypertension*(2008) 52(3): 542-548.

DOSTAL, D.E.; BAKER, K.M. **The cardiac renin-angiotensin system: conceptual, or a regulator of cardiac function?** *Circ Res*(1999) 85(7): 643-650.

FERRARIO, C.M.; TRASK, A.J.; JESSUP, J.A. **Advances in biochemical and functional roles of angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7) in regulation of cardiovascular function.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2005) 289(6): H2281-2290.

FERREIRA, A.J.; CASTRO, C.H.; GUATIMOSIM, S.; ALMEIDA, P.W.; GOMES, E.R.; DIAS-PEIXOTO, M.F.; ALVES, M.N.; FAGUNDES-MOURA, C.R.; RENTZSCH, B.; GAVA, E.; ALMEIDA, A.P.; GUIMARAES, A.M.; KITTEN, G.T.; REUDELHUBER, T.; BADER, M.; SANTOS, R.A. **Attenuation of isoproterenol-induced cardiac fibrosis in transgenic rats harboring an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein in the heart.** *Ther Adv Cardiovasc Dis* 4(2): 83-96.

FERREIRA, A.J.; OLIVEIRA, T.L.; CASTRO, M.C.; ALMEIDA, A.P.; CASTRO, C.H.; CALIARI, M.V.; GAVA, E.; KITTEN, G.T.; SANTOS, R.A. **Isoproterenol-induced impairment of heart function and remodeling are attenuated by the nonpeptide angiotensin-(1-7) analogue AVE 0991.** *Life Sci* (2007) 81(11): 916-923.

FERREIRA, A.J.; SANTOS, R.A.; ALMEIDA, A.P.. **Angiotensin-(1-7) improves the post-ischemic function in isolated perfused rat hearts.** *Braz J Med Biol Res* .(2002). 35:1083-1090.

_____ **Angiotensin-(1-7): cardioprotective effect in myocardial ischemia/reperfusion.** *Hypertension* (2001) 38(3 Pt 2): 665-668.

GIANCARLA, A.; BOTELHO, Santos; WALKYRIA O. Sampaio; REUDELHUBER, T. L.; BADER, Michael; CAMPAGNOLE SANTOS, Maria J.; SANTOS, Robson A. Souza. **Expression of an angiotensin-(1-7)- producing fusion protein in rats induced marked changes in regional vascular resistance.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol*(2007). 292:H2485-H2490.

GIESTAS, Anabela; PALMAS, Isabel; RAMOS, M. Helena; **Sistema Renina Aldosterona e sua Modulação Farmacológica.** (2010), *Acta Med Port* 23:677- 688.

GIRONACCCI, M.M.; VALERA, M.S.; YUJNOVSKY, I.; PENA, C. **Angiotensin-(1-7) inhibitory mechanism of norepinephrine release in hypertensive rats.** *Hypertension*(2004) 44(5): 783-787.

GIRONACCI, M.M.; YUJNOVSKY, I.; GORZALCZANY, S.; TAIRA, C.; PENA, C. **Angiotensin-(1-7) inhibits the angiotensin II-enhanced norepinephrine release in coarcted hypertensive rats.** *Regul Pept* (2004b) 118(1-2): 45-49.

GOMES, E.R.; LARA, A.A.; ALMEIDA, P.W.; GUIMARAES, D.; RESENDE, R.R.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J.; BADER, M.; SANTOS, R.A.; GUATIMOSIM, S. **Angiotensin-(1-7) prevents cardiomyocyte pathological remodeling through a nitric oxide/guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent pathway.**(2001) *Hypertension* 55(1): 153-160.

GUATIMOZIM, S.; SOBIE, E.A.; CRUZ, J.S.; MARTIM, L.A.; LEDERER, W.J. **Molecular identification of a TTX-sensitive Ca²⁺ current.** *American Journal of Physiology – Cell Physiology*, (2001) 280:C1327-C1339).

HIGASHI, M.; SHIMOKAWA, H.; HATTORI, T.; HIROKI, J.; MUKAI, Y.; MORIKAWA, K.; ICHIKI, T.; TAKAHASHI, S.; TAKESHITA, A. **Long-term inhibition of Rho-kinase suppresses angiotensin II-induced cardiovascular hypertrophy in rats in vivo: effect on endothelial NAD(P)H oxidase system.** *Circ (2003) Res* 93(8): 767-775.

KANNEL WB, LEVY D, CUPPLES LA. **Left ventricular hypertrophy and risk of cardiac failure: insights from the Framingham study.** *J Cardiovasc Pharmacol* 1978; 10: 135-40.

KANNEL WB. **Prevalence and natural history of eletrocardiographic ventricular hypertrophy.** *Am J Med* 1983; 26(suppl. 3A): 4-11.

KOHLMANN Jr, Osvaldo. **O Sistema renina-angiotensina-aldosterona e as moléstias cardiovasculares.** *Rev. Bras. Hipertens.* (2000),Vol. 7(3).

KUMAGAI, H.; KHOSLA, M.; FERRARIO, C.; FOUAD-TARAZI, F.M. **Biological activity of angiotensin-(1-7) heptapeptide in the hamster heart.** *Hypertension*(1990) 15(2 Suppl): I29-33.

LEMOS, V.S.; CORTES, S.F.; SILVA, D.M.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J.; SANTOS, R.A. **Angiotensin-(1-7) is involved in the endothelium-dependent modulation of phenylephrine-induced contraction in the aorta of mRen-2 transgenic rats.** *Br. J. Pharmacol*(2002) 135(7): 1743-1748.

LIMA, Augusto M.; XAVIER, Carlos H.; FERREIRA, Anderson J.; SANTOS, Robson A.; FONTES, Marco A.; **Angiotensin-(1-7) Reduces α -Adrenergic Mediated Tachycardia.**(2009) Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

MARIO A NETO, RICARDO R RASCADO, LUSIANE BENDHACK . **Receptores β -adrenérgicos no sistema cardiovascular.** Medicina, Ribeirão Preto 39 (1): 3-12, jan./mar. 2006

MERCURE, C.; YOGI, A.; CALLERA, G.E.; ARANHA, A.B.; BADER, M.; FERREIRA, A.J.; SANTOS, R.A.; WALTHER, T.; TOUYZ, R.M.; REUDELHUBER, T.L. **Angiotensin(1-7) blunts hypertensive cardiac remodeling by a direct effect on the heart.** *Circ Res* (2008) 103(11): 1319-1326.

MOKNI, W.; KERAUIS, T.; ETIENNE-SELLOUM, N.; WALTER, A.; KANE, M.O.; SCHINI-KERTH, V.B.; LUGNIER, C. **Concerted regulation of cGMP and cAMP phosphodiesterases in early cardiac hypertrophy induced by angiotensin II.**(1998) *PLoS One* 5(12): e14227.

NEIF MURAD, MARCELO FABIANO DE FRANCO, PAULO J. F. TUCCI **Caracterização Funcional da Hipertrofia Miocárdica Induzida pelo Isoproterenol e de sua Regressão.** Arq Bras Cardiol, volume 77 (nº 1), 51-8, 2001

NEVES, L.A.; SANTOS, R.A.; KHOSLA, M.C.; MILSTED, A. **Angiotensin-(1-7) regulates the levels of angiotensin II receptor subtype AT1 mRNA differentially in a strain-specific fashion.** *Regul Pept*(2008) 95(1-3): 99-107.

OUDOT, A.; VERGELY, C.; ECARNOT-LAUBRIET, A.; ROCHETTE, L. **Pharmacological concentration of angiotensin-(1-7) activates NADPH oxidase after ischemia-reperfusion in rat heart through AT1 receptor stimulation.** *Regul Pept* (2005) 127(1-3): 101-110.

REIKEN, S.; GABURJAKOVA, M.; GUATIMOSIM, S.; GOMEZ, A.M.; D'ARMIENTO, J.; BURKHOFF, D.; WANG, J.; VASSORT, G.; LEDERER, W.J.; MARKS, A.R. **Protein kinase A phosphorylation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) in normal and failing hearts. Role of phosphatases and response to isoproterenol.** *J. Biol Chem*(2003) 278(1): 444-453.

ROSENSTIEL, P.; GALLINAT, S.; ARLT, A.; UNGER, T.; SIEVERS, J.; LUCIUS, R. **Angiotensin AT2 receptor ligands: do they have potential as future treatments for neurological disease?** *CNS Drugs*(2002) 16(3): 145-153.

RUSKOAHO, H. **Effect of atenolol and pindolol on the phorbol ester- induced coronary vasoconstriction in the isolated perfused heart of the rat.** *Br. J. Pharmacol.* (1988 June); 94(2): 573–583.

SADOSHIMA, J.; IZUMO, S.; **Mechanotransduction in stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes.** *J. Recept Res*(1993a) 13(1-4): 777-794.

_____ **Molecular characterization of angiotensin II--induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype.** *Circ Res*(1993b) 73(3): 413-423.

_____ **Signal transduction pathways of angiotensin II--induced c-fos gene expression in cardiac myocytes in vitro. Roles of phospholipid-derived second messengers.** *Circ Res*(1993c) 73(3): 424-438.

SAMPAIO, W.O.; NASCIMENTO, A.A.; SANTOS, R.A. **Systemic and regional hemodynamic effects of angiotensin-(1-7) in rats.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2003) 284(6): H1985-1994.

SANTOS, R.A.S.; CAMPAGNOLE SANTOS, Maria J.; SANTOS M.I.; ANDRADE S.P. **Angiotensin (1-7) an update.** *Regul Pept* (2000); 91:45-62.

SANTOS, R.A.S.; CASTRO, C.H.; GAVA, E.; PINHEIRO, S.V.; ALMEIDA, A.P.; PAULA, R.D.; CRUZ, J.S.; RAMOS, A.S.; ROSA, K.T.; IRIGOYEN, M.C.; BADER, M.; ALENINA, N.; KITTEN, G.T.; FERREIRA, A.J. **Impairment of in vitro and in vivo heart function in angiotensin-(1-7) receptor MAS knockout mice.** *Hypertension*(2006) 47(5): 996-1002.

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.** *Physiol Genomics* (2004) 17(3): 292-299.

SANTOS, R.A.S.; FREZARD, F.; FERREIRA, A.J. **Angiotensin-(1-7): blood, heart, and blood vessels.** *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents* (2004) 3(4): 383-391.

SANTOS, R.A.S.; SIMOES E SILVA, A.C.; MARIC, C.; SILVA, D.M.; MACHADO, R.P.; DE BUHR, I.; HERINGER-WALTHER, S.; PINHEIRO, S.V.; 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.** *Proc Natl Acad Sci U S A* (2003) 100(14): 8258-8263.

SILVA, D.M.; VIANNA, H.R.; CORTES, S.F.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J.; SANTOS, R.A.; LEMOS, V.S. **Evidence for a new angiotensin-(1-7) receptor subtype in the aorta of Sprague-Dawley rats.** *Peptides*(2007) 28(3): 702-707.

SIMÕES E SILVA, A.C.; BARACHO, N.C.; PASSAGLIO, K.T.; SANTOS, R.A. **Renal actions of angiotensin-(1-7).** *Braz J. Med Biol Res* (1997) 30(4): 503-513.

STEWART, J.A.; JR. LAZARTIGUES, E.; LUCCHESI, P.A. **The angiotensin converting enzyme 2/Ang-(1-7) axis in the heart: a role for MAS communication?** *Circ Res*(1997) 103(11): 1197-1199.

TALLANT, E.A.; FERRARIO, C.M.; GALLAGHER, P.E. **Cardioprotective role for angiotensin-(1-7) and angiotensin converting enzyme 2 in the heart.** *Future Cardiol* (2006) 2(3): 335-342.

TALLANT, E.A.; LU, X.; WEISS, R.B.; CHAPPELL, M.C.; FERRARIO, C.M. **Bovine aortic endothelial cells contain an angiotensin-(1-7) receptor.** *Hypertension* (1997) 29(1 Pt 2): 388-393.

TRASK, A.J.; AVERILL, D.B.; GANTEN, D.; CHAPPELL, M.C.; FERRARIO, C.M. **Primary role of angiotensin-converting enzyme-2 in cardiac production of angiotensin-(1-7) in transgenic Ren-2 hypertensive rats.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2007) 292(6): H3019-3024.

UNGER, T. **The role of the renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease.** *Am J Cardiol*(2002) 89(2A): 3A-9A; discussion 10A.

WANG, Y.; QIAN, C.; ROKS, A.J.; WESTERMANN, D.; SCHUMACHER, S.M.; ESCHER, F.; SCHOEMAKER, R.G.; REUDELHUBER, T.L.; VAN GILST, W.H.; SCHULTHEISS, H.P.; TSCHOPE, C.; WALTHER, T. **Circulating rather than cardiac angiotensin-(1-7) stimulates cardioprotection after myocardial infarction.**(2002); *Circ Heart Fail* 3(2): 286-293.

ZHANG, Y.; GRIENDLING, K.K.; DIKALOVA, A.; OWENS, G.K.; TAYLOR, W.R. **Vascular hypertrophy in angiotensin II-induced hypertension is mediated by vascular smooth muscle cell-derived H₂O₂.** *Hypertension* (2005) 46(4): 732-737.

ZISMAN, L.S.; KELLER, R.S.; WEAVER, B.; LIN, Q.; SPETH, R.; BRISTOW, M.R.; CANVER, C.C. **Increased angiotensin-(1-7)-forming activity in failing human heart ventricles: evidence for upregulation of the angiotensin-converting enzyme Homologue ACE2.** *Circulation*(2003a) 108(14): 1707-1712.

ZISMAN, L.S.; MEIXELL, G.E.; BRISTOW, M.R.; CANVER, C.C. **Angiotensin-(1-7) formation in the intact human heart: in vivo dependence on angiotensin II as substrate.** *Circulation* (2003b) 108(14): 1679