



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E BIOFÍSICA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

**JÔNATHAS FERNANDES QUEIROZ DE ALMEIDA**

**MODELOS DE ESTUDO DE ATIVAÇÃO DO SISTEMA RENINA  
ANGIOTENSINA E SEU PAPEL NA FUNÇÃO CARDÍACA PÓS-  
ISQUÊMICA**

**ORIENTADOR: ROBSON AUGUSTO SOUZA DOS SANTOS**

BELO HORIZONTE

Julho de 2019

JÔNATHAS FERNANDES QUEIROZ DE ALMEIDA

**MODELOS DE ESTUDO DE ATIVAÇÃO DO SISTEMA RENINA  
ANGIOTENSINA E SEU PAPEL NA FUNÇÃO CARDÍACA PÓS-  
ISQUÊMICA.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, para obtenção do título de Doutor, área de concentração em Fisiologia

Orientador: Robson Augusto Souza dos Santos

BELO HORIZONTE

Julho de 2019

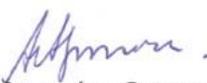
# "MODELOS DE ATIVAÇÃO DO SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA E SEU PAPEL NA FUNÇÃO CARDÍACA PÓS-ISQUÊMICA"

**JÔNATHAS FERNANDES QUEIROZ DE ALMEIDA**

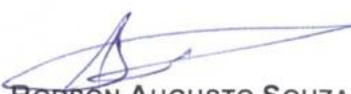
Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **01 de agosto de 2019**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

  
**PROF. DR. ALMIR DE SOUSA MARTINS**  
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

  
**PROFA. DRA. MARIA JOSÉ CAMPAGNOLE DOS SANTOS**  
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

  
**PROFA. DRA. ANDRÉIA CARVALHO ALZAMORA**  
ICEB/UFOP

  
**PROF. DR. CARLOS HENRIQUE DE CASTRO**  
ICB/UFG

  
**PROF. DR. ROBSON AUGUSTO SOUZA DOS SANTOS**  
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ORIENTADOR

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia  
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

**Belo Horizonte, 01 de agosto de 2019**

## **DEDICATÓRIA**

**Aos meus pais, Jacinto José de Almeida e Guiomar Antônia de Jesus Almeida, e à minha irmã, Janaína Cristina Queiroz de Almeida. Vocês são meu alicerce e meus maiores exemplos. Vocês sempre terão todo meu amor e minha gratidão.**

**À minha esposa, Luana Martins de Carvalho. Minha maior incentivadora e companheira acadêmica.**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Dr. Robson Augusto Souza dos Santos, pela oportunidade de continuar o trabalho iniciado no mestrado, pela paciência, pelos conhecimentos e pelo suporte sempre que necessário.

Aos amigos do Laboratório de Hipertensão, pela ótima convivência e aprendizado. Especialmente à Sílvia Zebral, Carina Cunha, Gabriel Sanglard, Dr. Lucas Souza, Giovanni Canta, Héric Monteiro e Filipe Silva. Vocês tornaram esse período mais fácil e mais leve.

Aos demais professores do Laboratório de Hipertensão, professoras Dra. Maria José e Dra. Andrea Haibara, professores Dr. Marco Antônio e Dr. Thiago Braga, pelos ensinamentos e amizade.

À professora Dr. Sílvia Guatmosin e ao colega de departamento Itamar Couto Guedes de Jesus, pela colaboração e pela convivência.

To Dr. Kathryn Sandberg from Georgetown University, Washington DC (USA), for the opportunity and many lessons. I couldn't be more grateful. My lab mate, Dr. Aline Souza, for all the patience, support and discussions. Hong Ji, Xie Wu, Parnika Kadam and Dr. Crystal West, thank you for the help, teachings and friendship.

Aos meus pais e à minha irmã, aos quais devo tudo que me tornei e dedico todas as minhas conquistas.

À minha esposa, Luana, grande responsável pelos incentivos e conselhos que eu precisei. Companheiros na vida pessoal e acadêmica. Sempre será meu maior exemplo.

Ao programa da pós-graduação em Ciências Biológicas, com área de concentração em Fisiologia e Farmacologia do ICB/UFMG.

Às agências de fomento, CNPq, CAPES, FAPEMIG e o INCT-NanoBioFar.

***“Nada é tão doloroso para a mente humana como uma grande e súbita mudança”***

(Mary Shelley)

## PREFÁCIO

Este trabalho é o resultado de dez anos de envolvimento com o sistema renina angiotensina, tendo início em 2009, no Laboratório de Órgãos Isolados, no departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Goiás. Após cursar apenas seis meses na graduação de Ciências Biológicas, iniciei minha iniciação científica sob supervisão da Profa. Dra. Elizabeth Pereira Mendes e do Prof. Dr. Carlos Henrique de Castro. Antes mesmo de cursar a disciplina de fisiologia já me encontrava em um laboratório totalmente voltado para essa área de concentração e com foco em um dos principais sistemas fisiológicos, o sistema renina angiotensina. Foram quatro anos de intenso aprendizado e formação acadêmica que formaram o alicerce da carreira que escolhi perseguir, espelhada nos meus orientadores.

Com o término da minha monografia, mais uma vez sob os ótimos conselhos da profa. Dra. Elizabeth, em 2013, apliquei para a seleção de mestrado no programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas com foco em Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais, sob orientação do prof. Dr. Robson Augusto Souza dos Santos no laboratório de Hipertensão. Assim que aprovado na seleção, iniciei a consolidação da minha carreira acadêmica e do interesse no sistema renina angiotensina. Trabalhar sob orientação do prof. Dr. Robson foi um privilégio que eu não estava disposto a abdicar, conseqüentemente, permaneci sob sua orientação no doutorado, no mesmo laboratório e programa de pós-graduação.

Iniciei o doutorado em 2015 e após qualificação em 2018, surgiu a oportunidade de um período de intercâmbio no Centro de Estudo de Diferenças sexuais, na Universidade de Georgetown em Washington D.C., EUA, sob orientação da profa. Dra. Kathryn Sandberg. Com total apoio e incentivo do professor Robson, permaneci 11 meses no laboratório da professora Sandberg ampliando meus conhecimentos sobre fisiologia, sistema renina angiotensina e sobre a língua mais importante do nosso meio acadêmico.

Em 2019, este trabalho visa encerrar mais um ciclo. Um ciclo que teve início em 2009 e, dez anos depois, termina com uma gama de possibilidades. Cada um dos professores citados acima contribuíram de modo único na minha formação acadêmica e pessoal, à eles dedico minha eterna gratidão.

## Sumário

Lista de Figuras .....	xi
Lista de Tabelas .....	xii
Lista de Abreviaturas .....	xiii
Resumo .....	15
Abstract .....	16
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	17
1.1 Infarto do miocárdio (IM).....	17
1.2 Sistema Renina Angiotensina (SRA) .....	18
1.2.1 SRA clássico .....	18
1.2.2 SRA não clássico .....	20
1.2.3 Alatensinas.....	22
2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA.....	25
3. OBJETIVOS .....	26
3.1 Objetivo Geral.....	26
3.2 Objetivos específicos.....	26
4. CAPÍTULO 1.....	27
4.1 Introdução .....	27
4.1.1 SRA e Isquemia/Reperusão .....	27
4.1.2 Ratos TGR(mREN2)27 (mREN) .....	29
4.2 Objetivo geral .....	31
4.2.1 Objetivos específicos.....	31
4.3 Material e métodos .....	32
4.3.1 Animais.....	32
4.3.2 Delineamento Experimental.....	32
4.3.3 Pletismografia de Cauda .....	33
4.3.4 Técnica de Langendorff (coração isolado) .....	33
4.3.5 Concentração dos Peptídeos.....	34
4.3.6 Coloração com cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) .....	34

4.3.7	Reação de polimerase em cadeia.....	34
4.3.8	Western blot .....	36
4.3.9	Análise estatística.....	37
4.4	Resultados .....	38
4.4.1	Dados gerais .....	38
4.4.2	Vasomotricidade e função cardíaca.....	38
4.4.3	Índice de Arritmias.....	48
4.4.4	Área Infartada.....	49
4.4.5	Regulação transcricional dos componentes do SRA.....	50
4.4.6	Expressão proteica .....	56
4.5	Discussão .....	59
5.	CAPÍTULO 2.....	64
5.1	Introdução .....	64
5.1.1	Restrição Alimentar .....	64
5.1.2	SRA e RAG .....	66
5.2	Objetivo geral .....	68
5.2.1	Objetivos específicos.....	68
5.3	Material e Métodos .....	69
5.3.1	Animais.....	69
5.3.2	Modelo de Restrição Alimentar Grave (RAG) .....	69
5.3.3	Delineamento Experimental.....	70
5.3.4	Coleta de sangue e urina.....	70
5.3.5	Medida das concentrações de sódio e potássio por fotômetro de chama 71	
5.3.6	Técnica de Langendorff .....	71
5.3.7	Reação de polimerase em cadeia em tempo real (q-PCR) .....	72
5.3.8	Reatividade vascular <i>in vitro</i> das artérias mesentéricas e femorais .....	72
5.4	Resultados .....	74
5.4.1	Avaliação da ingestão alimentar, consumo de água e peso corporal.....	74

5.4.2	Dosagens na urina e plasma .....	74
5.4.3	Peso dos tecidos .....	74
5.4.4	Vasomotricidade e função cardíaca .....	78
5.4.5	Porcentagem de arritmias no período de reperfusão .....	79
5.4.6	Avaliação da regulação transcricional do receptor AT1, MrgD e Mas ....	80
5.4.7	Reatividade vascular .....	83
5.5	Discussão .....	89
6.	CONCLUSÃO GERAL .....	94
7.	PERSPECTIVAS .....	95
8.	FIGURAS SUPLEMENTARES .....	96
9.	LIMITAÇÕES .....	100
10.	Referências Bibliográficas .....	101
11.	Agradecimento às agências de fomento.....	114

## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b>	Eixo clássico do Sistema Renina Angiotensina	19
<b>Figura 2</b>	Eixo não clássico do Sistema Renina Angiotensina	21
<b>Figura 3</b>	Eixo alatensinérgico do Sistema Renina Angiotensina	23
<b>Figura 4</b>	Ações da Ang-(1-7) e alamandina em diferentes órgãos	24
<b>Figura 5</b>	Delineamento Experimental	32
<b>Figura 6</b>	Efeitos da alamandina no fluxo coronariano	39
<b>Figura 7</b>	Efeitos da alamandina na pressão sistólica do ventrículo esquerdo	41
<b>Figura 8</b>	Efeitos da alamandina na pressão diastólica final do ventrículo esquerdo	42
<b>Figura 9</b>	Efeitos da alamandina na pressão desenvolvida do ventrículo esquerdo	44
<b>Figura 10</b>	Efeitos da alamandina na dP/dt máxima do ventrículo esquerdo	45
<b>Figura 11</b>	Efeitos da alamandina na dP/dt mínima do ventrículo esquerdo	46
<b>Figura 12</b>	Efeitos da alamandina na frequência cardíaca do ventrículo esquerdo	47
<b>Figura 13</b>	Efeitos da alamandina no índice de gravidade de arritmias	48
<b>Figura 14</b>	Efeitos da alamandina na extensão da área infartada	49
<b>Figura 15</b>	Quantidades relativas de mRNA do receptor AT1	51
<b>Figura 16</b>	Quantidades relativas de mRNA do receptor MrgD	52
<b>Figura 17</b>	Quantidades relativas de mRNA do receptor Mas	53
<b>Figura 18</b>	Quantidades relativas de mRNA da ECA	55
<b>Figura 19</b>	Quantidades relativas de mRNA da ECA 2	56
<b>Figura 20</b>	Fosforilação da AMPK $\alpha$	57
<b>Figura 21</b>	Efeitos de diferentes intensidades de dieta na sobrevida	64
<b>Figura 22</b>	Representação esquemática da divisão dos grupos de acordo com a dieta	69
<b>Figura 23</b>	Efeito da RAG na ingestão alimentar, consumo de água e peso corporal	75
<b>Figura 24</b>	Efeitos da RAG nos parâmetros hemodinâmicos	79
<b>Figura 25</b>	Efeitos da restrição alimentar na incidência de arritmias de reperfusão	80
<b>Figura 26</b>	Efeito da RAG na regulação transcricional dos receptores AT1, Mas e MrgD	81
<b>Figura 27</b>	Efeito da RAG na relação AT1/MrgD e AT1/Mas	82
<b>Figura 28</b>	Efeito da RAG na reatividade vascular em anéis de mesentérica	84
<b>Figura 29</b>	Efeito da RAG na reatividade vascular em anéis de femoral	85
<b>Figura 30</b>	Efeitos da realimentação na reatividade vascular em anéis de mesentérica	87
<b>Figura 31</b>	Efeitos da realimentação na reatividade vascular em anéis de femoral	88
<b>Figura S1</b>	Efeitos de diferentes doses de alamandina na IGA em ratos normotensos	96
<b>Figura S2</b>	Efeitos da alamandina na função cardíaca de ratos normotensos	97
<b>Figura S3</b>	Efeitos da alamandina, D-PRO, L-NAME e indometacina na função cardíaca	98
<b>Figura S4</b>	Efeitos da alamandina, D-PRO e A779 na função cardíaca	99

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1</b>	Pressão arterial média e parâmetros cardíacos morfométricos	37
<b>Tabela 2</b>	Efeitos da RAG nos parâmetros plasmáticos e urinários	75
<b>Tabela 3</b>	Efeitos da RAG no peso dos tecidos	76

## Lista de Abreviaturas

<b>A-779</b>	D-Ala <sup>7</sup> -Ang-(1-7), antagonista seletivo do receptor Mas
<b>ACh</b>	Acetilcolina
<b>AL</b>	Ad libitum
<b>ALA</b>	Alamandina
<b>AMPK</b>	5'-monofosfato-adenosina proteína quinase ativada
<b>Ang A</b>	Angiotensina A
<b>Ang I</b>	Angiotensina I
<b>Ang II</b>	Angiotensina II
<b>Ang-(1-7)</b>	Angiotensina-(1-7)
<b>Ang-(1-9)</b>	Angiotensina-(1-9)
<b>AT1</b>	Receptor angiotensinérgico tipo 1
<b>AT2</b>	Receptor angiotensinérgico tipo 2
<b>B2</b>	Receptor de Bradicininina tipo 2
<b>CCR</b>	Curva concentração resposta
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>CVLM</b>	Área ventrolateral caudal do bulbo
<b>DCI</b>	Doença do coração isquêmico
<b>DEPC</b>	Água tratada com o reagente dietil pirocarbonato
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>DNase</b>	Desoxirribonuclease
<b>dP/dt</b>	Derivada de contratilidade do ventrículo esquerdo
<b>DPRO</b>	D-Pro <sup>7</sup> -Ang-(1-7), antagonista do receptor Mas e MrgD
<b>dLVP</b>	Pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo
<b>ECA</b>	Enzima conversora de Angiotensina do tipo 1
<b>ECA 2</b>	Enzima conversora de Angiotensina do tipo 2
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiamino tetra-acético
<b>EPM</b>	Erro padrão da média
<b>FC</b>	Frequência cardíaca
<b>FE</b>	Fenilefrina
<b>HRP</b>	Horseradish Peroxidase
<b>I/R</b>	Isquemia/Reperusão
<b>ICV</b>	Intracerebro ventricular
<b>IM</b>	Infarto do miocárdio
<b>KHS</b>	Solução de Krebs Henseleit

<b>LDL</b>	Colesterol de baixa densidade
<b>LVEDP</b>	Pressão diastólica final do ventrículo esquerdo
<b>LVSP</b>	Pressão sistólica do ventrículo esquerdo
<b>mRA</b>	Grupo mREN tratado com alamandina
<b>mRC</b>	Grupo mREN sem tratamento
<b>mREN</b>	Linhagem TGR(mREN2)27
<b>MrgD</b>	MAS-related G-protein Coupled Receptor subtype D
<b>Mrgs</b>	MAS-related G-protein Coupled Receptors
<b>mRNA</b>	RNA mensageiro
<b>NEP</b>	Endopeptidase neutra
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NPS</b>	Nitroprussiato de sódio
<b>PAM</b>	Pressão Arterial Média
<b>PCR</b>	Reação de Polimerase em Cadeia
<b>PEP</b>	Proil-oligopeptidase
<b>PKA</b>	Proteína quinase A
<b>qPCR</b>	Reação de Polimerase em Cadeia em tempo real
<b>RA</b>	Restrição alimentar
<b>RAG</b>	Restrição alimentar grave
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RVLM</b>	Área ventrolateral rostral do bulbo
<b>SD</b>	Sprague-dawley
<b>SHR</b>	Ratos espontaneamente hipertensos
<b>SRA</b>	Sistema Renina Angiotensina
<b>TBS</b>	Tampão Tris-Buffered Saline
<b>TBS-T</b>	TBS + Tween
<b>TTC</b>	Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio
<b>U.A</b>	Unidade Arbitraria

## Resumo

O sistema renina angiotensina (SRA) desempenha um papel fundamental na regulação da função cardíaca. Nos últimos anos novos peptídeos foram adicionados a este sistema, tornando-o cada vez mais complexo. Com a recente descrição da Alamandina e de suas ações biológicas ligadas ao receptor MrgD por Lautner e colaboradores (2013), torna-se cada vez mais importante avaliar o papel do SRA em situações fisio e patológicas. Neste trabalho nós avaliamos o papel de dois efetores do SRA, a angiotensina II e a alamandina, em dois modelos animais diferentes que apresentam evidente ativação do SRA. Nossos estudos prévios mostram que a Alamandina melhorou a função cardíaca pós-isquêmica em ratos normotensos, em sequência, neste trabalho nós avaliamos os efeitos da Alamandina em um modelo mais desafiador, utilizando ratos TGR(mREN2)27 (mREN), já bem descritos pelo seu fenótipo hipertenso. Utilizando corações isolados de ratos Sprague-Dawley (SD) e mREN, nós observamos que a alamandina apresentou efeito cardioprotetor na LVSP, dLVP,  $\pm dP/dt$ , área infartada e índice de gravidade de arritmias apenas nos ratos SD. A ausência de efeitos da alamandina nos ratos mREN provavelmente se dá pela hipo-regulação do receptor MrgD no coração desses ratos. No segundo protocolo experimental, foram utilizados ratos Fischer submetidos a dois tipos de dieta, uma controle com consumo à vontade (CT) e outra com restrição alimentar grave (RAG) de 60% do consumo do controle por duas semanas. Ratos RAG apresentaram desequilíbrio eletrolítico, perda de 19% do peso corporal, redução do volume plasmático, atrofia cardíaca, aumento da porcentagem de arritmias de reperfusão, hiper-regulação do receptor AT1 no ventrículo esquerdo e aumento do efeito pressórico da Ang II em artérias mesentéricas. Para avaliar os efeitos a longo prazo da RAG, outro grupo foi submetido a 3 meses de realimentação à vontade (RAG-ra). Após o período de realimentação, nenhuma diferença foi observada entre o grupo RAG-ra e CT-ra, mostrando que o tempo de realimentação foi suficiente para recuperar os animais restritos. Juntos estes dados mostram que o SRA participa crucialmente dos dois modelos utilizados. No modelo de restrição calórica, o principal efector foi a Ang II e o receptor AT1, enquanto no modelo de hipertensão, a Alamandina não foi capaz de exercer seus efeitos pela hipo-regulação do receptor MrgD.

## Abstract

The renin angiotensin system (RAS) plays a key role in cardiac function regulation. In the past years new peptides have been described and added in this system, making it even more complex. Alamandine was recently described and it already became an important target to study the RAS role in physiological and pathological events. In this work we evaluated the role of two RAS effectors, angiotensin II and alamandine, in two different animal models with marked activation of RAS. Our previous data showed that alamandine improved post-ischemic cardiac function in normotensive rats, therefore, in this work we continue this investigation by evaluating alamandine effects in a more challenging model, using TGR(mREN2)27 (mREN), a well established model of hypertension. Using Sprague-Dawley (SD) isolated hearts we found that alamandine presented cardioprotective effect on LVSP, dLVP,  $\pm$ dP/dt, infarcted area and arrhythmia severity index. However, alamandine had no effects in mREN hearts, probably due the downregulation of MrgD receptor in this tissue. In our second experimental protocol, we used Fischer rats under two different diets for two weeks. First one was a regular diet with ad libitum ingestion (CT group), and second one was a severe food restricted diet with 60% of CT group ingestion (SFR). SFR rats showed electrolyte imbalance, 19% of body weight loss, plasmatic volume loss, cardiac atrophy, increased reperfusion arrhythmias, upregulation of AT1 receptor in left ventricle and increased Ang II pressor effect in mesenteric arteries. To evaluate long term effects of SFR, another group was submitted to 3 months of refeeding (SFR-rf). After refeeding, no differences were observed between SFR-rf and CT-rf groups. Together these data showed that RAS plays a key role in both models. In food restriction model, Ang II and AT1 receptor were the main effectors. Meanwhile, in hypertensive model, alamandine was unable to exercise its effects due MrgD downregulation.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1 Infarto do miocárdio (IM)

As doenças cardiovasculares são responsáveis por um terço da mortalidade em todo o mundo (ROTH et al., 2017). Dentre elas, podemos destacar a doença do coração isquêmico (DCI) como a maior contribuinte para esta estatística (GYÖNGYÖSI et al., 2018).

A DCI ou doença coronariana engloba complicações cardíacas causadas pela interrupção do suprimento sanguíneo levado pelas coronárias, na maioria das vezes essa interrupção é causada por placas ateroscleróticas (PANT et al., 2014). O bloqueio do suprimento sanguíneo no coração leva rapidamente à morte de cardiomiócitos e, posteriormente, lesão tecidual, gerando uma área lesada que é denominada infarto do miocárdio (FRANGOIANNIS, 2015). O IM, por sua vez, é uma combinação de eventos determinados pela interação entre o código genético de cada indivíduo e diversas interações com fatores ambientais ao longo da vida (ANDERSON; MORROW, 2017).

Normalmente, doenças de grande abrangência costumam envolver múltiplos fatores de risco e o IM não é uma exceção à regra. Vários são os fatores que contribuem para depósitos de gordura que estreitarão a luz dos vasos sanguíneos, levando conseqüentemente à formação de placas ateroscleróticas (NARULA et al., 2012). Dentre os principais fatores de risco podemos incluir: idade, tabagismo, hipertensão, hipercolesterolemia, obesidade, diabetes, síndrome metabólica, histórico familiar, sedentarismo, estresse, uso de drogas ilícitas, histórico de pré-eclâmpsia e doenças autoimunes (ANAND et al., 2008).

Quando o IM ocorre, vários mecanismos cooperam para induzir uma restrição funcional quase instantânea. Em uma primeira etapa, a sinalização celular aumenta a predisposição à falência cardíaca. Por exemplo, a formação de fosfato inorgânico derivada da clivagem das reservas de fosfato de creatinina inibe a funcionalidade das proteínas contráteis (ELLIOTT et al., 1992; KENTISH, 1986). Posteriormente, a acidose intracelular reduz as ligações de cálcio às proteínas contráteis, inibindo a contratilidade (SOLARO et al., 1988; STEENBERGEN et al., 1977).

Quase concomitantemente, assim que o IM ocorre, são iniciados os mecanismos que, a longo prazo, levarão ao remodelamento estrutural cardíaco na forma de dilatação progressiva do ventrículo esquerdo e hipertrofia local da parede da câmara (HORN et al., 1996). Simultaneamente às mudanças estruturais, alterações metabólicas são desencadeadas (BERTHIAUME et al., 2012). Essas modificações no fenótipo metabólico estão diretamente ligadas com a sinalização humoral. Já está bem descrito que o sistema renina angiotensina é um dos principais reguladores humorais do sistema

cardiovascular, estando diretamente ligado às respostas desencadeadas pelo IM (CHEN et al., 2013; DARGIE; BYRNE, 1995; SUN, 2010).

## 1.2 Sistema Renina Angiotensina (SRA)

O SRA é um dos principais sistemas responsáveis pelo controle da pressão sanguínea e do balanço hidroeletrolítico e consiste em uma complexa cascata enzimática. No decorrer da evolução humana, o SRA apresentou uma grande importância devido sua capacidade de controlar a ingestão de sal e estimular a sede (LEV-RAN; PORTA, 2005).

Ao longo das últimas décadas podemos perceber que, assim como o universo, o que sabemos sobre o SRA está em constante expansão. Nos últimos anos novos componentes foram descritos e adicionados a esse sistema, tornando necessárias novas divisões dentro do próprio SRA para facilitar o entendimento de como funciona esse importante componente regulatório do sistema cardiovascular. Dentre essas divisões, as mais aceitas são as que classificam o SRA em dois eixos, um clássico e um não clássico (CAREY; SIRAGY, 2003).

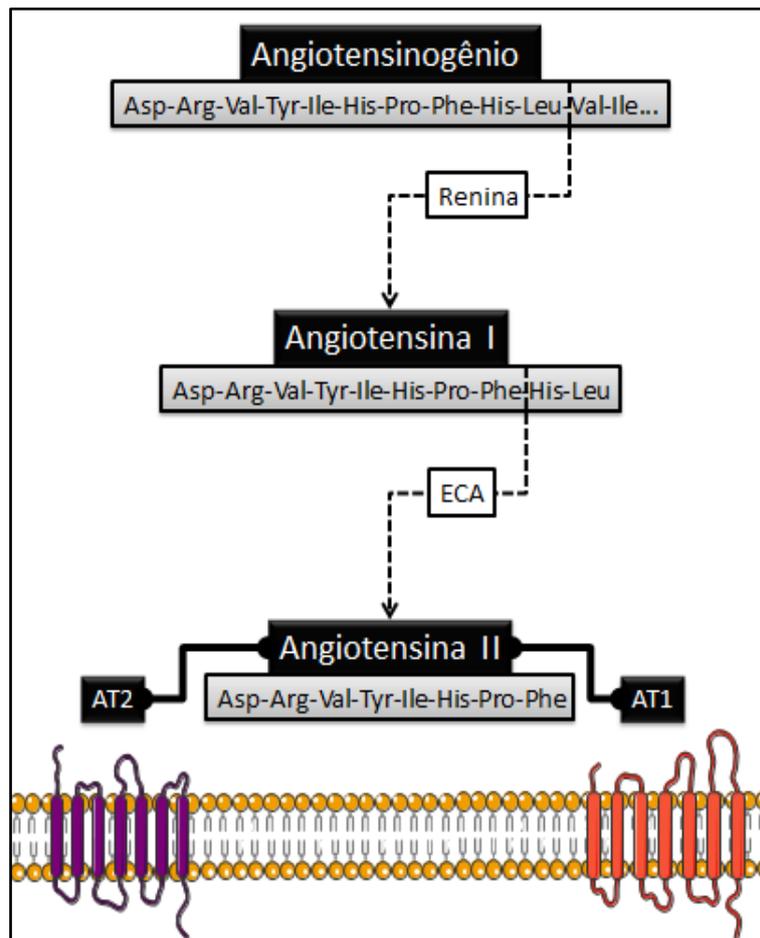
### 1.2.1 SRA clássico

De forma simplificada, a caracterização deste sistema começou em 1898, quando Tigerstedt e Bergman relataram um efeito pressor oriundo do extrato tecidual de rins de coelhos, denominando então a substância responsável de renina (TIGERSTEDT; BERGMAN, 1898). Em 1934, Harry Goldblatt induziu hipertensão em cães através da oclusão da artéria renal (GOLDBLATT et al., 1934), levando dois grupos de pesquisa a utilizar esta técnica para mostrar que o rim era capaz de secretar um agente pressor assim como a renina. Estes grupos, um de Buenos Aires e outro dos Estados Unidos, descreveram um novo composto que foi chamado de “hipertensina” e “angiotonina”, respectivamente, por cada um dos grupos (FASCIOLO; HOUSSAY; TAQUINI, 1938; PAGE; HELMER, 1940). Em 1958 um consenso foi feito para a escolha de um único termo, denominando então a substância de Angiotensina. Em 1956, Skeggs e colaboradores descobriram uma enzima capaz de converter a Angiotensina (Ang I) em Angiotensina II (Ang II), revelando também sua sequência de aminoácidos (SKEGGS; KAHN; SHUMWAY, 1956).

Mesmo com a descoberta do principal efetor do eixo clássico, a Ang II, muito ainda precisava ser elucidado sobre o restante do eixo. Um dos principais componentes, a enzima conversora de angiotensina (ECA), só foi devidamente compreendido devido à pesquisa de Ferreira e Rocha e Silva com o extrato do veneno da jararaca (*Bothrops*

*jararaca*), que em colaboração com Vane, observou que o extrato era capaz de inibir a ECA (ERDOS; YANG, 1967; FERREIRA; ROCHA E SILVA, 1965).

Após a identificação *in vitro* dos receptores angiotensinérgicos por experimentos de *binding* (HOLLEMANS; VAN DER MEER; TOUBER, 1968; LIN; GOODFRIEND, 1970), o eixo clássico estava montado. Reunindo dados de vários laboratórios foi possível estabelecer que esse eixo tem como precursor o Angiotensinogênio que, quando clivado pela enzima Renina produzida pelas células justaglomerulares, é convertido no decapeptídeo biologicamente inativo Ang I. Uma vez presente no sangue ou tecidos, a Ang I sofre hidrólise da ECA, presente na superfície luminal do endotélio vascular, em Ang II. A Ang II, por sua vez, exerce a maioria de suas ações através de dois receptores, os receptores angiotensinérgicos do tipo 1 (AT1) e do tipo 2 (AT2) pertencentes à superfamília de receptores acoplados à proteína G (MIURA; KARNIK; SAKU, 2011). A figura 1 mostra um esquema simplificado deste eixo clássico.



**Figura 1:** Versão simplificada do eixo clássico do sistema renina-angiotensina. ECA: enzima conversora de angiotensina. AT1; receptor angiotensinérgico do tipo 1. AT2: receptor angiotensinérgico do tipo 2.

Há uma variação na distribuição dos receptores AT1 e AT2 nos tecidos (BARNES et al., 1993), essa distribuição ampla foi identificada através de técnicas de bioquímica e biologia molecular, reforçando o conceito de um sistema endócrino, parácrino e autócrino (DZAU, 1988; PHILLIPS et al., 1979; WOLLERT; DREXLER, 1999). Talvez essa seja uma das maiores descobertas sobre o SRA, sua presença tecidual, que já foi observada no coração (VAN KATS et al., 1998), rins (KOBORI et al., 2004), cérebro (MOULIK et al., 2002), pâncreas (GHIANI; MASINI, 1995), órgãos e tecidos reprodutores (THOMAS; SERNIA, 1990), sistema linfático (IWAI et al., 1996) e tecido adiposo (KARLSSON et al., 1998). De fato o RAS tecidual exerce diferentes funções em cada órgão alvo e pode agir de maneira independente (BENIGNI; CASSIS; REMUZZI, 2010).

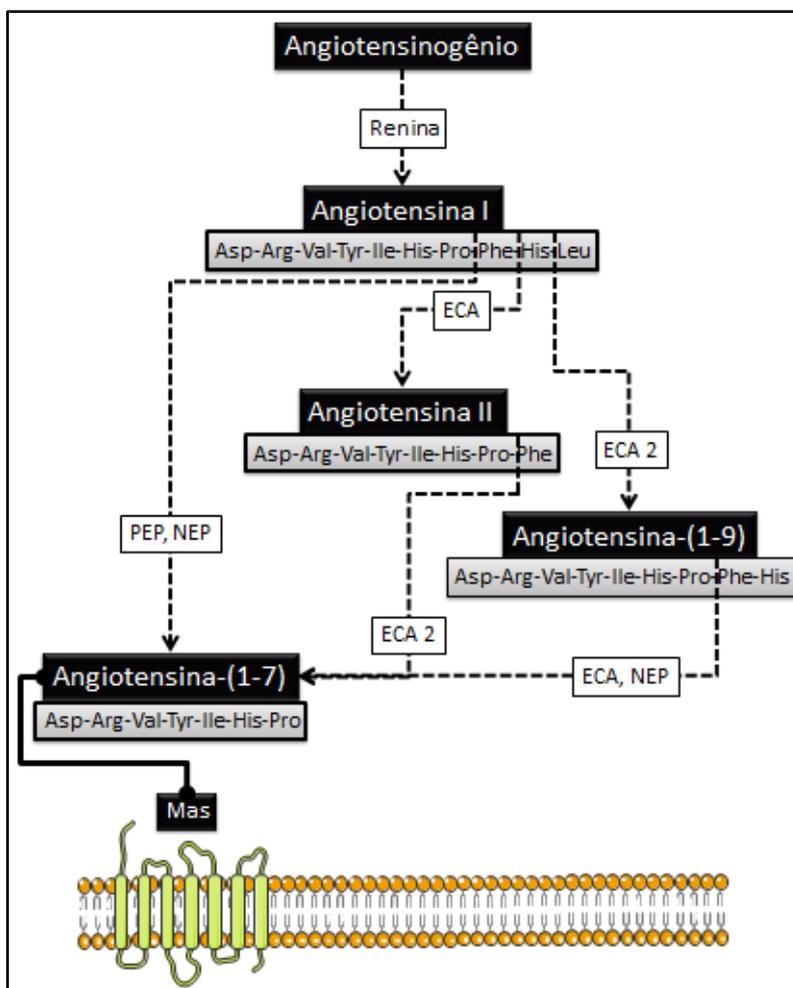
Ao longo das últimas décadas foi mostrado que a Ang II apresenta grande importância na modulação da hipertensão, falência cardíaca, remodelamento cardíaco e diabetes (RUIZ-ORTEGA et al., 2001). Mais especificamente, as ações da Ang II são capazes de aumentar a atividade simpática dirigida para o coração e vasos sanguíneos, levando a um efeito vasoconstritor direto que aumenta a resistência vascular periférica e, conseqüentemente, a pressão arterial (RUSH; AULTMAN, 2008). A grande maioria destes e outros efeitos descritos são via receptor AT1. Por sua vez, as ações via receptor AT2 são menos conhecidas, o que pode ser explicado pela sua menor expressão quando comparado com o receptor AT1. Além dessa diferença de expressão, na maior parte das vezes as ações da Ang II via AT2 são antagônicas às produzidas pela Ang II via receptor AT1 (SCHEUER; PERRONE, 1993), uma vez que a ligação ao receptor AT1 resulta em ações inotrópicas, cronotrópicas, hipertróficas e fibróticas no tecido cardíaco (BADER; GANTEN, 2008), a ligação da Ang II ao receptor AT2 resulta em ações anti-fibróticas, vasodilatadoras, apoptóticas, natriuréticas e anti-inflamatórias (UNGER; PAULIS; SICA, 2011).

### 1.2.2 SRA não clássico

Podemos dizer que a caracterização do SRA não clássico teve início em 1988 tanto com o trabalho de Santos e colaboradores mostrando a formação da Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] através da Ang I em uma via independente da ECA (SANTOS et al., 1988), quanto com o trabalho de Schiavone e colaboradores mostrando a primeira ação biológica *ex vivo* deste heptapeptídeo, que foi a liberação de vasopressina através de efeitos dose dependentes (SCHIAVONE et al., 1988). Estes dois experimentos propuseram que a Ang-(1-7) era um importante peptídeo biologicamente ativo do SRA.

Um ano após a descrição do primeiro efeito *ex vivo*, Campagnole-Santos e colaboradores mostraram que a micro injeção em quantidades femtomolares de Ang-(1-

7) no núcleo do trato solitário produziu redução significativa na pressão arterial de ratos anestesiados (CAMPAGNOLE-SANTOS et al., 1989), descrevendo o primeiro efeito *in vivo*. No mesmo ano também foi identificada a localização, por imunorreatividade, da Ang-(1-7) no cérebro (BLOCK et al., 1988) e no plasma (CHAPPELL et al., 1989).



**Figura 2:** Versão simplificada do eixo não clássico do sistema renina-angiotensina. ECA: enzima conversora de angiotensina. AT1; receptor angiotensinérgico do tipo 1. AT2: receptor angiotensinérgico do tipo 2. PEP; proil oligopeptidase. NEP; endopeptidase neutra.

O próximo passo marcante na descrição do SRA não clássico foi a síntese do primeiro antagonista da Ang-(1-7), o D-Ala<sup>7</sup>-Ang-(1-7) ou A-779 (AMBÜHL; FELIX; KHOSLA, 1994; SANTOS; CAMPAGNOLE-SANTOS, 1994) que contribuiu para a hipótese de um receptor específico para a Ang-(1-7) (FONTES et al., 1994).

No ano 2000, um segundo componente crucial foi adicionado à este eixo, a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA 2) (DONOGHUE et al., 2000; TIPNIS et al., 2000), revelando uma via enzimática inédita na formação da Ang-(1-7). A ECA 2 é uma carboxipeptidase ancorada na membrana resultante de uma duplicação da ECA que

sofreu fusão com uma colectrina (SANTOS et al., 2018). Três anos depois, outro componente fundamental foi atribuído a este eixo, o receptor Mas. A Ang-(1-7) liga-se a esse receptor acoplado à proteína G para exercer suas ações, como foi descrito pela primeira vez em 2003 (SANTOS et al., 2003).

Com esses componentes, podemos traçar, de forma simplificada, o eixo não clássico do SRA (figura 2). A Ang-(1-7), principal efector deste eixo, pode ser gerada pela clivagem da Ang I por endopeptidases (THOP1, NEP e PEP) ou da Ang II por carboxipeptidases (ECA 2, A ou prolil carboxipeptidase). Existe também uma via de produção da Ang-(1-7) pela clivagem da Ang-(1-9) pela ECA ou NEP, contudo sua eficiência catalítica é muito menor que a via dependente de ECA 2 (RICE et al., 2004).

### 1.2.3 Alatensinas

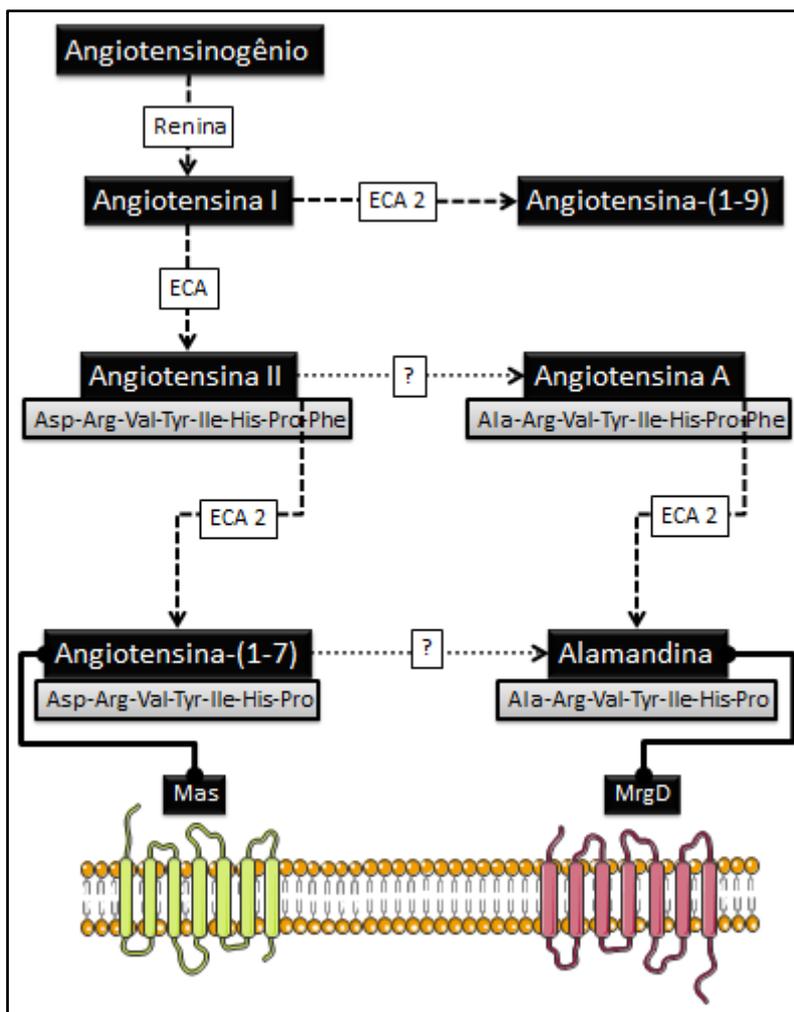
Em 2013, nosso grupo de pesquisa descreveu e caracterizou uma nova angiotensina, a Alamandina (LAUTNER et al., 2013). Alamandina é um análogo estrutural da Ang-(1-7) que apresenta um resíduo de aminoácido Ala no lugar de um Asp na posição 1.

O principal substrato para a formação da Alamandina é a Angiotensina A (Ang A), um octapeptídeo identificado pela primeira vez no plasma humano e que, assim como a Ang II, tem grande afinidade pelos receptores AT1 e AT2, sendo esta afinidade um pouco maior para o receptor AT2 (JANKOWSKI et al., 2007). Da mesma forma que a Alamandina e Ang-(1-7), a Ang A só se difere da Ang II em um aminoácido, possuindo uma alanina na posição N-terminal no lugar de um aspartato. De forma semelhante também à Ang II, a Ang A produz vasoconstrição e efeito pressor em ratos normotensos e hipertensos anestesiados, via receptor AT1 (COUTINHO et al., 2014; YANG et al., 2011).

A Alamandina pode ser formada por meio da conversão da Ang A pela ECA2 ou diretamente da descarboxilação do aspartato N-terminal da Ang-(1-7) (LAUTNER et al., 2013). Suas ações ocorrem via receptor MrgD. Este receptor é um componente da superfamília de receptores relacionados ao Mas (Mrgs), que constituem receptores acoplados à proteína G (DONG et al., 2001; GEMBARDT et al., 2008; MILASTA et al., 2006; SHINOHARA et al., 2004; ZHANG et al., 2005, 2007). O MrgD é vastamente expresso nos neurônios sensoriais do gânglio da raiz dorsal (DONG et al., 2001; ZHANG et al., 2005; ZYLKA et al., 2003), mas também está localizado nos testículos, bexiga, artérias, útero, cérebro, cerebelo, globo ocular, medula espinhal, traqueia, timo, coração, pulmão, diafragma, peritônio, trato gastrointestinal, músculo esquelético, próstata, vesícula seminal e tecido adiposo marrom e branco, em menores quantidades

(ZHANG et al., 2005; ZYLKA et al., 2003). A figura 3 mostra de forma simplificada o eixo Alatenosínérgico.

Apesar dos poucos anos desde sua descrição, diversos dados interessantes já foram publicados sobre a Alamandina. Em seu próprio artigo de descrição e caracterização foi mostrado que a Alamandina, assim como a Ang-(1-7), provoca vasodilatação dependente de endotélio em anéis de aorta de ratos e camundongos, modula a sensibilidade do barorreflexo após infusão intracerebroventricular (ICV), na área ventrolateral rostral do bulbo (RVLM) produz aumento da pressão sanguínea e queda no bulbo ventrolateral caudal (CVLM) (LAUTNER et al., 2013).



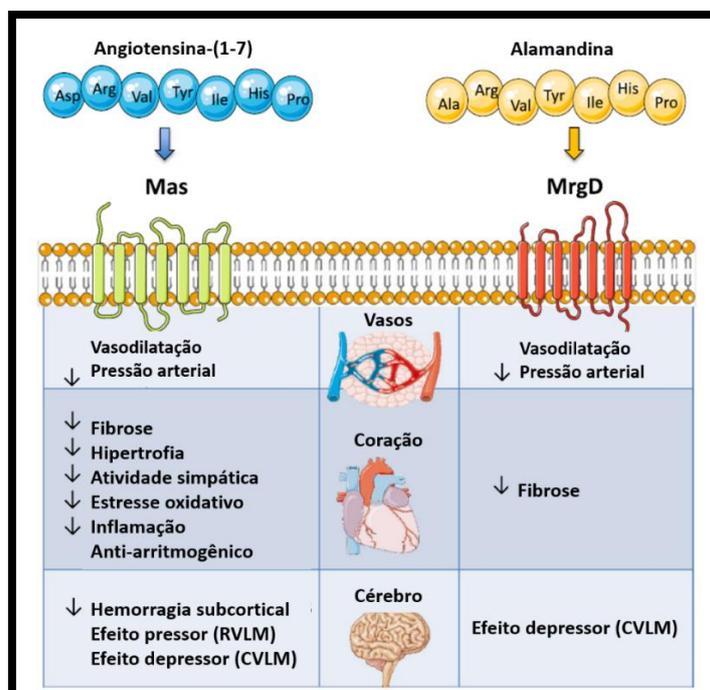
**Figura 3:** Versão simplificada do eixo das Alatenosinas com foco na Alamandina. ECA: enzima conversora de angiotensina. ECA 2; enzima conversora de angiotensina do tipo 2. MrgD: receptor acoplado à proteína G da família Mas do subtipo D.

Lautner e colaboradores mostraram que uma formulação oral obtida através da inclusão da Alamandina em HP- $\beta$  ciclodextrina, produziu, novamente, efeitos semelhantes aos da Ang-(1-7), como efeitos anti-hipertensivos em ratos

espontaneamente hipertensos (SHR), diminuição da síntese de colágeno tipo I e III, além de fibronectina em ratos tratados com isoproterenol (LAUTNER et al., 2013). Park e colaboradores mostraram que a Alamandina através do receptor MrgD não só melhorou a função cardíaca pós-isquêmica como reduziu os níveis de lactato desidrogenase e a área infartada (PARK et al., 2018). Liu e colaboradores descreveram que a administração subcutânea de Alamandina em ratos SHR levou à atenuação da hipertensão e da hipertrofia e melhorou a função cardíaca do ventrículo esquerdo (LIU et al., 2018).

No entanto, a Alamandina e a Ang-(1-7) não se restringem a cópias que desempenham apenas efeitos semelhantes. Já foi observado que a Alamandina não apresentou efeitos antiproliferativos agudos em dois tipos de células tumorais humanas (LAUTNER et al., 2013), além de apresentar efeitos vasoativos distintos da Ang-(1-7) nos vasos de coelhos submetidos à uma dieta aterogênica (HABIYAKARE et al., 2014). Além desses efeitos relatados, as vias de ação dos receptores Mas e MrgD nas células endoteliais são diferentes, uma vez ativado o receptor Mas age via liberação de NO e redução na produção de superóxido (SAMPAIO et al., 2007), enquanto que o receptor MrgD parece agir via proteína quinase A (PKA) (QARADAKHI; APOSTOLOPOULOS; ZULLI, 2016).

A figura 4 resume e compara o papel da Ang-(1-7) e da Alamandina em diferentes órgãos.



**Figura 4:** Ações da Ang-(1-7) e Alamandina em diferentes órgãos. Adaptado (DE SOUZA-NETO et al., 2018).

## 2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

Um dos mais importantes reguladores do sistema cardiovascular é o SRA. Através da regulação do volume sanguíneo e da resistência vascular sistêmica, o SRA age de forma insubstituível na regulação da pressão arterial. Contudo, quando ocorre desequilíbrio na ativação do eixo clássico, este sistema leva a uma série de condições patológicas, como a hipertensão arterial (FOUNTAIN; LAPPIN, 2019).

Do mesmo modo como a ativação patológica do SRA pode levar a uma série de condições adversas, a manipulação farmacológica do SRA é uma ferramenta importante no controle da falência cardíaca, hipertensão, diabetes e infarto do miocárdio. Inibidores da ECA, bloqueadores dos receptores angiotensinérgicos e antagonistas da aldosterona agem suprimindo os efeitos do SRA clássico e ativando o SRA não clássico. Podemos citar, por exemplo, a ativação do eixo ECA/Ang II/AT1 leva ao aumento da pressão arterial e contribui para danos irreversíveis em órgãos alvos como o coração, vasos e rins (PAUL; POYAN MEHR; KREUTZ, 2006). Dessa forma, os inibidores da ECA continuam como protagonistas no tratamento da hipertensão. Por outro lado, a ativação do eixo não clássico leva, na maioria das vezes, a efeitos cardioprotetores que são antagonistas aos do eixo clássico. Já está bem descrito que a ativação do eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas protege contra os danos em órgãos alvos através de seus efeitos anti-hipertroóficos, anti-fibróticos e antioxidantes (PATEL et al., 2016). No entanto, mesmo com 3 décadas desde a descrição da Ang-(1-7), ainda resta muito para ser descoberto sobre o SRA.

Uma das mais recentes descobertas sobre o SRA propõe um novo eixo como possível alvo terapêutico. A Alamandina é um heptapeptídeo semelhante estruturalmente à Ang-(1-7) mas que se difere em um resíduo de aminoácido, possuindo uma alanina no lugar do aspartato (LAUTNER et al., 2013). Apesar de ambas possuírem efeitos cardioprotetores semelhantes elas não são idênticas, iniciando pela estrutura, como já dito, receptor e via de sinalização (JESUS et al., 2018; LAUTNER et al., 2013). Assim, faz-se pertinente melhor avaliação da participação de alguns importantes componentes do SRA, principalmente da Alamandina e seu receptor MrgD, em modelos animais com SRA ativado. No primeiro modelo escolhido para esse estudo consiste em animais hipertensos que superexpressam renina e o segundo um modelo de restrição alimentar severa. Em ambos o foco foi avaliar a participação do SRA após uma lesão de isquemia/reperfusão, que consiste em um estímulo altamente estressor. No primeiro modelo foi dada ênfase à alamandina, enquanto no segundo o foco foi o SRA clássico.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

- Avaliar a participação de componentes do SRA na função cardíaca pós-isquêmica em dois modelos animais com SRA ativado.

#### **3.2 Objetivos específicos**

##### **Capítulo 1:**

- Avaliar os efeitos da alamandina na função cardíaca pós-isquêmica em corações isolados de ratos Sprague-Dawley e TGR(mREN2)<sup>27</sup>

##### **Capítulo 2:**

- Avaliar a participação do SRA na função cardíaca pós-isquêmica em corações isolados de ratos com restrição alimentar severa

## 4. CAPÍTULO 1

### AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ALAMANDINA NA FUNÇÃO CARDÍACA PÓS-ISQUÊMICA EM CORAÇÕES ISOLADOS DE RATOS SPRAGUE-DAWLEY E TGR(MREN2)27

#### 4.1 Introdução

##### 4.1.1 SRA e Isquemia/Reperusão

Devido à grande complexidade do SRA, vários peptídeos podem atuar nos eventos patogênicos e no desenvolvimento do IM. A Ang II, como principal efetor do SRA, desempenha papel crucial no remodelamento estrutural e metabólico desencadeado pelo IM (STRAUSS; HALL, 2016). Estudos apontam que após o IM agudo (YAMAGISHI et al., 1993) ou a reperusão do miocárdio (ZHANG; XU, 1995), o coração fica exposto à altos níveis de Ang II (DZAU, 1988). Já foi mostrado que a densidade de receptores AT1 sofre aumento significativo após o IM ou isquemia do miocárdio (LEFROY et al., 1996). Tratamentos crônicos com inibidores da ECA ou antagonistas do receptor AT1 atenuaram a dilatação do ventrículo esquerdo, a falência cardíaca e as lesões de isquemia e reperusão (SLEIGHT, 2002). Em adição, já foi mostrado que a participação da Ang II no estabelecimento da isquemia do miocárdio não é benéfica (MANN et al., 2014), além de contribuir para estimulação da apoptose (JUGDUTT, 2004).

Como os trabalhos iniciais indicavam que a Ang II apresentava grande importância na patogênese e desenvolvimento do IM, houve um aumento expressivo na quantidade de trabalhos explorando possíveis efeitos de outros componentes do SRA em protocolos de lesões de isquemia e reperusão. Grinstead e Young, que consolidaram a visão do SRA como sistêmico e tecidual, mostraram que o uso de inibidores da ECA apresentou efeitos anti-arritmogênicos (GRINSTEAD; YOUNG, 1992). Esse efeito foi atribuído à redução dos níveis locais de Ang II e prevenção da degradação da bradicinina, contudo, em 1991 Campbell e colaboradores mostraram que inibidores da ECA aumentavam os níveis plasmáticos de Ang-(1-7) (CAMPBELL et al., 1991), o que também poderia explicar os resultados de Grinstead e Young.

Este possível potencial da Ang-(1-7) como agente anti-arritmogênico fez com que Santos e colaboradores iniciassem uma investigação dos efeitos da Ang-(1-7) em lesões pós-isquêmicas. Em 1997, foi mostrado que, em uma concentração de 27nM, houve piora no índice de arritmias em corações isolados de ratos Wistar submetidos à isquemia e reperusão (NEVES et al., 1997). Esse resultado mostrando que a Ang-(1-7) apresentava um efeito deletério foi atribuído às altas concentrações utilizadas, uma vez que Almeida e colaboradores mostraram que a Ang-(1-7) em concentrações mais baixas

(2,2nM) aumentava a resposta vasodilatadora induzida pela bradicinina (ALMEIDA et al., 2000). Desta forma, ao ser utilizada em uma concentração de 0,22nM, a Ang-(1-7) diminuiu a incidência e duração de arritmias pós-isquemia reperusão em corações isolados de ratos Wistar, sendo que este efeito foi bloqueado na presença do A-779 (FERREIRA; SANTOS; ALMEIDA, 2001). Um ano após a evidência deste efeito anti-arritmogênico, foi mostrado também que a Ang-(1-7) melhorou a função cardíaca através da prevenção da queda da tensão sistólica e manutenção da frequência cardíaca e da  $\pm dP/dt$ . Estes efeitos também foram bloqueados na presença do A-779, antagonista do receptor B2 (HOE-140) e pelo inibidor da via das prostaglandinas (indometacina) (FERREIRA; SANTOS; ALMEIDA, 2002).

Mais dois importantes artigos contribuíram para caracterização do efeito da Ang-(1-7) em lesões isquêmicas em 2004. Primeiro, foi mostrado que a Ang-(1-7) a 10nM hiperpolarizava as células cardíacas e restabelecia a propagação de impulsos no coração isolado de ratas Sprague-Dawley durante o protocolo de isquemia e reperusão, além de aumentar a velocidade de elevação do potencial de ação, melhorando a refratariedade cardíaca (DE MELLO, 2004). Segundo, através da caracterização de um modelo de ratos transgênicos que apresentavam maior nível de Ang-(1-7) plasmática, Santos e colaboradores mostraram redução na duração de arritmias de reperusão e uma melhora na função pós-isquêmica em corações isolados (SANTOS et al., 2004).

Este último trabalho realçou a importância do uso de animais transgênicos para contribuir com a descrição dos efeitos da Ang-(1-7) em arritmias e lesões de isquemia e reperusão. Seguindo a mesma vertente, através da utilização de camundongos C57BL/6 com deleção gênica para o receptor Mas, foi mostrado que as alterações na função contrátil induzida pela deleção ou bloqueio do receptor Mas, durante a isquemia-reperusão, foram independentes da frequência cardíaca (CASTRO et al., 2006).

Com a consolidação do efeito anti-arritmogênico da Ang-(1-7) outros artigos mostraram a cardio (LIAO et al., 2011) e citoproteção da Ang-(1-7) contra lesões causadas pela isquemia e reperusão (WANG et al., 2014). Além de mostrar que a Ang-(1-7), através do receptor Mas, potencializa a atividade cardioprotetora do pré-condicionamento isquêmico em corações de ratos submetidos à isquemia e reperusão, principalmente pela atenuação da disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e apoptose dependente das mitocôndrias (PACHAURI et al., 2017).

Como citado acima, a Alamandina foi recentemente descrita (Lautner et al., 2013) e apresenta grande semelhança estrutural com a Ang-(1-7), assim como algumas ações de ambos são semelhantes. Desta forma surge um novo alvo do SRA como potencial agente anti-arritmogênico. Em dados não publicados do nosso grupo, referentes ao meu mestrado, nós iniciamos a avaliação dos efeitos da Alamandina na

função cardíaca pós-isquêmica e nas arritmias de reperfusão. A **figura S1** mostra que dentre três concentrações utilizadas (220pM, 22pM e 2,2pM), apenas a concentração de 22pM apresentou efeito anti-arritmogênico. A partir da escolha da concentração de 22pM, nós avaliamos os efeitos da Alamandina na função cardíaca pós isquêmica. A **figura S2** mostra que em concentrações picomolares a Alamandina apresentou efeito cardioprotetor ao impedir o prejuízo observado na pressão sistólica e  $\pm dP/dt$  no período isquêmico. Também mostramos que provavelmente a Alamandina age via receptor MrgD e com participação da via das prostaglandinas, mas não de óxido nítrico (**figura S3**). Corroborando nossos dados, Park e colaboradores mostraram em corações isolados de ratos SD que a Alamandina, via receptor MrgD, em uma dose de 0,1mg/Kg, apresentou efeitos cardioprotetores contra lesão de isquemia/reperfusão, reduzindo os níveis de lactato desidrogenase e diminuindo a área infartada através da ativação de uma via anti-apoptótica (PARK et al., 2018).

Assim, como nós já observamos que a Alamandina apresenta potencial terapêutico no tratamento das lesões pós isquêmicas em ratos normotensos, o objetivo do nosso trabalho foi avaliar o papel da Alamandina no protocolo de isquemia/reperfusão em um modelo mais desafiador, com ativação sistêmica do SRA, utilizando corações isolados de ratos normotensos e hipertensos [TGR(mREN2)27].

#### 4.1.2 Ratos TGR(mREN2)27 (mREN)

Em 2015 a hipertensão já afetava 1,2 bilhões de indivíduos (RAHIMI; EMDIN; MACMAHON, 2015). Dessa forma, sua grande abrangência e fatores de risco fazem com que a hipertensão ocupe o mais crítico e dispendioso patamar dentre os problemas de saúde pública (ROSSIER; BOCHUD; DEVUYST, 2017).

Este protagonismo fez com que diversos modelos animais fossem criados para o estudo da hipertensão (LERMAN et al., 2005). Dentre estes modelos podemos citar: o dois rins e um clipe, um modelo de hipertensão renovascular (GOLDBLATT et al., 1934); o DOCA, um mineralocorticóide normalmente associado com o consumo de salina (SELYE, 1942); o SHR (ratos espontaneamente hipertensos) que foram derivados do cruzamento entre ratos Wistar que apresentavam fenótipo hipertensivo naturalmente (OKAMOTO; AOKI, 1963) e o TGR(mRen-2)27, ratos transgênicos que superexpressam o gene Ren2 (MULLINS; PETERS; GANTEN, 1990). Os ratos mREN apresentam altos níveis de Ang II nas glândulas suprarrenais, coração e cérebro, além disso, desenvolvem hipertensão arterial desde jovens (BACHMANN et al., 1992; BADER et al., 1992).

Os ratos mREN foram desenvolvidos para uma melhor compreensão entre a relação entre o SRA e o sistema cardiovascular, principalmente alterações

cardiovasculares que levam a quadros mais graves, como a hipertensão (ENGLER; PAUL; PINTO, 1998a).

Vários estudos já estabeleceram que estes ratos apresentam fibrose cardíaca (BISHOP et al., 2000; CHOUABE et al., 2009; FRENAY et al., 2012; PINTO et al., 2000; ROTHERMUND et al., 2001; YU et al., 2013), remodelamento cardíaco (DE MELLO, 2015; HEERKENS et al., 2014; WHALEY-CONNELL et al., 2007, 2008), hipertrofia (CHOUABE et al., 2009; ZOLK et al., 1998a, 1998b, 2002) e disfunção cardíaca (DEMARCO et al., 2011; VEGTER et al., 2017). Além destas alterações cardiovasculares, estes ratos são considerados modelos consolidados de nefropatia (ROKSNOER et al., 2018; TE RIET et al., 2014) e apresentam redução da sensibilidade barorreflexa da frequência cardíaca (DIZ et al., 2008; JOHNSON et al., 2011). Além disso o papel do SRA é comprovado nesse modelo, pois a hipertensão arterial marcante desses ratos pode ser normalizada pelo uso de antagonistas do receptor AT1 (BADER et al., 1992).

Consequentemente, o uso dos ratos mREN como modelo animal de hipertensão por ativação do SRA é extremamente interessante para avaliar os efeitos da alamandina em condições mais desafiadoras.

## 4.2 Objetivo geral

- Avaliar os efeitos da Alamandina em corações isolados de ratos Sprague-Dawley e TGR(mREN2)27 submetidos a um protocolo de isquemia/reperfusão

### 4.2.1 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos da Alamandina na função cardíaca pós-isquêmica de ratos Sprague-Dawley e TGR(mREN2)27
- Avaliar os efeitos da Alamandina na extensão da área de lesão pós-isquêmica em ratos Sprague-Dawley e TGR(mREN2)27
- Avaliar os efeitos da Alamandina na regulação transcricional dos receptores MrgD, Mas, AT1 e as enzimas ECA e ECA 2 em diferentes estágios do protocolo de isquemia/reperfusão
- Avaliar a participação da AMPK $\alpha$  nos efeitos da Alamandina em diferentes estágios do protocolo de isquemia/reperfusão

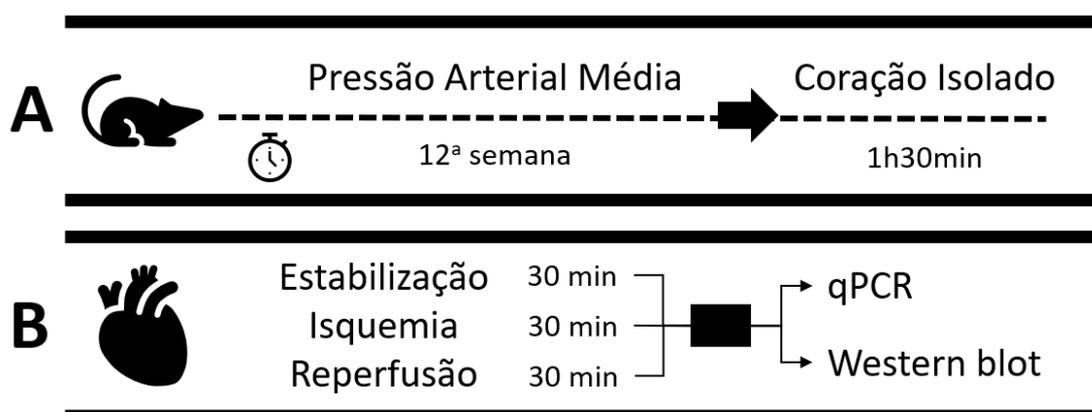
### 4.3 Material e métodos

#### 4.3.1 Animais

Foram utilizados ratos Sprague-Dawley (SD, n=48) e TGR(mREN2)27 (mREN, n=36), com 12-14 semanas, pesando entre 300-350g provenientes do Biotério de Animais Transgênicos do Laboratório de Hipertensão – ICB-UFMG. Os procedimentos utilizados neste trabalho foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA – UFMG com o protocolo 64-2017. Os animais foram alojados em temperatura ambiente e mantidos em um ciclo claro/escuro de 12/12 horas com ração e água *ad libitum*.

#### 4.3.2 Delineamento Experimental

Após completarem 12 semanas de idade, a pressão arterial dos ratos SD e mREN foi aferida. Apenas ratos SD com PAM inferior a 120mmHg e ratos mREN com PAM superior a 130mmHg foram utilizados no experimento. Após esta triagem, os ratos foram eutanasiados e o coração foi utilizado na técnica de Langendorff para avaliação da função cardíaca, permanecendo 30min em estabilização, 30min em isquemia e 30min em reperfusão, na ausência ou presença da Alamandina (20pM). Ao término de cada período (estabilização, isquemia, reperfusão), o experimento de coração isolado foi interrompido e o ventrículo esquerdo foi dissecado para avaliação da regulação transcricional dos componentes do SRA e fosforilação da AMPK $\alpha$  (figura 5).



**Figura 5:** Delineamento experimental dividido em duas etapas. Na letra **A** temos o início do experimento, começando com a triagem dos animais quanto os valores de PAM, ao final desse processo, os animais foram eutanasiados e os parâmetros funcionais cardíacos foram avaliados através da técnica de Langendorff. Na letra **B** temos o início das análises moleculares a partir das amostras extraídas do ventrículo esquerdo no final de cada etapa da técnica de Langendorff.

#### 4.3.3 Pletismografia de Cauda

Para avaliar se a pressão arterial média dos animais mREN se enquadrava nos parâmetros de hipertensão, os animais mREN e SD foram submetidos à um método não invasivo de medida da pressão arterial, a pletismografia de cauda. Os ratos foram contidos em isoladores individuais e então colocados sobre uma placa aquecida para vasodilatação dos vasos da cauda e, por consequência, facilitar a captação do sinal pressórico captado pelo sensor acoplado à cauda dos animais. Os ratos foram submetidos ao pletismógrafo por três vezes, duas para ambientação em dois dias seguidos, e outra para coleta dos dados em um terceiro dia. Ratos que se movimentavam muito no isolador no terceiro dia foram excluídos da análise. Os dados de pressão foram adquiridos pelo software Coda 4.1 (Kent Scientific, Northwest Connecticut, USA).

#### 4.3.4 Técnica de Langendorff (coração isolado)

Animais normotensos (SD) e hipertensos (mREN) foram heparinizados intraperitonealmente (100 U.I) e então eutanasiados por decapitação. Foi realizada uma incisão abaixo do processo xifoide que seguiu até as margens costais, atravessando as costelas nas linhas axilares anteriores esquerda e direita. A parede do peitoral anterior foi rebatida para cima e o coração foi então retirado através da transecção da aorta descendente, da veia cava inferior, da aorta ascendente e da veia cava superior, sendo transferido para uma placa de petri com solução de Krebs-Ringer gelada. Após extração, o coração foi acoplado ao aparato de Langendorff (ADInstruments, São Paulo, Brasil) onde foi dissecado e canulado pela aorta. Após canulado, o coração foi fixado ao aparelho de coração isolado com pressão constante (65 mmHg) e perfundido com solução nutritiva, tamponada (pH: 7,4), aquecida (37°C) e oxigenada (95% de O<sub>2</sub>, 5% de CO<sub>2</sub>) de Krebs-Ringer contendo 118.4 mmol/l NaCl, 4.7 mmol/l KCl, 1.2 mmol/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mmol/l MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 2.0 mmol/l CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 11.7 mmol/l glicose e 26.5 mmol/l NaHCO<sub>3</sub>. Um balão flexível foi inserido no ventrículo esquerdo através do átrio esquerdo após incisão no apêndice atrial esquerdo para registrar a pressão sistólica ventricular esquerda (LVSP), pressão diastólica final ventricular esquerda (LVEDP), frequência cardíaca (FC) e dP/dt máxima e mínima. A pressão ventricular esquerda desenvolvida (dLVP) foi obtida pela diferença entre a LVSP e a LVEDP. Os dados foram adquiridos pelo sistema de aquisição de dados PowerLab, LabChart 7 (ADInstruments, São Paulo, Brasil). O coração permaneceu em estabilização por 30min e foram submetidos a 30min de isquemia parcial, através da oclusão do ramo descendente anterior coronariano esquerdo, seguidos por 30 min de reperfusão em que a oclusão coronariana foi desfeita. Para avaliar se a Alamandina apresentava algum efeito anti-

arritmogênico, foi utilizado um índice de arritmias baseado no trabalho de Neves e colaboradores, em que a duração de arritmias de até 5min será creditada uma pontuação arbitrária de 1, até 10min será dado valor 2, até 15min valor 3, até 20min, valor 6, até 25min valor 9 e até 30min valor 12 (NEVES et al., 1997).

Ao término do protocolo, o coração foi retirado do aparato e os tecidos foram coletados para análise de área infartada ou para análises moleculares.

#### 4.3.5 Concentração da alamandina

A concentração para a Alamandina foi determinada por experimentos anteriores (**figura S1**). Foi escolhida uma concentração de 20pM pois foi a que apresentou os resultados que melhor atendiam ao nosso objetivo, que consistia em avaliar os efeitos da Alamandina na função cardíaca. Ademais, a concentração de 20pM é semelhante às concentrações utilizadas em trabalhos *ex vivo* que utilizaram a Ang-(1-7).

#### 4.3.6 Coloração com cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC)

Após término do experimento de coração isolado, os corações foram retirados do aparelho de Langendorff e uma fatia de 2mm foi retirada 4mm abaixo da base do coração. Essa fatia foi então incubada por 30min a 37° C em uma solução de 1% de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio. Este corante funciona através da reação de cofatores e enzimas desidrogenases do tecido com os sais do tetrazólio que forma um pigmento esbranquiçado, resultando em uma área infartada com uma coloração esbranquiçada, enquanto a área não infartada permanece avermelhada. Após coradas, as fatias foram fotografadas com uma câmera de 13MP e analisadas pelo software ImageJ.

#### 4.3.7 Reação de polimerase em cadeia

Foi coletado o ventrículo esquerdo dos corações isolados dos ratos normotensos e hipertensos após término das três etapas do protocolo de isquemia e reperfusão para avaliação da regulação transcricional dos receptores AT1, Mas, MrgD e as enzimas ECA e ECA2. Dessa forma, novos experimentos foram realizados para que os corações fossem coletados após 30 minutos de estabilização (período basal), 30 minutos de isquemia (período isquêmico) ou 30 minutos de reperfusão (período de reperfusão).

##### 4.3.7.1 Extração de RNA total

A extração de RNA total foi realizada do ventrículo esquerdo de ratos SD e mREN através do protocolo de TRIzol Reagent (Invitrogen, São Paulo, Brasil). Às

amostras ainda congeladas foi adicionado o TRIzol® em uma proporção de 1 mL/100 mg seguido de maceração com o homogeneizador Tissue Master 125 (OMNI International). Então, a solução ficou em TA por 5 minutos. Em seguida, foi adicionado 0,2mL de clorofórmio PA, agitado em vórtex por 10 segundos e incubado por mais 2-3 minutos a TA. As amostras foram então centrifugadas a 12000 G por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, onde foi adicionado 0,5 ml de isopropanol PA 100%, misturado por inversão durante 15 segundos e incubado por 10 minutos em TA. Nova centrifugação foi feita a 12000 G por 10 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado cuidadosamente e ao precipitado foi adicionado 1mL de etanol 75% gelado, seguido de centrifugação a 7500 G durante 5 minutos a 4°C. Ao término da centrifugação, o sobrenadante foi novamente desprezado e o precipitado ficou em temperatura ambiente por aproximadamente 20 minutos deixando evaporar todo etanol. Por fim, o pellet foi ressuscitado em 20µl de água Ultrapure® (Qiagen). O RNA total foi quantificado utilizando os equipamentos DeNovix DS-11 (DeNovix, Delaware, EUA). Todas as amostras utilizadas apresentaram razões 260/230 nm e 260/280 nm maiores ou iguais a 1,8.

#### 4.3.7.2 Desenho dos primers

A sequência dos exons dos genes de interesse foi retirada do banco de dados Ensembl Genome Browser. Em seguida, os pares de iniciadores foram avaliados através do site NCBI (National Center for Biotechnology Information) a fim de se evitar pares com formação de dímeros, alças, palíndromos e repetições. Dessa forma, os primers sem problemas estruturais detectáveis foram testados quanto sua especificidade através da análise por alinhamento local através do site da IDT (Integrated DNA Technologies). A relação completa dos iniciadores desenhados pode ser consultada na Tabela 1.

#### 4.3.7.3 Tratamento com DNase

As amostras do RNA total foram tratadas com DNase I (Sigma, São Paulo, Brasil) para eliminar o DNA genômico existente. Para cada 4µg de RNA foi adicionado 1µl de 10x PCR Reaction Buffer, 1µl de DNase I e água DEPC suficiente para completar o volume de 8µl. Em seguida, as amostras foram encubadas por 15min em temperatura ambiente. Ao fim desta etapa foi adicionado 1µl de solução de parada e as amostras foram submetidas a um ciclo de aquecimento a 70°C por 10 minutos seguido de 1 minuto em gelo, objetivando-se inativar a enzima.

#### 4.3.7.4 Confecção do cDNA

Para a síntese do DNA complementar (cDNA) foi utilizado o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Thermo Fisher Scientific, São Paulo, Brasil). Inicialmente, em um microtubo de reação foram adicionados: 4µg de RNA, 4,2µL de água Ultrapure® (Qiagen), 2µL de 10x RT Random primers, 0,8µL de dNTP mix, 2µL de Reaction Buffer 5X (Thermo Fisher Scientific) e 1µL da enzima Multiscrib Reverse Transcriptase totalizando o volume de 10µL. As amostras foram então colocadas em termociclador Peltier Thermal Cycler (Biocycler) com programação de 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 minutos, conforme instruções do fabricante. O cDNA obtido foi estocado a -20°C.

#### 4.3.7.5 PCR em tempo real

As reações foram realizadas no equipamento ViiA 7 System (Thermo Fisher Scientific, São Paulo, Brasil). Em todas as reações foi utilizado 2,5µL de SYBR® Green PCR Master Mix (QIAGEN, São Paulo, Brasil), 1µL de cDNA (10ng), 0,14µL da solução de primers e 8,2µL de água ultrapura. Em todas as reações foi utilizado um controle negativo (NTC) e o volume da reação mantido em 20µL. Foi adotado protocolo seguindo as especificações do SYBR® Green PCR Master Mix, iniciando com a ativação da Taq polimerase a 95°C por 15 minutos, seguido pelas etapas de desnaturação, anelamento e extensão, respectivamente (94°C por 15 segundos minutos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos por 35 ciclos). A curva de diluição foi feita em 5 concentrações (20ng, 10ng, 5ng, 2,5ng e 1,25ng) para cada gene analisado e todas as reações foram pipetadas em triplicata. A eficiência das reações foi calculada pelo software ViiA 7 System e o valor aceitável foi estipulado entre o intervalo de 95-105%. As curvas de dissociação foram analisadas e não foi verificado nenhum produto espúrio nem dímeros de *primer*. As quantidades relativas dos transcritos foram calculadas usando o método delta–delta Ct.

#### 4.3.8 Western blotting

Os corações foram homogeneizados por 40 minutos em tampão de lise (em mM: NaCl, 100; Tris-base, 50; EDTA-2Na, 5; Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O, 50; MgCl<sub>2</sub>, 1; pH 8,0) com detergentes (Nonidet P40 1%, Triton x-100 0,3% e deoxicolato de sódio 0,5%), contendo inibidores de protease (PMSF 200 mM; benzamidina 15,7 mg/mL; pepstatina 10 mM; aprotinina 10 mg/mL) e inibidores de fosfatase (em mM: NaF, 20; Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1). Ao fim do procedimento, procedeu-se a centrifugação do material (12 minutos, 8000 rpm, 4°C), coleta do sobrenadante e acondicionamento em freezer -80°C para posterior uso. As proteínas foram quantificadas de acordo com o método descrito por Bradford,

1976. 40-50 µg de proteínas foram separadas num gel de poliacrilamida cuja concentração variou entre 10 e 12% dependendo da massa molecular da proteína-alvo.

As amostras foram aquecidas a 95°C por 5 minutos. As corridas foram realizadas com voltagem fixa em 120V e tempo máximo de 2 horas. A transferência foi realizada utilizando-se o aparato de transferência semi-dry (BioRad), com voltagem fixa em 20V e tempo de transferência variando entre 25 e 30 minutos. Todas as membranas foram coradas em solução de Ponceau para monitorar a qualidade da transferência. Logo após, as membranas foram lavadas em solução de TBS-T (do inglês, Tris-Buffered Saline; em mmol/L: NaCl, 150; Tris, 25 e 0,05% de Tween 20, pH 8,0). O bloqueio foi realizado em solução de TBS-T com leite a 5% por 1 hora a temperatura ambiente. As membranas foram incubadas por 16 a 20 horas, a 4°C, com anticorpo primário diluído em solução de leite 1% em TBS-T. Os seguintes anticorpos foram utilizados: anti-AMPK $\alpha$  fosforilada (Thr172) (1:1000, Cell Signaling) e anti-GAPDH (1:3000, Santa Cruz). Após a incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas com TBS-T por 30 minutos (6 vezes de 5 minutos) e incubadas com o anticorpo secundário adequado conjugado a peroxidase (HRP) por 1 hora. Foram utilizados os seguintes anticorpos secundários: anti-coelho (1:15000, Sigma-Aldrich), anti-camundongo (1:15000, Sigma-Aldrich) e anti-cabra (1:10000, Sigma-Aldrich). Após este período, as membranas foram novamente lavadas com TBS-T por 30 minutos (6 vezes de 5 minutos). As bandas foram detectadas por reação de quimioluminescência utilizando o reagente ECL Plus® e analisadas no Image Quant TL®. Foram utilizados o GAPDH e a expressão total da proteína como normalizador da expressão proteica.

#### 4.3.9 Análise estatística

Nossos resultados foram inicialmente analisados quanto a distribuição Gaussiana ou não através do teste d'Agostino and Pearson. Parâmetros cujo resultado não respeitava a distribuição gaussiana foram analisados através do teste T seguido por Mann-Whitney ou one-way ANOVA seguido de Kruskal-Wallis, seguido de Dunn's e Dunnet's. Parâmetros que obedeciam a distribuição gaussiana foram analisados através de testes ANOVA two-way seguido de Bonferroni. Todos os testes foram realizados com o auxílio do software Prisma® 6.0. Foi considerado significativo  $p < 0,05$ .

## 4.4 Resultados

### 4.4.1 Dados gerais

A primeira etapa desse trabalho foi avaliar se os animais transgênicos utilizados no estudo possuíam as características descritas na literatura que caracterizam o modelo mREN como modelo animal de hipertensão.

Conforme descrito pela literatura (BADER et al., 1992; ENGLER; PAUL; PINTO, 1998b; LANGHEINRICH et al., 1996), os ratos mREN apresentaram pressão arterial média (PAM) de  $150,5 \pm 9,6$  mmHg acima dos valores apresentados pelos ratos SD ( $109,1 \pm 3,9$  mmHg), ambos com idade entre 12-14 semanas (**tabela 1**).

Na **tabela 1** também podemos observar que o peso corporal dos ratos SD foi de  $236,8 \pm 11,57$  g, não existindo diferença significativa com o peso corporal de  $246,4 \pm 18,90$  g dos ratos mREN. Ainda que com pesos corporais similares, o coração dos ratos mREN apresentou massa de  $1,169 \pm 0,030$  g, enquanto que o coração dos ratos SD apresentou massa de  $1,013 \pm 0,033$  g. Através do índice de massa ventricular (IMV), que consiste na normalização da massa dos corações pelo comprimento da tíbia, nós podemos observar que os corações dos ratos mREN são hipertrofiados ( $0,310 \pm 0,006$  g/cm) quando comparado com os corações dos animais SD ( $0,272 \pm 0,008$  g/cm).

	<b>Sprague Dawley</b>	<b>mREN</b>	<b>p</b>
<b>Pressão Arterial Média (mmHg)</b>	$109,1 \pm 3,9$ , n=6	$150,5 \pm 9,6$ , n=11	0,0103*
<b>Peso corporal (g)</b>	$236,8 \pm 11,57$ , n=11	$246,4 \pm 18,90$ , n=11	0,6713
<b>Coração (g)</b>	$1,013 \pm 0,033$ , n=8	$1,169 \pm 0,030$ , n=8	0,0037*
<b>Tíbia (cm)</b>	$3,763 \pm 0,046$ , n=8	$3,725 \pm 0,025$ , n=8	0,5341
<b>Índice de Massa Ventricular (g/cm)</b>	$0,272 \pm 0,008$ , n=8	$0,310 \pm 0,006$ , n=8	0,0014*

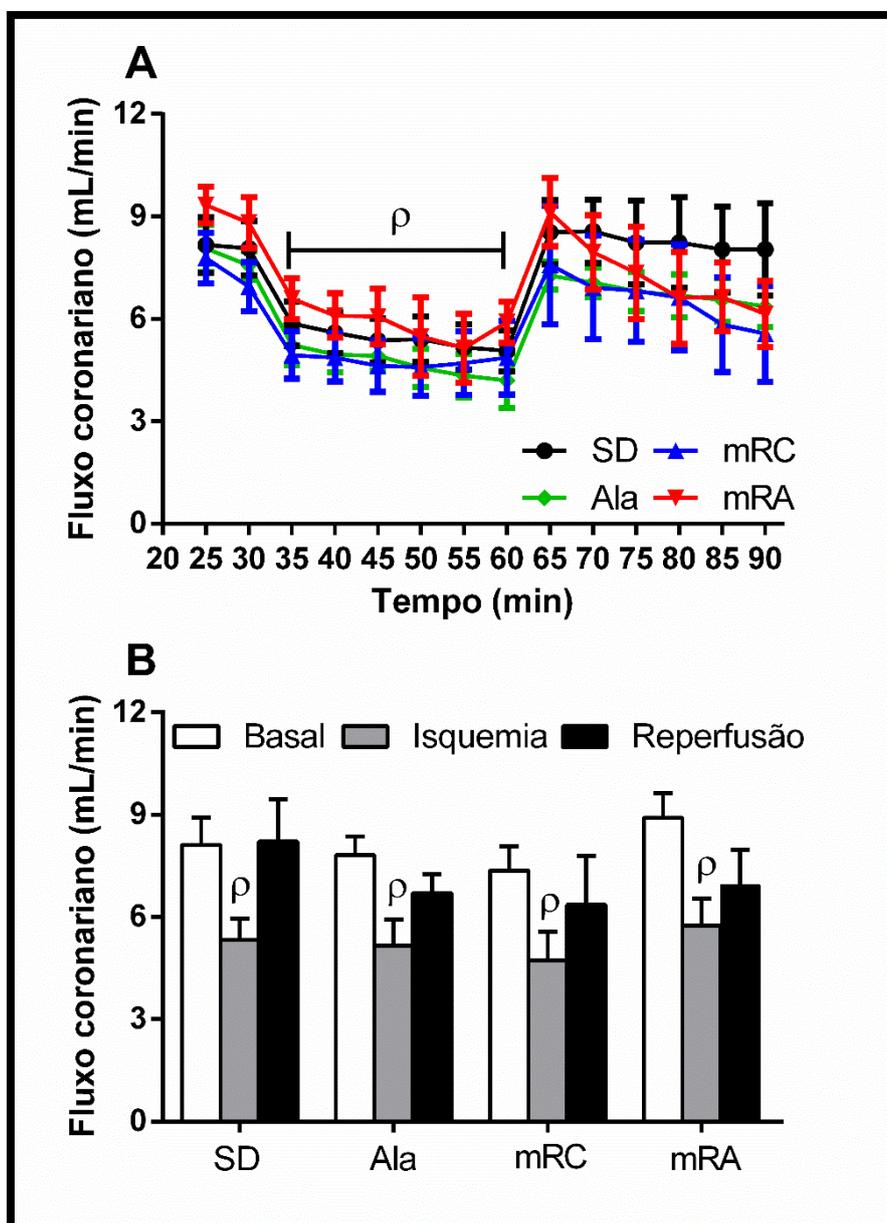
**Tabela 1:** Pressão arterial média e parâmetros cardíacos morfométricos. Teste t de Student foi utilizado para comparar diferença entre os grupos sprague-dawley e mREN. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  vs grupo Sprague Dawley.

### 4.4.2 Vasomotricidade e função cardíaca

Uma vez averiguado o fenótipo hipertensivo dos animais mREN, nosso próximo objetivo foi avaliar a resposta do coração isolado dos ratos mREN ao protocolo de isquemia/reperfusão.

Como já descrito na metodologia, os corações foram submetidos à isquemia parcial, que consistiu na oclusão do ramo descendente coronariano esquerdo. Em resposta à isquemia, o coração do grupo SD apresentou uma redução de 34,5% do fluxo coronariano, muito similar à resposta de 35,8% do grupo mREN. No período de

reperfusão, o fim da oclusão parcial coronariana levou à normalização do fluxo coronariano em ambos grupos (**figura 6**).



**Figura 6:** Efeitos da Alamandina no fluxo coronariano no experimento de coração isolado. O gráfico **A** mostra os valores absolutos do fluxo pelo tempo e o gráfico **B** mostra a representação em barras dos eventos no gráfico **A**. Two-way ANOVA foi utilizada para comparar diferença entre os grupos ao longo dos diferentes períodos do protocolo de I/R. Os valores são mostrados em média  $\pm$  EPM.  $\rho$   $p < 0,05$  vs período basal de cada respectivo grupo. SD significa grupo normotenso controle (n=10); Ala significa grupo normotenso tratado com alamandina (20pM, n=10); mRC representa grupo hipertenso controle (n=10); mRA significa grupo hipertenso tratado com alamandina (20pM, n=9).

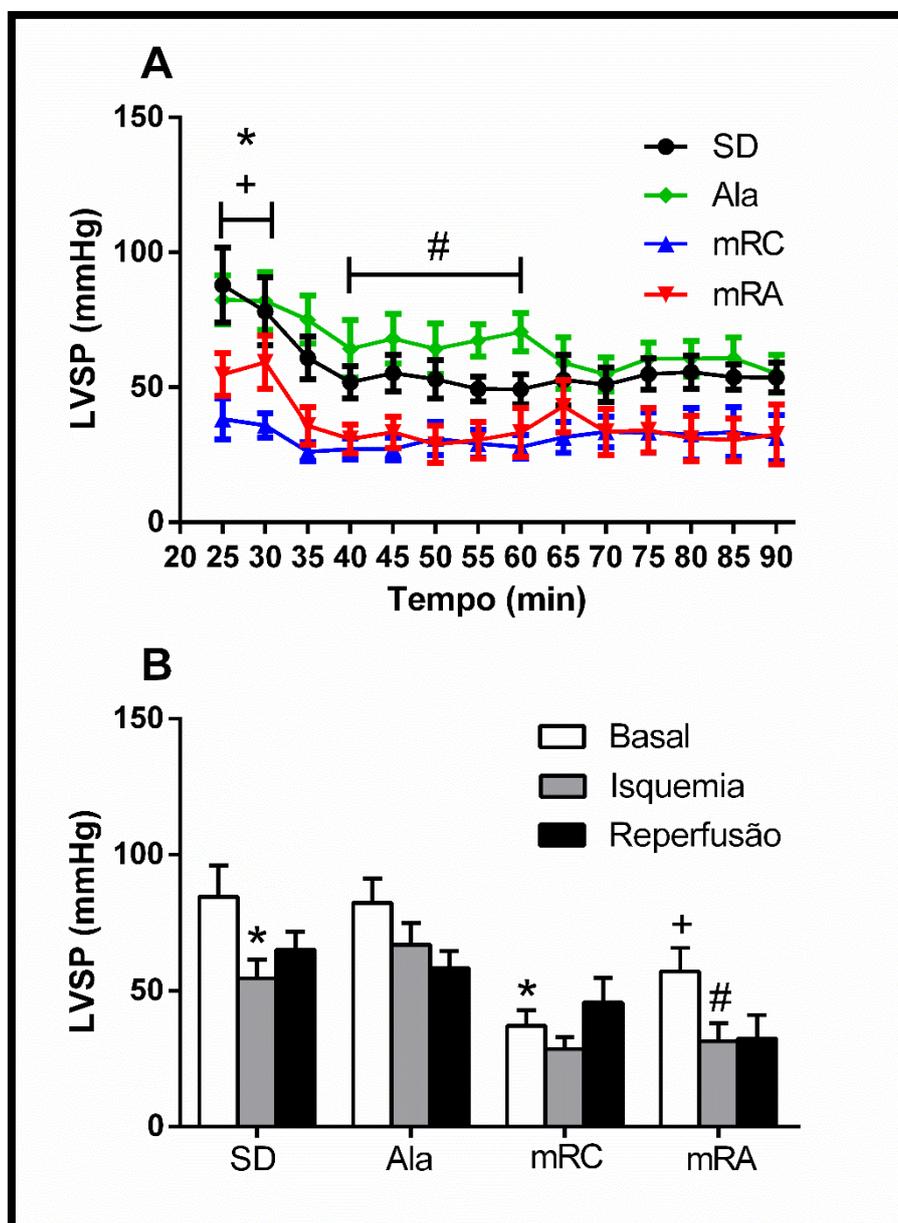
Na presença da alamandina, a isquemia levou a uma queda de 34% do fluxo coronariano no grupo ALA, valor muito semelhante ao grupo SD, retornando aos valores basais no período de reperfusão. Da mesma forma, o fluxo coronariano dos animais hipertensos tratados com alamandina apresentou queda de 35,6% no período isquêmico, mostrando que a alamandina não levou a nenhuma alteração do fluxo, tanto no grupo hipertenso, quanto no grupo normotenso (**figura 6**).

Em consequência da ausência de efeitos da alamandina nas alterações de fluxo coronariano ocasionadas pela isquemia, nossos dados sugerem que os efeitos apresentados a seguir pela alamandina são independentes do fluxo.

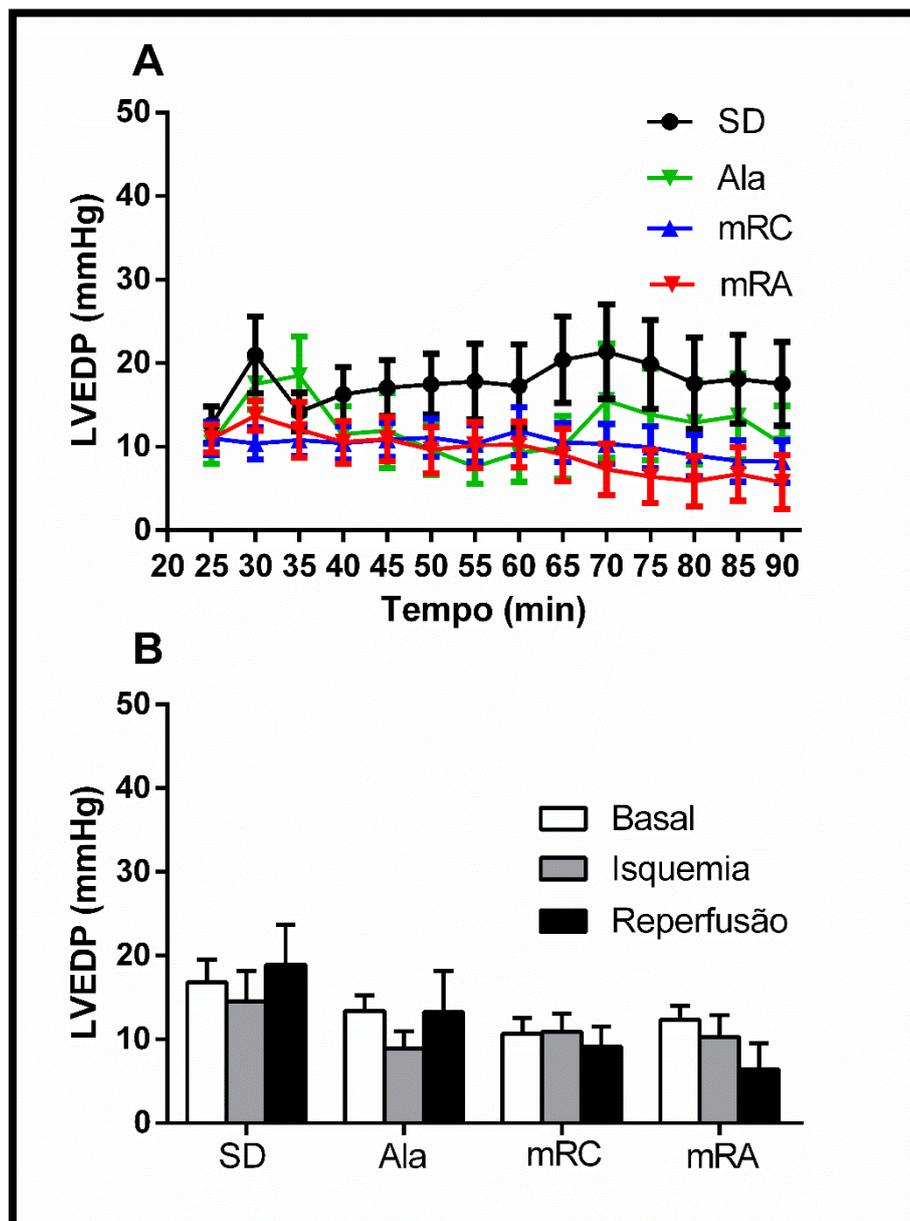
O próximo parâmetro avaliado foi a pressão sistólica do ventrículo esquerdo (LVSP). A contração do ventrículo esquerdo foi captada por um balão flexível, inserido no ventrículo esquerdo, acoplado ao transdutor de pressão. O valor obtido durante a sístole é um dos principais parâmetros utilizados para a exclusão do coração de um experimento de coração isolado porque está diretamente ligado com a capacidade contrátil de um coração saudável e sua adaptação ao sistema de Langendorff. O grupo SD apresentou LVSP de  $84,57 \pm 11,54$  mmHg no período basal. A isquemia levou a uma queda significativa ( $p=0,0443$ ) da LVSP para  $54,56 \pm 6,90$  mmHg e a reperfusão não foi capaz de restaurá-la. Na presença da alamandina, o grupo ALA apresentou LVSP de  $82,29 \pm 8,88$  mmHg no período basal, mostrando que a alamandina não alterou significativamente os valores basais da LVSP. Contudo, no período isquêmico a alamandina, em concentrações picomolares, foi capaz de impedir o efeito deletério do período isquêmico de reduzir a LVSP, mantendo a LVSP do grupo ALA em  $66,93 \pm 7,85$  mmHg. A LVSP no grupo mRC foi de  $37,09 \pm 5,70$  mmHg no período basal. Esse valor é significativamente menor ( $p=0,0041$ ) que o valor basal no grupo SD, o que mostra que em condições pré-isquêmicas, o grupo mRC já apresentava grande prejuízo na LVSP. No período isquêmico, a LVSP do grupo mRC foi de  $28,52 \pm 4,47$  mmHg, não diferindo significativamente do valor basal dentro do próprio grupo, ou mesmo da LVSP no período de reperfusão ( $45,68 \pm 9,08$  mmHg). O tratamento com alamandina levou o valor basal da LVSP do grupo mRA para  $57,06 \pm 8,70$  mmHg. Este valor é significativamente maior ( $p=0,0250$ ) que o valor basal do grupo mRC, mostrando que a alamandina foi capaz de melhorar a LVSP no período basal dos ratos hipertensos. Contudo, a presença da Alamandina não foi capaz de impedir os efeitos deletérios da isquemia na LVSP, reduzindo esse valor significativamente ( $p=0,0262$ ) a  $31,44 \pm 6,67$  mmHg no grupo mRA (**figura 7**).

Diferente da LVSP, a pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (LVEDP) é definida no período de estabilização em 10-15 mmHg, ou seja, é um parâmetro que é independente da ação cardíaca no período de estabilização, mas que está sujeito ao

controle intrínseco do coração a partir do fim do período basal. A **figura 8** mostra que nem a isquemia, nem a reperfusão, alteraram a LVEDP em nenhum dos grupos.



**Figura 7:** Efeitos da Alamandina na pressão sistólica do ventrículo esquerdo (LVSP) no experimento de coração isolado. O gráfico **A** mostra as variações da LVSP pelo tempo e o gráfico **B** mostra a representação em barras dos eventos no gráfico **A**. Two-way ANOVA foi utilizada para comparar diferença entre os grupos ao longo dos diferentes períodos do protocolo de I/R. Os valores são mostrados em média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  vs período basal do grupo SD; +  $p < 0,05$  vs período basal do grupo mRC; #  $p < 0,05$  vs período basal do grupo mRA. SD significa grupo normotenso controle (n=10); Ala significa grupo normotenso tratado com alamandina (20pM, n=10); mRC representa grupo hipertenso controle (n=10); mRA significa grupo hipertenso tratado com alamandina (20pM, n=9).



**Figura 8:** Efeitos da Alamandina na pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (LVEDP) no experimento de coração isolado. O gráfico **A** mostra as variações da LVEDP pelo tempo e o gráfico **B** mostra a representação em barras dos eventos no gráfico **A**. Two-way ANOVA foi utilizada para comparar diferença entre os grupos ao longo dos diferentes períodos do protocolo de I/R. Os valores são mostrados em média  $\pm$  EPM. SD significa grupo normotenso controle (n=10); Ala significa grupo normotenso tratado com alamandina (20pM, n=10); mRC representa grupo hipertenso controle (n=10); mRA significa grupo hipertenso tratado com alamandina (20pM, n=9).

A **figura 9** mostra a pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (dLVP). Esse parâmetro consiste na diferença entre a LVSP e a LVEDP e é muito utilizado na literatura para expressar a capacidade contrátil miocárdica, refinando valores sistólicos

pelos diastólicos. No grupo SD, a dLVP era de  $76,59 \pm 11,30$  mmHg no período basal, mas sofreu uma queda significativa ( $p=0,0185$ ) para  $39,48 \pm 7,64$  mmHg no período isquêmico e não se recuperou no período de reperfusão ( $47,38 \pm 9,00$  mmHg). O tratamento com Alamandina não alterou significativamente os valores basais da dLVP no grupo ALA ( $68,89 \pm 8,92$  mmHg), contudo a o heptapeptídeo foi capaz de manter a dLVP em  $58,87 \pm 8,04$  mmHg no período isquêmico, valor similar ao do período basal e ao período de reperfusão ( $52,01 \pm 8,03$  mmHg).

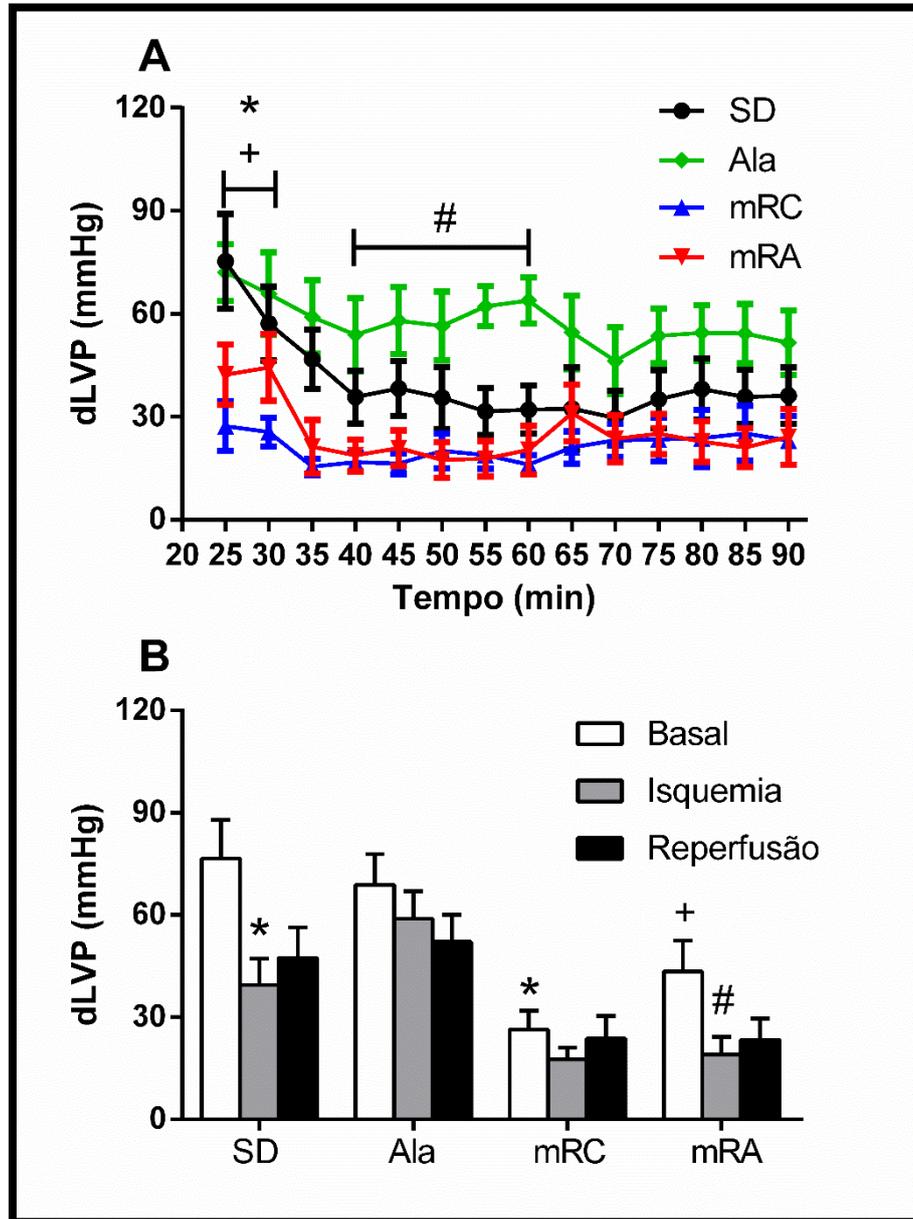
Por sua vez, o grupo mRC apresentou dLVP de  $26,39 \pm 5,49$  mmHg no período basal, valor significativamente inferior ( $p= 0,0021$ ) ao mesmo período no grupo SD. A isquemia não alterou significativamente o valor da dLVP ( $17,61 \pm 3,40$  mmHg), nem a reperfusão ( $23,69 \pm 6,62$  mmHg). O presença da alamandina no período basal do grupo mRA aumentou a dLVP significativamente ( $p= 0,0453$ ) para  $43,30 \pm 9,18$  mmHg quando comparado com o grupo mRC no mesmo período. Entretanto, a alamandina não foi capaz de impedir a queda significativa ( $p= 0,0175$ ) da dLVP para  $19,01 \pm 5,21$  no período isquêmico no grupo mRA.

Outro parâmetro bastante usado na literatura são as derivadas da onda de pressão do ventrículo esquerdo. A dP/dt positiva ou máxima e a dP/dt negativa ou mínima são derivadas que mostram a eficiência da contratilidade ou relaxamento, respectivamente, do ventrículo esquerdo. De forma mais simplificada, o cálculo da dP/dt envolve a variação de pressão em um determinado período e quanto menos tempo o ventrículo esquerdo leva para aumentar a pressão no seu interior, mais eficaz é sua contratilidade.

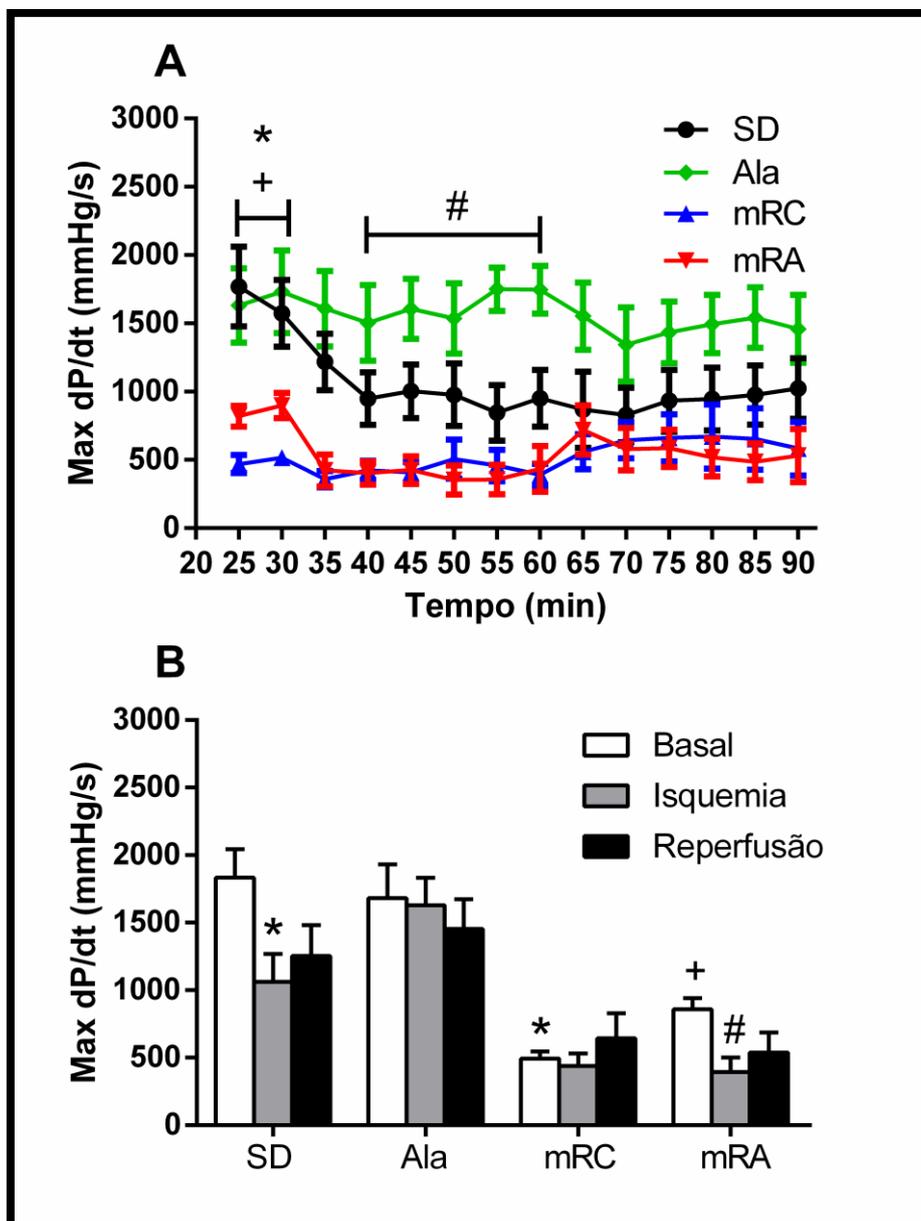
As **figuras 10 e 11** mostram as variações na dp/dt máxima e mínima, respectivamente ao longo do protocolo de isquemia/reperfusão. A **figura 10** mostra que, no grupo SD, a dP/dt máxima diminuiu significativamente ( $p=0,0232$ ) de  $1835 \pm 209,8$  mmHg/s no período basal, para  $1062 \pm 205,3$  mmHg/s no período isquêmico, se mantendo em  $1253 \pm 229,2$  mmHg/s no período de reperfusão. Em concentrações picomolares a alamandina impediu o efeito deletério da isquemia na contratilidade do grupo Ala, mantendo o valor da dP/dt máxima em  $1629 \pm 202,2$  mmHg/s, valor semelhante ao período basal no mesmo grupo ( $1682 \pm 248,8$  mmHg/s). O grupo mRC, por sua vez apresentou grande prejuízo ( $p<0,0001$ ) na contratilidade no período basal ( $493,6 \pm 51,92$  mmHg/s) quando comparado com o mesmo período dos ratos normotensos não tratados. A isquemia não levou a diferença estatística no valor da dP/dt máxima no grupo mRC, assim como a reperfusão, mantendo os valores em  $437,6 \pm 92,75$  mmHg/s e  $642,6 \pm 186,1$  mmHg/s, respectivamente.

Os animais hipertensos tratados com alamandina apresentaram dP/dt máxima de  $859,4 \pm 80,85$  mmHg/s no período basal. A presença da alamandina, no entanto, não

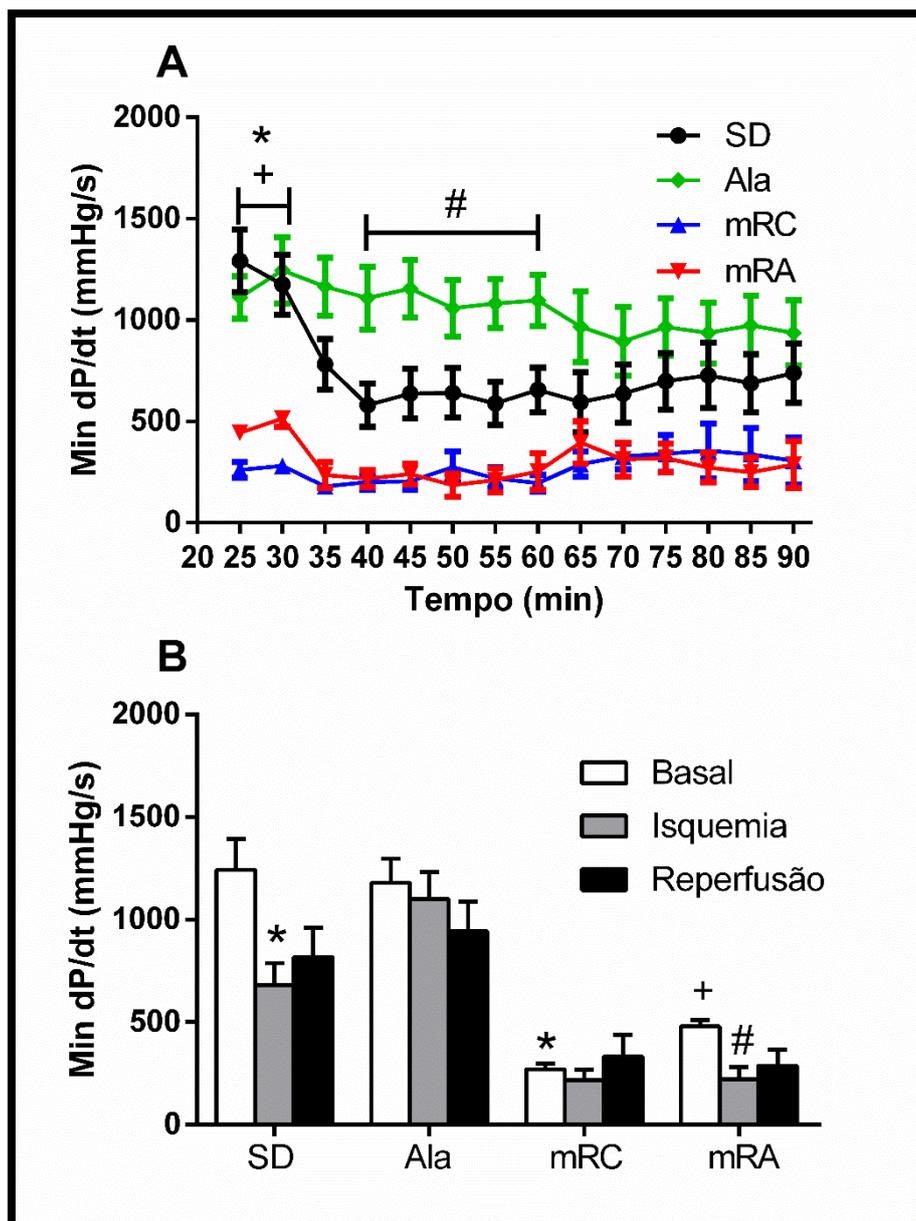
foi capaz de impedir uma queda significativa ( $p= 0,0111$ ) na  $dP/dt$  máxima para  $394,4 \pm 107,6$  mmHg/s no período isquêmico ou para  $539,8 \pm 147,3$  mmHg/s no período de reperfusão.



**Figura 9:** Efeitos da Alamandina na pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (dLVP) no experimento de coração isolado. O gráfico **A** mostra as variações da dLVP pelo tempo e o gráfico **B** mostra a representação em barras dos eventos no gráfico **A**. Two-way ANOVA foi utilizada para comparar diferença entre os grupos ao longo dos diferentes períodos do protocolo de I/R. Os valores são mostrados em média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  vs período basal do grupo SD; +  $p < 0,05$  vs período basal do grupo mRC; #  $p < 0,05$  vs período basal do grupo mRA. SD significa grupo normotenso controle ( $n=10$ ); Ala significa grupo normotenso tratado com alamandina (20pM,  $n=10$ ); mRC representa grupo hipertenso controle ( $n=10$ ); mRA significa grupo hipertenso tratado com alamandina (20pM,  $n=9$ ).



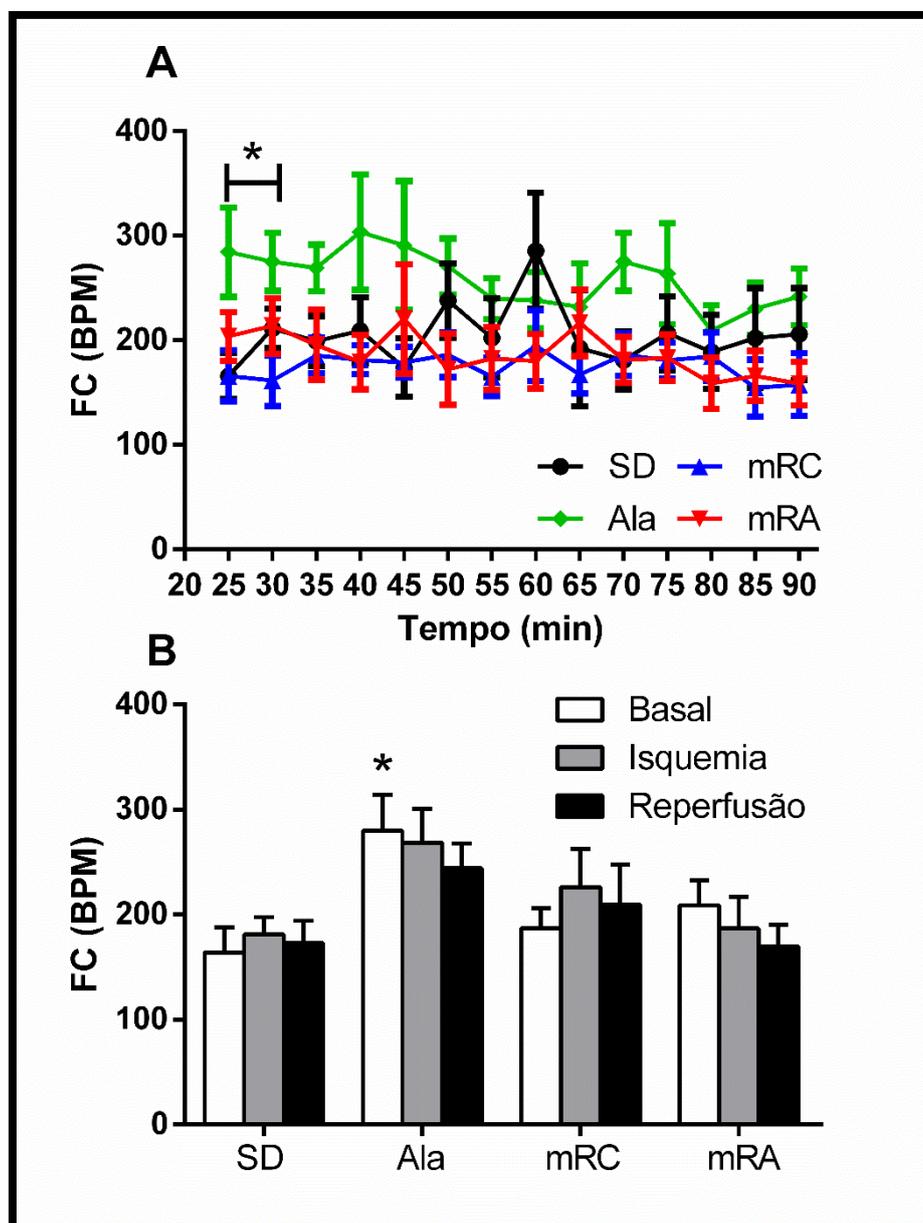
**Figura 10:** Efeitos da Alamandina na dP/dt máxima (max dP/dt) no experimento de coração isolado. O gráfico **A** mostra as variações da dP/dt máxima pelo tempo e o gráfico **B** mostra a representação em barras dos eventos no gráfico **A**. Two-way ANOVA foi utilizada para comparar diferença entre os grupos ao longo dos diferentes períodos do protocolo de I/R. Os valores são mostrados em média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  vs período basal do grupo SD; +  $p < 0,05$  vs período basal do grupo mRC; #  $p < 0,05$  vs período basal do grupo mRA. SD significa grupo normotenso controle (n=10); Ala significa grupo normotenso tratado com alamandina (20pM, n=10); mRC representa grupo hipertenso controle (n=10); mRA significa grupo hipertenso tratado com alamandina (20pM, n=9).



**Figura 11:** Efeitos da Alamandina na dP/dt mínima (min dP/dt) no experimento de coração isolado. O gráfico **A** mostra as variações da dP/dt mínima pelo tempo e o gráfico **B** mostra a representação em barras dos eventos no gráfico **A**. Two-way ANOVA foi utilizada para comparar diferença entre os grupos ao longo dos diferentes períodos do protocolo de I/R. Os valores são mostrados em média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  vs período basal do grupo SD; +  $p < 0,05$  vs período basal do grupo mRC; #  $p < 0,05$  vs período basal do grupo mRA. SD significa grupo normotenso controle (n=10); Ala significa grupo normotenso tratado com alamandina (20pM, n=10); mRC representa grupo hipertenso controle (n=10); mRA significa grupo hipertenso tratado com alamandina (20pM, n=9).

De forma semelhante à dP/dt máxima, a dP/dt mínima no grupo mRC apresentou queda significativa ( $p = 0,0115$ ) de  $478,5 \pm 32,94$  mmHg/s no período basal para  $221,7 \pm 58,39$  mmHg/s no período isquêmico. Não houve queda da dP/dt mínima

no período isquêmico do grupo Ala, mostrando importante efeito cardioprotetor na eficiência do relaxamento.



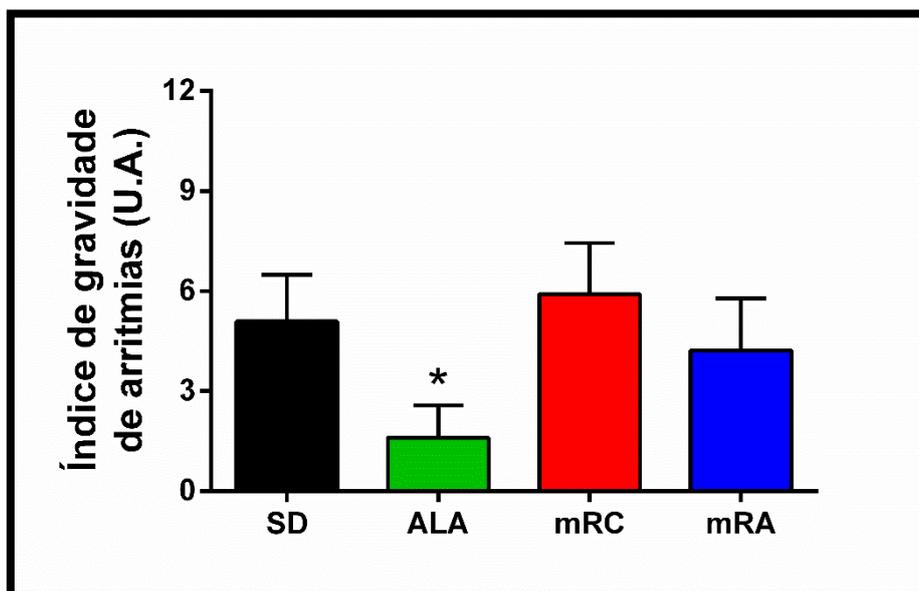
**Figura 12:** Efeitos da Alamandina na frequência cardíaca (FC) no experimento de coração isolado. O gráfico **A** mostra as variações da FC pelo tempo e o gráfico **B** mostra a representação em barras dos eventos no gráfico **A**. Two-way ANOVA foi utilizada para comparar diferença entre os grupos ao longo dos diferentes períodos do protocolo de I/R. Os valores são mostrados em média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  vs período basal do grupo SD. SD significa grupo normotenso controle (n=10); Ala significa grupo normotenso tratado com alamandina (20pM, n=10); mRC representa grupo hipertenso controle (n=10); mRA significa grupo hipertenso tratado com alamandina (20pM, n=9).

Entretanto, no coração dos animais hipertensos não tratados, há um prejuízo significativo ( $p < 0,0001$ ) na  $dP/dt$  mínima no período basal ( $270,7 \pm 28,81 \text{ mmHg/s}$ ) quando comparado com o mesmo período do grupo SD. O tratamento com alamandina melhorou significativamente ( $p = 0,0002$  vs mRC) a  $dP/dt$  mínima para  $478,5 \pm 32,94 \text{ mmHg/s}$  no período basal, mas não impediu a queda da  $dP/dt$  mínima para  $221,7 \pm 58,39 \text{ mmHg/s}$  no período isquêmico (**figura 11**).

Assim como os parâmetros citados acima, a frequência cardíaca (FC) foi acessada através do balão flexível acoplado a um transdutor de pressão. A isquemia não resultou em nenhuma alteração na frequência cardíaca em nenhum dos grupos, assim como a reperfusão. Contudo, o tratamento com alamandina, no grupo Ala, levou a um aumento significativo ( $p = 0,0137$ ) da FC no período basal ( $279,8 \pm 34,29 \text{ bpm}$ ) quando comparado com o grupo SD ( $186,9 \pm 19,34 \text{ bpm}$ ) no mesmo período (**figura 12**).

#### 4.4.3 Índice de Arritmias

O próximo passo foi avaliar se a alamandina em concentrações picomolares influenciaria no índice de gravidade de arritmias (IGA).

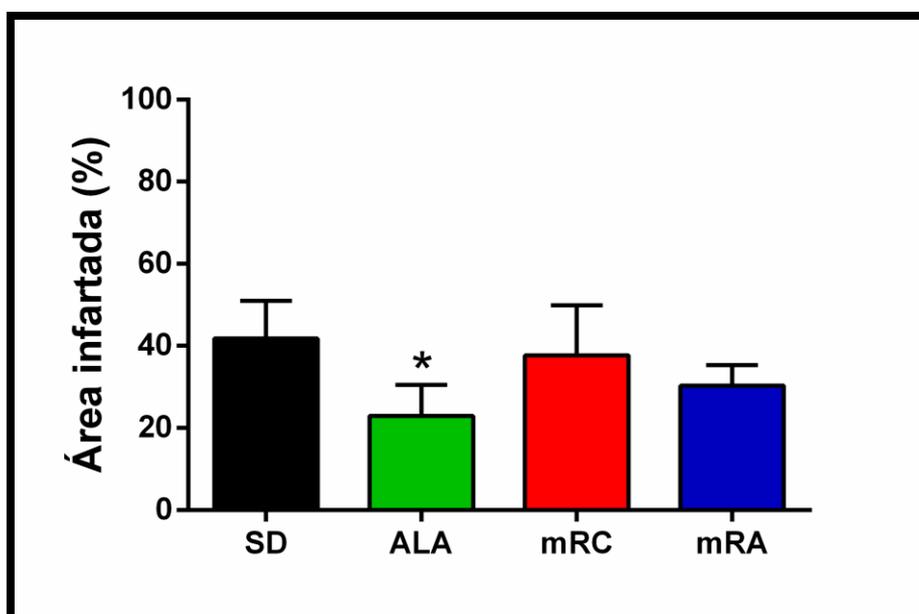


**Figura 13:** Efeitos da Alamandina no índice de gravidade de arritmias (IGA) no experimento de coração isolado. Teste t de Student foi utilizado para comparar diferença entre os grupos no IGA. Os valores são mostrados em média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  vs grupo SD. SD significa grupo normotenso controle (n=10); Ala significa grupo normotenso tratado com alamandina (20pM, n=10); mRC representa grupo hipertenso controle (n=10); mRA significa grupo hipertenso tratado com alamandina (20pM, n=9).

Na **figura 13** podemos observar a atribuição do IGA baseado no trabalho de Neves e colaboradores, 1997, na quantidade de arritmias de reperfusão em cada grupo. Podemos observar que o grupo SD apresentou IGA de  $5,100 \pm 1,394$ . Entretanto, o tratamento com alamandina levou a uma redução significativa ( $p= 0,0074$ ) no índice de arritmias para  $1,600 \pm 0,979$ . Contudo, em animais hipertensos não houve diferença significativa entre o índice de arritmias na presença ( $4,222 \pm 1,561$ ) ou ausência da Alamandina ( $5,900 \pm 1,545$ ), assim como o animal transgênico não tratado não apresentou índice arritmogênico diferente do animal normotenso controle.

#### 4.4.4 Área Infartada

A próxima etapa foi avaliar se a alamandina apresentaria alterações na área de lesão ocasionada pela insuficiência suplementar metabólica ocasionada pela isquemia.



**Figura 14:** Efeitos da Alamandina na área infartada no experimento de coração isolado. Teste t de Student foi utilizado para comparar diferença entre os grupos na porcentagem de área infartada. Os valores são mostrados em média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  vs grupo SD. SD significa grupo normotenso controle ( $n=6$ ); Ala significa grupo normotenso tratado com alamandina (20pM,  $n=6$ ); mRC representa grupo hipertenso controle ( $n=6$ ); mRA significa grupo hipertenso tratado com alamandina (20pM,  $n=6$ ).

Para essa avaliação foi utilizado o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio. Este sal reage com desidrogenases e cofatores, tornando a área lesada esbranquiçada e a área saudável adquire um tom vermelho escuro. No grupo SD, os corações pós-isquêmicos apresentaram  $41,78 \pm 4,10\%$  de área infartada, enquanto o tratamento com Alamandina reduziu significativamente ( $p=0,0087$ ) essa porcentagem para  $22,97 \pm 3,09\%$  no grupo

Ala, como mostra a **figura 14**. De forma interessante, nos animais hipertensos não houve alteração na área de lesão entre os grupos mRC ( $37,73 \pm 4,95\%$ ) e mRA ( $30,27 \pm 2,06\%$ ), mostrando que a alamandina não apresentou efeito protetor na área infartada nos animais transgênicos.

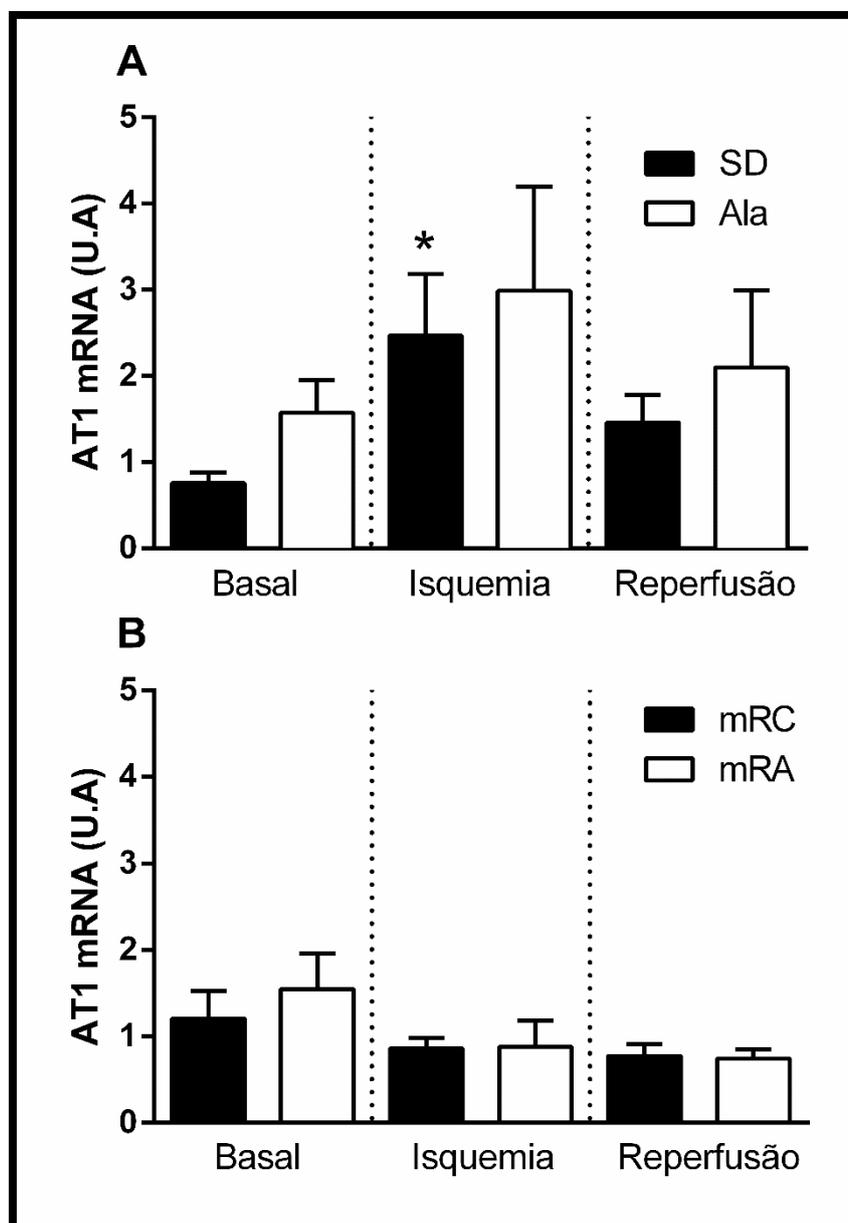
#### 4.4.5 Regulação transcricional dos componentes do SRA

Após avaliar que a Alamandina apresentava um interessante efeito cardioprotetor em animais normotensos, mas que esse efeito era reduzido em animais hipertensos, nós avaliamos a regulação transcricional de importantes componentes do SRA. A partir das amostras do ventrículo esquerdo dos corações isolados dos animais normotensos e hipertensos foi analisado, através da PCR em tempo real, os efeitos da Alamandina na regulação transcricional dos receptores AT1, MrgD e Mas e das enzimas ECA e ECA2.

O receptor AT1 foi o primeiro componente avaliado. Podemos observar na **figura 15A** que a isquemia, no grupo SD, aumentou significativamente ( $p=0,0499$ ) a quantidade de mRNA para  $1,462 \pm 0,3203$ , enquanto apresentava  $0,7565 \pm 0,1202$  no período basal. Contudo, não houve diferença quantitativa no período de reperfusão. O tratamento com alamandina no grupo ALA não levou a alterações significativas na quantidade de mRNA do receptor AT1 nos diferentes períodos. Nenhuma diferença foi observada na quantidade de mRNA do receptor AT1 nos animais hipertensos, tratados ou não com alamandina (**figura 15B**).

O próximo alvo avaliado foi o receptor da alamandina, o MrgD. Nos animais normotensos podemos observar que não houve diferença na quantidade de mRNA para o receptor MrgD, em condições basais, entre os grupos SD ( $2,049 \pm 0,654$ ) e ALA ( $1,617 \pm 0,7048$ ). como mostrado na **figura 16A**. O período isquêmico também não levou a diferença estatística entre os grupos SD ( $4,401 \pm 1,828$ ) e ALA ( $5,431 \pm 1,533$ ), incluindo quando comparados com o período basal. No período de reperfusão o padrão se manteve, não havendo diferença entre os grupos SD ( $4,650 \pm 2,274$ ) e ALA ( $3,216 \pm 1,589$ ). De forma interessante, nos animais hipertensos, podemos observar que a quantidade de mRNA do receptor MrgD basal foi mais baixa do que quando comparada com os animais normotensos (**figura 16B**). No período basal, não houve diferença significativa entre os grupos mRC ( $0,6438 \pm 0,1313$ ) e mRA ( $0,4930 \pm 0,1832$ ). O período isquêmico levou à quantidade de mRNA em ambos os grupos mRC ( $0,0233 \pm 0,004$ ) e mRA ( $0,1290 \pm 0,0545$ ) próxima à zero, sendo que o período de reperfusão não foi capaz de aumentar os níveis de mRNA dos grupos mRC ( $0,0993 \pm 0,0330$ ) e mRA ( $0,0280 \pm 0,0085$ ). Estes dados mostram pela primeira vez que nos animais

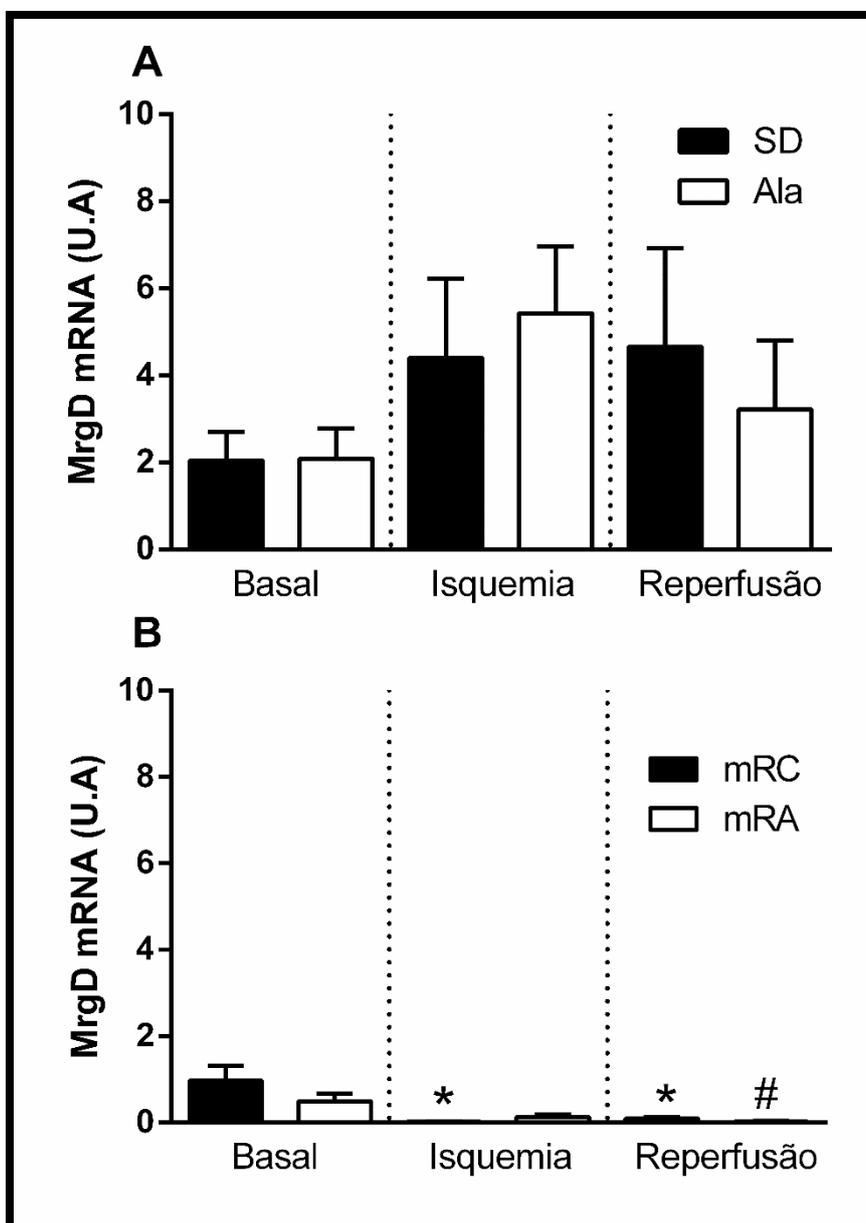
TGR(mREN2)27 o receptor MrgD está hipo-regulado em relação aos animais sprague-dawley.



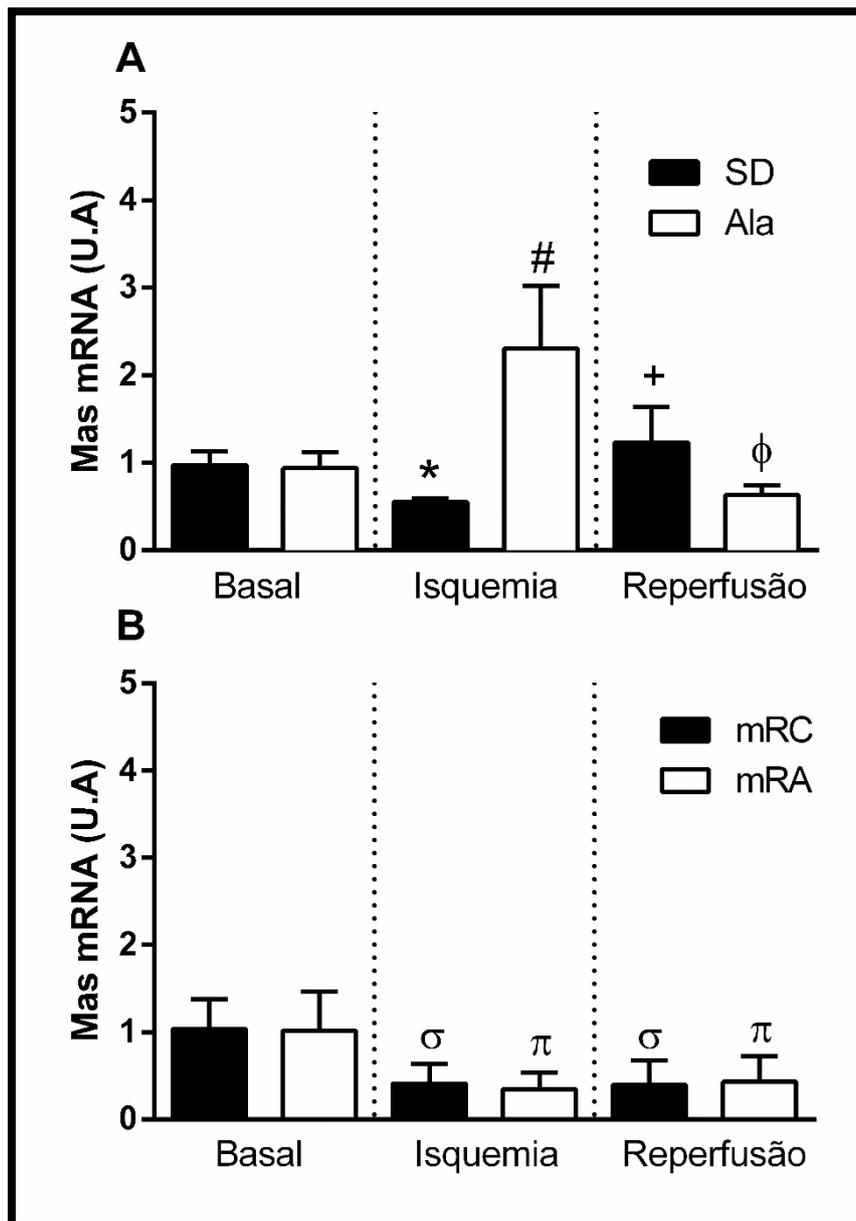
**Figura 15:** Efeitos da Alamandina na quantidade de mRNA do receptor AT1 ao longo do protocolo de isquemia/reperusão. Teste t de Student foi utilizado para comparar diferença entre os períodos do protocolo de isquemia e reperusão. Os valores são mostrados em média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  vs período basal do grupo SD. SD significa grupo normotenso controle (n=8); Ala significa grupo normotenso tratado com alamandina (20pM, n=8); mRC representa grupo hipertenso controle (n=6); mRA significa grupo hipertenso tratado com alamandina (20pM, n=6).

A **figura 17** mostra as quantidades de mRNA do receptor Mas ao longo do protocolo de isquemia e reperusão. Nos animais normotensos (**figura 17A**), no período basal, a presença da Alamandina não levou a diferenças entre o grupo SD ( $0,9748 \pm$

0,1572) e ALA ( $0,9384 \pm 0,1864$ ). Já no período isquêmico, o receptor Mas está hiporegulado no grupo SD ( $0,5540 \pm 0,0384$ ) com relação ao período basal. Antagonicamente, o tratamento com Alamandina levou a hiper-regulação do receptor Mas do grupo ALA ( $2,307 \pm 0,7137$ ).



**Figura 16:** Efeitos da Alamandina na quantidade de mRNA do receptor MrgD ao longo do protocolo de isquemia/reperusão. Teste t de Student foi utilizado para comparar diferença entre os períodos do protocolo de isquemia e reperusão. Os valores são mostrados em média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  vs período basal do grupo mRC. #  $p < 0,05$  vs período basal do grupo mRA. SD significa grupo normotenso controle (n=8); Ala significa grupo normotenso tratado com alamandina (20pM, n=8); mRC representa grupo hipertenso controle (n=6); mRA significa grupo hipertenso tratado com alamandina (20pM, n=6).



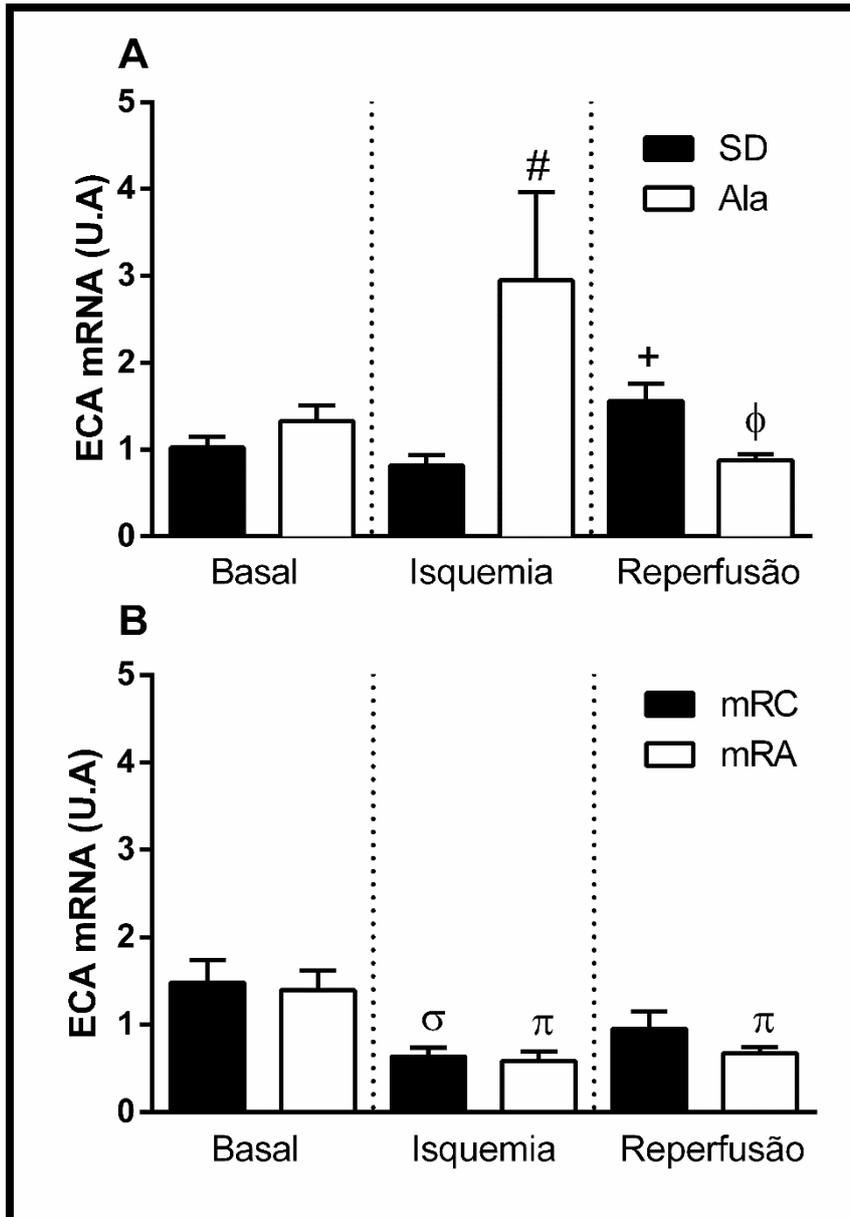
**Figura 17:** Efeitos da Alamandina na quantidade de mRNA do receptor Mas ao longo do protocolo de isquemia/reperusão. Teste t de Student foi utilizado para comparar diferença entre os períodos do protocolo de isquemia e reperusão. Os valores são mostrados em média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  vs período basal do grupo SD; #  $p < 0,05$  vs período basal do grupo ALA; +  $p < 0,05$  vs período isquêmico do grupo SD.  $\phi$   $p < 0,05$  vs período isquêmico no período ALA.  $\sigma$   $p < 0,05$  vs período basal do grupo mRC.  $\pi$   $p < 0,05$  vs período basal do grupo mRA. SD significa grupo normotenso controle (n=8); Ala significa grupo normotenso tratado com alamandina (20pM, n=8); mRC representa grupo hipertenso controle (n=6); mRA significa grupo hipertenso tratado com alamandina (20pM, n=6).

Na reperfusão, o efeito observado na isquemia em ambos grupos normotensos foi abolido, retornando os valores de mRNA do grupo SD ( $1,233 \pm 0,4034$ ) e do grupo ALA ( $0,6309 \pm 0,1161$ ) próximos aos níveis do período basal. Os animais hipertensos (**figura 17B**), por sua vez, não mostraram diferenças significativas entre os grupos mRC e mRA nos períodos basal ( $1,039 \pm 0,1525$  e  $1,019 \pm 0,1989$ , respectivamente). No entanto, o período isquêmico e de reperfusão levou a hipo-regulação do receptor Mas no grupo mRC ( $0,4087 \pm 0,09477$  e  $0,3928 \pm 0,1160$ , respectivamente) e no grupo mRA ( $0,3455 \pm 0,0791$  e  $0,4310 \pm 0,1186$ , respectivamente) quando comparado com o período basal do seu respectivo grupo.

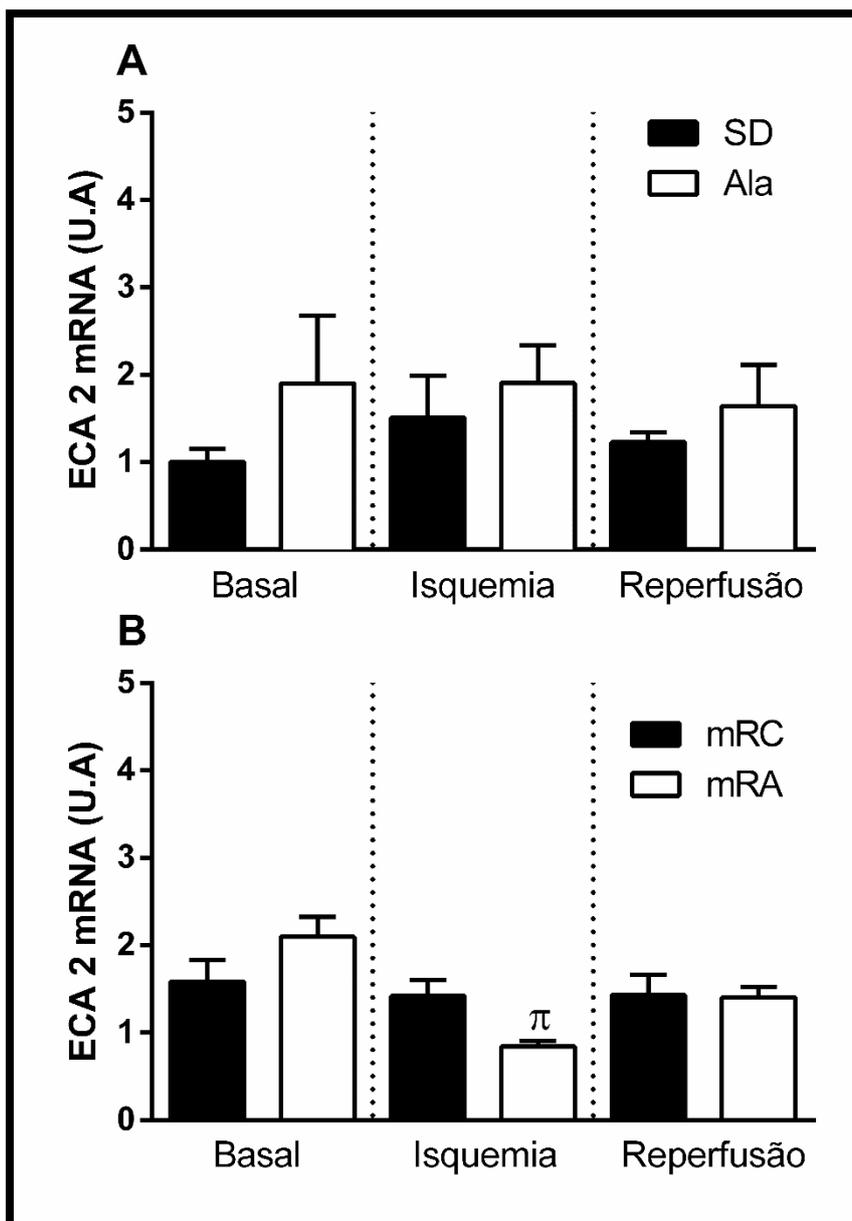
Quanto à regulação transcricional da ECA, a **figura 18A** mostra que, nos animais normotensos, não houve diferença entre os grupos SD ( $1,022 \pm 0,1223$ ) e ALA ( $1,330 \pm 0,1755$ ) no período basal. Não houve diferença entre os valores do grupo SD no período isquêmico ( $0,8195 \pm 0,1178$ ) quando comparado com o período basal, contudo, de forma interessante, no grupo ALA a ECA está hiper-regulada no período isquêmico ( $2,949 \pm 1,013$ ) quando comparado com o período basal. O período de reperfusão levou a hiper-regulação da ECA no grupo SD ( $1,559 \pm 0,1969$ ) quando comparado com o período isquêmico. No grupo ALA, o período de reperfusão levou os níveis de mRNA da ECA ( $0,8755 \pm 0,0700$ ) para valores semelhantes aos do período basal.

Os animais hipertensos (**figura 18B**), por sua vez, não mostraram diferenças significativas entre os grupos mRC e mRA nos períodos basal ( $1,482 \pm 0,2607$  e  $1,399 \pm 0,2232$ , respectivamente). Contudo, a isquemia levou à hipo-regulação da ECA no período isquêmico ( $0,6410 \pm 0,0989$ ) no grupo mRC e no grupo mRA ( $0,5873 \pm 0,1048$ ). Na reperfusão, apenas no grupo mRA a ECA permaneceu hipo-regulada ( $0,6767 \pm 0,0700$ ) em relação ao período basal.

Por fim, na **figura 19** podemos observar os valores da quantidade de mRNA da ECA 2 ao longo do protocolo de isquemia e reperfusão. Como aponta a **figura 19A**, diferentemente da ECA, não houve diferença entre os grupos SD e ALA nos períodos basal ( $1,001 \pm 0,1557$  e  $1,903 \pm 0,7722$ , respectivamente), isquêmico ( $1,511 \pm 0,4804$  e  $1,906 \pm 0,4281$ , respectivamente) e de reperfusão ( $1,231 \pm 0,1144$  e  $1,642 \pm 0,4733$ , respectivamente). Similarmente, a **figura 19B** mostra que também não foram observadas diferenças significativas entre os grupos mRC e mRA nos períodos basal ( $1,584 \pm 0,2517$  e  $2,096 \pm 0,2300$ , respectivamente). Contudo, no grupo mRA a isquemia levou a hipo-regulação da ECA 2 ( $0,8445 \pm 0,06198$ ) em comparação ao período basal. Não foram observadas diferenças na regulação transcricional no período isquêmico ( $1,423 \pm 0,1788$ ) do grupo mRC e no período de reperfusão dos grupos mRC e mRA ( $1,433 \pm 0,2335$  e  $1,404 \pm 0,1206$ , respectivamente).



**Figura 18:** Efeitos da Alamandina na quantidade de mRNA da ECA ao longo do protocolo de isquemia/reperusão. Teste t de Student foi utilizado para comparar diferença entre os períodos do protocolo de isquemia e reperusão. Os valores são mostrados em média  $\pm$  EPM. #  $p < 0,05$  vs período basal do grupo Ala. +  $p < 0,05$  vs período isquêmico do grupo SD.  $\phi$   $p < 0,05$  vs período isquêmico no período ALA.  $\sigma$   $p < 0,05$  vs período basal do grupo mRC.  $\pi$   $p < 0,05$  vs período basal do grupo mRA. SD significa grupo normotenso controle (n=8); Ala significa grupo normotenso tratado com alamandina (20pM, n=8); mRC representa grupo hipertenso controle (n=6); mRA significa grupo hipertenso tratado com alamandina (20pM, n=6).

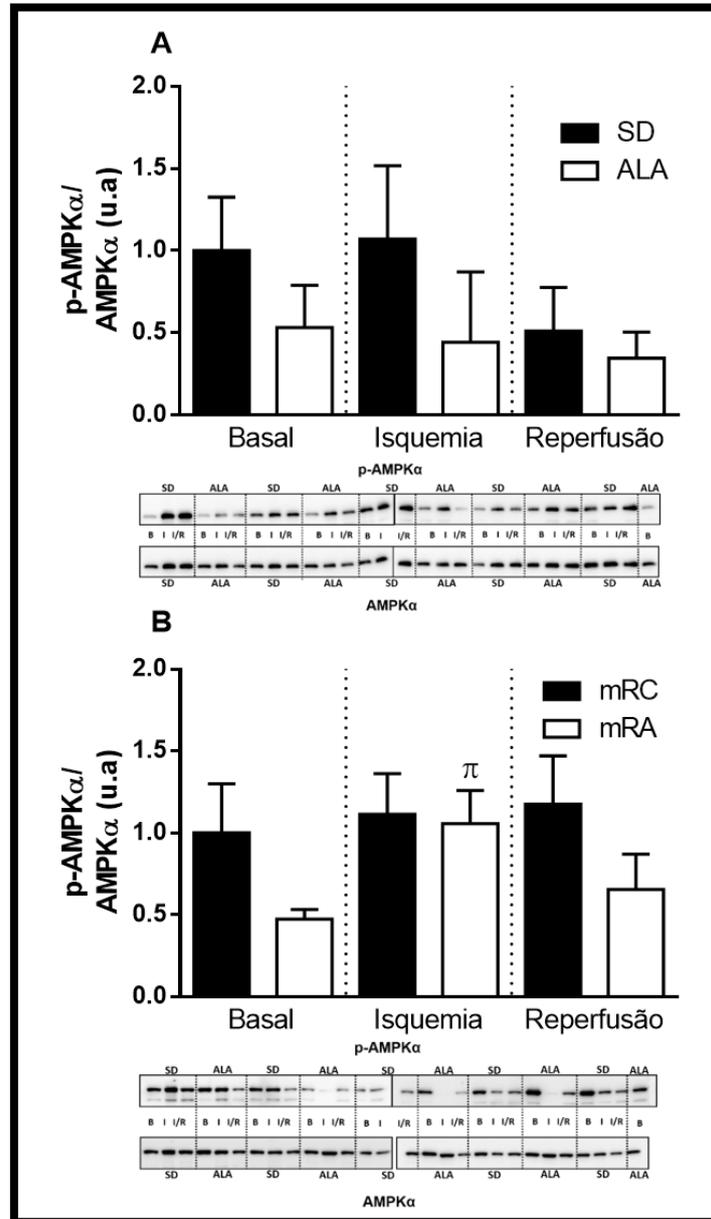


**Figura 19:** Efeitos da Alamandina na quantidade de mRNA da ECA 2 ao longo do protocolo de isquemia/reperusão nos ratos normotensos (A) e hipertensos (B). Teste t de Student foi utilizado para comparar diferença entre os períodos do protocolo de isquemia e reperusão. Os valores são mostrados em média  $\pm$  EPM.  $\pi$   $p < 0,05$  vs período basal do grupo mRA. SD significa grupo normotenso controle (n=8); Ala significa grupo normotenso tratado com alamandina (20pM, n=8); mRC representa grupo hipertenso controle (n=6); mRA significa grupo hipertenso tratado com alamandina (20pM, n=6).

#### 4.4.6 Expressão proteica

Uma vez observada que a regulação transcricional do receptor MrgD estava significativamente reduzida nos animais mREN. Nosso próximo passo foi avaliar a fosforilação da AMPK $\alpha$ . Jesus e colaboradores mostraram que a Alamandina, através do MrgD, promoveu a ativação da via AMPK/óxido nítrico (NO) para contra regular a

hipertrofia induzida pela Ang II em cardiomiócitos isolados (JESUS et al., 2018). Dessa forma, nós avaliamos se a fosforilação da AMPK $\alpha$  estava alterada nos ratos normotensos e hipertensos, com ou sem o tratamento com alamandina.



**Figura 20:** Efeito da alamandina na fosforilação da AMPK $\alpha$  ao longo do protocolo de isquemia/reperusão em ratos normotensos (A) e hipertensos (B). Teste t de Student foi utilizado para comparar diferença entre os períodos do protocolo de isquemia e reperusão. Os valores são mostrados em média  $\pm$  EPM.  $\pi$   $p < 0,05$  vs período basal do grupo mRA. SD significa grupo normotenso controle (n=5); Ala significa grupo normotenso tratado com alamandina (20pM, n=5); mRC representa grupo hipertenso controle (n=5); mRA significa grupo hipertenso tratado com alamandina (20pM, n=5).

A **figura 20** mostra que a alamandina não alterou a fosforilação da AMPK $\alpha$  ao longo do protocolo de isquemia/reperfusão nos animais normotensos. Contudo, nos animais hipertensos, nós podemos observar que o tratamento com alamandina aumentou significativamente ( $p= 0,0413$ ) a fosforilação da AMPK $\alpha$  no período isquêmico ( $1,058 \pm 0,2011$ ) dos ratos hipertensos, quando comparado com seu período basal ( $0,4750 \pm 0,058$ ).

#### 4.5 Discussão

Os resultados deste trabalho mostram pela primeira vez que o tratamento agudo com doses picomolares de alamandina melhorou a função cardíaca pré-isquêmica em ratos hipertensos. Contudo, diferente dos efeitos apresentados por esse heptapeptídeo nos animais normotensos, a alamandina não foi capaz de impedir os prejuízos desencadeados pela isquemia na função cardíaca, índice de gravidade de arritmias e extensão da área infartada. Também foi apresentado pela primeira vez nesse trabalho que o receptor MrgD está hipo-regulado na linhagem TGR(mren2)27, em comparação com a linhagem controle, Sprague-Dawley.

Os dados anteriores deste projeto mostram que a Alamandina teve importante efeito cardioprotetor ao impedir os efeitos deletérios da isquemia em corações de ratos Sprague-Dawley. Ademais, esta alatensina ainda reduziu o índice de gravidade de arritmias e a extensão da área infartada. Estes efeitos foram abolidos na presença do PD12319 e do D-PRO<sup>7</sup>-Ang-(1-7), ambos antagonistas não seletivos do receptor MrgD, mas não foram abolidos pelo A779, antagonista do receptor Mas. No presente estudo nós utilizamos ratos TGR(mren2)27 como modelo hipertenso de ativação do SRA. A técnica de Langendorff nos ratos mREN apontou significativo prejuízo na função cardíaca *ex vivo* quando comparado com os animais SD. Os ratos mREN são conhecidos na literatura pelo prejuízo que apresentam na função cardíaca. Pinto e colaboradores mostraram que, os ratos mREN apresentam importante prejuízo na dP/dt positiva, sendo este prejuízo superior ao dos ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (PINTO et al., 1997). Através do ecocardiograma realizado em ratos mREN, Schellings e colaboradores observaram redução da da dP/dt negativa comparado com ratos SD com 16 semanas de idade (SCHELLINGS et al., 2006). DeMarco e colaboradores, por sua vez, observaram que ratos mREN com 10-11 semanas de idade já apresentam prejuízos contráteis associados com estresse oxidativo, hipertrofia e fibrose (DEMARCO et al., 2011). Em adição nossos resultados do IMV mostraram que o coração dos ratos mREN estavam hipertrofiados, o que também acarreta prejuízo hemodinâmico (MARIAN, 2010; TARDIFF, 2006). O tratamento com Alamandina melhorou significativamente a função cardíaca pré-isquêmica dos ratos mREN, como podemos observar na LVSP, dLVP, e  $\pm$ dP/dt. Ainda que esses efeitos apontados por esse estudo nos animais mREN sejam pré-isquemia, Park e colaboradores descreveram que a alamandina, em uma dose de 0.1mg/Kg, melhorou os efeitos decorridos da isquemia na dLVP, LVEDP,  $\pm$ dP/dt e fluxo coronariano (PARK et al., 2018). Estes estudos, aliados a outros, comprovam que os importantes efetores do sistema renina angiotensina são capazes de modular a função contrátil, como a Ang II (FORD et al., 2001; MUFTI et al.,

2008; SERNERI et al., 2001) e a Ang-(1-7) (CASTRO-CHAVES et al., 2009; CASTRO et al., 2006; LOOT et al., 2002).

De forma interessante, a alamandina não foi capaz de prevenir o prejuízo ocasionado pela isquemia nos corações isolados de ratos hipertensos, além de não reduzir o índice de severidade de arritmias e o a extensão da área infartada. Souza e colaboradores mostraram que o efeito vasodilatador da Ang-(1-7) observado em coronárias de ratos Wistar foi abolido em corações de ratos Wistar hipertrofiados (NUNES et al., 2017; SOUZA et al., 2013). Estes estudos mostraram que, em situações patológicas que envolvem remodelamento cardíaco e disfunção endotelial, pode haver uma perda no efeito apresentado pelo peptídeo em condições fisiológicas.

Para investigar a ausência do efeito cardioprotetor da alamandina no período pós-isquêmico dos ratos mREN, nós nos baseamos no artigo de Yang e colaboradores. Neste trabalho eles mostraram que após o protocolo de isquemia/reperfusão, houve um aumento na expressão do receptor AT1, tanto a nível proteico quanto a nível de mRNA (YANG et al., 1998b). Assim nosso próximo passo foi avaliar a regulação transcricional de importantes receptores e enzimas do SRA ao longo de todas as três etapas do protocolo de isquemia/reperfusão. Dos três receptores angiotensinérgicos avaliados, todos apresentaram alterações na regulação transcricional. Nos ratos SD, o receptor AT1 está hiper-regulado no período isquêmico. Este efeito não nos surpreendeu pois está bem estabelecido na literatura a importância do receptor AT1 em situações patológicas. Kaprielian e colaboradores descreveram que o receptor AT1 está hiper-regulado, em nível nucleico, nos átrios direito e esquerdo de corações humanos com cardiomiopatia dilatada (KAPRIELIAN et al., 1997). Suzuki e colaboradores também mostraram que o nível do mRNA do receptor AT1 está elevado no coração hipertrofiado de ratos hipertensos (SUZUKI et al., 1993). Da mesma forma, hamsters com cardiomiopatia dilatada apresentaram aumento de 90% na densidade do receptor AT1 em ambos ventrículos (LAMBERT; MASSILLON; MELOCHE, 1995). No entanto, nos surpreendeu que o receptor AT1 não permaneceu hiper-regulado durante o período de reperfusão, indo em desencontro aos dados mostrados por Yang e colaboradores (YANG et al., 1998b), que mostraram aumento da expressão do AT1 ao final do período de reperfusão. A regulação transcricional do AT1 nos ratos hipertensos não apresentou alterações ao longo do protocolo de isquemia/reperfusão, com ou sem tratamento com alamandina. Ao compararmos o período isquêmico dos ratos normotensos com os ratos hipertensos, nós observamos que apenas os normotensos apresentaram hiper-regulação do receptor AT1. Nickenig e colaboradores mostraram que em corações de ratos mREN o receptor AT1 está hipo-regulado em comparação ao grupo SD (NICKENIG et al., 1997). Também já foi descrito pelo nosso grupo que não existem

diferenças de expressão do receptor AT1 no ventrículo esquerdo de ratos mREN quando comparados com o ratos SD (KANGUSSU et al., 2015). Dessa forma, a ausência de diferença dos níveis de mRNA do receptor AT1 entre os ratos normotensos e hipertensos, no período basal, não nos surpreendeu.

O próximo gene alvo foi o receptor MrgD. Lautner e colaboradores descreveram o MrgD como receptor efetivo da alamandina através de experimentos funcionais e de *binding* (LAUTNER et al., 2013), outros estudos também já mostraram que os efeitos observados com tratamento com a alamandina foram via MrgD (JESUS et al., 2018; LIU et al., 2018; PARK et al., 2018; QARADAKHI et al., 2017). Nossos resultados, mostraram pela primeira vez que nos ratos TGR(mREN2)27 o receptor MrgD está hipo-regulado em relação aos animais SD. Já foi mostrado no ventrículo esquerdo de ratos mREN que a quantidade relativa do receptor Mas era significativamente menor que no grupo controle (KANGUSSU et al., 2015). A redução da quantidade relativa do mRNA do receptor Mas também está presente em corações de ratos SHR (MA; TAN; WU, 2011). O receptor AT2 também já foi descrito com hipo-regulado em mulheres com hipertensão induzida pela gestação (TAKEDA-MATSUBARA et al., 2003). Juntos estes dados apontam que, em situações patológicas, é comum que haja uma hipo-regulação dos receptores caracterizados como pertencentes ao eixo não clássico. Além disso, a hipo-regulação do receptor MrgD no coração isolado dos ratos mREN fornece fortes indícios para a ausência de efeito da Alamandina no período pós-isquêmico, além do IGA e da extensão da área infartada.

A regulação transcricional do receptor Mas também foi avaliada. Lautner e colaboradores não observaram interação significativa entre a alamandina e células CHO transfectadas com o receptor Mas, tampouco houve liberação de NO nessas mesmas células (LAUTNER et al., 2013). Nos ratos normotensos, a isquemia levou a uma hipo-regulação do receptor Mas e este efeito foi abolido no período de reperfusão. Nos animais tratados com alamandina este efeito foi invertido, pois o receptor Mas no período isquêmico estava hiper-regulado. Ainda que não haja evidências que apontem para qualquer interação entre a alamandina e o receptor Mas, é necessário lembrar que o MrgD e o Mas são receptores da mesma superfamília (SOLINSKI; GUDERMANN; BREIT, 2014), assim é possível que a interação entre a alamandina e os receptores MrgD no coração dos ratos normotensos, leva a uma hiper-regulação na transcrição de outros receptores da família do receptor Mas. De forma similar ao receptor MrgD, o receptor Mas também apresentou hipo-regulação no período pós-isquêmico nos ratos hipertensos. Este efeito corrobora a hipótese acima, evidenciando uma ligação entre a regulação transcricional dos receptores pertencentes à superfamília de receptores relacionados ao receptor Mas e a lesão isquêmica. Vale ressaltar que nossos dados

prévios mostraram que a presença do A779, antagonista do receptor Mas, não influenciou o efeito cardioprotetor da alamandina no período isquêmico (**figura S4**).

Uma vez que os receptores angiotensinérgicos apresentam grande importância nas ações dos seus respectivos peptídeos, o mesmo deve ser dito das principais enzimas reguladoras da sua formação/degradação. Ao avaliarmos a regulação transcricional dos genes que codificam as enzimas conversoras de angiotensina 1 e 2, nós precisamos formular hipóteses para possível formação de outros peptídeos do SRA e conseqüentemente alterações no equilíbrio entre os eixos clássico e não clássico. Nosso primeiro alvo enzimático foi a ECA. Esta enzima, assim com a renina, tem como função principal aumentar os níveis de Ang II. No entanto, diferente da renina, que se trata de uma enzima muito específica quanto ao seu substrato, a ECA é “promiscua”, podendo hidrolisar a Ang I, bradicinina, neurotensina, Ang-(1-9) e outros (BERNSTEIN et al., 2011). Em todos estes peptídeos a ECA age na porção C-terminal, clivando dois aminoácidos. Nossos resultados mostraram hiper-regulação da ECA no período isquêmico dos ratos normotensos tratados com alamandina. Lautner e colaboradores descreveram que a principal forma de síntese da Alamandina é através da hidrólise catalítica da ECA 2 na porção C terminal da Angiotensina A (LAUTNER et al., 2013), contudo pouco se sabe da degradação da alamandina ainda. Uma hipótese para a hiper-regulação da ECA nos corações normotensos tratados com alamandina é que a alta disponibilidade deste heptapeptídeo leve a uma hiper-regulação do gene que codifica a ECA com a finalidade de degradar este substrato em abundância. Já foi descrito que a Ang-(1-7) é degradada pela ECA para a formação da Ang-(1-5) (CHAPPELL et al., 1998; DEDDISH et al., 1998), o que poderia acontecer também com a alamandina.

Por fim, avaliamos a regulação transcricional do gene que regula a ECA 2. Nossos dados mostraram que não houve alterações nas quantidades relativas de mRNA da ECA 2 ao longo dos períodos de isquemia e reperfusão na presença ou ausência da alamandina nos ratos normotensos. Este resultado não nos surpreendeu pois, como já citado acima, a principal forma de produção da alamandina é através da ECA 2, uma vez que o peptídeo já está em ampla disponibilidade não se faz necessário aumentar os níveis da enzima que aumentaria sua produção. Nos ratos mREN este efeito foi ainda mais pronunciado, havendo hipo-regulação da ECA2 no período isquêmico apenas dos ratos tratados com alamandina.

É importante ressaltar que a maioria das mudanças transcricionais observadas ocorreram durante o período isquêmico. Seria possível que toda essa regulação transcricional ocorresse após trinta minutos do estímulo da isquemia? Sim. Em um paralelo traçado entre uma célula bacteriana e uma célula mamífera, Shamir e colaboradores calcularam que um gene humano, que tem aproximadamente 10

kilopares de base, leva 10 minutos para ser transcrito, com uma taxa de 10-100 nucleotídeos por segundo (SHAMIR et al., 2016). Dessa forma, mesmo que o tempo necessário para que a tradução em proteína leve mais tempo e provavelmente não ocorra mesmo no final do período de reperfusão, é plausível que a maquinaria genética altere rapidamente os níveis de mRNA em 30 minutos, que consiste no período de cada etapa do protocolo de isquemia/reperfusão. Além disso, os efeitos funcionais observados pelo tratamento com a alamandina ocorreram principalmente no período isquêmico.

Jesus e colaboradores mostraram em cardiomiócitos isolados que o efeito protetor da alamandina via MrgD envolve a via AMPK/KO de sinalização (JESUS et al., 2018). Assim, um vez que observamos que a alamandina apresentava efeito protetor no coração isolado de ratos SD, fez-se plausível a hipótese de que os efeitos observados nos cardiomiócitos e no coração isolado ativassem a mesma via de sinalização. Entretanto, em contraste com nossa hipótese, a avaliação dos níveis de fosforilação da AMPK $\alpha$  nos animais normotensos não apresentou diferenças significativas entre os períodos, com ou sem tratamento com alamandina. Outros estudos sugerem diferentes vias de sinalização da Alamandina. Park e colaboradores, em corações isolados de ratos sprague-dawley, mostraram atenuação da liberação de peptídeo atrial natriurético induzida pela alamandina após o pré-tratamento com inibidores da óxido nítrico sintase (L-NAME), fosfolipase-C (U73122) e p38 MAP quinase (SB239063) (PARK et al., 2018), sugerindo que o efeito da alamandina ocorre através de mecanismos relacionados a PLC/p38 e MAPK/NO. Em outro tecido alvo, Qaradakhi e colaboradores mostraram em anéis de aorta abdominal de coelhos que a potencialização pela alamandina do efeito vasodilatador da acetilcolina envolve a via de sinalização da PKA (QARADAKHI et al., 2017). Liu e colaboradores também sugerem o envolvimento da via de sinalização da PKA no efeito anti-hipertensivo e cardioprotetor da administração subcutânea de alamandina (LIU et al., 2018). Por fim, UCHIYAMA e colaboradores (2017) mostraram envolvimento da via PLC/cSrc/p38 MAPK na redução da expressão de leptina no tecido adiposo.

Nos animais mREN o tratamento com Alamandina não levou a alteração da fosforilação da AMPK $\alpha$ . Entretanto, houve aumento na fosforilação da AMPK $\alpha$  no período isquêmico dos ratos hipertensos tratados com alamandina. Ainda que não haja diferença estatística entre os níveis basais de fosforilação entre os ratos mREN tratados ou não com alamandina, nos parece que o aumento da fosforilação da AMPK $\alpha$  no período isquêmico na presença da alamandina se deve mais aos baixos níveis apresentados no período basal. Estudos adicionais serão necessários para responder este efeito observado.

## 5. CAPÍTULO 2

### AVALIAR A PARTICIPAÇÃO DO SRA NA FUNÇÃO CARDÍACA PÓS-ISQUÊMICA EM CORAÇÕES ISOLADOS DE RATOS COM RESTRIÇÃO ALIMENTAR GRAVE

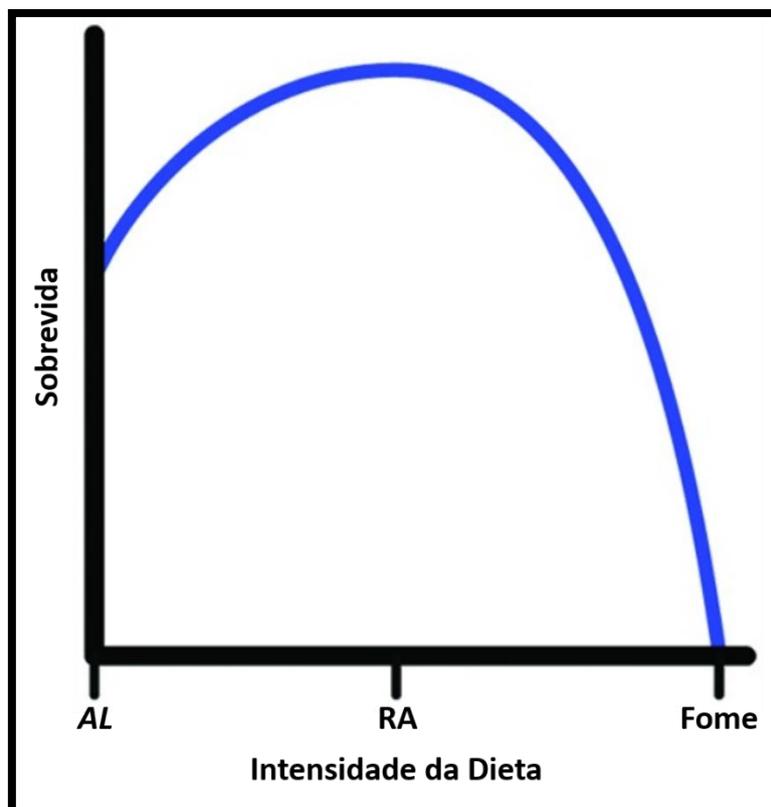
#### 5.1 Introdução

##### 5.1.1 Restrição Alimentar

Qualquer intervenção dietética que reduz a ingestão de calorias e nutrientes abaixo do normal consumido (*ad libitum*) é denominada restrição alimentar (RA).

Diferentes motivos e finalidades levam a diferentes tipos de RA, levando também a diferentes consequências no organismo. Dentre as principais razões para a RA, existem os fatores psicológicos (anorexia nervosa), uso de medicamentos (quimioterapia), escassez (pobreza ou guerras) e outros (BARAJAS GALINDO et al., 2017; DIVASTA et al., 2010; MCDONALD; RAMSEY, 2010; VICTORA et al., 1986).

Nos últimos anos tem crescido o interesse no estudo de como as RAs influenciam na sobrevida. Na **figura 21**, Szafranski e Mekhail descreveram que diferentes tipos de intensidades de dieta, levam a diferentes resultados na sobrevida (SZAFRANSKI; MEKHAIL, 2014).



**Figura 21:** Efeitos de diferentes intensidades de dieta na sobrevida. Adaptado de Szafranski e Mekhail, 2014. AL; *ad libitum*. RA; restrição alimentar.

Já está bem descrito na literatura que restrições alimentares de até no máximo 40% da ingestão alimentar tem diversos efeitos benéficos. Um dos estudos pioneiros no ramo de RA foi realizado por Rous e colaboradores, mostrando que a RA reduzia a incidência de câncer em roedores (ROUS, 1914). Loft e colaboradores também observaram que a RA aumenta a eficiência de mecanismos de reparo do DNA, além de reduzir os danos oxidativos (LOFT et al., 1995). Em adição a estes estudos, mais recentemente, outros trabalhos corroboram o papel da RA na redução da carcinogênese (THOMPSON; JIANG; ZHU, 1999; WILLCOX; WILLCOX, 2014). Outro trabalho também considerado pioneiro na área de RA mostrou que 20% de redução na ingestão alimentar de ratos aumentava a sobrevivência em 69% para machos e 3% para fêmeas, evidenciando, além de um importante efeito da RA, um efeito ligado à diferença sexual (MCCAY; CROWELL; MAYNARD, 1935). Utilizando um modelo animal mais próximo ao humano, Colman e colaboradores observaram que após 20 anos de RA, macacos rhesus apresentaram redução na incidência de diabetes, câncer e atrofia cerebral (COLMAN et al., 2009). Juntos, estes estudos contribuíram para o estabelecimento de uma importante linha de pesquisa na biologia do envelhecimento e sua modulação pela restrição calórica (KAEBERLEIN, 2010).

No entanto, a partir de estudos em diferentes espécies (KAPAHI; KAEBERLEIN; HANSEN, 2017; PARTRIDGE; PIPER; MAIR, 2005), foi observado que existe um padrão contra evolutivo na restrição alimentar. À medida que se reduz a quantidade de calorias ingeridas se tem aumento da sobrevivência e, antagonicamente, redução da fase reprodutiva. Evolutivamente, a maioria das espécies prioriza a reprodução em detrimento da longevidade, portanto esta visão da RA estar agindo em contramão da evolução sugeriu um possível papel deletério da RA (SZAFRANSKI; MEKHAIL, 2014).

Dessa forma, com a finalidade de refinar a variabilidade entre as respostas obtidas com a RA em diferentes espécies, foram estabelecidos limites percentuais de RA de acordo com a resposta esperada. Em uma revisão bem fundamentada sobre o tema, Ribaric chegou à conclusão que, a partir de dezenas de outros estudos na literatura, a RA alimentar sem comprometer o aporte necessário de nutrientes estaria entre 20-40% (RIBARIČ, 2012). Se analisarmos a **figura 21**, podemos considerar que a RA entre 20-40% ficaria exatamente no meio do eixo X, onde há o pico de sobrevivência. Podemos concluir também, que, em algumas espécies, independente da porcentagem de RA, se há má nutrição do organismo, o efeito da RA será deletério (ANTON; LEEUWENBURGH, 2013).

Casos que quase sempre apresentam prejuízo nutricional apresentam acima de 50% na redução da ingestão diária. Na **figura 21** esta porcentagem representaria o

terço final do eixo X, onde há queda exponencial da sobrevivência (SZAFRANSKI; MEKHAIL, 2014). Altas porcentagens de restrição alimentar também evidenciam graves problemas cardiovasculares, dentre eles hipotensão, bradicardia, redução da  $\pm$  dP/dt, disfunção miocárdica e aumento na síntese de epinefrina e norepinefrina no músculo cardíaco (HILDERMAN et al., 1996; PINOTTI et al., 2010). Complementarmente, de Souza e colaboradores mostraram que ratos submetidos a RA de 60% apresentaram catabolismo proteico, redução do colesterol total e LDL, aumento da sensibilidade  $\alpha$  adrenérgica (DE SOUZA et al., 2015), redução do volume plasmático, desequilíbrio eletrolítico e ativação do eixo clássico do SRA (DE SOUZA et al., 2018).

Portanto, uma vez que são poucos os trabalhos utilizando restrições alimentares graves (RAG) e avaliando as suas consequências cardiofisiológicas, faz-se interessante avaliar melhor os efeitos dessa dieta na função cardíaca e o papel do SRA nesse tipo de restrição.

#### 5.1.2 SRA e RAG

A complexa cascata enzimática e os diversos peptídeos que compõem o SRA desempenham papel fundamental na fisiologia cardiovascular e renal. Dentre seus diversos efeitos teciduais e sistêmicos, as duas funções mais reconhecidas e estudadas do SRA são a regulação da pressão arterial e do equilíbrio entre sal e água.

A redução do volume plasmático observada em RAG (DE SOUZA et al., 2018) é um gatilho para aumento da síntese de Ang II (MCKINLEY et al., 2008) e aumento atividade da ECA (XIANG et al., 2013). Zhang e colaboradores também observaram hiper-regulação e aumento na expressão proteica da ECA em ovelhas submetidas a 30% de RA (ZHANG et al., 2013).

Recentemente, um estudo de Souza e colaboradores avaliou a resposta de ratos submetidos à 60% de RA aos efeitos da infusão endovenosa de diferentes componentes do SRA. As ratas com RAG apresentaram redução do efeito pressor da Ang II, mas não apresentaram diferença após infusão da Ang-(1-7). Estas ratas também apresentaram hipotensão, bradicardia e aumento da atividade enzimática da ECA e ECA2 plasmáticas e hiper-regulação do receptor AT1 no leito mesentérico (DE SOUZA et al., 2018).

Os dados descritos acima geraram duas perguntas que buscamos responder neste estudo. A primeira foi: quais seriam os efeitos desencadeados pela RAG em ratos machos, avaliando então se existe alguma diferença sexual em resposta à restrição alimentar. Por fim, a segunda foi: quais seriam os efeitos de um período longo de realimentação após o período de RAG, existiria um efeito a longo prazo da RAG?

Dessa forma, como evidências também sugerem uma importante participação do SRA em resposta a RAG, cabe investigar estes efeitos, além de avaliar a função cardíaca *ex vivo* destes animais, submetendo-os a um protocolo de I/R como um evento estressor.

## 5.2 Objetivo geral

- Avaliar a participação do SRA na função cardíaca pós-isquêmica e reatividade vascular em corações isolados de ratos com restrição alimentar grave

### 5.2.1 Objetivos específicos

- Avaliar as consequências da RAG e da realimentação nos parâmetros fisiológicos e metabólicos
- Avaliar os efeitos da RAG e da realimentação na função cardíaca pós-isquêmica
- Avaliar o efeito da RAG e da realimentação na regulação transcricional dos receptores AT1, Mas e MrgD após protocolo de isquemia e reperfusão
- Avaliar o efeito da RAG e da realimentação na reatividade vascular à diferentes concentrações de Ang II

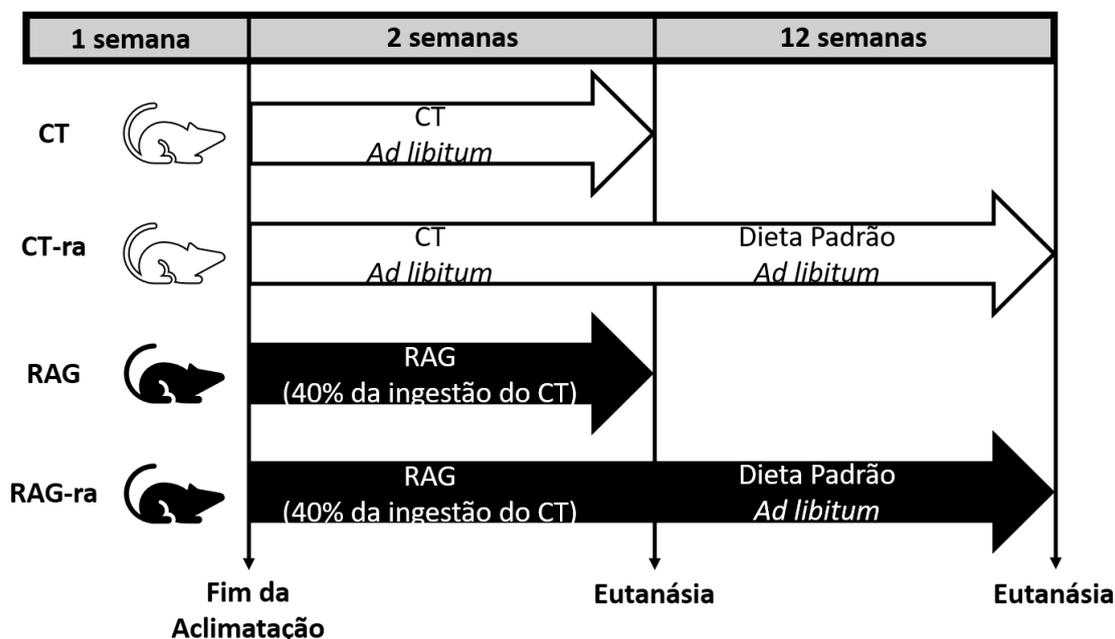
### 5.3 Material e Métodos

#### 5.3.1 Animais

Foram utilizados ratos Fischer machos com 12 semanas de idade, pesando entre 250-300g, provenientes do Research Resource Facility – Georgetown University Medical Center. Os procedimentos utilizados neste trabalho foram previamente aprovados pelo Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) com o protocolo 16:1234. Os animais foram alojados em temperatura ambiente e mantidos em um ciclo claro/escuro de 12/12 horas com ração e água ad libitum até início do protocolo de restrição alimentar.

#### 5.3.2 Modelo de Restrição Alimentar Grave (RAG)

Após uma semana de aclimatação, os animais foram divididos em dois grupos com base em duas dietas. O primeiro grupo, chamando grupo controle (CT), recebeu dieta ad libitum durante 2 semanas. O segundo grupo, chamado grupo com restrição alimentar grave (RAG), recebeu apenas 40% da ingestão diária do grupo CT por dia, ao longo de 2 semanas. Para avaliar os efeitos a longo prazo da restrição alimentar, nós criamos outros dois grupos que foram alimentados ad libitum por 3 meses após o período de duas semanas de restrição alimentar (**figura 22**).



**Figura 22:** Representação esquemática da divisão dos grupos de acordo com a dieta. Os ratos foram divididos em 4 grupos. Dois grupos foram eutanasiados no fim da segunda semana de sua dieta, controle (CT) ou restrita (RAG). Outros dois grupos passaram pelas mesmas duas semanas de dieta, CT ou RAG, contudo, permaneceram mais 3 meses se alimentando com a dieta controle, sendo então denominados de CT-ra ou RAG-ra, para então serem eutanasiados.

### 5.3.3 Delineamento Experimental

Ratos Fischer foram submetidos a dois protocolos dietéticos; um com ingestão *ad libitum* (CT) e outro com restrição de 60% da ingestão alimentar do grupo controle (RAG), ao longo de duas semanas. No dia anterior ao início das duas semanas e no último dia os ratos foram colocados em gaiolas metabólicas para coleta de urina e fezes por 24h. No final da segunda semana de restrição, os ratos foram anestesiados e foi coletado sangue da artéria caudal e/ou da artéria aorta abdominal. Ao término da coleta, o coração foi retirado para o experimento de coração isolado e o leito mesentérico, assim como a artéria femoral, foram retirados para reatividade vascular. Finalmente, foram coletados cérebro, aorta torácica, rins, suprarenal, tecido adiposo epididimal, tecido adiposo retroperitoneal, tecido adiposo inguinal e tecido adiposo marrom subescapular. A tíbia foi dissecada e medida para realização do índice de massa cardíaca (ICM).

Para avaliar os efeitos a longo prazo da restrição alimentar, outros dois grupos foram criados em que os animais foram realimentados por 3 meses após o período de duas semanas inicial. Além do mesmo período de coleta de urina e fezes do grupo acima, os ratos realimentados também foram colocados em gaiolas metabólicas no final do primeiro, segundo e terceiro meses de realimentação. No final do terceiro mês de realimentação, o protocolo de eutanásia e coleta de tecidos foi igual ao descrito acima.

### 5.3.4 Coleta de sangue e urina

Os ratos foram colocados em gaiolas metabólicas para coleta de urina e fezes ao final da última semana de aclimatação (dia 0), três primeiros dias de restrição alimentar (dias 1, 2 e 3), último dia de restrição alimentar e quatro primeiros dias de realimentação (dias 14, 15, 16, 17 e 18), fim do primeiro (dia 44), segundo (dia 74) e terceiro (dia 104) meses de realimentação. As coletas foram realizadas em períodos de 24h. Após coleta, a urina foi medida e armazenada em freezer -80°C. As fezes foram pesadas e descartadas.

O sangue foi coletado pela artéria caudal ao término da segunda semana de restrição alimentar e ao final do primeiro, segundo e terceiro meses de realimentação. Após coleta, o sangue foi centrifugado à 2000 x g e soro e plasma foram aliquotados e armazenados em freezer -80°C. Uma fração do sangue foi colocada em um capilar de vidro e centrifugada para avaliação da porcentagem ocupada pelos glóbulos vermelhos ou hemácias no volume total de sangue (hematócrito).

### 5.3.5 Medida das concentrações de sódio e potássio por fotômetro de chama

As amostras de urina ou soro foram diluídas 500 vezes para determinação das concentrações de sódio e potássio. Através do fotômetro de chama (Model #2655-10; Cole-Parmer, Vernon Hills, IL), as amostras são pulverizadas dentro de uma câmara por um atomizador, e são então sugadas para a chama. A luz produzida pela combustão dos elementos é conduzida à uma célula fotoelétrica que ativa um galvanômetro. Dessa maneira, as concentrações de sódio ou potássio podem ser estimadas pela leitura no galvanômetro. Os valores obtidos pelo aparelho foram então recalculados a partir da diluição prévia.

### 5.3.6 Técnica de Langendorff

Ao término do protocolo de restrição alimentar ou realimentação, os ratos Fischer foram heparinizados intraperitonealmente (100 U.I) e então anestesiados (2.5% de isoflurano em 3L/min de O<sub>2</sub>). Foi realizada uma incisão abaixo do processo xifoide que seguiu até as margens costais, atravessando as costelas nas linhas axilares anteriores esquerda e direita. A parede do peitoral anterior foi rebatida para cima e o coração foi então retirado através da transecção da aorta descendente, da veia cava inferior, da aorta ascendente e da veia cava superior, sendo transferido para uma placa de petri com solução de Krebs-Ringer gelada. Após extração, o coração acoplado ao aparato de Langendorff (ADInstruments, Colorado Springs, EUA) onde foi dissecado e canulado pela aorta. Após canulado, o coração foi fixado ao aparelho de coração isolado com fluxo constante 9-10mL/min e perfundidos com solução nutritora, tamponada (pH: 7,4), aquecida (37°C) e oxigenada (95% de O<sub>2</sub>, 5% de CO<sub>2</sub>) de Krebs-Ringer contendo 118.4 mmol/l NaCl, 4.7 mmol/l KCl, 1.2 mmol/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mmol/l MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1.5 mmol/l CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 11.7 mmol/l glicose e 26.5 mmol/l NaHCO<sub>3</sub>. Um balão flexível foi inserido no ventrículo esquerdo através do átrio esquerdo após incisão no apêndice atrial esquerdo para registrar a pressão sistólica ventricular esquerda (LVSP), pressão diastólica final ventricular esquerda (LVEDP), frequência cardíaca (FC) e dP/dt máxima e mínima. A pressão ventricular esquerda desenvolvida (dLVP) foi obtida pela diferença entre a LVSP e a LVEDP. Os dados foram adquiridos pelo sistema de aquisição de dados PowerLab, LabChart 8 (ADInstruments, Colorado Springs, EUA). O coração permaneceu em estabilização por 30min e foram submetidos a 30min de isquemia global, seguidos por 60 min de reperfusão. Para avaliar quantitativamente o número de eventos arrítmicos, foram contabilizados o tempo de todo e qualquer evento arrítmico do período de reperfusão, para então esse valor ser dividido pelo tempo total de reperfusão, obtendo assim a porcentagem de tempo que o coração apresentou eventos arrítmicos durante o período de reperfusão.

### 5.3.7 Reação de polimerase em cadeia em tempo real (q-PCR)

A q-PCR foi realizada conforme protocolo descrito no **Capítulo 1**. O ventrículo esquerdo foi dissecado e após protocolo de isquemia e reperfusão para avaliação da regulação transcricional dos receptores AT1, Mas, MrgD.

### 5.3.8 Reatividade vascular *in vitro* das artérias mesentéricas e femorais

As artérias mesentéricas foram dissecadas e montadas no miógrafo conforme descrição prévia (BRIDGES et al., 2011). Após eutanásia dos animais e retirada do coração para o experimento de coração isolado, uma laparotomia foi realizada para expor o leito mesentérico. Cerca de 85cm de intestino foi retirado com sua vascularização e colocado em uma placa de petri com solução gelada de Krebs-Henseleit (KHS, composição: NaCl 118; KCl 4,7; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,9; MgSO<sub>4</sub> 1,1; CaCl<sub>2</sub> 2,5; NaHCO<sub>3</sub> 25, D-glucose 11 (mM)). O intestino foi fixado de forma que o leito mesentérico ficasse tensionado para facilitar a dissecação dos ramos de 3<sup>a</sup> ordem da artéria mesentérica. Por sua vez, a artéria femoral foi cuidadosamente dissecada e colocada em uma placa de petri com solução de KHS gelada e posterior montagem, conforme previamente descrito (SLEZÁK et al., 2010).

Tanto os vasos mesentéricos quanto femorais foram então delicadamente montados num fio de aço inoxidável de 40 µm de diâmetro acoplado a um miógrafo para pequenos vasos (modelo 620M; DMT, Aarhus Denmark). As respostas foram registradas usando-se transdutores de tensão isométrica (AD Instruments, Colorado Springs, EUA) conectados a um amplificador (QUAD Bridge, AD Instruments, Colorado Springs, EUA). O programa Power Lab versão 8 foi utilizado para a aquisição e análise dos dados. A normalização foi realizada para determinar a a circunferência interna que o vaso deve ter quando relaxado sob pressão de 100mmHg. O próprio software calcula a circunferência interna a partir de uma constante para o calibre do vaso. Foram utilizadas as constantes 0,7 para a mesentérica e 0,9 para a femoral (VAN DEN AKKER et al., 2010). Após a normalização, foi realizado um procedimento denominado “começo padrão (standard start)” onde os vasos foram reativados após a normalização padrão do aparelho. Essa reativação ocorre através quatro aplicações repetidas de 5µL de fenilefrina (FE) com lavagens entre cada aplicação. Após as doses seriadas de FE, o vaso estava apto para a avaliação da curva concentração resposta de Ang II.

#### 5.3.8.1 Avaliação do efeito vasoconstritor da Ang II nas artérias mesentéricas e femorais de ratos com RAG

Para se obter as curvas concentração-resposta (CCR) da Ang II, foram utilizadas concentrações finais de  $10^{-10}$ – $10^{-6}$ mol/L. Os valores de contração foram expressos como porcentagem da contração máxima com FE. Também foram realizadas curvas concentração-resposta de fenilefrina (FE,  $10^{-8}$ – $10^{-5}$ mol/L), acetilcolina (ACh,  $10^{-9}$ – $10^{-5}$ mol/L) e nitroprussiato de sódio (SNP,  $10^{-9}$ – $10^{-5}$ mol/L).

## 5.4 Resultados

### 5.4.1 Avaliação da ingestão alimentar, consumo de água e peso corporal

A **figura 23A** mostra graficamente que os ratos submetidos à restrição alimentar grave ingeriram 40% da ingestão alimentar do grupo controle. Após o final do período de restrição, não houve diferença na ingestão alimentar entre o grupo CT ou RAG. O mesmo parâmetro foi observado para o consumo de água (**figura 23B**). Os ratos do grupo RAG beberam em média 60% da quantidade ingerida pelo grupo CT, porém não houve diferença entre a ingestão de água no período de realimentação.

A restrição alimentar levou a perda de 19% do peso corporal do grupo RAG, quando comparado ao grupo controle. Ao término do período de restrição, os ratos do grupo RAG levaram duas semanas para que o peso corporal se igualasse ao grupo CT (**figura 23C**). A partir da 4ª semana, os dois grupos não apresentaram diferença em relação ao peso corporal.

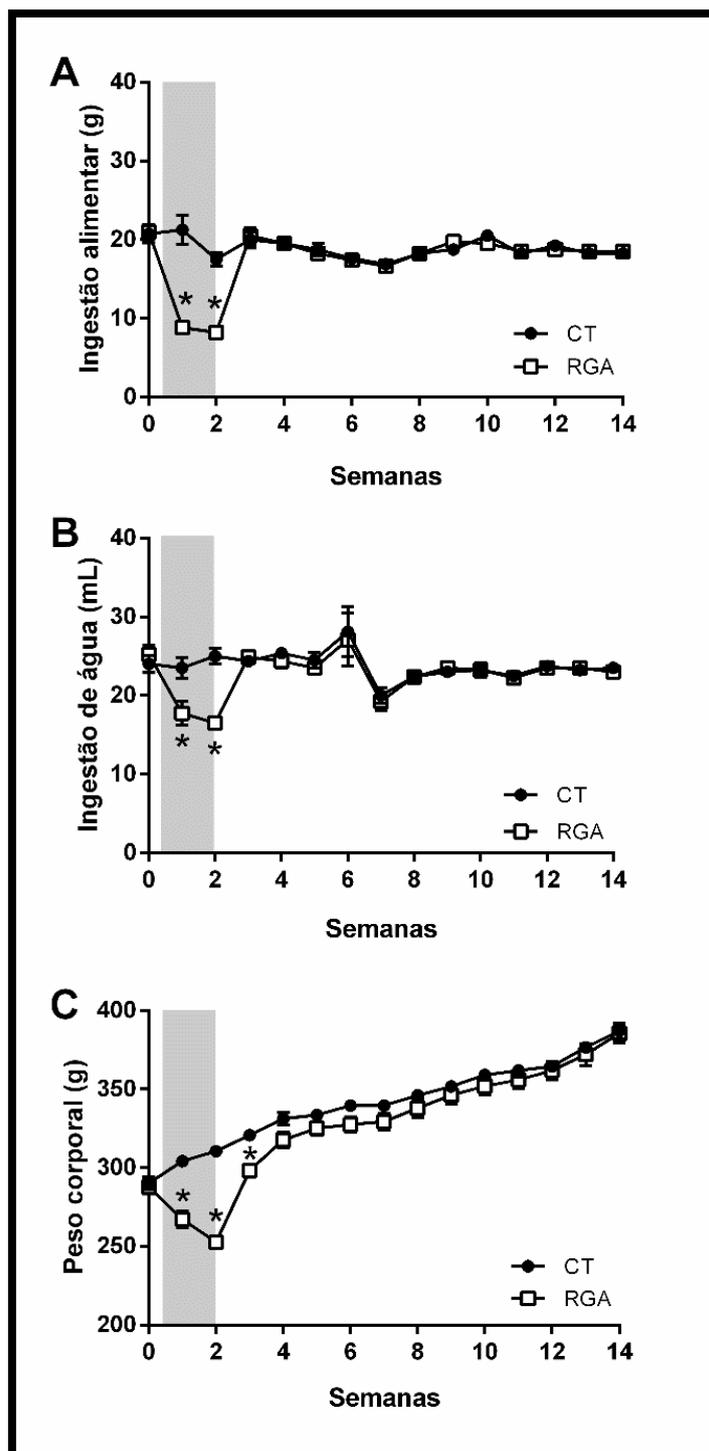
### 5.4.2 Dosagens na urina e plasma

O próximo passo foi avaliar como a restrição alimentar influenciava no balanço eletrolítico e volume plasmático. A **tabela 2** mostra que os ratos do RAG apresentaram aumento do hematócrito devido à redução no volume plasmático. Além disso, estes mesmos ratos apresentaram redução da concentração de sódio e potássio na urina devido à menor ingestão desses sais, quando comparado ao grupo CT. Após 3 meses de realimentação, não houve diferença entre os grupo CT-ra e RGA-ra, mostrando que o período de realimentação foi suficiente para recuperar o balanço eletrolítico dos ratos submetidos à restrição alimentar.

### 5.4.3 Peso dos tecidos

Conforme esperado, os ratos do grupo RAG apresentaram redução na deposição de gordura retroperitoneal, epididimal e inguinal quando comparados ao grupo controle (**tabela 3**). Além disso, importantes órgãos como rins e coração também apresentaram redução de massa. A suprarrenal, por sua vez, apresentou aumento de massa no grupo RAG, um conhecido marcador de estresse devido à altos níveis de cortisol (ULRICH-LAI et al., 2006).

Os ratos CT-ra e RGA-ra não apresentaram diferenças significativas em nenhum parâmetro, exceto deposição de gordura retroperitoneal. Estes dados mostram que a realimentação recuperou o peso corporal dos ratos RAG-ra e, por consequência, o peso dos tecidos.



**Figura 23:** Efeito da restrição alimentar grave (RAG) e 12 semanas de recuperação na ingestão alimentar, consumo de água e peso corporal. Na figura são mostradas mudanças na ingestão alimentar (A), consumo de água (B) e peso corporal (C) no grupo controle (CT, n=8) e no grupo RAG (n=8). A área cinza representa o período de RAG, enquanto a área branca representa que ambos grupos receberam a mesma ração. Teste t de Student foi usado para comparar diferenças entre os grupos CT e RGA em mesmo período. Os valores são mostrados em média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  vs. CT.

	CT	RAG		CT-ra	RAG-ra	
	Média ± EPM, N	Média ± EPM, N	p	Média ± EPM, N	Média ± EPM, N	p
Hematócrito (fração)	45.170 ± 1.078, n=6	51.13 ± 1.355, n=8	0.004 *	46,88 ± 1,529, n=8	49,13 ± 1,552, n=8	0,3192
Volume do plasma (mL)	11.98 ± 0.2286, n=6	8.663 ± 0.3469, n=8	0.0007 *	9.484 ± 0.345, n=8	9.093 ± 0.749, n=8	0.7687
Volume urinário (mL/24h)	10.230 ± 0.574, n=8	8.688 ± 0.807, n=8	0.1430	10,69 ± 0,2825, n=8	10,56 ± 0,8527, n=8	0,8913
Ingestão de Na <sup>+</sup> (mmol/24h)	2.315 ± 0.107, n=8	1.094 ± 0.026, n=8	<0.0001 *	2,181 ± 0,1187, n=8	2,180 ± 0,1778, n=8	0,9988
U <sub>Na</sub> (mmol/L)	269.3 ± 23.11, n=8	155.9 ± 15.35, n=8	0.0011 *	182,3 ± 14,73, n=8	185,5 ± 16,09, n=8	0,8855
U <sub>NaV</sub> (mmol/24h)	2.732 ± 0.249, n=8	1.286 ± 0.077, n=8	<0.0001 *	1,940 ± 0,1507, n=8	2,031 ± 0,2590, n=8	0,7661
Ingestão de Na <sup>+</sup> - U <sub>NaV</sub> (nmol/L)	-0.416 ± 0.208, n=8	-0.1921 ± 0.07, n=8	0.33	0,2404 ± 0,1059, n=8	0,1491 ± 0,1654, n=8	0,6494
Concentração plasmática Na <sup>+</sup> (nmol/L)	168.1 ± 5.461, n=6	170.7 ± 5.564, n=7	0.74	116,5 ± 2,541, n=8	121,3 ± 3,161, n=8	0,2610
Ingestão de K <sup>+</sup> (mmol/24h)	4.937 ± 0.232, n=8	2.323 ± 0.056, n=8	0.0002 *	4,654 ± 0,2552, n=8	4,654 ± 0,3804, n=8	0,9998
U <sub>K</sub> (mmol/L)	494.4 ± 35.24, n=8	291.0 ± 22.63, n=8	0.0003 *	403,4 ± 26,35, n=8	411,0 ± 15,73, n=8	0,8074
U <sub>KV</sub> (mmol/24h)	5.014 ± 0.396, n=8	2.418 ± 0.111, n=8	0.0002 *	4,305 ± 0,2973, n=8	4,404 ± 0,4327, n=8	0,8529
Ingestão de K <sup>+</sup> - U <sub>KV</sub> (nmol/L)	-0.077 ± 0.337, n=8	-0.096 ± 0.101, n=8	0.96	0,3489 ± 0,2030, n=8	0,2496 ± 0,2853, n=8	0,7810
Concentração plasmática K <sup>+</sup> (nmol/L)	5.300 ± 0.106, n=6	4.957 ± 0.203, n=7	0.28	4,388 ± 0,2240, n=8	4,638 ± 0,3053, n=8	0,5198

**Tabela 2:** Efeitos da restrição alimentar grave (RAG) ou realimentação (ra) nos parâmetros plasmáticos e urinários. Valores basais fisiológicos em ratos machos submetidos à dieta controle (CT) ou restrita (RAG) por duas semanas ou após 3 meses de realimentação com dieta controle (CT-ra e RAG-ra). \* p<0,05 vs CT, Teste t student. U<sub>Na</sub> = concentração de sódio na urina. U<sub>NaV</sub> = excreção urinária de sódio. U<sub>K</sub> = concentração de potássio na urina. U<sub>KV</sub> = excreção urinária de potássio.

	CT	RAG		CT-ra	RAG-ra	
Tecidos	Média ± EPM, N	Média ± EPM, N	p	Média ± EPM, N	Média ± EPM, N	p
Coração (g)	1.169 ± 0.03063, n=8	1.013 ± 0.03246, n=8	0.0037 *	1,362 ± 0,03703, n=8	1,417 ± 0,04639, n=8	0,3698
Tíbia (cm)	3.8 ± 0.03086, n=7	3.725 ± 0.03660, n=8	0.1474	4,138 ± 0,01830, n=8	4,125 ± 0,01637, n=8	> 0,9999
IMC (g/cm)	0.3106 ± 0.006708, n=7	0.2720 ± 0.007529, n=8	0.0023 *	0,3294 ± 0,009738, n=8	0,3436 ± 0,01127, n=8	0,2747
Rim esquerdo (g)	0.9304 ± 0.9304, n=8	0.7793 ± 0.04120, n=8	0.0040 *	1,208 ± 0,02779, n=8	1,210 ± 0,03107, n=8	0,9319
Rim direito (g)	0.9323 ± 0.01995, n=8	0.7452 ± 0.03546, n=6	0.0004 *	1,174 ± 0,03469, n=9	1,177 ± 0,03136, n=8	0,9477
Glândula suprarenal (g)	0.04175 ± 0.002969, n=8	0.05313 ± 0.004116, n=8	0.0417 *	0,0400 ± 0,001488, n=8	0,04175 ± 0,001206, n=8	0,3764
Tecido adiposo retroperitoneal (g)	3.264 ± 0.2389, n=7	1.357 ± 0.2960, n=7	0.0003 *	4,891 ± 0,2462, n=8	5,655 ± 0,2348, n=8	0,0412 *
Tecido adiposo inguinal (g)	3.366 ± 0.2234, n=6	1.774 ± 0.2910, n=5	0.0017 *	3,903 ± 0,1576, n=8	3,977 ± 0,2431, n=8	0,8038
Tecido adiposo epididimal (g)	4.969 ± 0.2863, n=8	2.948 ± 0.3861, n=8	0.0009 *	9,053 ± 0,1550, n=8	8,936 ± 0,2731, n=8	0,7148
Tecido adiposo marrom subescapular (g)	0.1982 ± 0.03355, n=5	0.1970 ± 0.04310, n=4	>0.9999	0,3056 ± 0,01921, n=8	0,3288 ± 0,008512, n=8	0,2896

**Tabela 3:** Efeitos da restrição alimentar grave (RAG) ou realimentação (ra) no peso ou tamanho dos tecidos. \* p<0,05 vs CT, Teste t student. IMC = índice de massa cardíaca (peso do coração/tamanho da tíbia)

#### 5.4.4 Vasomotricidade e função cardíaca

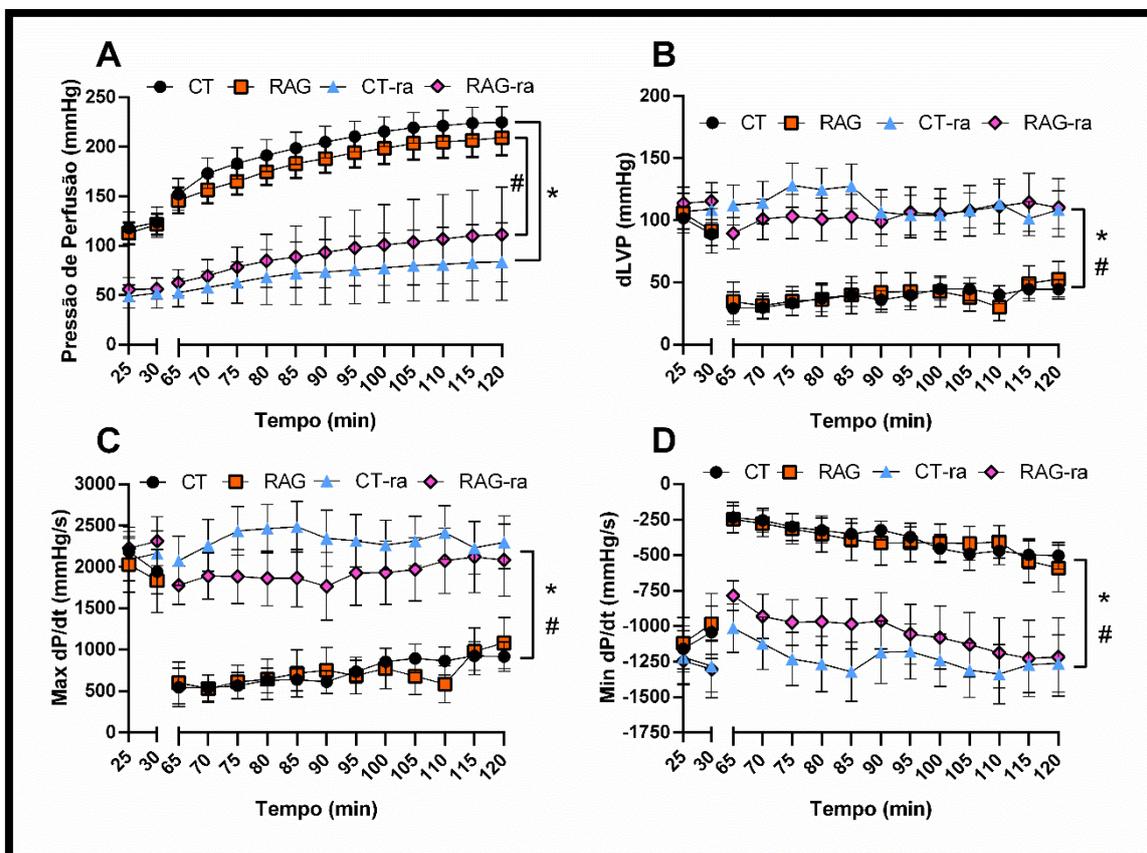
Para avaliar os efeitos da RAG na função cardíaca *ex vivo*, foi utilizada a técnica de Langendorff com protocolo de isquemia/reperfusão. Este protocolo foi escolhido por dois motivos, sendo o primeiro para avaliar como a RAG influencia na incidência de arritmias de reperfusão, e o segundo para avaliar se um evento estressor como a isquemia alteraria a regulação transcricional dos receptores angiotensinérgicos.

O primeiro parâmetro avaliado foi a pressão de perfusão. Este parâmetro consiste na pressão exercida pela solução de Krebs para perfundir as coronárias. A **figura 24A** mostra os efeitos da RAG nas variações da pressão de perfusão ao longo do período de reperfusão. Pode-se observar que não houve diferenças significativas entre o grupo CT e o grupo RAG, contudo o período de realimentação levou a uma redução significativa da pressão de perfusão tanto no grupo CT-ra, quanto no grupo RAG-ra, quando comparado com seus respectivos controles. A análise através da ANOVA de duas vias mostrou que a dieta ( $F(3, 22) = 22,60$ ), o tempo ( $F(13, 286) = 96,17$ ) e a interação entre a dieta e o tempo ( $F(39, 286) = 5,123$ ) afetaram significativamente ( $p < 0,0001$ ) a pressão de perfusão.

O segundo parâmetro avaliado foi a pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (dLVP). A **figura 24B** mostra que não houve diferença significativa entre o grupo CT e o grupo RAG durante o período de reperfusão. Os grupos CT-ra e RAG-ra também não apresentaram diferença significativa entre si, mas apresentaram queda significativa quando comparado com seus respectivos controles. Mais uma vez, através da análise de variância podemos confirmar que a dieta ( $F(3, 22) = 6,930$ ), o tempo ( $F(13, 286) = 12,77$ ) e a interação entre dieta e tempo ( $F(39, 286) = 4,599$ ) afetaram significativamente ( $p < 0,0001$ ) a dLVP.

Finalmente, foram avaliadas as derivadas dP/dt máxima e mínima. Podemos observar na **figura 24C** que não houve diferença entre os grupos CT e RAG na dP/dt máxima, assim como não houve diferença entre os grupos CT-ra e RAG-ra. Entretanto houve diferença entre os grupos CT x CT-ra e entre os grupos RAG x RAG-ra. O teste estatístico ANOVA de duas vias mostrou que houve influência significativa ( $p < 0,0001$ ) da dieta ( $F(3, 22) = 8,006$ ), tempo ( $F(13, 286) = 17,32$ ) e na interação entre dieta e tempo ( $F(39, 286) = 5,414$ ) na dP/dt máxima. A **figura 24D** mostra as variações da dP/dt mínima. Assim como na dP/dt máxima, não houve diferença entre os grupos CT e RAG no período de reperfusão. Após o período de realimentação também não houve diferença entre os grupos CT-ra e RAG-ra. Após o período de realimentação, ambos grupos CT-ra e RAG-ra apresentaram dP/dt mínima menor que os grupos CT e RAG, respectivamente. Mais uma vez, a análise com ANOVA de duas vias mostrou que a

dieta ( $F(3, 22) = 6,529$ ), o tempo ( $F(13, 286) = 24,22$ ) e a interação entre dieta e tempo ( $F(39, 286) = 3,637$ ) influenciaram significativamente ( $p < 0,0001$ ) a  $dP/dt$  mínima.

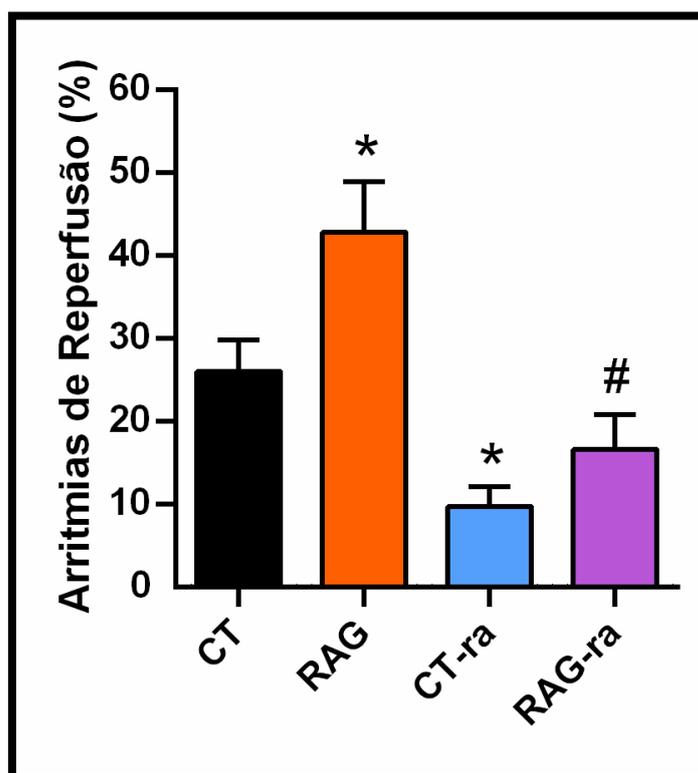


**Figura 24:** Efeitos da restrição alimentar na pressão de perfusão (**A**), pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (dLVP, **B**),  $dP/dt$  máxima (**C**) e mínima (**D**) nos períodos pré e pós- isquêmicos no coração isolado. Círculo preto representa o grupo controle (CT,  $n=6$ ), quadrado alaranjado representa o grupo com restrição alimentar grave (RAG,  $n=7$ ), triângulo azul representa o grupo CT realimentado (CT-ra,  $n=7$ ) e o losango roxo representa o grupo RAG realimentado (RAG-ra,  $n=6$ ). Análise de variância de duas vias seguida de Bonferroni foi usada para determinar diferença estatística entre os grupos. Os valores são mostrados em média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  CT vs CT-ra. #  $p < 0,05$  RAG vs RAG-ra.

#### 5.4.5 Porcentagem de arritmias no período de reperfusão

Diferente do capítulo 1, em que avaliamos o número de eventos arrítmicos através do índice de gravidade de arritmias, neste estudo nós avaliamos o efeito da restrição alimentar na incidência de arritmias de reperfusão através da razão entre o tempo em que o coração apresentou eventos arrítmicos pelo tempo total de reperfusão. Nós optamos por não utilizar o IGA por dois motivos. Primeiro por se tratar de uma arritmia global, e não parcial, e segundo pelo tempo de reperfusão ser o dobro do tempo utilizado no trabalho de Neves e colaboradores (1997).

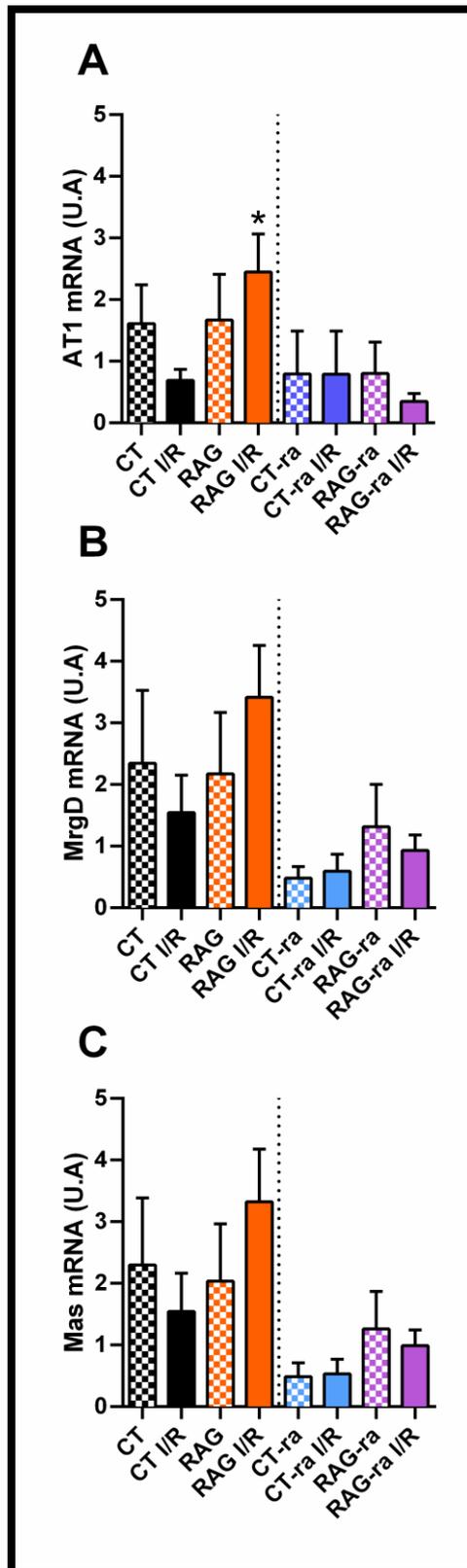
A **figura 25** mostra que a RAG aumentou significativamente ( $p=0,0463$ ) a porcentagem de arritmias para  $42,79 \pm 6,071\%$ , quando comparado com a porcentagem de  $26,00 \pm 3,830\%$  do grupo CT. Após o período de realimentação, houve redução significativa ( $p= 0,0043$ ) da porcentagem de arritmias para  $9,667 \pm 2,418\%$  no grupo CT-ra quando comparado com o grupo CT. A realimentação também reduziu significativamente ( $p= 0,0070$ ) a porcentagem de arritmias para  $16,62 \pm 4,208\%$  no grupo RAG-ra quando comparado com o grupo RAG. Contudo, a diferença entre o grupo CT e RAG desapareceu após o período de realimentação.



**Figura 25:** Efeitos da restrição alimentar na incidência de arritmias de reperfusão. Teste t de Student foi utilizado para comparar diferença entre os grupos na porcentagem de arritmias de reperfusão. Os valores são mostrados em média  $\pm$  EPM. \*  $p<0,05$  vs grupo CT. # vs grupo RAG. CT, n=6. RAG, n=7. CT-ra, n=7. RAG-ra, n=6.

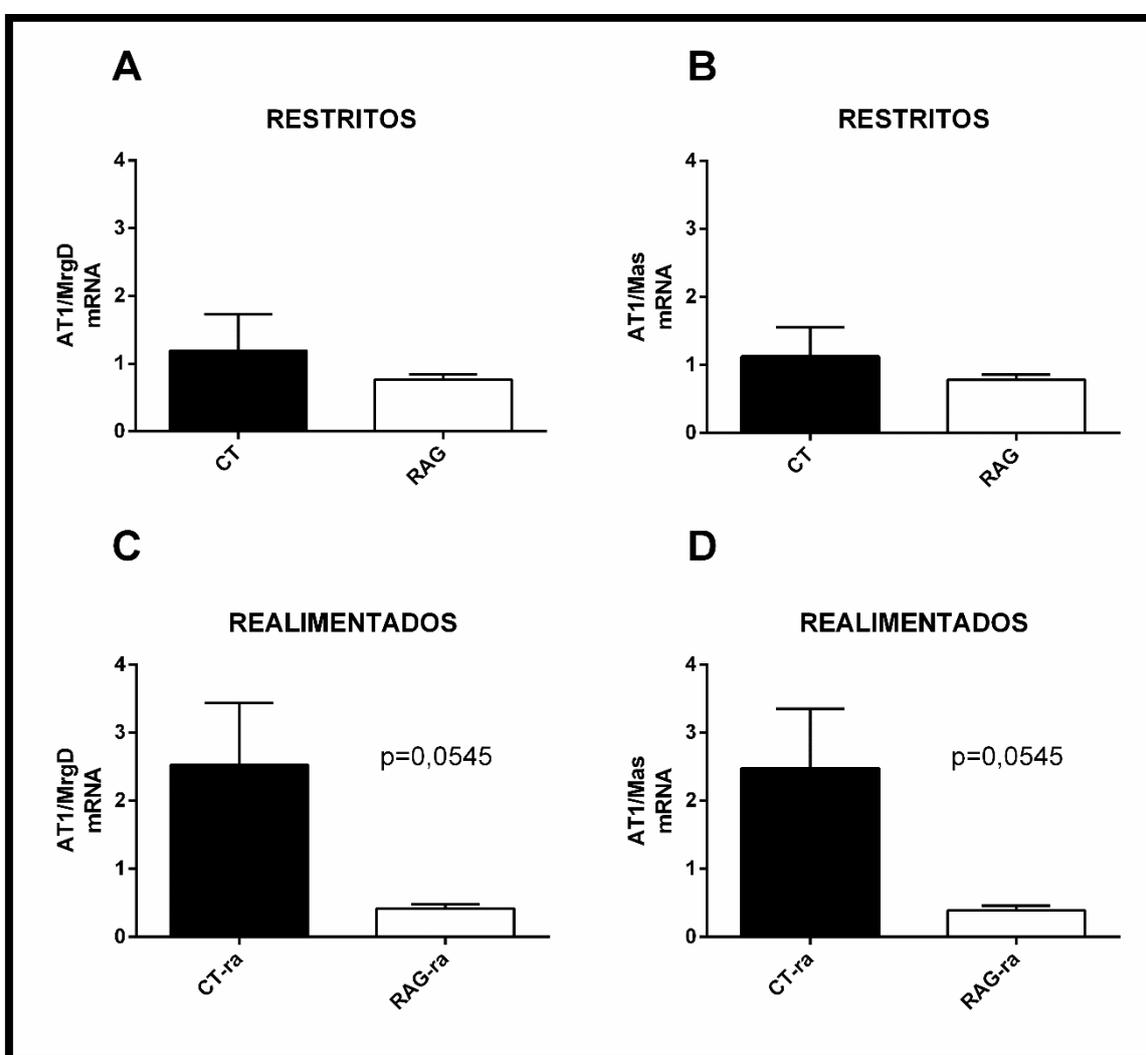
#### 5.4.6 Avaliação da regulação transcricional do receptor AT1, MrgD e Mas

Uma vez que observamos que a restrição alimentar grave, levou à redução do volume plasmático e Souza e colaboradores (2018) mostraram que o sistema renina angiotensina encontra-se ativado nesse modelo dietético, nós optamos por avaliar a regulação transcricional de 3 importantes receptores do SRA no ventrículo esquerdo. Também avaliamos como o protocolo de I/R influenciou na regulação transcricional destes receptores, para isso avaliamos também corações que não foram submetidos ao protocolo de I/R.



**Figura 26:** Efeito da restrição alimentar e protocolo de isquemia e reperfusão na regulação transcricional do receptor AT1 (A), MrgD (B) e Mas (C). Teste t de Student foi utilizado para comparar diferença entre os grupos nos níveis de mRNA. Os valores são mostrados em média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  vs grupo CT I/R. I/R significa isquemia/reperfusão. CT significa controle. RAG significa restrição alimentar grave. ra significa realimentado.

O primeiro receptor avaliado foi o receptor AT1. A **figura 26A** mostra que o receptor AT1 está hiper-regulado apenas no grupo RAG I/R ( $0,4594 \pm 4,338$ ) quando comparado ao grupo CT I/R ( $0,3246 \pm 1,412$ ). Este dado é muito interessante pois sugere regulação transcricional do receptor AT1 nos ratos RAG apenas se submetidos ao protocolo de I/R. Não houve diferenças significativas entre os grupos realimentados, com ou sem I/R. O segundo receptor avaliado foi o MrgD. A **figura 26B** mostra que não houve diferenças significativas entre os grupos, submetidos ou não ao protocolo de isquemia e reperfusão. Por fim foi avaliada a regulação transcricional do receptor Mas. Assim como o receptor MrgD, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos, submetidos ou não ao protocolo de I/R (**figura 26C**).



**Figura 27:** Efeitos da restrição alimentar grave (RAG) e realimentação (ra) na relação entre os níveis de mRNA no ventrículo esquerdo após protocolo de isquemia/reperfusão entre os receptores AT1, MrgD e Mas. Teste t de Student foi utilizado para comparar a diferença entre os grupos. Os valores são mostrados em média  $\pm$  EPM. CT significa grupo controle; RAG significa grupo com restrição alimentar grave; "ra" significa que o grupo foi realimentado.

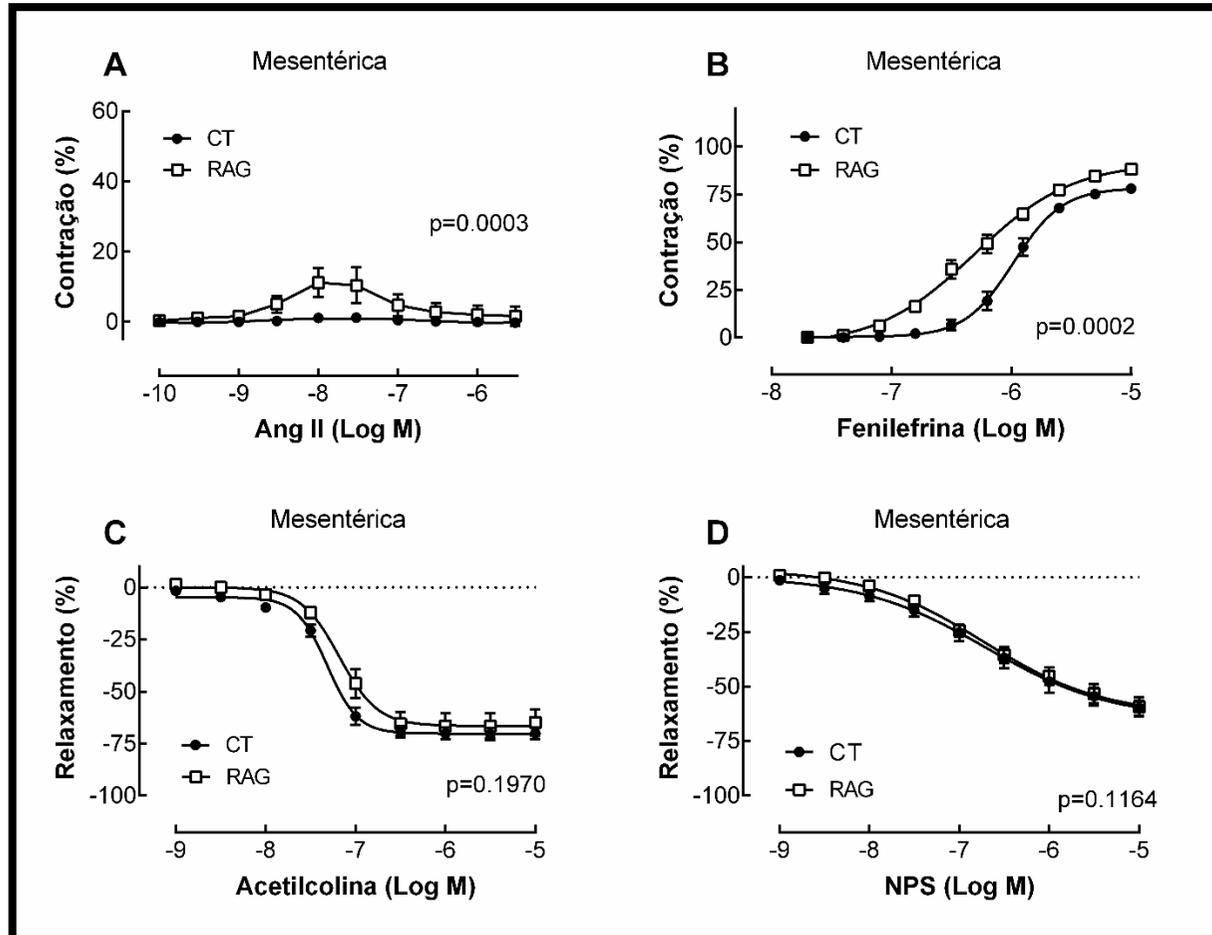
A **figura 27** mostra a razão dos níveis de mRNA do receptor AT1 sobre os níveis de mRNA dos receptores MrgD (**27A** e **27C**) e Mas (**27B** e **27D**). Após 2 semanas de restrição alimentar, não houve diferença significativa nas razões AT1/MrgD ou AT1/Mas entre os grupos CT e RAG. Entretanto, após 3 meses de realimentação, a razão AT1/MrgD e AT1/Mas apresentou diferença entre os grupos CT-ra e RAG-ra, mostrando uma tendência a ser maior no grupo CT-ra quando comparado com o grupo RAG-ra.

#### 5.4.7 Reatividade vascular

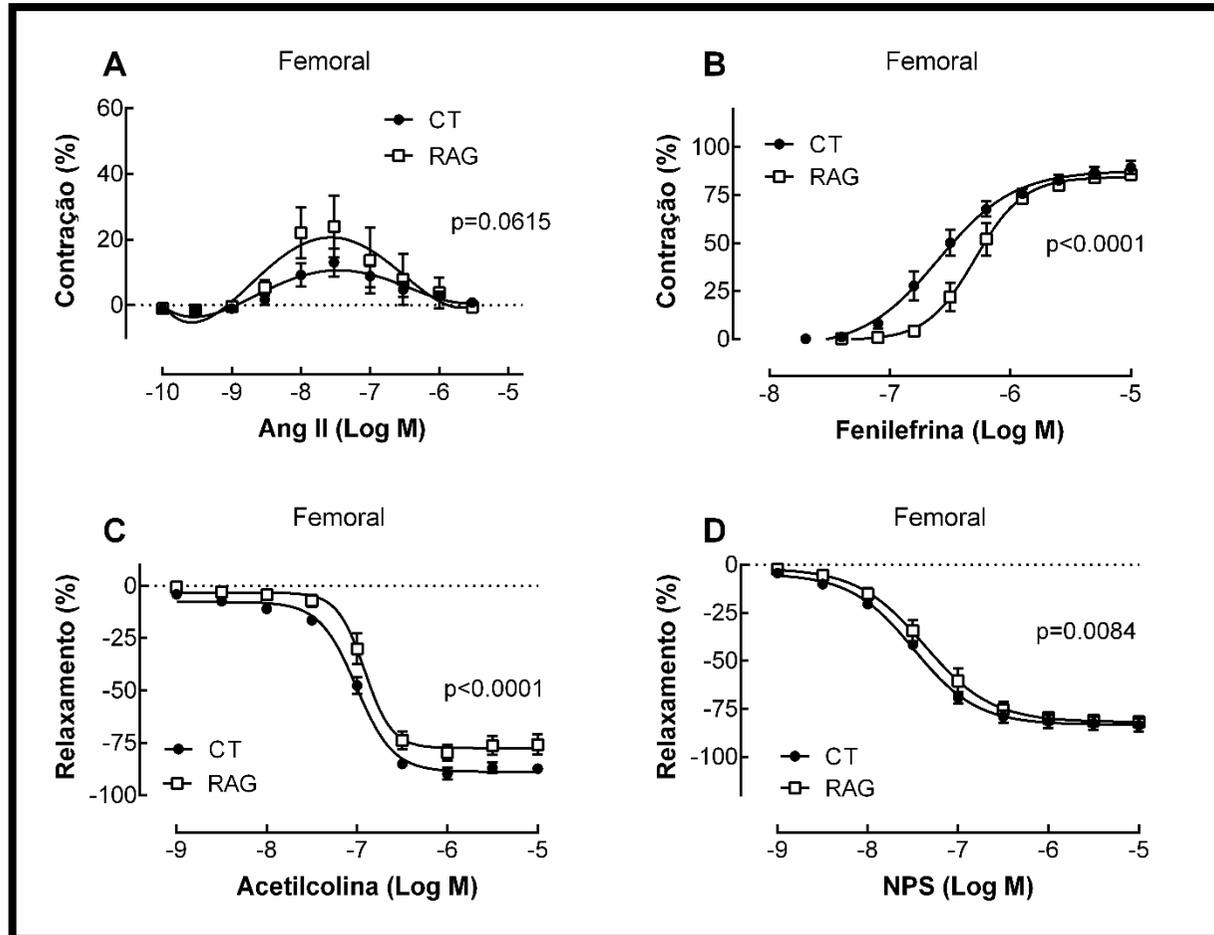
Uma vez que Souza e colaboradores (2018) observaram que o receptor AT1 está hiper-regulado nas mesentéricas de ratas submetidas à RAG, nós achamos interessante avaliar a resposta desses vasos à diferentes concentrações de Ang II, fenilefrina, acetilcolina e nitroprussiato de sódio (NPS). A título comparativo, também avaliamos os efeitos das drogas citadas acima na artéria femoral.

A **figura 28** mostra o efeito da RAG em curvas concentrações resposta das artérias mesentéricas de terceira ordem. Podemos observar nas **figuras 28A** e **28B** que a RAG levou a um aumento significativo na sensibilidade da artéria mesentérica à resposta da Ang II e da fenilefrina, respectivamente, quando comparado ao grupo CT. Entretanto não foram observadas diferenças entre os grupos RAG e CT nas respostas vasodilatadoras à diferentes concentrações de acetilcolina e NPS (**figuras 28C** e **28D**, respectivamente).

No leito femoral, não foi observada diferença entre os grupos CT e RAG no efeito vasoconstritor da Ang II (**figura 29A**). Entretanto, podemos observar que houve uma inversão quanto a sensibilidade à fenilefrina (**figura 29B**), de modo que o grupo CT se mostrou mais sensível que o grupo RAG. Também foi observado somente no leito femoral diferença significativa entre os grupos CT e RAG quanto a resposta vasodilatadora da acetilcolina e do NPS, onde o grupo CT apresentou maior sensibilidade tanto à acetilcolina (**figura 29C**) quanto ao NPS (**figura 29D**).



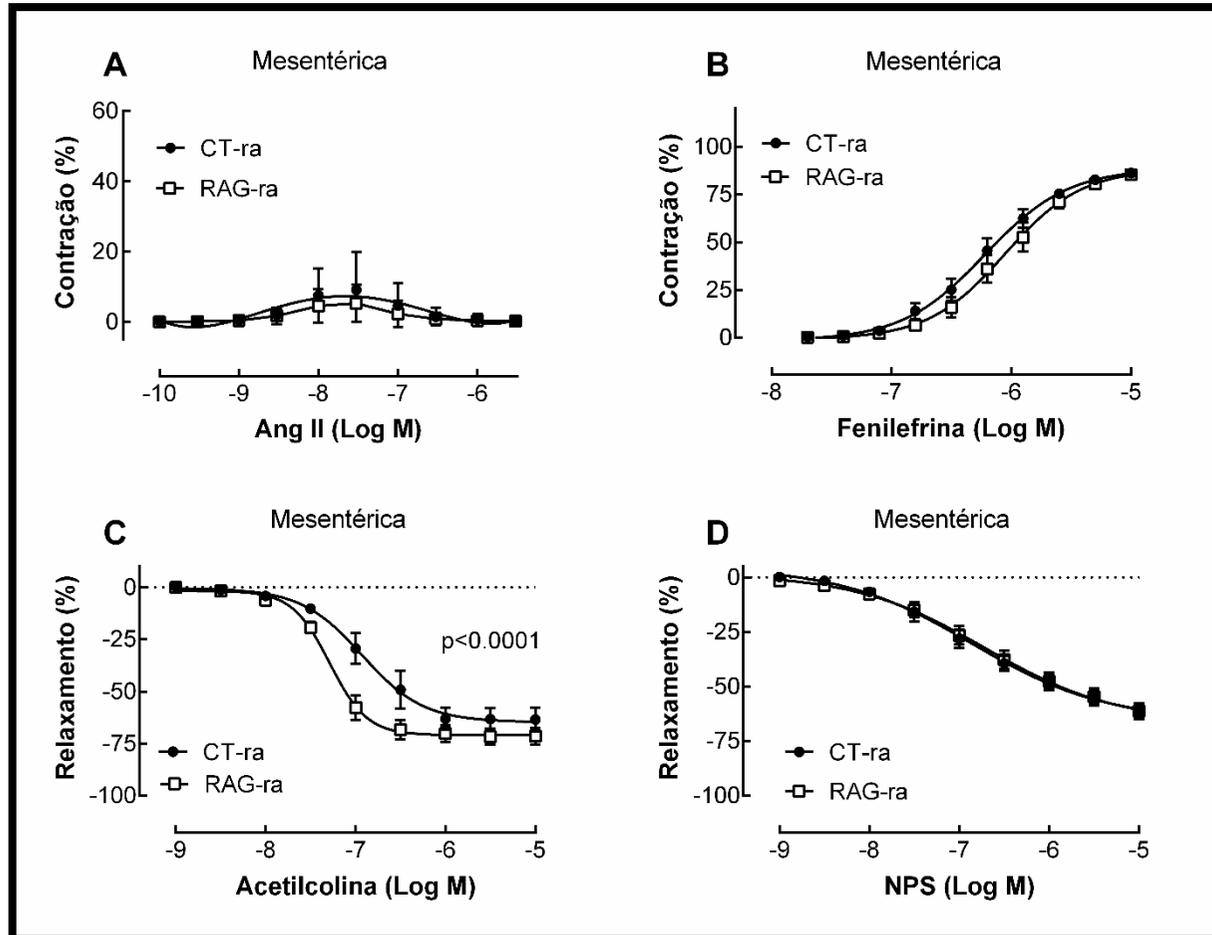
**Figura 28:** Efeitos da restrição alimentar nas respostas vasoconstritoras da angiotensina II (A) e fenilefrina (B) e nas respostas vasodilatadoras da acetilcolina (C) e nitroprussiato de sódio (D) nas artérias mesentéricas de terceira ordem. Análise de variância de duas vias seguida de Bonferroni foi usada para determinar diferença estatística entre os grupos. Os valores são mostrados em média  $\pm$  EPM. CT significa grupo controle (n=7); RAG significa grupo com restrição alimentar grave (n=7); Ang II significa angiotensina II; NPS significa nitroprussiato de sódio.



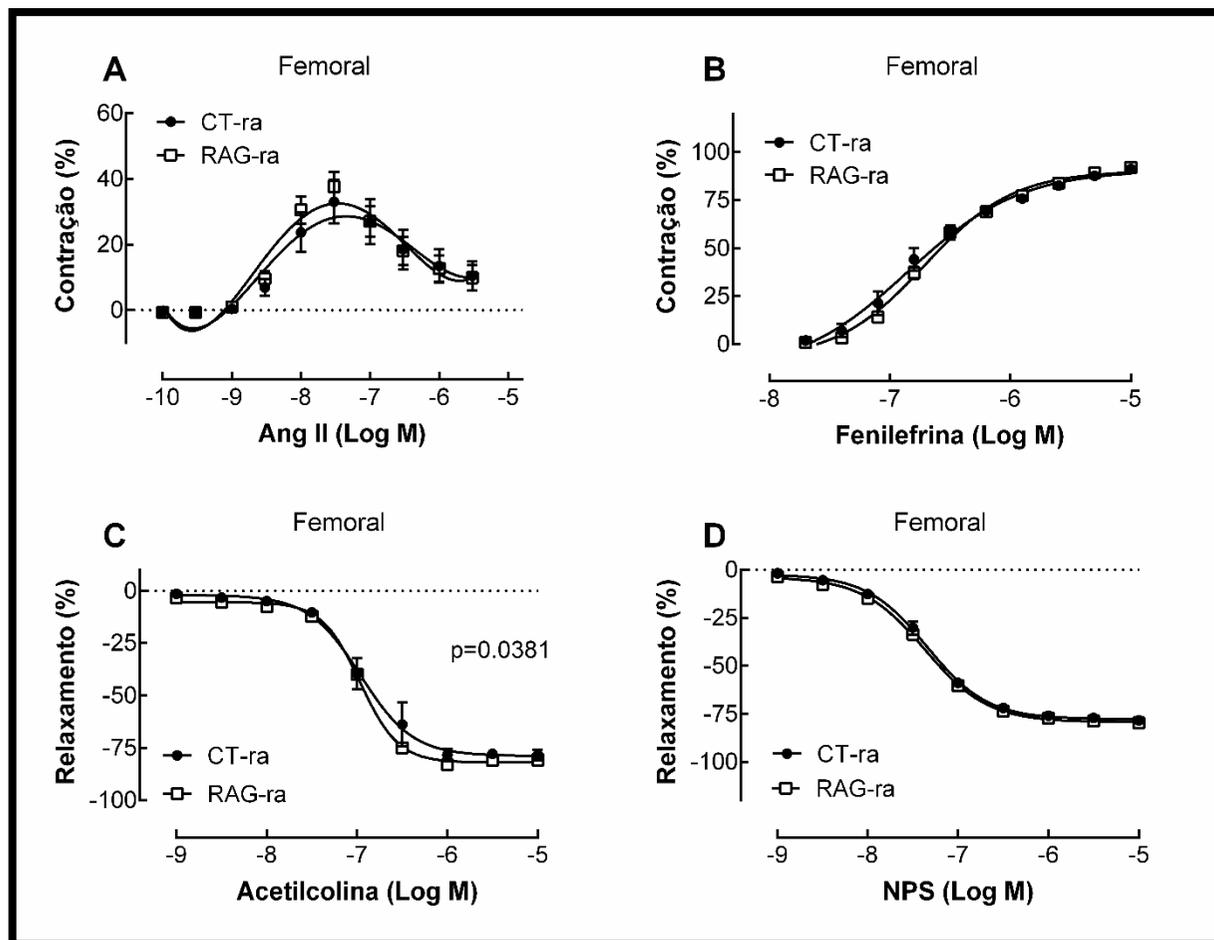
**Figura 29:** Efeitos da restrição alimentar nas respostas vasoconstritoras da angiotensina II (A) e fenilefrina (B) e nas respostas vasodilatadoras da acetilcolina (C) e nitroprussiato de sódio (D) na artéria femoral. Análise de variância de duas vias seguida de Bonferroni foi usada para determinar diferença estatística entre os grupos. Os valores são mostrados em média  $\pm$  EPM. CT significa grupo controle (n=6); RAG significa grupo com restrição alimentar grave (n=6); Ang II significa angiotensina II; NPS significa nitroprussiato de sódio.

Nas artérias mesentéricas, após o período de 3 meses de realimentação, as diferenças observadas, no final do período de restrição alimentar, nas respostas às drogas vasoconstritoras desapareceram (**figura 30A e 30B**). Contudo, houve aumento de sensibilidade no grupo RAG-ra à acetilcolina quando comparado com o grupo CT-ra (**figura 30C**). Não houve diferença entre os grupos na resposta vasodilatadora do NPS (**figura 30D**), assim como no período pré-realimentação.

No leito femoral, não houve diferença entre os grupos CT-ra e RAG-ra nas respostas vasoconstritoras da Ang II e da fenilefrina (**figura 31A e 31B**). Entretanto, houve aumento da sensibilidade do grupo RAG-ra à acetilcolina (**figura 31C**), efeito oposto ao observado antes da realimentação (**figura 29C**). Por fim, não houve diferença entre os grupos CT-ra e RAG-ra na resposta vasodilatadora do NPS (**figura 31D**).



**Figura 30:** Efeitos da realimentação após a restrição alimentar nas respostas vasoconstritoras da angiotensina II (A) e fenilefrina (B) e nas respostas vasodilatadoras da acetilcolina (C) e nitroprussiato de sódio (D) nas artérias mesentéricas de terceira ordem. Análise de variância de duas vias seguida de Bonferroni foi usada para determinar diferença estatística entre os grupos. Os valores são mostrados em média  $\pm$  EPM. CT significa grupo controle (n=8); RAG significa grupo com restrição alimentar grave (n=8); Ang II significa angiotensina II; NPS significa nitroprussiato de sódio.



**Figura 31:** Efeitos da realimentação após restrição alimentar nas respostas vasoconstritoras da angiotensina II (**A**) e fenilefrina (**B**) e nas respostas vasodilatadoras da acetilcolina (**C**) e nitroprussiato de sódio (**D**) na artéria femoral. Análise de variância de duas vias seguida de Bonferroni foi usada para determinar diferença estatística entre os grupos. Os valores são mostrados em média  $\pm$  EPM. CT significa grupo controle (n=8); RAG significa grupo com restrição alimentar grave (n=8); Ang II significa angiotensina II; NPS significa nitroprussiato de sódio.

## 5.5 Discussão

Nossos resultados mais importantes mostram que ratos Fischer machos submetidos a duas semanas de restrição alimentar grave apresentam desequilíbrio hidroeletrólítico, redução do volume plasmático, atrofia cardíaca e aumento da incidência de arritmias de reperfusão. O SRA apresenta um papel importante em ratos RAG pois observamos hiper-regulação do receptor AT1 no ventrículo esquerdo destes ratos após o protocolo de isquemia/reperfusão. Além disso, apenas os ratos RAG apresentaram resposta ao efeito vasoconstritor da Ang II no leito mesentérico.

Três meses de realimentação foram suficientes para recuperar o balanço eletrolítico, o volume plasmático, a massa cardíaca e abolir o aumento na incidência de arritmias. Em adição, os níveis de mRNA do receptor AT1 foram normalizados e não foram mais observadas diferenças no efeito vasoconstritor da Ang II entre os grupos RAG-ra e CT-ra.

O modelo de restrição alimentar utilizado nesse trabalho consistiu em reduzir 60% da quantidade de calorias e nutrientes oferecidos por 14 dias. Essa restrição levou a uma redução de 19% do peso corporal, valor bem semelhante à outros trabalhos que já utilizaram esse protocolo de privação alimentar (CARR et al., 1998; DE SOUZA et al., 2015; MARINKOVIĆ et al., 2007). O ratos restritos também apresentaram redução no consumo de água diário quando comparados com o grupo controle, o que era esperado devido à redução na ingestão de carboidratos, proteínas e sódio (BANKIR et al., 2017; DE CASTRO, 1991), reduzindo por consequência a sede. Para avaliar se a RAG levaria a alterações a longo prazo, tanto na ingestão alimentar e de água, quanto no peso corporal, outros dois grupos foram realimentados por 3 meses. Depois desse período de realimentação, não foram observadas diferenças entre os grupos CT-ra e RAG-ra nos três parâmetros citados acima.

A redução na ingestão de sódio e potássio provocada pela restrição alimentar levou também a consequente redução da concentração de sódio e potássio na urina. Contudo, o balanço (ingestão – excreção) de sódio e potássio não apresentou diferença significativa entre os grupos CT e RAG. Além disso, os grupos CT e RAG apresentaram valores negativos no balanço de sódio e potássio, o que implica que os ratos estão excretando mais sódio e potássio do que retendo (HOLBROOK et al., 1984). Após o período de realimentação, as concentrações de sódio e potássio na urina no grupo RAG-ra se igualaram ao grupo CT-ra. Além disso, ambos grupos realimentados apresentaram balanço de sódio e potássio positivo, o que implica em maior retenção de sódio e potássio do que excreção. Já foi mostrado que, a medida em que mamíferos vão envelhecendo há aumento na retenção de sódio e potássio (SCHLANGER; BAILEY; SANDS, 2010). Ainda que os ratos utilizados no estudo tenham por volta de 7 meses

após a realimentação, sendo considerados adultos jovens (SENGUPTA, 2013), pode ser que o processo de retenção de sódio e potássio se inicie em períodos anteriores ao da velhice.

O peso dos órgãos e tecidos avaliados, exceto a tíbia e o tecido adiposo marrom subescapular, foi significativamente menor nos ratos RAG quando comparado com o grupo CT. Se observamos a figura 23C, podemos concluir que os ratos CT continuam crescendo ao longo do período de restrição alimentar e realimentação. Já os ratos restritos, ao perderem peso, não apresentam disponibilidade nutricional suficiente para o desenvolvimento dos órgãos. A nossa hipótese então é que a restrição alimentar impede o aumento dos órgãos ao longo do desenvolvimento dos ratos. De forma interessante, o comprimento da tíbia não foi diferente entre os grupos CT e RAG. O comprimento da tíbia é um parâmetro muito usado na literatura para relativizar o peso de órgãos com o tamanho do corpo. A tíbia cresce em torno de 30mm da 3ª semana de idade até 21ª em ratos Wistar (SANTIAGO et al., 2015). A ausência de diferença entre o comprimento da tíbia dos ratos CT e RAG indica que a restrição alimentar não influenciou no crescimento dos ratos, uma vez que eles estão com a mesma idade. Outro tecido que não apresentou diferença entre o grupo CT e o grupo RAG foi o tecido adiposo marrom subescapular (TAMs). A função do tecido adiposo marrom é catabolizar lipídios para produzir calor. Em restrições alimentares já foi mostrado que o TAMs é ativado para geração de calor (SUGDEN et al., 1982), e que existe a conversão do tecido adiposo branco para o tecido adiposo marrom (FABBIANO et al., 2016). Por ser um tecido exigido em momentos de ausência de calorias, é plausível que nos ratos RAG esse tecido não seja afetado. Por fim, após os 3 meses de realimentação nenhuma diferença foi observada quanto ao peso dos tecidos entre os grupos RAG-ra e CT-ra, o que mostra que este período de realimentação apresenta tempo suficiente para recuperação do desenvolvimento dos ratos RAG.

Ao analisarmos a função cardíaca *ex vivo* dos ratos RAG nós não observamos diferença em relação ao grupo CT em nenhum dos parâmetros. Sugizaki e colaboradores mostraram que 50% de restrição alimentar por 90 dias levou a redução na  $dP/dt$  máxima em uma preparação de músculo papilar isolado e aumentou as dimensões diastólica, sistólica final, aórtica e atrial esquerda (SUGIZAKI et al., 2005). Por outro lado Okoshi e colaboradores não observaram diferenças na  $\pm dP/dt$  em ratos submetidos ao mesmo modelo de restrição (OKOSHI et al., 2004). Em um modelo de dieta com baixíssimo teor calórico com 3 dias de duração, humanos saudáveis apresentaram prejuízo na função diastólica do ventrículo esquerdo (VAN DER MEER et al., 2007). Juntos estes dados mostram que diferentes tipos de restrição alimentar levam a diferentes respostas cardiovasculares, dessa forma, a ausência de diferença nos

parâmetros observados não nos surpreendeu. Entretanto, o que nos surpreendeu foi a forma como os ratos realimentados, tanto controle quanto restrito, apresentaram redução na pressão de perfusão e manutenção dos valores da dLVP e  $\pm dp/dt$ , no período de reperfusão, próximos aos valores do período basal. Já está bem descrito na literatura que o período de reperfusão pós isquemia é seguido por queda da dLVP e da  $\pm dp/dt$ , além de aumento da LVEDP (HEUSCH, 2016; LINDSEY et al., 2018; MANN et al., 2014; YANG et al., 1998a). A única diferença entre os ratos CT e CT-ra é a idade. Contudo, vários estudos já descreveram que o envelhecimento agrava a função cardíaca pós isquêmica (ABETE et al., 1996; LESNEFSKY et al., 1994; TANI et al., 1997). Ademais, os ratos realimentados foram eutanasiados com 7 meses de idade, sendo enquadrados como machos adultos/jovens ainda.

Nossa próxima etapa foi avaliar a incidência de arritmias de reperfusão no coração isolado dos ratos. Esse foi um objetivo pautado em dois pontos principais. Primeiro, a RAG é um modelo altamente estressor para o rato, pois envolve isolamento e jejum, ademais sabe-se que o estresse é um grande precursor de arritmias (BUCKLEY; SHIVKUMAR, 2016; JOHNSON; FRANCIS, 2014). Segundo, já foi mostrado que a restrição calórica pode aumentar a incidência de arritmias devido ao aumento a sensibilidade da estimulação adrenérgica, tornando os ratos mais suscetíveis à arritmias (DROTT; LUNDHOLM, 1992). Conforme esperado, a RAG levou a um aumento na incidência de arritmias de reperfusão quando comparado com o grupo controle. Após 3 meses de realimentação, não houve diferença entre o grupo CT-ra e o grupo RAG-ra. Entretanto, o tempo em que o coração permaneceu em arritmias durante o período de reperfusão no grupo CT-ra foi menor que no grupo CT, assim como a porcentagem do grupo RAG-ra foi menor que do grupo RAG. Este dado pode ter duas explicações. A primeira é que o período de 3 meses de realimentação aboliu todas as alterações que levaram ao aumento da incidência de arritmias, como o estresse do período de restrição. A segunda é que, uma vez que o grupo CT-ra também estava inferior ao grupo CT, o período de 3 meses de realimentação levou a alterações que adaptaram o coração melhor à lesão isquêmica. Essa hipótese pode ser corroborada pelos resultados da função cardíaca, que mostra que os corações quase não sofreram alterações pós isquêmicas depois dos 3 meses de recuperação. Entretanto, para confirmar qualquer uma das duas hipóteses novos estudos serão necessários.

Por fim, avaliamos a participação do SRA na RAG através de dois experimentos. Yang e colaboradores (1998) mostraram que o receptor AT1 está hiper-regulado no coração de ratos submetidos ao protocolo de isquemia/reperfusão. Dessa forma, uma vez que Souza e colaboradores (2018) mostraram que o SRA clássico está ativado no modelo de RAG, nós avaliamos a regulação transcricional do receptor AT1

no ventrículo esquerdo pós isquemia/reperfusão. A restrição alimentar levou a uma hiper-regulação do receptor AT1 quando comparado com o grupo CT. Contudo essa diferença só foi observada na presença do protocolo de isquemia e reperfusão. Eventos patológicos muitas vezes funcionam como gatilho para ativação do eixo clássico do SRA, conseqüentemente, a I/R pode ser um estímulo forte o suficiente para ativar a maquinaria genética do coração que já apresenta alterações decorrentes da RAG. Após os 3 meses de realimentação, os níveis de mRNA para o receptor AT1 não sofreram alterações na presença ou ausência do protocolo de I/R. Este dado sugere que o SRA já não é ativado com o mesmo estímulo que no grupo RAG. Também avaliamos a regulação transcricional dos receptor MrgD e Mas para avaliar a participação do eixo não clássico na RAG. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos CT e RAG, com ou sem I/R, antes ou após 3 meses de realimentação. Este dado sugere que o equilíbrio do SRA está desviado para o eixo clássico, que, conforme mostrado pela literatura, desempenha um importante papel em situações patológicas (KAPRIELIAN et al., 1997; TOUYZ; SCHIFFRIN, 2001; YANG et al., 1998b).

Após constatar que o receptor AT1 estava hiper-regulado no grupo RAG submetido à I/R e que os receptores MrgD e Mas apresentavam tendência semelhante, nós avaliamos a relação entre os níveis de mRNA do receptor AT1 sobre os níveis de mRNA dos receptores MrgD ou Mas. De forma interessante, no período de restrição alimentar nós não observamos diferenças significativas nas razões AT1/MrgD e AT1/Mas entre os grupos CT e RAG. Contudo nós observamos uma clara tendência de maiores níveis de mRNA do receptor AT1 sobre os níveis de mRNA dos receptor MrgD e Mas no grupo CT-ra em comparação ao grupo RAG-ra. Este dado mostra que, ainda que os níveis de mRNA dos receptor AT1, MrgD e Mas, no período de realimentação, não apresentem diferenças significativas entre si, a quantidade de mRNA do receptor AT1 é maior que dos receptores Mas e MrgD no grupo CT-ra em comparação ao grupo RAG-ra.

O segundo experimento para avaliar o papel do SRA na RAG foi através da reatividade vascular em mesentéricas e femorais. Apenas ratos RAG apresentaram efeito constritor da Ang II nas artérias mesentéricas. Este dado é corroborado pelo dado de Souza e colaboradores (2018) que mostra que o receptor AT1 está hiper-regulado na mesentérica de ratas Fischer sob RAG. Por sua vez, na artéria femoral, houve pronunciado efeito vasoconstritor em ambos grupos CT e RAG, contudo, não houve diferença significativa entre os grupos. Após o período de realimentação, não foram observadas diferenças entre os grupos RAG-ra e CT-ra tanto nas artérias femorais, quanto nas mesentéricas. Estes dados mostram que o período de 3 meses de realimentação foi capaz de reduzir o aumento de sensibilidade a concentrações

crescentes de Ang II nos ratos submetidos à RAG. Em adição, este dado corrobora com os nossos outros dados que também foram abolidos após o período de realimentação. Outros grupos já mostraram diferentes respostas da Ang II em diferenças leitos vasculares. Leite e colaboradores mostraram que a Ang II apresentou o mesmo efeito vasoconstritor nas artérias mesentéricas na ausência ou presença de endotélio, enquanto que em anéis de aorta, na ausência de endotélio o efeito vasoconstritor da Ang II foi duas vezes maior do que na presença do endotélio (LEITE et al., 1997). Holzer e colaboradores também mostraram, em um estudo *in vivo* com ratos, que a Ang II causou vasoconstrição na artéria mesentérica e vasodilatação na artéria femoral (HEINEMANN; WACHTER; HOLZER, 1998). Satoh e colaboradores descreveram que a Ang II estimula a produção de prostaglandinas na artéria renal por uma via AT1-fosfolipase C, enquanto que na artéria femoral essa via não apresentou participação (SATOH; HOSONO; SATOH, 1984). Juntos estes dados mostram que a os efeitos da Ang II variam de acordo com o leito vascular e a concentração utilizada, o que explica os efeitos diferentes observados entre a mesentérica e a femoral.

De forma interessante, também observamos uma resposta leito-específica quanto a exposição a diferentes concentrações de fenilefrina. Nas mesentéricas, houve significativa diferença entre os grupos RAG e CT, sendo o grupo RAG mais sensível à exposição à fenilefrina. Este padrão de resposta se inverteu na femoral, onde o grupo CT apresentou maior sensibilidade à fenilefrina. Souza e colaboradores mostraram aumento das concentrações plasmáticas de Ang II em ratas submetidas a RAG (DE SOUZA et al., 2018). Já foi descrito que a Ang II endógena pode amplificar o efeito vasoconstritor da fenilefrina em ratos normotensos e hipertensos (QIU; HENRION; LEVY, 1994), conseqüentemente as mesentéricas dos ratos RAG apresentaram maior sensibilidade à fenilefrina, provavelmente pela hiper-regulação do receptor AT1 neste tecido.

O nosso único dado que mostra diferença entre o grupo RAG-ra e o grupo CT-ra foi em relação a sensibilidade à acetilcolina. Contudo, estudos adicionais são necessários para responder o motivo desta diferença, uma vez que todos os outros parâmetros foram recuperados após o período de realimentação.

## 6. CONCLUSÃO GERAL

O presente estudo visou determinar o papel do sistema renina angiotensina (SRA) em dois modelos animais distintos. O primeiro modelo utilizado foram os ratos TGR(mREN2)27 (mREN) que superexpressam o gene Ren2, resultando em um sólido modelo de hipertensão com ativação do eixo clássico do SRA. O segundo modelo utilizado foram ratos Fischer submetidos à restrição alimentar grave (RAG), que também apresentam ativação do eixo clássico do SRA.

Nos ratos mREN, o tratamento com alamandina, que havia apresentado melhoras na função cardíaca e índice de arritmias no grupo normotenso, não apresentou efeitos cardioprotetores, provavelmente devido à hipo-regulação do receptor MrgD no ventrículo esquerdo desses ratos.

Nos ratos RAG, a restrição alimentar levou ao desequilíbrio eletrolítico, aumento da incidência de arritmias de reperfusão, hiper-regulação do receptor AT1 no ventrículo esquerdo e aumento da sensibilidade à resposta constritora da Ang II em artérias mesentéricas.

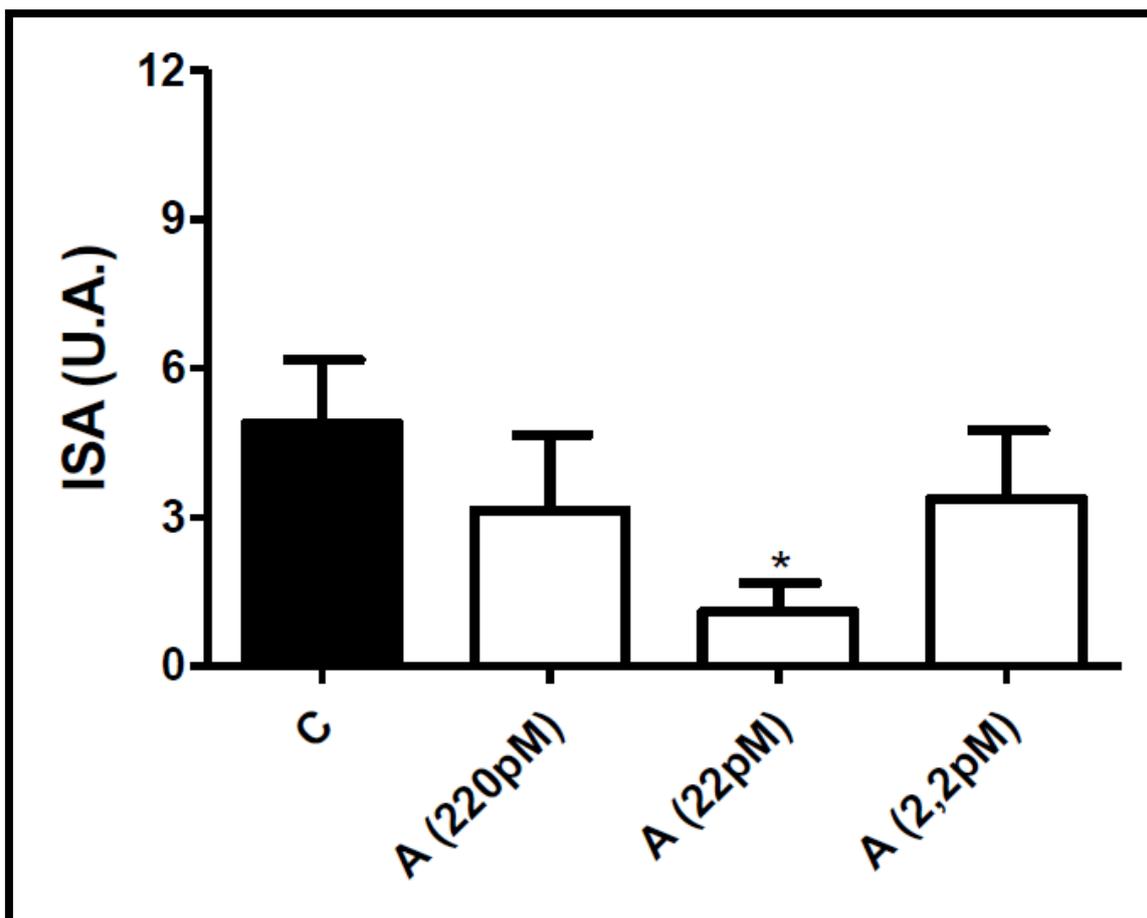
Juntos estes dados mostram que o SRA apresenta um papel fundamental tanto na gênese como no desenvolvimento das patologias cardiovasculares. Ademais, trata-se de um excelente alvo farmacológico, tanto no bloqueio do eixo clássico (ECA/Ang II/AT1), quanto na ativação do eixo não clássico (ECA2/Ang-(1-7)/Mas), ou, até mesmo, na ativação do eixo alatenosinérgico (ECA2/Alamandina/MrgD).

## 7. PERSPECTIVAS

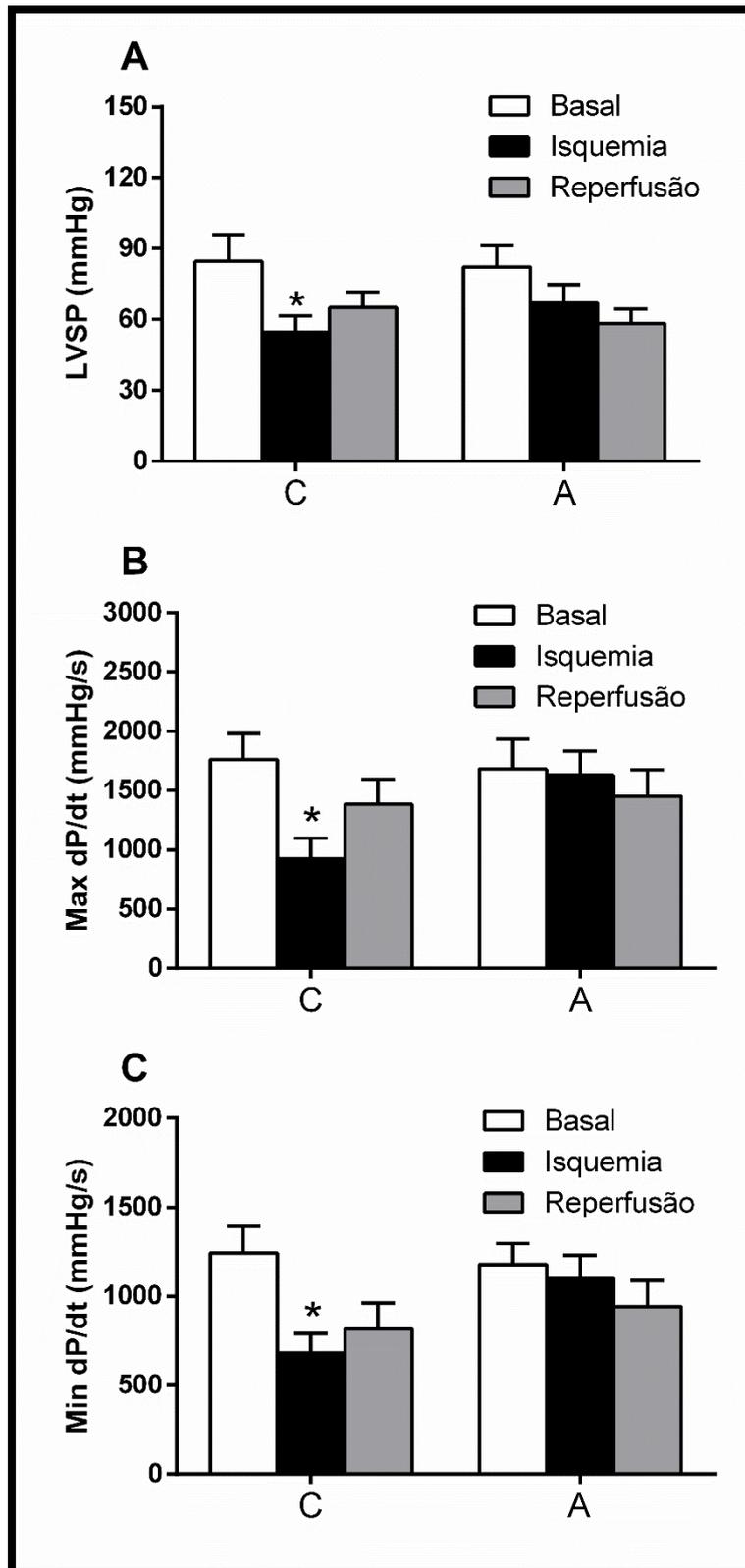
Este trabalho abre algumas perspectivas futuras. Em relação ao capítulo 1, seria interessante responder sob qual via a Alamandina estaria agindo para exercer os efeitos observados nos corações de ratos normotensos. Em adição, seria interessante investigar a razão pela qual o receptor MrgD está hipo-regulado em corações isolados de ratos TGR(mREN2)<sup>27</sup>.

Em relação ao capítulo 2, cabe avaliar se existem diferenças sexuais no modelo de restrição alimentar grave. Já foi mostrado pelo grupo da Dr. Sandberg que o sistema renina angiotensina está ativado no final do período de RAG em ratas Fischer. Entretanto esta avaliação ainda não foi realizada no período de realimentação. Também cabe avaliar nos machos parâmetros que já foram avaliados nas fêmeas para confirmar se a RAG apresenta efeitos dirigidos pelo sexo. Em dados ainda não publicados, nós observamos que a deposição de gordura em tecidos específicos permanece alterada em fêmeas após o período de realimentação, o que não ocorre nos machos. Ademais, as fêmeas não apresentaram aumento na porcentagem de arritmias de reperusão, como observado nos machos. Estes são alguns dos dados que mostram que a avaliação das possíveis diferenças sexuais seria de grande importância.

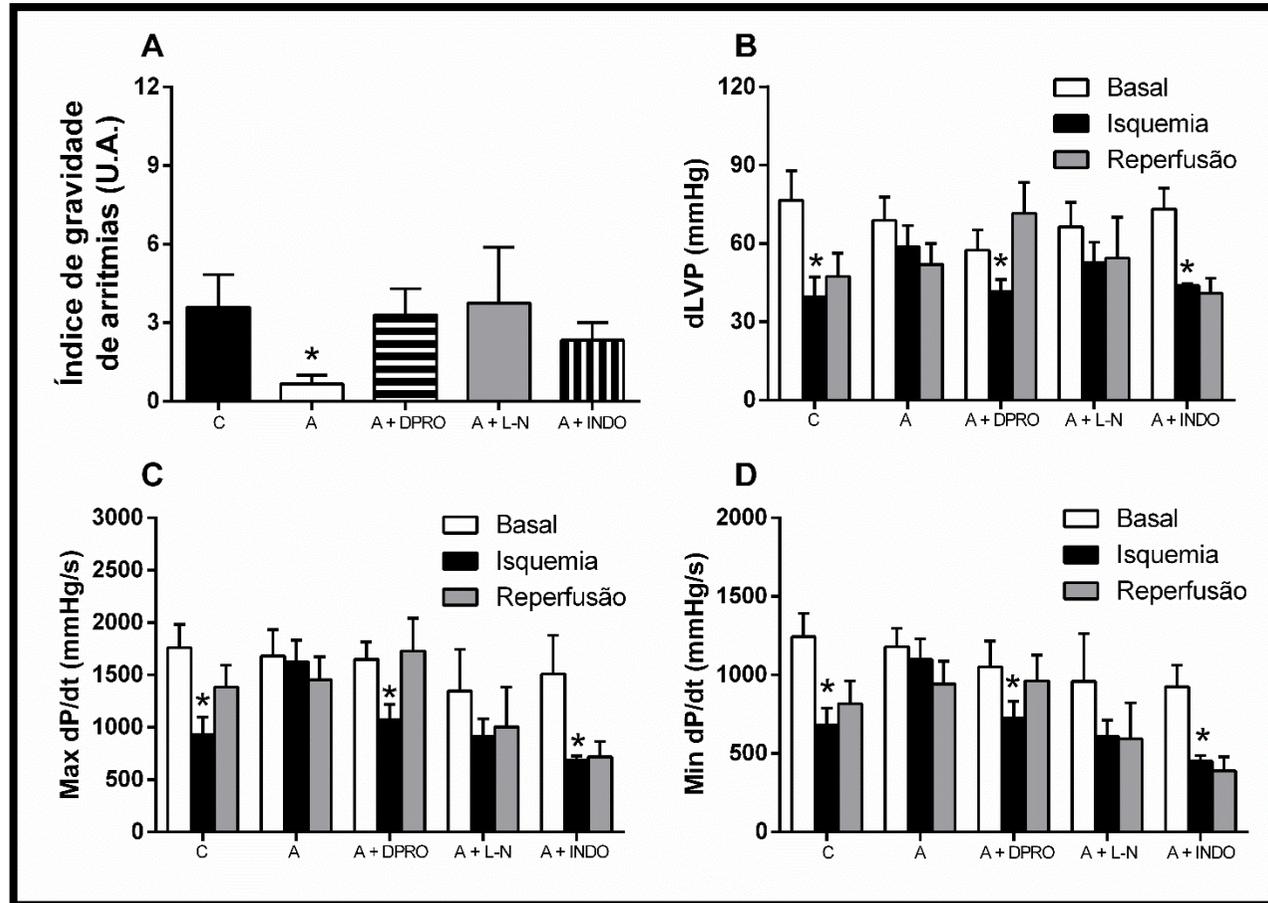
## 8. FIGURAS SUPLEMENTARES



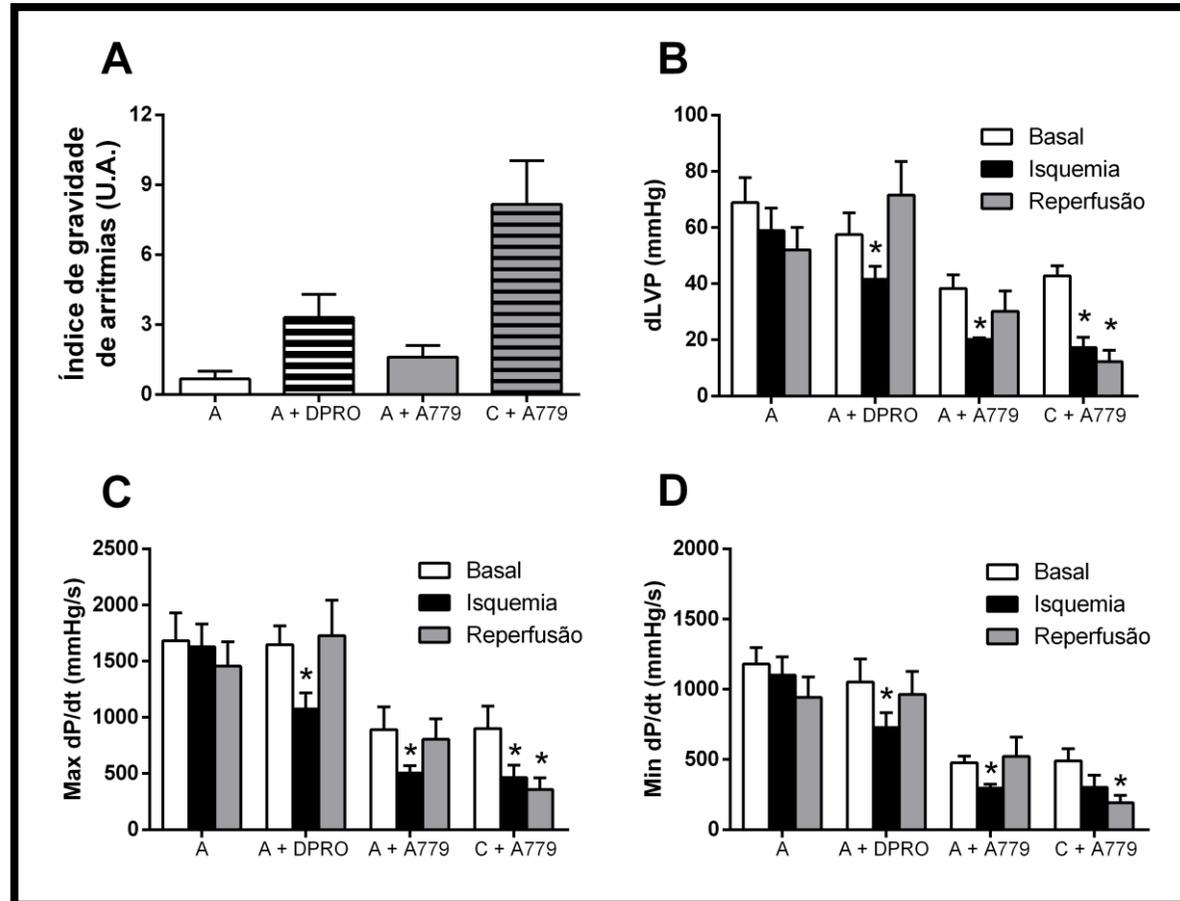
**Figura S1:** Efeitos de diferentes concentrações de alamandina no índice de gravidade de arritmias (ISA). Teste t de Student foi utilizado para comparar diferença entre os grupos no ISA. Os valores são mostrados em média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  vs grupo C. C significa grupo controle; A significa grupo tratado com alamandina.



**Figura S2:** Efeitos da alamandina (20pM) na pressão sistólica do ventrículo esquerdo (LVSP), e dP/dt máxima e mínima. Teste t de Student foi utilizado para comparar diferença entre os grupos nos diferentes períodos do protocolo de isquemia/reperusão. Os valores são mostrados em média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  vs grupo C no período basal. C significa grupo controle; A significa grupo tratado com alamandina.



**Figura S3:** Efeitos da alamandina (20pM), D-Pro<sup>7</sup>-Ang-(1-7) (220pM), L-NAME (30mg/Kg) e Indometacina (5mg/Kg) no índice de gravidade de arritmias, pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (dLVP), e dP/dt máxima e mínima. Teste t de Student foi utilizado para comparar diferenças entre os grupos nos diferentes períodos do protocolo de isquemia/reperusão. Os valores são mostrados em média ± EPM. \* p<0,05 vs respectivo grupo no período basal. C significa grupo controle; A significa grupo tratado com alamandina. D-PRO, significa grupo tratado com D-Pro<sup>7</sup>-Ang-(1-7), L-N significa grupo tratado com L-NAME, INDO significa grupo tratado com Indometacina.



**Figura S4:** Efeitos da alamandina (20pM), D-Pro<sup>7</sup>-Ang-(1-7) (220pM) e A779 (220pM) no índice de gravidade de arritmias, pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (dLVP), e dP/dt máxima e mínima. Teste t de Student foi utilizado para comparar diferenças entre os grupos nos diferentes períodos do protocolo de isquemia/reperusão. Os valores são mostrados em média ± EPM. \* p<0,05 vs respectivo grupo no período basal. C significa grupo controle; A significa grupo tratado com alamandina. D-PRO, significa grupo tratado com D-Pro<sup>7</sup>-Ang-(1-7), A779 significa grupo tratado com A779.

## 9. LIMITAÇÕES

Mesmo com grande empenho das partes envolvidas, todo trabalho apresenta limitações. A principal limitação deste trabalho ocorreu durante o período de intercâmbio no Centro de diferenças Sexuais, Georgetown University, Washington D.C, EUA. O objetivo principal do período de intercâmbio era a avaliação, à nível celular, de regiões codificantes dos receptores angiotensinérgicos em cardiomiócitos, o que acrescentaria grande contribuição ao trabalho principal que estava sendo realizado no laboratório de Hipertensão. Entretanto, ao adentrar no laboratório da professora Sandberg, não foi possível seguir com o objetivo citado acima. Dessa forma, obtive a oportunidade de participar de um outro projeto já estava sendo desenvolvido e que, mesmo com sua grande divergência com projeto principal, apresentava duas similaridades com o meu foco de estudo: o SRA e a lesão de I/R.

Devido à mudança de projeto, e as consequências temporais que essa mudança acarretou, não foi possível aferir a pressão arterial média, os níveis plasmáticos dos peptídeos do SRA e a regulação transcricional das enzimas ECA e ECA2 no ventrículo esquerdo de ratos machos Fischer. O próprio uso da linhagem Fischer foi outra limitação, pois divergiu da linhagem utilizada no projeto principal.

## 10. Referências Bibliográficas

- ABETE, P. et al. Preconditioning does not prevent postischemic dysfunction in aging heart. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 27, n. 7, p. 1777–86, jun. 1996.
- ALMEIDA, A. P. et al. Angiotensin-(1-7) potentiates the coronary vasodilatory effect of bradykinin in the isolated rat heart. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 6, p. 709–713, 2000.
- AMBÜHL, P.; FELIX, D.; KHOSLA, M. C. [7-D-ALA]-angiotensin-(1–7): Selective antagonism of angiotensin-(1–7) in the rat paraventricular nucleus. **Brain Research Bulletin**, v. 35, n. 4, p. 289–291, 1 jan. 1994.
- ANAND, S. S. et al. Risk factors for myocardial infarction in women and men: insights from the INTERHEART study. **European Heart Journal**, v. 29, n. 7, p. 932–940, abr. 2008.
- ANDERSON, J. L.; MORROW, D. A. Acute Myocardial Infarction. **New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 21, p. 2053–2064, 25 maio 2017.
- ANTON, S.; LEEUWENBURGH, C. Fasting or caloric restriction for healthy aging. **Experimental gerontology**, v. 48, n. 10, p. 1003–5, out. 2013.
- BACHMANN, S. et al. Transgenic rats carrying the mouse renin gene--morphological characterization of a low-renin hypertension model. **Kidney Int**, v. 41, n. 1, p. 24–36, 1992.
- BADER, M. et al. Role of tissue renin in the pathophysiology of hypertension in TGR(mREN2)27 rats. **Hypertension**, v. 19, n. 6 Pt 2, p. 681–686, 1992.
- BADER, M.; GANTEN, D. Update on tissue renin-angiotensin systems. **Journal of Molecular Medicine**, v. 86, n. 6, p. 615–621, 2008.
- BANKIR, L. et al. Relationship between Sodium Intake and Water Intake: The False and the True. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 70, n. 1, p. 51–61, 2017.
- BARAJAS GALINDO, D. E. et al. Appetite disorders in cancer patients: Impact on nutritional status and quality of life. **Appetite**, v. 114, p. 23–27, 1 jul. 2017.
- BARNES, J. M. et al. Identification and characterisation of angiotensin II receptor subtypes in human brain. **European Journal of Pharmacology**, v. 230, n. 3, p. 251–258, 1993.
- BENIGNI, A.; CASSIS, P.; REMUZZI, G. Angiotensin II revisited: new roles in inflammation, immunology and aging. **EMBO molecular medicine**, v. 2, n. 7, p. 247–57, jul. 2010.
- BERNSTEIN, K. E. et al. Different in vivo functions of the two catalytic domains of angiotensin converting enzyme (ACE). **Curr Opin Pharmacol**, v. 11, n. 2, p. 105–111, 2011.
- BERTHIAUME, J. M. et al. Normalizing the metabolic phenotype after myocardial infarction: impact of subchronic high fat feeding. **J Mol Cell Cardiol**, v. 53, n. 1, p. 125–133, 2012.
- BISHOP, J. E. et al. Raised blood pressure, not renin-angiotensin systems, causes cardiac fibrosis in TGR m(Ren2)27 rats. **Cardiovascular research**, v. 47, n. 1, p. 57–67, jul. 2000.
- BLOCK, C. H. et al. Immunocytochemical localization of angiotensin-(1–7)

in the rat forebrain. **Peptides**, v. 9, n. 6, p. 1395–1401, 1 nov. 1988.

- BRIDGES, L. E. et al. Mesenteric Artery Contraction and Relaxation Studies Using Automated Wire Myography. **J. Vis. Exp**, n. 55, p. 3119, 2011.
- BUCKLEY, U.; SHIVKUMAR, K. Stress-induced cardiac arrhythmias: The heart-brain interaction. **Trends in cardiovascular medicine**, v. 26, n. 1, p. 78–80, jan. 2016.
- CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. et al. Cardiovascular effects of angiotensin-(1-7) injected into the dorsal medulla of rats. **American Journal of Physiology**, v. 257, n. 1 Pt 2, p. H324-9, 1989.
- CAMPBELL, D. J. et al. Differential regulation of angiotensin peptide levels in plasma and kidney of the rat. **Hypertension**, v. 18, n. 6, p. 763–773, 1991.
- CAREY, R. M.; SIRAGY, H. M. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. **Endocrinology Reviews**, v. 24, n. 3, p. 261–271, 2003.
- CARR, K. D. et al. Neuroanatomical patterns of Fos-like immunoreactivity induced by naltrexone in food-restricted and ad libitum fed rats. **Brain Research**, v. 779, n. 1–2, p. 26–32, jan. 1998.
- CASTRO-CHAVES, P. et al. Acute modulation of myocardial function by angiotensin 1-7. **Peptides**, v. 30, n. 9, p. 1714–1719, 2009.
- CASTRO, C. H. et al. Effects of genetic deletion of angiotensin-(1-7) receptor Mas on cardiac function during ischemia/reperfusion in the isolated perfused mouse heart. **Life Science**, v. 80, n. 3, p. 264–268, 2006.
- CHAPPELL, M. C. et al. Identification of angiotensin-(1-7) in rat brain. Evidence for differential processing of angiotensin peptides. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 28, p. 16518–16523, 1989.
- CHAPPELL, M. C. et al. Metabolism of Angiotensin-(1–7) by Angiotensin-Converting Enzyme. **Hypertension**, v. 31, n. 1, p. 362–367, 1 jan. 1998.
- CHEN, Y. et al. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and risk of myocardial infarction in an updated meta-analysis based on 34993 participants. **Gene**, v. 522, n. 2, p. 196–205, 2013.
- CHOUABE, C. et al. Evaluation of remodeling in left and right ventricular myocytes from heterozygous (mRen2)27 transgenic rats. **General physiology and biophysics**, v. 28, n. 1, p. 24–38, mar. 2009.
- COLMAN, R. J. et al. Caloric Restriction Delays Disease Onset and Mortality in Rhesus Monkeys. **Science**, v. 325, n. 5937, p. 201–204, 10 jul. 2009.
- COUTINHO, D. C. et al. Cardiovascular effects of angiotensin A: A novel peptide of the renin–angiotensin system. **Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, v. 15, n. 4, p. 480–486, 5 dez. 2014.
- DARGIE, H. J.; BYRNE, J. Pathophysiological aspects of the renin-angiotensin-aldosterone system in acute myocardial infarction. **Journal of cardiovascular risk**, v. 2, n. 5, p. 389–95, out. 1995.
- DE CASTRO, J. M. The relationship of spontaneous macronutrient and sodium intake with fluid ingestion and thirst in humans. **Physiology & behavior**, v. 49, n. 3, p. 513–9, mar. 1991.
- DE MELLO, W. C. Angiotensin (1-7) re-establishes impulse conduction in cardiac muscle during ischaemia-reperfusion. The role of the sodium pump. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst**, v. 5, n. 4, p. 203–208, 2004.
- DE MELLO, W. C. Spironolactone enhances the beneficial effect of aliskiren on cardiac structural and electrical remodeling in TGR(mRen2)27 rats.

**J Renin Angiotensin Aldosterone Syst**, v. 16, n. 3, p. 488–494, 2015.

- DE SOUZA-NETO, F. P. et al. Angiotensin-(1–7) and Alamandine on Experimental Models of Hypertension and Atherosclerosis. **Current Hypertension Reports**, v. 20, n. 2, p. 17, 14 fev. 2018.
- DE SOUZA, A. A. et al. Increased  $\alpha$ 1-adrenoreceptor activity is required to sustain blood pressure in female rats under food restriction. **Life Sciences**, v. 128, p. 55–63, 1 maio 2015.
- DE SOUZA, A. M. A. et al. Role of the Renin Angiotensin System in Blood Pressure Allostasis-induced by Severe Food Restriction in Female Fischer rats. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 10327, 9 jul. 2018.
- DEDDISH, P. A. et al. N-domain-specific substrate and C-domain inhibitors of angiotensin-converting enzyme: angiotensin-(1-7) and keto-ACE. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 31, n. 4, p. 912–7, abr. 1998.
- DEMARCO, V. G. et al. Comparative analysis of telmisartan and olmesartan on cardiac function in the transgenic (mRen2)27 rat. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 300, n. 1, p. H181-90, 2011.
- DIVASTA, A. D. et al. Malnutrition and hemodynamic status in adolescents hospitalized for anorexia nervosa. **Archives of pediatrics & adolescent medicine**, v. 164, n. 8, p. 706–13, 1 ago. 2010.
- DIZ, D. I. et al. Angiotensin-(1-7) and Baroreflex Function in Nucleus Tractus Solitarii of (mRen2)27 Transgenic Rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 51, n. 6, p. 542–548, jun. 2008.
- DONG, X. et al. A diverse family of GPCRs expressed in specific subsets of nociceptive sensory neurons. **Cell**, v. 106, n. 5, p. 619–32, 7 set. 2001.
- DONOGHUE, M. et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. **Circ Res**, v. 87, n. 5, p. E1-9, 2000.
- DROTT, C.; LUNDHOLM, K. Cardiac effects of caloric restriction-mechanisms and potential hazards. **International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 16, n. 7, p. 481–6, jul. 1992.
- DZAU, V. J. Molecular and physiological aspects of tissue renin-angiotensin system: emphasis on cardiovascular control. **Journal of Hypertension**, v. 6, n. 3, p. S7-12, 1988.
- ELLIOTT, A. C. et al. Metabolic changes during ischaemia and their role in contractile failure in isolated ferret hearts. **J Physiol**, v. 454, p. 467–490, 1992.
- ENGLER, S.; PAUL, M.; PINTO, Y. M. The TGR(mRen2)27 transgenic rat model of hypertension. **Regulatory peptides**, v. 77, n. 1–3, p. 3–8, 16 out. 1998a.
- ENGLER, S.; PAUL, M.; PINTO, Y. M. The TGR(mRen2)27 transgenic rat model of hypertension. **Regulatory peptides**, v. 77, n. 1–3, p. 3–8, 16 out. 1998b.
- ERDOS, E. G.; YANG, H. Y. An enzyme in microsomal fraction of kidney that inactivates bradykinin. **Life Sciences**, v. 6, n. 6, p. 569–574, 1967.
- FABBIANO, S. et al. Caloric Restriction Leads to Browning of White Adipose Tissue through Type 2 Immune Signaling. **Cell Metabolism**, v. 24, n. 3, p. 434–446, 13 set. 2016.
- FASCIOLO, J. C.; HOUSSAY, B. A.; TAQUINI, A. C. The blood-pressure raising secretion of the ischaemic kidney. **The Journal of Physiology**, v. 94, n.

3, p. 281–293, 14 dez. 1938.

- FERREIRA, A. J.; SANTOS, R. A.; ALMEIDA, A. P. Angiotensin-(1-7): cardioprotective effect in myocardial ischemia/reperfusion. **Hypertension**, v. 38, n. 3 Pt 2, p. 665–668, 2001.
- FERREIRA, A. J.; SANTOS, R. A.; ALMEIDA, A. P. Angiotensin-(1-7) improves the post-ischemic function in isolated perfused rat hearts. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 9, p. 1083–1090, 2002.
- FERREIRA, S. H.; ROCHA E SILVA, M. Potentiation of bradykinin and eledoisin by BPF (bradykinin potentiating factor) from Bothrops jararaca venom. **Experientia**, v. 21, n. 6, p. 347–349, jun. 1965.
- FONTES, M. A. P. et al. Evidence that angiotensin-(1–7) plays a role in the central control of blood pressure at the ventro-lateral medulla acting through specific receptors. **Brain Research**, v. 665, n. 1, p. 175–180, 28 nov. 1994.
- FORD, W. R. et al. Angiotensin II reduces infarct size and has no effect on post-ischaemic contractile dysfunction in isolated rat hearts. **British Journal of Pharmacology**, v. 134, n. 1, p. 38–45, 2001.
- FOUNTAIN, J. H.; LAPPIN, S. L. **Physiology, Renin Angiotensin System**. [s.l.] StatPearls Publishing, 2019.
- FRANGOIANNIS, N. G. Pathophysiology of Myocardial Infarction. **Compr Physiol**, v. 5, n. 4, p. 1841–1875, 2015.
- FRENAY, A.-R. S. et al. Renal effects of long-term darbepoetin alpha treatment in hypertensive TGR(mRen2)27 rats. **Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, v. 13, n. 2, p. 232–238, 26 jun. 2012.
- GEMBARDT, F. et al. Angiotensin metabolites can stimulate receptors of the Mas-related genes family. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 319, n. 1–2, p. 115–23, 18 dez. 2008.
- GHIANI, B. U.; MASINI, M. A. Angiotensin II binding sites in the rat pancreas and their modulation after sodium loading and depletion. **Comparative biochemistry and physiology. Part A, Physiology**, v. 111, n. 3, p. 439–44, jul. 1995.
- GOLDBLATT, H. et al. STUDIES ON EXPERIMENTAL HYPERTENSION: I. THE PRODUCTION OF PERSISTENT ELEVATION OF SYSTOLIC BLOOD PRESSURE BY MEANS OF RENAL ISCHEMIA. **J Exp Med**, v. 59, n. 3, p. 347–379, 1934.
- GRINSTEAD, W. C.; YOUNG, J. B. The myocardial renin-angiotensin system: existence, importance, and clinical implications. **Am Heart J**, v. 123, n. 4 Pt 1, p. 1039–1045, 1992.
- GYÖNGYÖSI, M. et al. Meta-Analysis of Cell Therapy Studies in Heart Failure and Acute Myocardial Infarction. **Circulation Research**, v. 123, n. 2, p. 301–308, 2018.
- HABİYAKARE, B. et al. Reduction of angiotensin A and alamandine vasoactivity in the rabbit model of atherogenesis: differential effects of alamandine and Ang(1-7). **International Journal of Experimental Pathology**, v. 95, n. 4, p. 290–295, 2014.
- HEERKENS, E. H. J. et al.  $\beta$  Integrins Mediate FAK Y397 Autophosphorylation of Resistance Arteries during Eutrophic Inward Remodeling in Hypertension. **Journal of Vascular Research**, v. 51, n. 4, p. 305–314, 2014.
- HEINEMANN, A.; WACHTER, C. H.; HOLZER, P. Differential regulation of mesenteric and femoral blood flow in the rat as revealed by computerized data

acquisition and evaluation. **Journal of Autonomic Pharmacology**, v. 18, n. 1, p. 39–48, 1 fev. 1998.

- HEUSCH, G. Myocardial Ischemia: Lack of Coronary Blood Flow or Myocardial Oxygen Supply/Demand Imbalance? **Circulation Research**, v. 119, n. 2, p. 194–196, 8 jul. 2016.
- HILDERMAN, T. et al. Effects of long-term dietary restriction on cardiovascular function and plasma catecholamines in the rat. **Cardiovascular drugs and therapy**, v. 10 Suppl 1, p. 247–50, jun. 1996.
- HOLBROOK, J. T. et al. Sodium and potassium intake and balance in adults consuming self-selected diets. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 40, n. 4, p. 786–793, 1 out. 1984.
- HOLLEMANS, H. J. G.; VAN DER MEER, J.; TOUBER, J. L. Radioimmunoassay of Angiotensin. **Nature**, v. 217, n. 5125, p. 277–278, jan. 1968.
- HORN, M. et al. Preservation of left ventricular mechanical function and energy metabolism in rats after myocardial infarction by the angiotensin-converting enzyme inhibitor quinapril. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 27, n. 2, p. 201–210, 1996.
- IWAI, N. et al. Renin is expressed in rat macrophage/monocyte cells. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 27, n. 3 Pt 1, p. 399–403, mar. 1996.
- JANKOWSKI, V. et al. Mass-spectrometric identification of a novel angiotensin peptide in human plasma. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 27, n. 2, p. 297–302, 2007.
- JESUS, I. C. G. DE et al. Alamandine acts via MrgD to induce AMPK/NO activation against ANG II hypertrophy in cardiomyocytes. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 314, n. 6, p. C702–C711, 1 jun. 2018.
- JOHNSON, B.; FRANCIS, J. Stress and cardiac arrhythmias. **Indian pacing and electrophysiology journal**, v. 14, n. 5, p. 230–2, set. 2014.
- JOHNSON, M. S. et al. Sex differences in baroreflex sensitivity, heart rate variability, and end organ damage in the TGR(mRen2)27 rat. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 301, n. 4, p. H1540-50, 2011.
- JUGDUTT, B. I. Apoptosis after reperfused myocardial infarction: Role of angiotensin II. In: **Exp Clin Cardiol**. [s.l: s.n.]. v. 9p. 219–228.
- KAEBERLEIN, M. Lessons on longevity from budding yeast. **Nature**, v. 464, n. 7288, p. 513–519, 24 mar. 2010.
- KANGUSSU, L. M. et al. Activation of angiotensin-(1–7)/Mas axis in the brain lowers blood pressure and attenuates cardiac remodeling in hypertensive transgenic (mRen2)27 rats. **Neuropharmacology**, v. 97, p. 58–66, out. 2015.
- KAPAHI, P.; KAEBERLEIN, M.; HANSEN, M. Dietary restriction and lifespan: Lessons from invertebrate models. **Ageing Research Reviews**, v. 39, p. 3–14, out. 2017.
- KAPRIELIAN, R. R. et al. Angiotensin II Receptor Type 1 mRNA is Upregulated in Atria of Patients with End-stage Heart Failure. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 29, n. 8, p. 2299–2304, 1 ago. 1997.
- KARLSSON, C. et al. Human adipose tissue expresses angiotensinogen and enzymes required for its conversion to angiotensin II. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 83, n. 11, p. 3925–9, nov. 1998.
- KENTISH, J. C. The effects of inorganic phosphate and creatine

phosphate on force production in skinned muscles from rat ventricle. **J Physiol**, v. 370, p. 585–604, 1986.

- KOBORI, H. et al. AT1 Receptor Mediated Augmentation of Intrarenal Angiotensinogen in Angiotensin II-Dependent Hypertension. **Hypertension**, v. 43, n. 5, p. 1126–1132, 1 maio 2004.
- LAMBERT, C.; MASSILLON, Y.; MELOCHE, S. Upregulation of cardiac angiotensin II AT1 receptors in congenital cardiomyopathic hamsters. **Circulation research**, v. 77, n. 5, p. 1001–7, nov. 1995.
- LANGHEINRICH, M. et al. The hypertensive Ren-2 transgenic rat TGR (mREN2)27 in hypertension research. Characteristics and functional aspects. **Am J Hypertens**, v. 9, n. 5, p. 506–512, 1996.
- LAUTNER, R. Q. et al. Discovery and characterization of alamandine: a novel component of the renin-angiotensin system. **Circulation Research**, v. 112, n. 8, p. 1104–1111, 2013.
- LEFROY, D. C. et al. Regional changes in angiotensin II receptor density after experimental myocardial infarction. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 28, n. 2, p. 429–440, 1996.
- LEITE, R. et al. Role of endothelium in angiotensin II formation by the rat aorta and mesenteric arterial bed. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, n. 5, p. 649–656, maio 1997.
- LERMAN, L. O. et al. Animal models of hypertension: an overview. **J Lab Clin Med**, v. 146, n. 3, p. 160–173, 2005.
- LESNEFSKY, E. J. et al. Aging increases ischemia-reperfusion injury in the isolated, buffer-perfused heart. **The Journal of laboratory and clinical medicine**, v. 124, n. 6, p. 843–51, dez. 1994.
- LEV-RAN, A.; PORTA, M. Salt and hypertension: a phylogenetic perspective. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 21, n. 2, p. 118–131, mar. 2005.
- LIAO, X. et al. Cyclooxygenase mediates cardioprotection of angiotensin-(1-7) against ischemia/reperfusion-induced injury through the inhibition of oxidative stress. **Mol Med Rep**, v. 4, n. 6, p. 1145–1150, 2011.
- LIN, S.; GOODFRIEND, T. Angiotensin receptors. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, v. 218, n. 5, p. 1319–1328, maio 1970.
- LINDSEY, M. L. et al. Guidelines for experimental models of myocardial ischemia and infarction. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 314, n. 4, p. H812–H838, 1 abr. 2018.
- LIU, C. et al. Alamandine attenuates hypertension and cardiac hypertrophy in hypertensive rats. **Amino Acids**, v. 50, n. 8, p. 1071–1081, 12 ago. 2018.
- LOFT, S. et al. Energy restriction and oxidative DNA damage in humans. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 4, n. 5, p. 515–9, 1995.
- LOOT, A. E. et al. Angiotensin-(1-7) attenuates the development of heart failure after myocardial infarction in rats. **Circulation**, v. 105, n. 13, p. 1548–1550, 2002.
- MA, H.; TAN, Z.; WU, J. Regulation of angiotensin-converting enzyme 2 and Mas receptor by Ang-(1-7) in heart and kidney of spontaneously hypertensive rats. **Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, v. 12, n. 4, p. 413–419, 2011.

- MANN, S. et al. Effects of acute angiotensin II on ischemia reperfusion injury following myocardial infarction. **Journal of Renin Angiotensin Aldosterone System**, 2014.
- MARIAN, A. J. Hypertrophic cardiomyopathy: from genetics to treatment. **European journal of clinical investigation**, v. 40, n. 4, p. 360–9, abr. 2010.
- MARINKOVIĆ, P. et al. Behavioral and biochemical effects of various food-restriction regimens in the rats. **Physiology & behavior**, v. 92, n. 3, p. 492–9, 22 out. 2007.
- MCCAY, C. M.; CROWELL, M. F.; MAYNARD, L. A. The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. 1935. **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)**, v. 5, n. 3, p. 155–71; discussion 172, 1935.
- MCDONALD, R. B.; RAMSEY, J. J. Honoring Clive McCay and 75 years of calorie restriction research. **The Journal of nutrition**, v. 140, n. 7, p. 1205–10, 1 jul. 2010.
- MCKINLEY, M. J. et al. Osmoregulatory fluid intake but not hypovolemic thirst is intact in mice lacking angiotensin. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 294, n. 5, p. R1533–R1543, maio 2008.
- MILASTA, S. et al. Interactions between the Mas-related receptors MrgD and MrgE alter signalling and trafficking of MrgD. **Molecular pharmacology**, v. 69, n. 2, p. 479–91, 17 fev. 2006.
- MIURA, S.; KARNIK, S. S.; SAKU, K. Review: angiotensin II type 1 receptor blockers: class effects versus molecular effects. **Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS**, v. 12, n. 1, p. 1–7, mar. 2011.
- MOULIK, S. et al. Angiotensin II receptor subtype distribution in the rabbit brain. **Experimental Brain Research**, v. 142, n. 2, p. 275–283, 1 jan. 2002.
- MUFTI, S. et al. Angiotensin II-dependent loss of cardiac function: mechanisms and pharmacological targets attenuating this effect. **Journal of Cellular Physiology**, v. 217, n. 1, p. 242–249, 2008.
- MULLINS, J. J.; PETERS, J.; GANTEN, D. Fulminant hypertension in transgenic rats harbouring the mouse Ren-2 gene. **Nature**, v. 344, n. 6266, p. 541–544, 1990.
- NARULA, N. et al. My Parents Died of Myocardial Infarction: Is that My Destiny? **Med Clin N Am**, v. 96, p. 67–86, 2012.
- NEVES, L. A. et al. Effect of angiotensin-(1-7) on reperfusion arrhythmias in isolated rat hearts. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, n. 6, p. 801–809, 1997.
- NICKENIG, G. et al. **Down-regulation of aortic and cardiac AT 1 receptor gene expression in transgenic (mRen-2) 27 rats.** [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1564644/pdf/121-0701088a.pdf>>. Acesso em: 20 jun. 2019.
- NUNES, A. D. C. et al. Influence of antihypertensive drugs on aortic and coronary effects of Ang-(1-7) in pressure-overloaded rats. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 50, n. 4, p. e5520, 23 mar. 2017.
- OKAMOTO, K.; AOKI, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Jpn Circ J**, v. 27, p. 282–293, 1963.

- OKOSHI, K. et al. Food restriction induces in vivo ventricular dysfunction in spontaneously hypertensive rats without impairment of in vitro myocardial contractility. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 4, p. 607–613, abr. 2004.
- PACHAURI, P. et al. Angiotensin (1-7) facilitates cardioprotection of ischemic preconditioning on ischemia-reperfusion-challenged rat heart. **Mol Cell Biochem**, v. 430, n. 1–2, p. 99–113, 2017.
- PAGE, I. H.; HELMER, O. M. A CRYSTALLINE PRESSOR SUBSTANCE (ANGIOTONIN) RESULTING FROM THE REACTION BETWEEN RENIN AND RENIN-ACTIVATOR. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 71, n. 1, p. 29–42, 1940.
- PANT, S. et al. Inflammation and Atherosclerosis—Revisited. **Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics**, v. 19, n. 2, p. 170–178, 31 mar. 2014.
- PARK, B. M. et al. Alamandine Protects the Heart Against Reperfusion Injury via the MrgD Receptor. **Circulation Journal**, 12 jul. 2018.
- PARTRIDGE, L.; PIPER, M. D. W.; MAIR, W. Dietary restriction in Drosophila. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 126, n. 9, p. 938–950, set. 2005.
- PATEL, V. B. et al. Role of the ACE2/Angiotensin 1–7 Axis of the Renin–Angiotensin System in Heart Failure. **Circulation Research**, v. 118, n. 8, p. 1313–1326, 15 abr. 2016.
- PAUL, M.; POYAN MEHR, A.; KREUTZ, R. Physiology of Local Renin-Angiotensin Systems. **Physiological Reviews**, v. 86, n. 3, p. 747–803, jul. 2006.
- PHILLIPS, M. I. et al. Evidence for an endogenous brain renin-angiotensin system. **Federation Proceedings**, v. 38, n. 9, p. 2260–2266, 1979.
- PINOTTI, M. F. et al. A comparative study of myocardial function and morphology during fasting/refeeding and food restriction in rats. **Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology**, v. 19, n. 5, p. e175-82, set. 2010.
- PINTO, Y. M. et al. Cardiovascular end-organ damage in Ren-2 transgenic rats compared to spontaneously hypertensive rats. **Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)**, v. 75, n. 5, p. 371–7, maio 1997.
- PINTO, Y. M. et al. Reduction in left ventricular messenger RNA for transforming growth factor beta(1) attenuates left ventricular fibrosis and improves survival without lowering blood pressure in the hypertensive TGR(mRen2)27 Rat. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 36, n. 5, p. 747–54, nov. 2000.
- QARADAKHI, T. et al. Alamandine reverses hyperhomocysteinemia-induced vascular dysfunction via PKA-dependent mechanisms. **Cardiovascular Therapeutics**, v. 35, n. 6, p. e12306, dez. 2017.
- QARADAKHI, T.; APOSTOLOPOULOS, V.; ZULLI, A. Angiotensin (1-7) and Alamandine: Similarities and differences. **Pharmacol Res**, v. 111, p. 820–826, 2016.
- QIU, H. Y.; HENRION, D.; LEVY, B. I. **Endogenous Angiotensin II Enhances Phenylephrine-Induced Tone in Hypertensive Rats.** [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://ahajournals.org>>. Acesso em: 6 jul. 2019.
- RAHIMI, K.; EMDIN, C. A.; MACMAHON, S. The epidemiology of blood pressure and its worldwide management. **Circ Res**, v. 116, n. 6, p. 925–936,

2015.

- RIBARIČ, S. Diet and Aging. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2012, p. 1–20, 2012.
- RICE, G. I. et al. Evaluation of angiotensin-converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism. **Biochemical Journal**, v. 383, n. Pt 1, p. 45–51, 2004.
- ROKSNOER, L. C. W. et al. Neprilysin inhibition and endothelin-1 elevation: Focus on the kidney. **European Journal of Pharmacology**, v. 824, p. 128–132, 5 abr. 2018.
- ROSSIER, B. C.; BOCHUD, M.; DEVUYST, O. The Hypertension Pandemic: An Evolutionary Perspective. **Physiology (Bethesda)**, v. 32, n. 2, p. 112–125, 2017.
- ROTH, G. A. et al. Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 70, n. 1, p. 1–25, 4 jul. 2017.
- ROTHERMUND, L. et al. Effects of angiotensin II subtype 1 receptor blockade on cardiac fibrosis and sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> handling in hypertensive transgenic rats overexpressing the Ren2 gene. **Journal of hypertension**, v. 19, n. 8, p. 1465–72, ago. 2001.
- ROUS, P. THE INFLUENCE OF DIET ON TRANSPLANTED AND SPONTANEOUS MOUSE TUMORS. **Journal of Experimental Medicine**, v. 20, n. 5, p. 433–451, 1 nov. 1914.
- RUIZ-ORTEGA, M. et al. Role of the renin-angiotensin system in vascular diseases: expanding the field. **Hypertension**, v. 38, n. 6, p. 1382–1387, 2001.
- RUSH, J. W.; AULTMAN, C. D. Vascular biology of angiotensin and the impact of physical activity. **Applied Physiology Nutrition and Metabolism**, v. 33, n. 1, p. 162–172, 2008.
- SAMPAIO, W. O. et al. Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. **Hypertension**, v. 49, n. 1, p. 185–192, 2007.
- SANTIAGO, H. A. R. DE et al. Allometric relationships among body mass, MUZZLE-tail length, and tibia length during the growth of Wistar rats<sup>1</sup>. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 30, n. 11, p. 743–748, nov. 2015.
- SANTOS, R. A. et al. Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brainstem. **Hypertension**, v. 11, n. 2 Pt 2, p. 1153-7, 1988.
- SANTOS, R. A. et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**, v. 100, n. 14, p. 8258–8263, 2003.
- SANTOS, R. A. et al. Expression of an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein produces cardioprotective effects in rats. **Physiol Genomics**, v. 17, n. 3, p. 292–299, 2004.
- SANTOS, R. A.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. Central and peripheral actions of angiotensin-(1-7). **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 27, n. 4, p. 1033–47, abr. 1994.
- SANTOS, R. A. S. et al. The ACE2/Angiotensin-(1–7)/MAS Axis of the Renin-Angiotensin System: Focus on Angiotensin-(1–7). **Physiological Reviews**, v. 98, n. 1, p. 505–553, 1 jan. 2018.
- SATOH, H.; HOSONO, M.; SATOH, S. Distinctive effect of angiotensin II

on prostaglandin production in dog renal and femoral arteries. **Prostaglandins**, v. 27, n. 6, p. 807–820, 1 jun. 1984.

- SCHELLINGS, M. W. M. et al. Imatinib Attenuates End-Organ Damage in Hypertensive Homozygous TGR(mRen2)27 Rats. 2006.
- SCHEUER, D. A.; PERRONE, M. H. Angiotensin type 2 receptors mediate depressor phase of biphasic pressure response to angiotensin. **American Journal of Physiology**, v. 264, n. 5 Pt 2, p. R917-23, 1993.
- SCHIAVONE, M. T. et al. Release of vasopressin from the rat hypothalamo-neurohypophysial system by angiotensin-(1-7) heptapeptide. **Proceedings of National Academy of Science of the USA**, v. 85, n. 11, p. 4095–4098, 1988.
- SCHLANGER, L. E.; BAILEY, J. L.; SANDS, J. M. Electrolytes in the aging. **Advances in chronic kidney disease**, v. 17, n. 4, p. 308–19, jul. 2010.
- SELYE, H. Production of Nephrosclerosis by Overdosage with Desoxycorticosterone Acetate. **Can Med Assoc J**, v. 47, n. 6, p. 515–519, 1942.
- SENGUPTA, P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. **International journal of preventive medicine**, v. 4, n. 6, p. 624–30, jun. 2013.
- SERNERI, G. G. et al. Cardiac angiotensin II formation in the clinical course of heart failure and its relationship with left ventricular function. **Circulation Research**, v. 88, n. 9, p. 961–968, 2001.
- SHAMIR, M. et al. Characteristic rates and timescales in cell biology. **Cell**, v. 164, p. 1302- 1302.e1, 2016.
- SHINOHARA, T. et al. Identification of a G protein-coupled receptor specifically responsive to beta-alanine. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 22, p. 23559–64, 28 maio 2004.
- SKEGGS, L. T.; KAHN, J. R.; SHUMWAY, N. P. The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 103, n. 3, p. 295–299, 1956.
- SLEIGHT, P. Angiotensin II and trials of cardiovascular outcomes. **American Journal of Cardiology**, v. 89, n. 2A, p. 11A-16A; discussion 16A-17A, 2002.
- SLEZÁK, P. et al. Accurate normalization factor for wire myography of rat femoral artery. **Physiological research**, v. 59, n. 6, p. 1033–6, 2010.
- SOLARO, R. J. et al. Effects of acidosis on ventricular muscle from adult and neonatal rats. **Circ Res**, v. 63, n. 4, p. 779–787, 1988.
- SOLINSKI, H. J.; GUDERMANN, T.; BREIT, A. Pharmacology and Signaling of MAS-Related G Protein-Coupled Receptors. **Pharmacological Reviews**, v. 66, n. 3, p. 570–597, 27 maio 2014.
- SOUZA, A. P. S. et al. Angiotensin II type 1 receptor blockade restores angiotensin-(1-7)-induced coronary vasodilation in hypertrophic rat hearts. **Clinical Science**, v. 125, n. 9–10, p. 449–459, 2013.
- STEENBERGEN, C. et al. Effects of acidosis and ischemia on contractility and intracellular pH of rat heart. **Circ Res**, v. 41, n. 6, p. 849–858, 1977.
- STRAUSS, M. H.; HALL, A. S. The Divergent Cardiovascular Effects of Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors and Angiotensin Receptor Blockers on Myocardial Infarction and Death. **Prog Cardiovasc Dis**, v. 58, n. 5, p. 473–482, 2016.
- SUGDEN, M. C. et al. Brown-adipose-tissue lipogenesis in starvation: effects of insulin and (-) hydroxycitrate. **Bioscience reports**, v. 2, n. 5, p. 289–

97, maio 1982.

- SUGIZAKI, M. M. et al. Myocardial Dysfunction Induced by Food Restriction is Related to Morphological Damage in Normotensive Middle-Aged Rats. **Journal of Biomedical Science**, v. 12, n. 4, p. 641–649, 12 jul. 2005.
- SUN, Y. Intracardiac renin–angiotensin system and myocardial repair/remodeling following infarction. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 48, n. 3, p. 483–489, mar. 2010.
- SUZUKI, J. et al. Rat angiotensin II (type 1A) receptor mRNA regulation and subtype expression in myocardial growth and hypertrophy. **Circulation research**, v. 73, n. 3, p. 439–47, set. 1993.
- SZAFRANSKI, K.; MEKHAIL, K. The fine line between lifespan extension and shortening in response to caloric restriction. **Nucleus (Austin, Tex.)**, v. 5, n. 1, p. 56–65, 27 jan. 2014.
- TAKEDA-MATSUBARA, Y. et al. Expression of endothelial angiotensin II receptor mRNA in pregnancy-induced hypertension. **American Journal of Hypertension**, v. 16, n. 12, p. 993–999, 1 dez. 2003.
- TANI, M. et al. Decrease in ischemic tolerance with aging in isolated perfused Fischer 344 rat hearts: relation to increases in intracellular Na<sup>+</sup> after ischemia. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 29, n. 11, p. 3081–9, nov. 1997.
- TARDIFF, J. C. Cardiac hypertrophy: stressing out the heart. **The Journal of clinical investigation**, v. 116, n. 6, p. 1467–70, jun. 2006.
- TE RIET, L. et al. Deterioration of kidney function by the (pro)renin receptor blocker handle region peptide in aliskiren-treated diabetic transgenic (mRen2)27 rats. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 306, n. 10, p. F1179–F1189, 15 maio 2014.
- THOMAS, W. G.; SERNIA, C. The immunocytochemical localization of angiotensinogen in the rat ovary. **Cell and tissue research**, v. 261, n. 2, p. 367–73, ago. 1990.
- THOMPSON, H. J.; JIANG, W.; ZHU, Z. Mechanisms by which Energy Restriction Inhibits Carcinogenesis. In: **Advances in experimental medicine and biology**. [s.l.: s.n.]. v. 470p. 77–84.
- TIGERSTEDT, R.; BERGMAN, P. Q. Niere und Kreislauf. **Skandinavisches Archiv Für Physiologie**, v. 8, n. 1, p. 223–271, jan. 1898.
- TIPNIS, S. R. et al. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. **The Journal of Biology Chemistry**, v. 275, n. 43, p. 33238–33243, 2000.
- TOUYZ, R. M.; SCHIFFRIN, E. L. Increased generation of superoxide by angiotensin II in smooth muscle cells from resistance arteries of hypertensive patients: role of phospholipase D-dependent NAD(P)H oxidase-sensitive pathways. **Journal of hypertension**, v. 19, n. 7, p. 1245–54, jul. 2001.
- UCHIYAMA, T. et al. Alamandine reduces leptin expression through the c-Src/p38 MAP kinase pathway in adipose tissue. **PLOS ONE**, v. 12, n. 6, p. e0178769, 7 jun. 2017.
- ULRICH-LAI, Y. M. et al. Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 291, n. 5, p. E965–E973, nov. 2006.
- UNGER, T.; PAULIS, L.; SICA, D. A. Therapeutic perspectives in hypertension: novel means for renin-angiotensin-aldosterone system modulation

and emerging device-based approaches. **European Heart Journal**, v. 32, n. 22, p. 2739–2747, 2011.

- VAN DEN AKKER, J. et al. Small artery remodeling: current concepts and questions. **Journal of vascular research**, v. 47, n. 3, p. 183–202, 2010.
- VAN DER MEER, R. W. et al. Short-term caloric restriction induces accumulation of myocardial triglycerides and decreases left ventricular diastolic function in healthy subjects. **Diabetes**, v. 56, n. 12, p. 2849–53, 1 dez. 2007.
- VAN KATS, J. P. et al. Angiotensin production by the heart: a quantitative study in pigs with the use of radiolabeled angiotensin infusions. **Circulation**, v. 98, n. 1, p. 73–81, 7 jul. 1998.
- VEGTER, E. L. et al. Rodent heart failure models do not reflect the human circulating microRNA signature in heart failure. **PLOS ONE**, v. 12, n. 5, p. e0177242, 5 maio 2017.
- VICTORA, C. G. et al. Risk factors for malnutrition in Brazilian children: the role of social and environmental variables. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 64, n. 2, p. 299–309, 1986.
- WANG, L. et al. Ang-(1-7) offers cytoprotection against ischemia-reperfusion injury by restoring intracellular calcium homeostasis. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 63, n. 3, p. 259–264, 2014.
- WHALEY-CONNELL, A. et al. Angiotensin II-mediated oxidative stress promotes myocardial tissue remodeling in the transgenic (mRen2) 27 Ren2 rat. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 293, n. 1, p. E355-63, jul. 2007.
- WHALEY-CONNELL, A. et al. Effect of renin inhibition and AT1R blockade on myocardial remodeling in the transgenic Ren2 rat. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 295, n. 1, p. E103-9, jul. 2008.
- WILLCOX, B. J.; WILLCOX, D. C. Caloric restriction, caloric restriction mimetics, and healthy aging in Okinawa: controversies and clinical implications. **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**, v. 17, n. 1, p. 51–8, jan. 2014.
- WOLLERT, K. C.; DREXLER, H. The renin-angiotensin system and experimental heart failure. **Cardiovascular Research**, v. 43, n. 4, p. 838–849, 1999.
- XIANG, L. et al. Impaired blood pressure compensation following hemorrhage in conscious obese Zucker rats. **Life sciences**, v. 93, n. 5–6, p. 214–219, 14 ago. 2013.
- YAMAGISHI, H. et al. Contribution of cardiac renin-angiotensin system to ventricular remodeling in myocardial-infarcted rats. **J Mol Cell Cardiol**, v. 25, n. 11, p. 1369–1380, 1993.
- YANG, B. et al. Myocardial angiotensin II receptor expression and ischemia-reperfusion injury. **Vascular Medicine**, v. 3, n. 2, p. 121–130, 15 maio 1998a.
- YANG, B. C. et al. Critical role of AT1 receptor expression after ischemia/reperfusion in isolated rat hearts: beneficial effect of antisense oligodeoxynucleotides directed at AT1 receptor mRNA. **Circulation research**, v. 83, n. 5, p. 552–9, 7 set. 1998b.
- YANG, R. et al. Pressor and renal hemodynamic effects of the novel angiotensin A peptide are angiotensin II type 1A receptor dependent. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 57, n. 5, p. 956–64, 1 maio 2011.

- YU, L. et al. Genetic and Pharmacological Inhibition of Galectin-3 Prevents Cardiac Remodeling by Interfering With Myocardial Fibrogenesis. **Circulation: Heart Failure**, v. 6, n. 1, p. 107–117, 1 jan. 2013.
- ZHANG, L. et al. Cloning and expression of MRG receptors in macaque, mouse, and human. **Molecular Brain Research**, v. 133, n. 2, p. 187–197, 18 fev. 2005.
- ZHANG, R. et al. Development of a homogeneous calcium mobilization assay for high throughput screening of mas-related gene receptor agonists. **Acta pharmacologica Sinica**, v. 28, n. 1, p. 125–31, jan. 2007.
- ZHANG, S. et al. Dietary restriction in the periconceptual period in normal-weight or obese ewes results in increased abundance of angiotensin-converting enzyme (ACE) and angiotensin type 1 receptor (AT1R) in the absence of changes in ACE or AT1R methylation in the adrenal of the offspring. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 146, n. 5, p. 443–54, nov. 2013.
- ZHANG, Y.; XU, S. Increased vulnerability of hypertrophied myocardium to ischemia and reperfusion injury. Relation to cardiac renin-angiotensin system. **Chin Med J (Engl)**, v. 108, n. 1, p. 28–32, 1995.
- ZOLK, O. et al. Effects of quinapril, losartan and hydralazine on cardiac hypertrophy and beta-adrenergic neuroeffector mechanisms in transgenic (mREN2)27 rats. **British journal of pharmacology**, v. 123, n. 3, p. 405–12, fev. 1998a.
- ZOLK, O. et al. Alteration of intracellular Ca<sup>2+</sup>(+)-handling and receptor regulation in hypertensive cardiac hypertrophy: insights from Ren2-transgenic rats. **Cardiovascular research**, v. 39, n. 1, p. 242–56, jul. 1998b.
- ZOLK, O. et al. Activation of the cardiac endothelin system in left ventricular hypertrophy before onset of heart failure in TG(mREN2)27 rats. **Cardiovascular research**, v. 53, n. 2, p. 363–71, 1 fev. 2002.
- ZYLKA, M. J. et al. Atypical expansion in mice of the sensory neuron-specific Mrg G protein-coupled receptor family. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 17, p. 10043–8, 19 ago. 2003.

## **11. Agradecimento às agências de fomento**

Esse trabalho não teria sido proposto ou concluído sem o auxílio das seguintes agências de fomento:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) – NanoBiofar