

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e**  
**Farmacologia**

Sílvia Amaral Zebral

**EFEITOS DO AUMENTO CENTRAL DE ANGIOTENSINA-(1-7) SOBRE A  
SIMPATOEXCITAÇÃO DE RATOS COM INSUFICIÊNCIA CARDÍACA:  
PARTICIPAÇÃO DO NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO**

Belo Horizonte

2020

Sílvia Amaral Zebral

**EFEITOS DO AUMENTO CENTRAL DE ANGIOTENSINA-(1-7) SOBRE A  
SIMPATOEXCITAÇÃO DE RATOS COM INSUFICIÊNCIA CARDÍACA:  
PARTICIPAÇÃO DO NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO**

*Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas.*

**Orientadora:** Profa. Dra. Andréa Siqueira Haibara

Belo Horizonte

2020

043

Zebral, Sílvia Amaral.

Efeitos do aumento central de angiotensina-(1-7) sobre a simpatoexcitação de ratos com insuficiência cardíaca: participação do núcleo paraventricular do hipotálamo [manuscrito] / Sílvia Amaral Zebral. - 2020.

123 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Siqueira Haibara.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Fisiologia. 2. Sistema Nervoso Simpático. 3. Núcleo Hipotalâmico Paraventricular. 4. Sistema Renina-Angiotensina. I. Haibara, Andréa Siqueira. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612:615

# "EFEITOS DO AUMENTO CENTRAL DE ANG-(1-7) SOBRE A SIMPATOEEXCITAÇÃO DE RATOS COM INSUFICIÊNCIA CARDÍACA: PARTICIPAÇÃO DO NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO"

**SILVIA AMARAL ZEBRAL**


Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia 24 de janeiro de 2020, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

  
PROFA. DRA. FERNANDA CACILDA DOS SANTOS SILVA  
ICEB/UFOP

  
PROFA. DRA. RENATA MARIA LATARO  
CFS/UFSC

  
PROF. DR. THIAGO VERANO BRAGA  
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

  
PROF. DR. LUCAS MIRANDA KANGUSSU  
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

  
PROFA. DRA. ANDREA SIQUEIRA HAIBARA  
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ORIENTADORA

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

Belo Horizonte, 24 de janeiro de 2020

♥ **Dedico este trabalho aos meus  
queridos pais, Marta e Amauri.**

“É fazendo que se aprende a fazer  
aquilo que se deve aprender a fazer.”

**Aristóteles**

## **AGRADECIMENTOS**

Meus sinceros agradecimentos:

À Deus, por não ter me deixado desistir nos momentos de dificuldade e por colocar pessoas especiais em meu caminho que me ajudaram e me incentivaram sempre.

À minha orientadora, Profa. Dra. Andréa Siqueira Haibara, que abriu as portas do laboratório para mim no mestrado e me deu oportunidade de continuar no doutorado. Serei eternamente grata pelo apoio, confiança, ensinamentos e pelo exemplo de profissionalismo e força!

Aos meus pais, Amauri e Marta, que, sem medir esforços, sempre me incentivaram a estudar e correr atrás do meu futuro. É difícil descrever em palavras o quanto vocês são especiais e contribuíram para que eu chegasse até aqui...

Ao meu noivo, Jhonny, em quem eu descarreguei todos os meus problemas e angústias e que, com muita paciência e otimismo, me ajudou a superar cada momento difícil.

Aos professores Dr. Hélio Salgado e Dr. Rubens Fazan, da FMRP-USP, que abriram as portas dos seus laboratórios para que eu aprendesse técnicas que foram essenciais para o desenvolvimento desse trabalho.

Às doutorandas Carina Cunha, Cristiane Amorim e Bárbara Fernandes, que me ajudaram diretamente nos experimentos.

Aos amigos Jônathas, Héric, Carina, Mari, Filipe, Sthefanie, Luiz e Zezé, pela amizade, ajuda, as boas conversas e por tornarem essa caminhada mais leve e divertida.

Aos professores e demais colegas do Laboratório de Hipertensão, que se tornaram minha segunda família. Irei me recordar sempre com muito carinho de todos.

Ao CNPq, pelo financiamento da minha bolsa de doutorado. Nesse período de crise seria praticamente impossível realizar esse trabalho e participar de eventos científicos se não tivesse o auxílio da taxa de bancada.



Aos animais de laboratório, que são tão amáveis e contribuem tanto para o progresso da ciência.

Á todos aqueles que de alguma forma me ajudaram ou, simplesmente, torceram por mim, **MUITO OBRIGADA!!!**

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

µg - micrograma

µl - microlitro

µm - micrômetro

2R1C - 2 rins 1 clipe

Ang II - Angiotensina II

Ang-(1-7) - Angiotensina (1-7)

ATP - *adenosine triphosphate* - trifosfato de adenosina

AVP - *arginine vasopressin* - arginina vasopressina

BAT - *baroreflex activation therapy* - terapia de ativação do barorreflexo

BSA - *bovine serum albumine* - albumina de soro bovino

CaCl<sub>2</sub> - cloreto de cálcio

CEBIO - Centro de bioterismo

CEUA - comissão de ética no uso de animais

CO<sub>2</sub> - dióxido de carbono

cpm - ciclos por minuto

CVLM - *caudal ventrolateral medulla* - região ventrolateral caudal do bulbo

DAB - diaminobenzidina

dLVP - pressão desenvolvida do ventrículo esquerdo

dP/dt - derivada de pressão em relação ao tempo do ventrículo esquerdo

ECA - enzima conversora de angiotensina

ECA2 - enzima conversora de angiotensina 2

EDTA - *ethylenediamine tetraacetic acid* - ácido etilenodiamino tetra-acético

eNOS - *endothelial nitric oxide synthase* - óxido nítrico sintase endotelial

EPM - erro padrão da média

FC - frequência cardíaca

FR - frequência respiratória

GABA - *gamma-amino butyric acid* - ácido gama-amino butírico

H<sub>2</sub>O - água

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - peróxido de hidrogênio

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - ácido sulfúrico

HCl - ácido clorídrico

HPβCD - hidroxipropil β-ciclodextrina

i.p. - intraperitoneal

i.v. - intravenoso

IC - insuficiência cardíaca

ICV - intracerebroventricular

IgG - imunoglobulina G

IL-1β - interleucina 1β

IL-6 - interleucina-6

IM - infarto do miocárdio

IP - intervalo de pulso

KCl - cloreto de potássio

KCN - cianeto de potássio

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - fosfato de potássio monobásico

L-NMMA - *N*<sup>G</sup>-*Methyl-L-arginine* - N-metilarginina

LVEDP - pressão diastólica final do ventrículo esquerdo

LVSP - pressão sistólica do ventrículo esquerdo

MgSO<sub>4</sub> - sulfato de magnésio

mmHg - milímetros de mercúrio

MMP - *matrix metalloproteinases* - metaloproteinases de matriz

MrgD - *Mas-related G-protein coupled receptor D* - receptor D acoplado a proteína G relacionado ao Mas

ms - milisegundos

NA - núcleo ambíguo

NaCl - cloreto de sódio

NADPH - *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NaHCO<sub>3</sub> - bicarbonato de sódio

NF- κB - fator nuclear-kappa B

nm - nanômetro

NMDA - *N-methyl-D-aspartate* - N-metil D-aspartato

nNOS - neuronal nitric oxide synthase - óxido nítrico sintase neuronal

NO - *nitric oxide* - óxido nítrico

NPS - nitroprussiato de sódio

NTS - núcleo do trato solitário

O<sub>2</sub> - oxigênio

OMS - organização mundial de saúde

PAM - pressão arterial média

PAP - pressão arterial pulsátil

PB - phosphate buffer - tampão fosfato

pCO<sub>2</sub> - pressão parcial de gás carbônico

PE-10 - tubo de polietileno número 10

PE-50 - tubo de polietileno número 50

PFA - paraformaldeído

PGE<sub>2</sub> - prostaglandina E<sub>2</sub>

pH - potencial hidrogeniônico

PMSF - *phenylmethylsulfonyl fluoride* - fluoreto de fenilmetilsufonila

pO<sub>2</sub> - pressão parcial de oxigênio

PTX - pentoxifilina

PVDF - *polyvinylidene difluoride* - difluoreto de polivinilideno

PVN - *paraventricular nucleus* of hypothalamus - núcleo paraventricular do hipotálamo

rpm - rotações por minuto

RSNA - renal sympathetic nerve activity - atividade do nervo simpático renal

RVLM - *rostromedullary lateral medulla* - região ventrolateral rostral do bulbo

SBC - sociedade brasileira de cardiologia

SDS - *sodium dodecyl sulfate* - dodecil sulfato de sódio

SNC - sistema nervoso central

SRA - sistema renina-angiotensina

TBS-T - *tris-buffered saline* - tampão salina-tris

TNF- $\alpha$  - *Tumor necrosis factor alpha* - fator de necrose tumoral- $\alpha$

VE - ventilação por minuto

VE - ventrículo esquerdo

VT - volume corrente

## **SUMÁRIO**

RESUMO .....	1
ABSTRACT .....	4
I. INTRODUÇÃO .....	7
II. OBJETIVOS.....	25
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1. Animais .....	28
3.2. Procedimentos cirúrgicos.....	28
3.2.1. Cirurgia de indução do infarto agudo do miocárdio .....	29
3.2.2. Cirurgia de implante da mini-bomba osmótica no ventrículo lateral cerebral .....	31
3.2.3. Canulação da artéria e veia femoral.....	33
3.3. Registro dos parâmetros ventilatórios basais.....	34
3.4. Registro dos Parâmetros Cardiovasculares .....	36
3.5. Avaliação dos reflexos cardiovasculares e do tônus autonômico cardíaco .....	37
3.5.1. Avaliação da sensibilidade do barorreflexo .....	37
3.5.2. Avaliação do quimiorreflexo periférico .....	37
3.5.3. Avaliação do tônus autonômico cardíaco.....	38
3.6. Avaliação <i>ex vivo</i> da função cardíaca no sistema de Langendorff .....	40
3.7. Avaliação <i>in vivo</i> da função cardíaca .....	41
3.8. Avaliação da hipertrofia cardíaca e da área infartada .....	42
3.9. Registro da atividade do nervo simpático renal.....	44
3.10. Imunohistoquímica para fosB no PVN.....	45
3.11. Atividade da NADPH-diaforase como um marcador da atividade da nNOS no PVN.....	46
3.12. Micropunch do PVN .....	47
3.13. Análise por western blot do receptor NMDA (NR1) no PVN .....	48



3.14. Avaliação da expressão de IL-1 $\beta$ no PVN.....	49
3.15. Análise Estatística.....	50
3.16. Protocolos experimentais.....	51
IV. RESULTADOS .....	56
4.1. Taxa de sobrevivência .....	57
4.2. Características gerais dos grupos avaliados .....	59
4.3. Efeito da infusão intracerebroventricular crônica de Ang-(1-7) sobre a morfologia cardíaca de animais infartados.....	60
4.4. Efeito da infusão intracerebroventricular crônica de Ang-(1-7) sobre a função cardíaca basal <i>ex vivo</i> de animais infartados .....	63
4.5. Efeito da infusão intracerebroventricular crônica de Ang-(1-7) sobre a função cardíaca basal <i>in vivo</i> de animais infartados .....	66
4.6. Efeito da infusão intracerebroventricular crônica de Ang-(1-7) sobre os parâmetros cardioventilatórios basais de animais infartados .....	68
4.7. Efeito da infusão intracerebroventricular crônica de Ang-(1-7) sobre o tônus autonômico cardíaco de animais infartados .....	70
4.8. Efeito da infusão intracerebroventricular crônica de Ang-(1-7) sobre a atividade basal do nervo simpático renal de animais infartados.....	72
4.9. Efeito da infusão intracerebroventricular crônica de Ang-(1-7) sobre os reflexos cardiovasculares de animais infartados .....	73
4.10. Efeito da infusão intracerebroventricular crônica de Ang-(1-7) sobre a ativação dos neurônios do PVN de animais infartados .....	75
4.11. Efeito da infusão intracerebroventricular crônica de Ang-(1-7) sobre a atividade da NADPH-diaforase em neurônios do PVN de animais infartados .....	77
4.12. Efeito da infusão intracerebroventricular crônica de Ang-(1-7) sobre os níveis de IL-1 $\beta$ e a expressão do receptor NMDA no PVN de animais infartados.....	79
V. DISCUSSÃO .....	81
VI. CONCLUSÃO .....	101

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	104
VIII. ANEXOS.....	119

**RESUMO**

A insuficiência cardíaca (IC) é caracterizada por aumento exacerbado da atividade simpática, alterações neurohumorais e desordens respiratórias. Estudos mostram que alterações nos reflexos cardiovasculares e na atividade dos neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) estão relacionadas com o sistema renina-angiotensina (SRA), em especial com a Ang II/receptor AT<sub>1</sub>, e contribuem para a progressão da IC. O outro eixo do SRA, representado pela Ang-(1-7)/receptor Mas é amplamente conhecido por seus efeitos opostos à Ang II/receptor AT<sub>1</sub> em diferentes condições patológicas. Esse estudo teve como objetivo avaliar o efeito da infusão central crônica de Ang-(1-7) sobre as alterações cardiovasculares, ventilatórias e autonômicas de ratos com IC, e investigar se seus efeitos ocorrem através de mecanismo dependente de NO, receptores NMDA e/ou citocinas pró-inflamatórias no PVN. O infarto do miocárdio foi induzido através da oclusão da artéria coronária descendente esquerda em ratos Wistar (240-280g - CEUA 236/2017). A infusão central crônica de Ang-(1-7) (0,1µg/h/28dias) ou salina (0,9%) foi realizada através de mini-bomba osmótica implantada intracerebroventricularmente 3 semanas após o infarto. Após 4 semanas da infusão central, os experimentos foram realizados. O tratamento crônico com Ang-(1-7) reduziu a taxa de mortalidade, melhorou a sensibilidade do barorreflexo e o desbalanço autonômico cardíaco, reduziu a atividade simpática basal, bem como o aumento da atividade dos neurônios do PVN do grupo IC. Tais efeitos foram acompanhados pelo aumento da expressão da enzima NOS e redução dos níveis da citocina pró-inflamatória IL-1β no PVN. O tratamento com Ang-(1-7), porém, não alterou de forma significativa a expressão dos receptores NMDA no PVN. Esses resultados mostram que o aumento crônico dos níveis cerebrais de Ang-(1-7), provavelmente contrabalanceando as ações da Ang II, foi efetivo em reduzir o aumento da atividade simpática de animais com IC,

reforçando a hipótese do SRA central como um potencial alvo terapêutico para o tratamento de doenças cardiovasculares, contribuindo para controlar a progressão da IC, melhorando a qualidade e a expectativa de vida de indivíduos nessa condição.

Palavras-chave: Insuficiência cardíaca. Simpatoexcitação. Núcleo paraventricular do hipotálamo. Sistema Renina-Angiotensina.

## **ABSTRACT**

Heart failure (HF) is characterized by an exacerbated increase in sympathetic activity, neurohumoral alterations and respiratory disorders. Studies have shown that changes in cardiovascular reflexes and in the paraventricular nucleus of hypothalamus (PVN) activity are related to renin-angiotensin system (RAS), especially Ang II/AT1 receptor, and contribute to HF progression. The other axis of RAS, represented by Ang-(1-7)/receptor Mas is widely known for its opposite effects to Ang II/AT1 receptor under different pathological conditions. The aim of this study was to evaluate the chronic effect of central infusion of Ang-(1-7) on cardiovascular, ventilatory and autonomic parameters in rats with HF induced by myocardial infarction, and to investigate whether their effects occur through NO, NMDA receptors and/or proinflammatory cytokines-dependent mechanism in PVN. Myocardial infarction was induced by left descending coronary artery ligation in Wistar rats (240-280g - CEUA 236/2017). Chronic central infusion of Ang-(1-7) (0.1µg/h/28 days) or saline (0.9%) was performed through an intracerebroventricular osmotic minipump implanted 3 weeks after myocardial infarction. The experiments were performed four weeks after the beginning of central infusion. Chronic treatment with Ang-(1-7) reduced mortality rate, improved baroreflex sensitivity and cardiac autonomic imbalance, and reduced basal sympathetic activity and PVN neurons activity in the HF group. These effects were accompanied by increased in NOS expression and reduced levels of proinflammatory cytokine IL-1β in PVN. Treatment with Ang-(1-7), however, did not alter NMDA receptor expression in PVN. These results show that chronic increase of Ang-(1-7) levels in the brain, probably counteracting the Ang II actions, was effective in reducing the increase in sympathetic nerve activity of HF animals, reinforcing the hypothesis of central RAS as a potential therapeutic target for the treatment of cardiovascular diseases,

contributing to control the HF progression, improving the quality and life expectancy of individuals in this condition.

*Keywords:* Heart failure. Sympathoexcitation. Paraventricular nucleus of hypothalamus. Renin-Angiotensin system.



# **I. INTRODUÇÃO**

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC), o infarto agudo do miocárdio (IM) está entre as doenças cardiovasculares de maior incidência e que causa o maior número de mortes no Brasil e no mundo (OMS, 2017; Précoma e cols., 2019). Dentre os fatores de risco para o IM destacam-se a hipertensão, dislipidemia, tabagismo, sedentarismo, obesidade, *diabetes mellitus*, além de fatores como idade, sexo e histórico familiar (Précoma e cols., 2019).

O IM é causado pela interrupção do fluxo sanguíneo coronário de uma região do músculo cardíaco, tendo como principal causa o rompimento de placas ateroscleróticas. O rompimento dessas placas causa intensa resposta inflamatória, formação de trombo e agregação plaquetária, impedindo a passagem normal do fluxo sanguíneo e resultando na diminuição da oxigenação do miocárdio (Mechanic e Grossman, 2019). Dentro de poucas horas após a oclusão coronariana, os cardiomiócitos começam a entrar em processo de necrose e apoptose devido à falta de oxigênio e baixa produção de ATP, tornando-se incapazes de exercer a sua função contrátil. Como consequência, ocorre redução da capacidade de bombeamento do coração, resultando inicialmente em diminuição do débito cardíaco e da pressão arterial, que levam à ativação de mecanismos compensatórios, como alterações neuro-humorais e aumento do tônus simpático (Mill e cols., 2011). Apesar dos mecanismos compensatórios serem benéficos nos estágios iniciais para manter o débito cardíaco e a perfusão sanguínea sistêmica, se sustentados por um período de tempo maior, eles se tornam prejudiciais ao organismo, exacerbando as anormalidades hemodinâmicas e levando ao remodelamento cardíaco que, por sua vez, também causa alterações hemodinâmicas, estabelecendo um ciclo vicioso cujo resultado final é a evolução intransponível da insuficiência cardíaca (IC) (Zucker e

cols., 1995; Zucker e cols., 2004; Gronda e cols., 2019), podendo causar até mesmo a morte súbita do indivíduo (Aires e cols., 2017).

Já é bem estabelecido na literatura que a IC, tanto em humanos quanto em modelos animais, é caracterizada, principalmente, por aumento exacerbado da atividade simpática (Zucker & Wang, 1991; Francis e cols., 2001; Huang e Leenen, 2009; Guggilam e cols., 2011; May e cols., 2013; Passamani cols., 2014; Yu e cols., 2016; Toledo e cols., 2017), além de alterações neuro-humorais (Francis e cols., 2001; Huang e Leenen, 2009; Zucker e cols., 2014; Yu e cols., 2019), alterações nos reflexos cardiovasculares (Wang e cols., 1990; Sun e cols., 1999b) e desordens respiratórias (Marcus e cols., 2014; Schultz e cols., 2015; Toledo e cols., 2017).

A hiperatividade simpática envolve alterações neuro-humorais em áreas do sistema nervoso central (SNC) que regulam a atividade nervosa simpática e que se encontram hiperativadas na IC. Entre essas áreas destaca-se o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) (Patel e cols., 2000; Badoer, 2001; Zhang e cols., 2002a; Han e cols., 2010; Xu e cols., 2012; Pyner, 2014). O PVN fica localizado bilateralmente ao terceiro ventrículo e é dividido em duas regiões principais: magnocelular e parvocelular. Os neurônios magnocelulares localizam-se nas porções laterais do PVN e são especializados na síntese de vasopressina. Este hormônio é transportado através de projeções axonais até a hipófise posterior, onde é liberado na circulação. A região parvocelular localiza-se medialmente e é composta por conjuntos heterogêneos de neurônios, dentre os quais inclui-se os que se projetam para o RVLM (bulbo ventrolateral rostral) e para a coluna intermediolateral (CIML) da medula espinhal, ativando os neurônios pré-motores simpáticos e neurônios pré-ganglionares simpáticos, respectivamente (Badoer, 2001).

O PVN integra e responde a uma variedade de sinais neurais e humorais regulando o tônus simpático e o volume de fluido extracelular, podendo ser considerado o maior centro integrativo que participa do controle cardiovascular, possuindo conexões neuronais com outras áreas centrais envolvidas no controle autonômico e cardiovascular, como o núcleo do trato solitário (NTS) e o RVLM (Badoer, 2001; Benarroch, 2005; Guyenet, 2006; Pyner, 2009; May e cols., 2013; Shenton e Pyner, 2016; Medonça e cols., 2018). Além disso, o PVN envia projeções diretas para os neurônios pré-ganglionares simpáticos da CIML (Guyenet, 2006), demonstrando a sua importante participação na regulação da atividade nervosa simpática, tanto em condições normais quanto na IC. De fato, estudos de Vahid-Ansari e Leenen (1998) e Patel e cols. (2000) observaram aumento da expressão da proteína c-fos e Fra-LI, marcadores de ativação neuronal aguda e crônica respectivamente, nos neurônios do PVN de animais com IC. Corroborando com esse resultado, Zhang e cols. (2002a) observaram em seus estudos que os neurônios do PVN de ratos com IC possuem maior frequência de disparos, sugerindo que essa maior atividade do PVN seja uma das possíveis causas da simpatoexcitação observada na IC.

A maioria dos principais neurotransmissores do SNC já foi identificada no PVN. Entre eles, destacam-se o glutamato (Bains & Ferguson 1997) e a angiotensina II (Li & Ferguson 1996) exercendo geralmente efeitos excitatórios (Miyawaki e cols., 1996), e o ácido gama-aminobutírico (GABA) (Decavel & Van den Pol 1990) e o óxido nítrico (NO) (Bredt e cols., 1990, Zhang e cols. 1997) atuando como mediadores inibitórios no PVN. Para manter o controle autonômico e cardiovascular, os neurônios do PVN estão sob a constante modulação desses neurotransmissores excitatórios e inibitórios. O aumento da atividade dos neurônios

do PVN pode ser associado, portanto, ao desequilíbrio da interação entre a neurotransmissão excitatória e inibitória, prevalecendo a modulação excitatória, resultando em significativa ativação simpática (Li e Patel, 2003).

Estudos já demonstraram que dentro de poucas horas após o insulto cardíaco o sistema renina-angiotensina (SRA) é rapidamente ativado. O aumento dos níveis plasmáticos e cerebrais de Ang II pode contribuir para a ativação de áreas do sistema nervoso central que são importantes no controle cardiovascular, como o PVN, resultando em aumento do tônus simpático, remodelamento cardíaco e progressão da disfunção cardíaca (Francis e cols., 2001; Zhang e cols., 2002a; Huang e Leenen, 2009; Passamani e cols., 2014). Dessa forma, o aumento da atividade nervosa simpática tanto em humanos quanto em modelos animais de IC tem sido fortemente associado com a hiperativação do SRA, principalmente pelo aumento da sinalização sistêmica e cerebral de Ang II (Basu e cols., 2017), contribuindo de forma importante para a progressão da doença.

O conceito atual do SRA inclui 2 eixos principais: o eixo clássico e o eixo contra-regulatório. O eixo clássico é composto, principalmente, pela renina, enzima conversora de angiotensina (ECA), Angiotensina II (Ang II) e os receptores do tipo 1 (AT1) e do tipo 2 (AT2). O octapeptídeo Ang II é o principal efetor do eixo clássico e é produzido através da atividade da enzima ECA sobre a Angiotensina I (Ang I) (Santos, 2014). Por outro lado, o eixo não-clássico, ou eixo contra-regulatório, é composto pela enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), a Angiotensina-(1-7) (Ang-(1-7)) e o receptor Mas. A Ang-(1-7) pode ser formada a partir da Ang II pela ação da enzima ECA2, através da remoção do aminoácido fenilalanina da região carboxi-terminal, e também a partir da Ang I e da Angiotensina-(1-9), pela ação da ECA2 e da ECA, respectivamente (Santos e cols., 2003; Santos, 2014).

A Ang II interage com alta afinidade aos receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>, que são receptores acoplados a proteína G e diferem quanto ao peso molecular e ao mecanismo de sinalização (Li e cols., 2012). Quando interage com o receptor AT<sub>1</sub> a Ang II produz importantes alterações autonômicas e cardiovasculares, como vasoconstrição, aumento da pressão arterial, hipertrofia, fibrose, aumento do tônus simpático e redução do parassimpático, redução da sensibilidade do barorreflexo e aumento da sensibilidade do quimiorreflexo além de aumento da liberação de aldosterona. Por outro lado, ao interagir com o receptor AT<sub>2</sub> ela produz vasodilatação, redução da pressão arterial e da fibrose e aumento da liberação de óxido nítrico (NO) (Danyel e cols., 2013; Mendonza-Torres e cols., 2015; Miller e Arnold, 2018). Em contrapartida, a Ang-(1-7) ao se ligar ao receptor Mas produz alterações cardiovasculares e autonômicas opostas às ações deletérias da Ang II, como redução da fibrose e da hipertrofia, vasodilatação, aumento do débito cardíaco, redução do tônus simpático e aumento do parassimpático e aumento da sensibilidade do barorreflexo (Iwai & Horiuchi, 2009; Santos e cols., 2012; Miller e Arnold, 2018; Santos e cols., 2018).

A estimulação dos neurônios do PVN com Ang II aumenta a atividade nervosa simpática, a pressão arterial e a frequência cardíaca tanto em animais normotensos (Li & Pan, 2005; Li e cols., 2006; Zheng e cols., 2009; Fujisawa e cols., 2011) quanto em animais com IC (Zhu e cols., 2004; Zheng e cols., 2009; Sharma e cols., 2017). Entretanto, o aumento da atividade simpática e da frequência cardíaca foi significativamente maior nos animais com IC (Zheng e cols., 2009), o que é condizente com o achado de que a expressão da ECA e do receptor AT<sub>1</sub> está aumentada no PVN de animais com IC (Tan e cols., 2004; Kar e cols., 2010). Zhang e cols. (2002a) testaram a hipótese de que o eixo ECA/Ang II/receptor AT<sub>1</sub> teria

participação na ativação exacerbada dos neurônios do PVN de animais com IC. Nesse estudo foi observado que a injeção intra-carotídea de losartan, antagonista do receptor AT<sub>1</sub>, ou a injeção do inibidor da ECA, captopril, reduziu a atividade neuronal do PVN (Zhang e cols., 2002a). Além disso, a administração central (ICV ou PVN) do losartan ou do captopril reduziu a atividade nervosa simpática de maneira mais intensa nos animais com IC (Francis e cols., 2004b, Zheng e cols., 2009).

Além da Ang II, outro neurotransmissor excitatório do PVN com papel relevante na hiperatividade simpática da IC é o glutamato. Li e cols. (2003) observaram que a microinjeção de NMDA (N-metil-D-aspartato, agonista de receptor glutamatérgico) no PVN produziu aumento dose-dependente potencializado da atividade nervosa simpática renal, pressão arterial e frequência cardíaca em animais com IC quando comparados ao grupo sham. Ainda nesse estudo, foi observado que os níveis de glutamato no PVN dos animais com IC não se apresentaram elevados, porém a expressão da subunidade NR1 do receptor NMDA estava significativamente elevada, sugerindo que o aumento da expressão de receptores glutamatérgicos do PVN contribua na anormalidade simpática observada nessa condição. Kleiber e colaboradores (2010) por sua vez, observaram que existe interação entre a Ang II e o receptor NMDA, uma vez o bloqueio dos receptores AT<sub>1</sub>, através do tratamento com losartan na água de beber, normalizou o aumento da atividade nervosa simpática renal mediada pela microinjeção de NMDA no PVN, bem como normalizou a expressão da subunidade NR1 do receptor NMDA de animais com IC, sugerindo que a Ang II teria participação nessas alterações. Essa suposição foi confirmada em cultura de células neuronais (NG-108), onde o tratamento com Ang II, atuando em

receptores  $AT_1$ , causou aumento dose-dependente da expressão proteica do receptor NR1 (Kleiber e cols., 2010).

Se por um lado, a neurotransmissão excitatória glutamatérgica e angiotensinérgica estão aumentadas, do outro lado a neurotransmissão inibitória nitrérgica e gabaérgica apresentam-se reduzidas no PVN de animais com IC (Zhang e cols., 2001; Zhang e cols., 2002b; Li e Patel, 2003; Zheng e cols., 2011; Sharma e cols., 2013). Tanto o NO quanto o GABA são neurotransmissores conhecidos por possuírem efeitos inibitórios no SNC, estando envolvidos no controle simpático (Yun e cols.; 1997; Bowery & Smart, 2006). Estudos mostram que a microinjeção de nitroprussiato de sódio (NPS), um doador de NO, no PVN reduziu a atividade nervosa simpática renal, a pressão arterial e a frequência cardíaca, enquanto a microinjeção de L-NMMA (inibidor seletivo da nNOS), produziu efeitos opostos (Zhang e cols., 1997). Em animais com IC as respostas induzidas pelo NPS e L-NMMA no PVN foram expressivamente atenuadas (Zhang e cols., 2001), sugerindo que o efeito inibitório mediado pelo NO endógeno no PVN é menos potente, provavelmente devido a menor atividade da nNOS (Zhang e cols., 1998), resultando em menor produção de NO e inibição atenuada do fluxo simpático. De forma interessante, no estudo de Sharma e cols. (2011) foi observado que o tratamento de animais com IC com losartan na água de beber por 3 semanas aumentou a expressão de nNOS e reduziu a expressão da proteína inibidora da nNOS (PIN) no PVN, sugerindo que a redução da expressão da nNOS também seria mediada pela Ang II. Complementando esse achado, foi observado que em cultura de células hipotalâmicas, o NO atua como um inibidor da expressão do receptor  $AT_1$  (Sharma e cols., 2012), enquanto o aumento dos níveis de NO obtidos a partir transferência gênica da nNOS no PVN de ratos com IC reduziu a expressão do receptor NMDA



(Zheng e cols., 2011a), sugerindo que o NO pode desempenhar importante papel reduzindo a modulação excitatória sobre neurônios do PVN na IC. Assim, em conjunto, esses estudos sugerem que o desbalanço entre os mecanismos excitatórios e inibitórios mediado pelas ações centrais da Ang II no PVN, contribui com o aumento da atividade dos neurônios desse núcleo, em parte por reduzir os níveis de NO e aumentar a expressão do receptor NMDA, contribuindo, portanto, com a hiperatividade simpática e com a progressão da doença.

Além dos animais com IC apresentarem expressão aumentada da ECA e do receptor AT<sub>1</sub> no PVN, também possuem prejuízo na expressão de componentes do eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas, caracterizado pela reduzida expressão da ECA2 (Kar e cols., 2010) e também do receptor Mas (Zheng e cols., 2011), tornando tanto a produção quanto a ação da Ang-(1-7) limitadas. Estudos mostram que no cérebro a interação da Ang-(1-7) com o receptor Mas tem sido associada com a ativação de várias vias de sinalização intracelular e também com a produção de NO, tendo função simpatoinibitória e hipotensiva (Zhang e cols., 2008; Xing e cols., 2014), agindo de maneira oposta às ações da Ang II. Em animais com IC, o tratamento intracerebroventricular crônico com Ang-(1-7) promoveu redução da atividade simpática e aumento da atividade parassimpática, sem causar qualquer alteração em animais sham (Kar e cols., 2011). Zheng e colaboradores (2011) observaram que a aplicação de vetor adenoviral contendo a sequência de ECA2 especificamente no PVN de animais com IC atenuou a hiperatividade simpática renal desses animais e, de forma interessante, aumentou a expressão de nNOS e do receptor Mas. No entanto, estudos utilizando superexpressão de ECA2 deixam em aberto uma questão: os resultados obtidos foram decorrentes da maior produção de Ang-(1-7), pela redução dos níveis de Ang II ou por um efeito combinado entre eles? Assim,

para confirmar esse resultado, Zheng e colaboradores avaliaram a superexpressão de ECA2 em cultura neuronal e foi observado aumento dose-dependente dos níveis de nNOS nessas células, assim como observado *in vivo*, sendo esse efeito revertido pelo bloqueio do receptor Mas com o antagonista A-779 (Zheng e cols., 2011). Dessa forma, foi confirmada a interação entre a Ang-(1-7) e a nNOS, sendo possível sugerir que a Ang-(1-7), aumentando os níveis da nNOS, induza maior produção de NO, o que contribui para reduzir a hiperatividade simpática do animais com IC. Há evidências de que a Ang-(1-7) facilita a liberação de NO no sistema nervoso central, sendo esse efeito abolido pelo bloqueio do receptor Mas (Zhang e cols., 2008). Entretanto, estudos que permitam avaliar os efeitos diretos da Ang-(1-7) sobre a modulação de neurotransmissores excitatórios e inibitórios precisam ainda ser melhor explorados, podendo apresentar resultados mais específicos da ação desse peptídeo no PVN.

Várias evidências na literatura indicam que a inflamação exerce importante papel na patogênese na IC (Hedayat e cols., 2010). Francis e colaboradores (2004a) avaliaram a síntese de TNF- $\alpha$  no plasma, coração e cérebro de animais infartados, desde a indução do infarto até após 4 semanas, sendo observado aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  desde os primeiros minutos e horas e sustentado ao longo de todo o período avaliado. Estudos já demonstraram que as citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  estão aumentadas no PVN de animais com IC (Francis e cols., 2004a, Kang e cols., 2008a,b) e são capazes de modular a atividade cardiovascular e autonômica, contribuindo na simpatoexcitação observada nessa condição (Kang e cols., 2008). Após o IM, acredita-se que a elevação dos níveis circulantes de citocinas pró-inflamatórias seja capaz de aumentar os níveis de citocinas cerebrais, uma vez que, embora não consiga atravessar a barreira hematoencefálica, as

citocinas sejam capazes de estimular células endoteliais da barreira a produzir prostaglandina E2 que, por sua vez, pode induzir a síntese local de citocinas (Mulla & Buckingham, 1999). Além disso, as citocinas são sintetizadas no cérebro pelos neurônios e células da glia, sendo consideradas importantes neuromoduladores no sistema nervoso central, principalmente em condições patológicas (Pan e cols., 1997).

Já é bem estabelecido na literatura que as citocinas pró-inflamatórias e o SRA são mutuamente conectados, participando da fisiopatologia de doenças cardiovasculares. A Ang II e o TNF- $\alpha$  podem potencializar os efeitos um do outro, resultando no ciclo vicioso que leva à progressão da IC (Tsutamoto e cols., 2000). Tem sido reportado que o bloqueio das citocinas no SNC induz redução dos componentes do SRA (Kang e cols., 2008, Guggilam e cols., 2008), e por sua vez, o bloqueio do SRA atenua a produção de citocinas pró-inflamatórias (Kang e cols., 2008). O tratamento intracerebroventricular crônico com a Pentoxifilina (PTX), um inibidor da síntese de citocinas pró-inflamatórias (Yoshikawa e cols., 1999), reduziu os níveis de renina e da ECA no PVN, além de causar expressiva redução da atividade dos neurônios desse núcleo (Kang e cols., 2008b). Em outro estudo em que também foi realizado o bloqueio com PTX, porém por via intraperitoneal, em animais com IC, observou-se restauração na expressão da nNOS e redução do receptor AT1 no PVN, além de melhora no controle barorreflexo da atividade simpática renal, contribuindo para a redução da simpatoexcitação e com o aumento na taxa de sobrevivência dos animais (Guggilam e cols., 2008). Kang e colaboradores (2008a) investigaram mais a fundo a interação entre o SRA e as citocinas pró-inflamatórias. Nesse estudo o tratamento intracerebroventricular crônico com losartan atenuou os níveis de citocinas pró-inflamatórias no PVN e no

plasma, reduziu os níveis plasmáticos de norepinefrina e Ang II e reduziu a pressão diastólica final do ventrículo esquerdo nos animais com IC, sugerindo a influência da Ang II na síntese de citocinas pró-inflamatórias no SNC de animais com IC. Além disso, o tratamento com losartan também reduziu a expressão proteica do fator nuclear-kappa B (NF- $\kappa$ B), que é um potente indutor de citocinas pró-inflamatórias (Kang e cols., 2008a), sugerindo que o NF- $\kappa$ B possa mediar o *cross-talk* entre as citocinas pró-inflamatórias e o SRA.

A Ang II e a Ang-(1-7) também parecem exercer efeitos opostos no que se refere à ação sobre a inflamação. A Ang-(1-7) exerce, através de receptores Mas, efeitos diretos na micróglia, diminuindo a produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias, sendo esse efeito anti-inflamatório dependente da inibição do NF- $\kappa$ B (Liu e cols., 2016). De forma interessante, a superexpressão da ECA2 no PVN atenua a hipertensão, bem como o aumento da expressão da IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 no PVN induzido pela infusão de Ang II (Sriramula e cols., 2011).

Em conjunto esses trabalhos demonstram a importante interação entre mecanismos neuro-humorais excitatórios e inibitórios no PVN, entretanto, esses mecanismos se encontram em desequilíbrio na IC, sendo que a Ang II e as citocinas pró-inflamatórias modulam positivamente os excitatórios e negativamente os inibitórios, o que contribui para a hiperatividade simpática observada nessa condição. Em contrapartida, a Ang-(1-7) produz efeitos opostos, no sentido de reequilibrar esses mecanismos e normalizar a disfunção autonômica.

A hiperatividade do eixo ECA/Ang II/AT1 em animais com IC também tem sido associada com alterações funcionais dos reflexos cardiovasculares, principalmente do barorreflexo e do quimiorreflexo, que são responsáveis por controlar a pressão arterial e a frequência cardíaca a curto prazo (Spyer, 1990). Contudo, quando

desregulados, os reflexos cardiovasculares contribuem com a deterioração em longo prazo da função cardíaca e progressão da IC (Schultz e Li, 2007; Kar e cols., 2011; Del Rio e cols., 2013a; Gronda e cols., 2014; Marcus e cols., 2014; Toschi-Dias e cols., 2017).

Os quimiorreceptores periféricos estão localizados bilateralmente na bifurcação da artéria carótida comum (quimiorreceptores carotídeos) ou em pequenos corpúsculos espalhados entre o arco aórtico e a artéria pulmonar (quimiorreceptores aórticos) (Comroe, 1939; Sapru e Krieger, 1977). São estruturas especializadas em detectar alterações na pressão parcial de oxigênio ( $pO_2$ ), na pressão parcial de gás carbônico ( $pCO_2$ ) e na concentração de íons hidrogênio (pH) do sangue (Heymans e Bouckaert, 1930; Biscoe, 1971). Quando estimulado, o quimiorreflexo induz ajustes cardioventilatórios, caracterizados pelo aumento da pressão arterial e intensa bradicardia (Urbanski e Sapru 1988; Spyer, 1990; Dampney, 1994) além de aumento na frequência e amplitude respiratória, que tem como objetivo normalizar a  $PO_2$  do sangue arterial (Heymans e Bouckaert, 1930). Assim, o SNC desempenha importante papel na manutenção do fluxo sanguíneo, a fim de garantir adequada perfusão a todos os tecidos, através de mecanismos integrados cardiorrespiratórios.

Recentes estudos na literatura mostram que o aumento da excitabilidade do corpúsculo carotídeo está correlacionado com a diminuição progressiva da função ventricular esquerda, devido à redução da perfusão sanguínea das células glômicas e, portanto, menor aporte de  $O_2$  (Schultz e cols., 2007). Contudo, estudos mostram que não apenas anormalidades no corpúsculo carotídeo, mas também nas suas aferências ou no seu processamento no SNC podem contribuir para o desenvolvimento ou a progressão de doenças cardiovasculares, como a hipertensão

e a IC, pois contribuem para o aumento tônico simpático observado nessas doenças (Ponikowski e cols., 2001; Schultz e cols., 2013; Del Rio e cols., 2013a; Toschi-Dias e cols., 2017).

O aumento da sensibilidade do corpúsculo carotídeo na IC contribui para a geração de oscilações periódicas no padrão respiratório, com episódios de apneia e hiperventilação (Ponikowski e cols., 1999; Marcus e cols., 2014). A respiração oscilatória e as apneias centrais podem produzir hipóxia intermitente e contribuir para a maior sensibilização do corpúsculo carotídeo na IC, resultando em aumento da atividade simpática (Fung e cols., 2014). A modulação da atividade dos quimiorreceptores periféricos, através da suplementação com O<sub>2</sub>, pode reduzir ou abolir padrões respiratórios anormais e reduzir a atividade simpática (Ponikowski e cols., 1999; Xing e cols., 2014). Da mesma forma, a ablação do corpúsculo carotídeo reduz significativamente o tônico simpático, levando à melhora da função cardíaca e significativa redução da mortalidade dos animais com IC, sendo, portanto, uma opção no tratamento de pacientes com IC (Del Rio e cols., 2013b; Marcus e cols., 2014).

Estudos mostram que indivíduos com IC apresentam elevada produção de Ang II no corpúsculo carotídeo assim como elevada expressão do receptor AT<sub>1</sub> (Li e cols., 2006; Schultz, 2011). Schultz e cols. (2015) sugerem que o aumento da excitabilidade das células glômicas seja devido ao aumento do estresse oxidativo resultante dos elevados níveis circulantes e locais de Ang II, que contribuem para a maior atividade aferente e, conseqüentemente, maior ativação dos centros cardioventilatórios. Por outro lado, Ang-(1-7) reduz a excitabilidade dessas células por aumentar os níveis de nNOS, que se encontram reduzidos no corpúsculo

carotídeo de animais com IC, assim como no PVN, tendo, portanto, papel oposto ao da Ang II (Schultz e cols., 2015).

Anormalidades no processamento central do quimiorreflexo também contribuem com o aumento da atividade simpática e envolvem o PVN (Reddy e cols., 2007). De forma interessante, a microinjeção de um inibidor da NO sintase no PVN aumentou a resposta simpática causada pela estimulação dos quimiorreceptores com cianeto de potássio (KCN) em ratos sham, mas não teve qualquer efeito em animais com IC. Por outro lado, a microinjeção de um doador de NO no PVN de animais com IC atenuou a resposta simpatoexcitatória do quimiorreflexo em ratos sham e em menor extensão nos ratos com IC, sugerindo que o NO no PVN desempenha um importante papel no processamento do quimiorreflexo e que animais com IC apresentam comprometimento da função do NO no PVN, o que contribui para uma resposta quimiorreflexa aumentada e, conseqüentemente, elevação da atividade simpática (Reddy e cols., 2007).

Estudos do nosso laboratório demonstraram que animais com deleção genética do receptor Mas apresentam aumento das respostas cardiovasculares à estimulação do quimiorreflexo (de Moura e cols., 2010). Considerando que animais com IC apresentam redução da expressão do receptor Mas no PVN (Zheng e cols., 2011), pode-se inferir que, na IC, a redução da expressão do receptor Mas possa contribuir para o aumento da resposta simpatoexcitatória do quimiorreflexo, resultando em desbalanço autonômico e hiperatividade simpática.

Além dos quimiorreceptores, outro mecanismo de controle neural da pressão arterial que tem sido relacionado de forma importante à hiperatividade simpática durante a IC são os barorreceptores arteriais (Toschi-Dias e cols., 2017). Os barorreceptores são terminações nervosas livres, densamente ramificadas que estão

localizados na bifurcação da artéria carótida comum e no arco aórtico, distribuídos na camada adventícia desses grandes vasos, sendo que o seu principal mecanismo de ativação é a deformação mecânica das terminações neurais, decorrentes da distensão da parede vascular (Kirchheim, 1976). Elevação súbita da pressão arterial leva à ativação dos barorreceptores arteriais, causando redução da atividade tônica simpática e aumento da atividade vagal, resultando em redução da resistência periférica vascular, da frequência cardíaca e do débito cardíaco, o que contribui para o retorno da pressão arterial aos níveis normais (Heymans e Neil, 1958).

Ao contrário do que ocorre nos quimiorreceptores, a sensibilidade dos barorreceptores periféricos é reduzida tanto em humanos como em animais com IC e a perda da modulação inibitória pelos barorreceptores tem sido associada com o aumento sustentado da atividade simpática nessa condição (DiBona e Sawin, 1995; Gao e cols., 2005; Zucker *et al.*, 2007, Gronda e cols., 2014). Existem evidências de que em condições de hiperatividade simpática os reflexos mediados pelo sistema nervoso parassimpático são atenuados (Higgins e cols., 1972). No estudo de Higgins e cols. (1972) foi observado que o aumento de pressão arterial induzido pela injeção de fenilefrina foi igual entre cães normais e cães com IC, porém, os animais com IC exibiram uma resposta bradicárdica barorreflexa profundamente atenuada. Os mecanismos responsáveis por essa disfunção ainda não foram completamente elucidados, podendo ser causada por alterações no próprio barorreceptor como também no processamento central das suas aferências. Wang e cols. (1990) mostraram que o nervo do seio carotídeo de animais com IC induzida por estimulação contínua do marcapasso possui diminuição significativa da frequência de descarga, além de aumento no limiar de pressão necessário para que houvesse o disparo. Isso pode ser decorrente da perda de elasticidade da parede vascular na

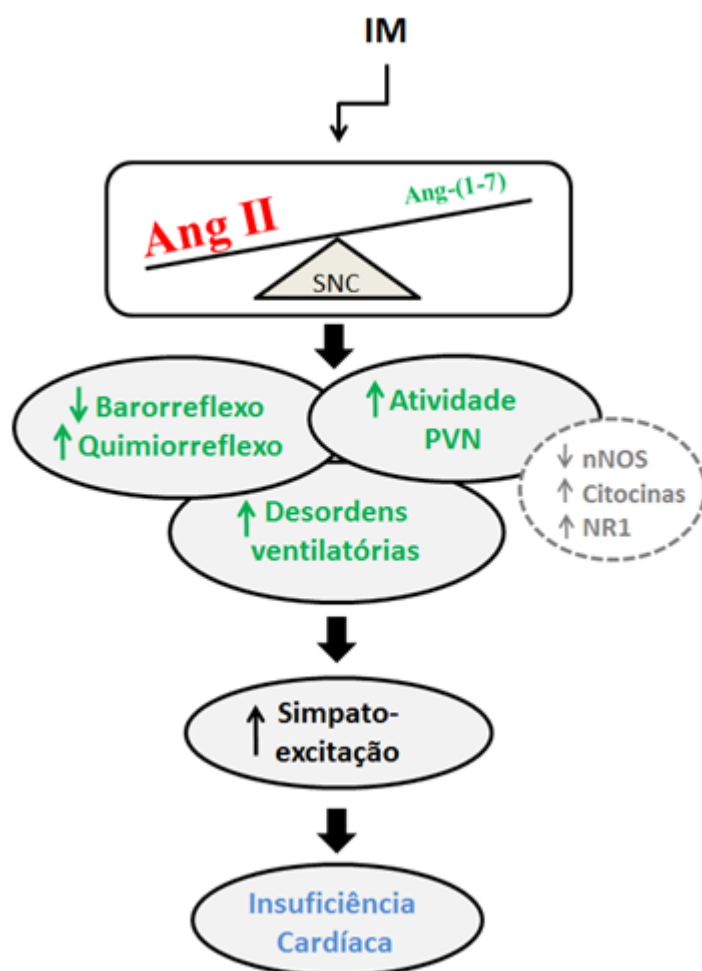


área do seio carotídeo, provocada pelo aumento do conteúdo de sódio da parede vascular, levando à redução da distensibilidade da parede arterial, causando rigidez vascular e, conseqüentemente, reduzindo a ativação dos barorreceptores durante alterações da pressão arterial (Zelis e cols., 1970).

Assim como no quimiorreflexo, a sensibilidade barorreflexa também pode ser alterada por fatores neurohumorais, como Ang II e vasopressina, que podem modular as respostas reflexas, atuando no sistema nervoso central ou periférico (Irigoyen e Krieger, 1998). Em condições basais, sabe-se que, no cérebro, a Ang II atua reduzindo a sensibilidade do barorreflexo, enquanto a Ang-(1-7) tem ação contrária, ou seja, facilita o barorreflexo (Campagnole-Santos e cols., 1992; Santos e cols., 2018). DiBona e cols. (1995) mostraram que a hiperatividade do eixo ECA/Ang II/AT<sub>1</sub> central e periférico contribui com a redução da sensibilidade do barorreflexo e com o aumento da atividade simpática em animais com IC, pois o bloqueio do receptor AT<sub>1</sub>, com losartan intravenoso ou intracerebroventricular, melhorou o controle barorreflexo da atividade simpática. Sobre o eixo contrarregulatório, a Ang-(1-7) atua melhorando a sensibilidade do barorreflexo em animais com IC, como demonstrado por Kar e cols. (2011), que observaram que o tratamento intracerebroventricular com Ang-(1-7) aumentou o ganho barorreflexo, sendo esse efeito revertido pelo tratamento com A-779. Sendo assim, na IC a redução da sensibilidade barorreflexa resulta em aumento da atividade simpática.

Tendo em vista a alta incidência de mortes por problemas cardiovasculares, torna-se importante o melhor entendimento das vias e dos mecanismos centrais ativados após o IM para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas que ajudem no tratamento da IC. Dessa forma, tendo como base todos os trabalhos citados acima e o fato de que não estão ainda completamente estabelecidos os

efeitos diretos do aumento central de Ang-(1-7) sobre as alterações autonômicas, neuro-humorais e cardiovasculares em animais com IC, parte deste estudo teve como objetivo esclarecer e complementar os dados já existentes em relação às ações centrais da Ang-(1-7) sobre a modulação da atividade cardioventilatória (basal e reflexa) e autonômica de animais com IC. Além disso, também avaliamos o papel da Ang- (1-7) sobre a atividade dos neurônios do PVN. A hipótese desse estudo é que a Ang-(1-7), infundida cronicamente no ventrículo lateral cerebral, é capaz de atenuar/contrarregular os efeitos causados pela Ang II, contribuindo para a redução da simpatoexcitação de animais com IC induzida pelo infarto agudo do miocárdio, através da modulação dos mecanismos excitatórios e/ou inibitórios que controlam a atividade dos neurônios do PVN.



**Figura 1** - Representação esquemática das alterações induzidas pelo aumento dos níveis centrais de Ang II observadas após o infarto do miocárdio que resultam no aumento da atividade nervosa simpática e no desenvolvimento da insuficiência cardíaca. IM - infarto do miocárdio; SNC - sistema nervoso central; PVN - núcleo paraventricular do hipotálamo; nNOS - óxido nítrico sintase neuronal; NR1 - subunidade do receptor glutamatérgico NMDA.

## **II. OBJETIVOS**

O objetivo geral desse estudo foi avaliar os efeitos do aumento central crônico dos níveis Ang-(1-7) sobre as alterações cardiovasculares, autonômicas e ventilatórias de ratos com insuficiência cardíaca induzida por infarto agudo do miocárdio, e investigar se seus efeitos ocorrem através de mecanismo dependente de NO, receptores NMDA e/ou citocinas pró-inflamatórias no PVN. Para atingir esse objetivo, avaliamos se a infusão central crônica de Ang-(1-7) em animais com IC altera:

- a taxa de sobrevivência;
- a morfologia cardíaca;
- a função cardíaca *in vivo* e *ex vivo*;
- os parâmetros cardiovasculares e ventilatórios basais;
- os reflexos cardiovasculares (barorreflexo e quimiorreflexo);
- o tônus autonômico cardíaco;
- a atividade nervosa simpática renal;
- a ativação dos neurônios do PVN;
- a expressão do receptor NMDA no PVN;
- a atividade da enzima nNOS no PVN;
- os níveis da citocina pró-inflamatória IL-1 $\beta$  no PVN.

### **III. MATERIAL E MÉTODOS**

### 3.1. Animais

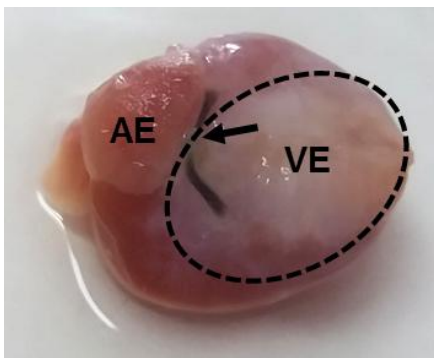
Para a execução deste trabalho foram utilizados ratos Wistar machos pesando entre 240-280g, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB-UFMG). Os animais foram mantidos em gaiolas para roedores (5 animais/gaiola), em ambiente adequado com temperatura e ciclo claro-escuro controlados, além disso, tiveram livre acesso a ração para roedores (Nuvilab) e água. Os animais foram divididos em 3 grupos experimentais: sham tratado com salina (grupo sham salina), insuficiência cardíaca tratado com salina (grupo IC salina) e insuficiência cardíaca tratado com Angiotensina-(1-7) (grupo IC Ang-(1-7)). Todos os procedimentos realizados neste estudo foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA 236/2017).

### 3.2. Procedimentos cirúrgicos

Inicialmente os animais foram submetidos à indução do infarto agudo do miocárdio e, após 3 semanas, foi realizado o exame ecocardiográfico para avaliar se os mesmos desenvolveram insuficiência cardíaca. Após a avaliação ecocardiográfica, os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implante intracerebroventricular de minibomba osmótica contendo Ang-(1-7) ou salina, cujo período de infusão foi de 4 semanas. A primeira parte dos experimentos consistiu na avaliação da atividade ventilatória e foi realizada 46 dias após a indução do infarto. A canulação da artéria e veia femoral foi feita no dia 47, sendo o registro dos parâmetros cardiovasculares obtidos nos dias 48 e 49, assim como os experimentos de avaliação da função cardíaca *in vivo* e *ex*



o quarto espaço intercostal foi realizada com o auxílio de uma pinça hemostática. O pericárdio foi localizado e removido cuidadosamente e, em seguida, o coração foi exteriorizado pela compressão lateral do tórax. O ramo descendente anterior da artéria coronária esquerda foi rapidamente localizado e ligado a aproximadamente 2 mm da sua origem, entre a borda do átrio esquerdo e o sulco da artéria pulmonar, com fio de sutura de seda 4-0 (Ethicon 790G, Johnson & Johnson) causando a oclusão do vaso (Figura 2).



*Figura 2 - Coração representativo de um animal do grupo infartado mostrando o local da oclusão da artéria coronária esquerda, indicado pela seta, e a área do ventrículo esquerdo infartada, indicada pela linha tracejada. AE - átrio esquerdo; VE - ventrículo esquerdo.*

Após a ligadura, o coração foi rapidamente reposicionado, o espaço entre as costelas foi fechado assim como o tórax foi suturado com fio de seda 4-0. Essa técnica tem sido amplamente utilizada para a indução do infarto do miocárdio por causar uma lesão transmural, caracterizada por necrose isquêmica envolvendo praticamente toda a espessura da parede ventricular esquerda (Zornoff e cols., 2009; Wu e cols., 2011). Animais controle (Sham) foram submetidos ao mesmo procedimento descrito acima, no entanto não foi realizada a ligadura da coronária. Após a extubação os animais foram mantidos em uma manta aquecida sob constante supervisão até a completa recuperação da anestesia. Foi administrado nos animais um analgésico (Cloridrato de tramadol 2 mg/kg, via subcutânea) por 3 dias consecutivos. Além disso, os animais também receberam antiinflamatório (Banamine injetável 1,1 mg/kg, via subcutânea) e antibiótico de amplo espectro (Pentabiótico veterinário para



animais de pequeno porte 2,5 mg/kg, via intramuscular), sendo este último administrado no dia da cirurgia e repetido após uma semana.

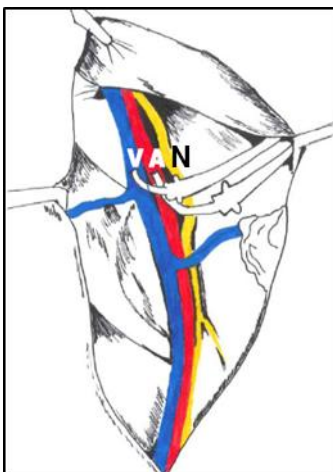
### **3.2.2. Cirurgia de implante da mini-bomba osmótica no ventrículo lateral cerebral**

A infusão intracerebroventricular crônica de Ang-(1-7) (0,4mg/mL) ou salina estéril (NaCl 0,9%) foi realizada no ventrículo lateral cerebral direito utilizando mini-bombas osmóticas (Alzet modelo 2004) cuja taxa de infusão é de 0,25  $\mu$ L/h durante 28 dias consecutivos. A dose de Ang-(1-7) foi baseada em estudos anteriores do Laboratório de Hipertensão (Campagnole-Santos e cols., 1992; Kangussu e cols., 2015). As cânulas foram confeccionadas a partir de um escalpe de infusão endovenosa (25G). A agulha do escalpe foi dobrada em ângulo de 90° e cortada de maneira que seu comprimento final fosse de aproximadamente 4,5 mm, para que alcançasse em profundidade o ventrículo lateral. A extremidade posterior do escalpe foi conectada a um tubo de silicone de 3 cm de comprimento a fim de fazer a conexão da mini-bomba com a cânula. Tanto a cânula quanto a mini-bomba foram preenchidos com salina estéril ou Ang-(1-7), e mantidas submersas em salina estéril a 37° por 24h antes de serem implantadas no animal, conforme instrução do fabricante. As cânulas foram implantadas em direção ao ventrículo lateral direito, através de cirurgia estereotáxica, três semanas após a cirurgia de indução do infarto do miocárdio, em animais anestesiados com cloridrato de cetamina (50 mg/kg) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg) utilizando as coordenadas obtidas no atlas de Paxinos e Watson (2007), sendo estas: ântero-posterior (AP) -0,8mm; latero-lateral (LL)  $\pm$  1,5mm e dorso-ventral (DV) -4,5mm. Para isso, foi realizada

tricotomia da região dorsal da cabeça e o animal posicionado no aparelho estereotáxico. Através de duas barras auriculares a cabeça do animal foi colocada em posição fixa. Após a assepsia da pele com solução de álcool iodado (1%) foi injetado subcutaneamente na região do escalpo o anestésico local xilocaína contendo vasoconstritor (cloridrato de lidocaína 2% + epinefrina 1:200000), que foi utilizado para evitar sangramento excessivo na região a ser aberta e assim facilitar a localização do bregma. A seguir foi realizada uma incisão longitudinal na pele e tecido subcutâneo expondo a calota craniana. O bregma foi localizado e com o auxílio de uma broca odontológica foram feitos três orifícios na calota craniana, sendo que dois foram utilizados para fixar miniparafusos de aço inox, que serviram de suporte para fixar a cânula ao crânio do animal com uso de resina acrílica auto-polimerizante de uso odontológico. O terceiro orifício foi realizado de acordo com a leitura do bregma e utilizado para o implante da cânula em direção ao ventrículo lateral. O tecido subcutâneo localizado entre as escápulas foi divulsionado para facilitar a acomodação da mini-bomba osmótica. Por fim, a incisão na pele foi suturada e os animais receberam uma dose de antiinflamatório (Banamine 1,1 mg/kg, via subcutânea) e de antibiótico (Pentabiótico veterinário para animais de pequeno porte 2,5 mg/kg, via intramuscular) como medida profilática. Feito isso, os animais foram mantidos em caixas coletivas, em sala com temperatura e luminosidade controladas, com água e ração à vontade, por um período de 28 dias.

### 3.2.3. Canulação da artéria e veia femoral

Após sete semanas da indução do infarto (ou quatro semanas após o implante da mini-bomba osmótica) os animais foram anestesiados com solução de cloridrato de cetamina (50 mg/kg) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg) (ip) e submetidos à cirurgia de canulação da artéria e veia femoral. As cânulas foram confeccionadas a partir de um tubo de polietileno PE-10 (5 cm para a artéria e 2 cm para a veia) fixado a um tubo de polietileno PE-50 (16 cm). Antes de serem implantadas, as cânulas foram preenchidas com solução salina (NaCl 0,9%) e obstruídas na extremidade livre do PE-50 com pinos de metal. Foi realizada tricotomia da região inguinal e da região interescapular do animal seguida de assepsia destes locais com álcool iodado (1%). O animal foi posicionado em decúbito dorsal, tendo as patas traseiras fixadas à mesa cirúrgica. Através de uma pequena incisão na região inguinal, o feixe vâsculo-nervoso femoral foi localizado, os vasos femorais identificados e, cuidadosamente, separados do nervo femoral. A cânula arterial foi inserida na artéria femoral até a aorta abdominal e a cânula venosa inserida na veia femoral (Figura 3).



**Figura 3** - Representação esquemática do feixe vâsculo-nervoso femoral, demonstrando o local de inserção da cânula na artéria (A) e na veia (B) femoral. N - nervo femoral (Modificado de Fortes, 2010).

Em seguida, as cânulas foram conduzidas subcutaneamente com o auxílio de um trocater e exteriorizadas na região interescapular, onde foram suturadas junto à pele, sendo que essa disposição permitiu o registro e a administração de drogas com livre movimentação do animal. Terminado o procedimento, os locais de incisão foram suturados e os animais mantidos em caixas individuais até o dia seguinte para a realização dos experimentos. A cânula arterial foi utilizada para registro direto da pressão arterial e a cânula venosa utilizada para administração sistêmica de drogas.

### **3.3. Registro dos parâmetros ventilatórios basais**

Na sétima semana após a cirurgia de indução do infarto do miocárdio os parâmetros ventilatórios basais foram avaliados pelo método de pletismografia de corpo inteiro para pequenos animais descrito por Bartlett Jr. e Tenney (1970). Inicialmente os animais foram habituados ao sistema de pletismografia (Figura 4) por 2 dias durante 30 minutos, sendo colocados dentro de uma câmara de acrílico transparente (volume 6 litros), ventilados com ar ambiente e com livre movimentação dentro da mesma. Para a realização da medida de ventilação, a câmara foi totalmente vedada por curtos períodos de tempo (2-3 minutos) para evitar alterações no padrão respiratório decorrentes do aumento da pressão parcial de CO<sub>2</sub> dentro da câmara. Os sinais gerados pelas oscilações de pressão causadas pela respiração do animal foram captados por um transdutor de pressão diferencial de alta sensibilidade (ML141 Spirometer, ADInstruments) conectado à câmara. O software de aquisição de dados (PowerLab, ADInstruments) amplificou os sinais captados pelo transdutor e quantificou a amplitude e a frequência dos sinais respiratórios. A calibração do

volume ( $V_k$ ) foi feita por meio da injeção de 1 mL de ar dentro da câmara vedada. A temperatura dentro da câmara pletismográfica assim como a temperatura da sala de experimentação e a pressão barométrica foram monitoradas ao longo do experimento. A temperatura corporal do animal foi medida ao final do registro ventilatório. A frequência respiratória (FR, cpm) foi calculada pelo *software* de aquisição (PowerLab), já o volume corrente ( $V_T$ , mL/kg) e a ventilação minuto ( $V_E$ , mL/kg/min) foram calculados a partir das equações abaixo (Drorbaugh e Fenn, 1955):

$$V_T = V_K \times \frac{P_T}{P_K} \times \frac{T_c (P_B - P_A)}{T_c (P_B - P_A) - T_A (P_B - P_C)}$$

$$V_E \text{ (mL/Kg/min)} = V_T \text{ (mL/Kg)} \times \text{FR (cpm)}$$

Onde:

**VK:** volume de ar injetado na câmara para calibração;

**PK:** deflexão de pressão associada com o volume de ar injetado para calibração;

**PT:** deflexão de pressão associada com cada volume de ar corrente;

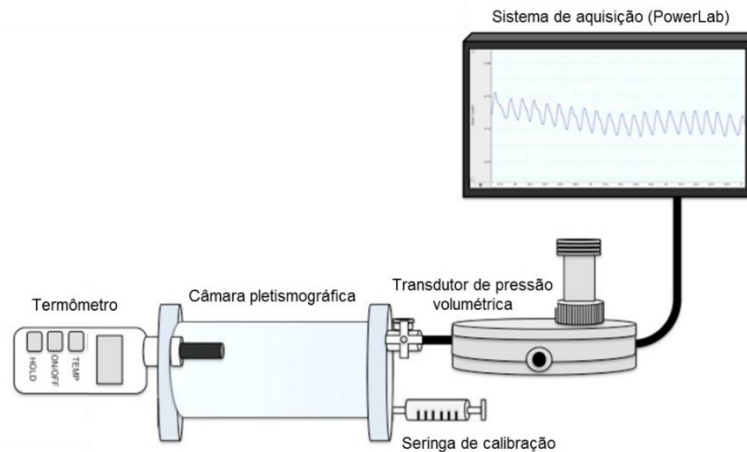
**TC:** temperatura corporal do animal;

**TA:** temperatura do ar dentro da câmara;

**PB:** pressão barométrica;

**PC:** pressão de vapor d'água à temperatura corporal;

**PA:** pressão de vapor d'água à temperatura da câmara.



**Figura 4** - Representação esquemática do sistema de pletorespirometria de corpo inteiro utilizado para registro da atividade ventilatória (Modificado de Lim e cols., 2014).

### 3.4. Registro dos Parâmetros Cardiovasculares

O registro dos parâmetros cardiovasculares foi realizado no dia seguinte ao da canulação, em animais não-anestesiados e com livre movimentação. Após prévia calibração do equipamento, a cânula arterial foi conectada a um transdutor de pressão acoplado a um sistema de aquisição de dados analógico-digital (Biopac Systems, modelo MP 150). Foi utilizado o programa de computador *Acqknowledge* (Biopac Systems) para registro da pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC). Os valores de PAM e FC foram calculados pelo programa de computador a partir dos valores obtidos de PAP. Após um período de adaptação do animal foi iniciado o registro dos parâmetros cardiovasculares basais até a sua completa estabilização. Na sequência, foi realizado os procedimentos para avaliação dos reflexos cardiovasculares e do tônus autonômico cardíaco, conforme descrito no item a seguir. Os parâmetros cardiovasculares foram continuamente registrados ao longo de todo o período de experimento.

### **3.5. Avaliação dos reflexos cardiovasculares e do tônus autonômico cardíaco**

#### **3.5.1. Avaliação da sensibilidade do barorreflexo**

Para aferir a sensibilidade dos barorreceptores foram feitas injeções de fenilefrina (Sigma), potente agonista de receptores  $\alpha$ -1 adrenérgicos, nas concentrações de 2,5, 5,0 e 10,0  $\mu\text{g/mL}$ , injetadas em bôlus (0,1 mL) pela cânula venosa. Entre cada injeção foi dado um intervalo de no mínimo 5 minutos para que a PAM e FC retornassem aos valores basais. A fenilefrina foi utilizada por aumentar a pressão arterial através de vasoconstrição, efeito que provoca acentuada bradicardia reflexa causada pela ativação dos barorreceptores. A sensibilidade barorreflexa foi avaliada relacionando-se as alterações reflexas de FC induzidas pelas alterações transitórias da PAM. As alterações máximas de FC foram convertidas em intervalo de pulso (IP) através da fórmula:  $\text{IP (em milisegundos, ms)} = 60000/\text{FC}$ . Dessa forma, a sensibilidade do barorreflexo foi estimada pela razão entre as alterações de IP (ms) e alterações da PAM (mmHg) para cada dose de fenilefrina utilizada ( $\Delta\text{IP}/\Delta\text{PAM}$ , ms/mmHg), denominado índice de sensibilidade barorreflexa (Campagnole-Santos e cols., 1988).

#### **3.5.2. Avaliação do quimiorreflexo periférico**

Para a estimulação dos quimiorreceptores periféricos foi utilizada solução de KCN (cianeto de potássio) na concentração de 400  $\mu\text{g/mL}$ , injetado em bôlus (0,1 mL) pela cânula venosa cerca de 15 minutos após a ativação dos barorreceptores, ou até que os parâmetros cardiovasculares retornassem aos valores basais. O KCN é descrito na literatura como um potente estímulo para

os quimiorreceptores periféricos, interferindo na utilização tecidual de oxigênio através da inibição da enzima citocromo-oxidase, envolvida na cadeia respiratória (Biscoe e Duchon, 1990; Franchini e Krieger, 1993). Como consequência, ocorre um déficit energético celular associado à indisponibilidade de O<sub>2</sub>, promovendo uma hipóxia citotóxica, o que leva à estimulação das células quimiossensíveis do corpúsculo carotídeo (Gonzales e cols, 1994). Barros e cols. (2002) demonstraram que as respostas cardiovasculares produzidas pela injeção intravenosa de KCN na dose utilizada neste estudo (40µg/0,1mL) foram abolidas após a ligadura bilateral da artéria do corpúsculo carotídeo, indicando que o KCN é um estímulo adequado para a ativação dos quimiorreceptores periféricos.

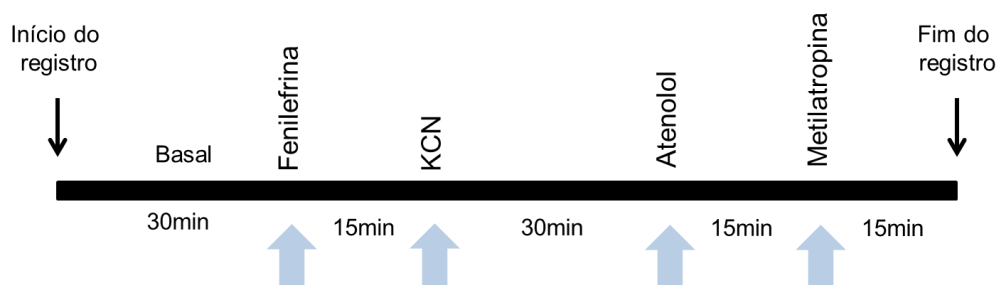
### **3.5.3. Avaliação do tônus autonômico cardíaco**

A atividade autonômica cardíaca foi avaliada através do bloqueio sequencial e por dois dias consecutivos dos receptores muscarínicos e β-adrenérgicos. No primeiro dia de avaliação do tônus autonômico o bloqueio foi realizado cerca de 30 minutos após a avaliação dos reflexos cardiovasculares, ou até que os parâmetros cardiovasculares retornassem aos valores basais. Foi realizado bloqueio dos receptores muscarínicos pela administração de metil-atropina (3 mg/kg, i.v.) e, após um intervalo de 15 minutos, o antagonista não-seletivo dos receptores β-adrenérgicos atenolol (4 mg/kg, i.v.) foi injetado. Logo após, foi aguardado um período de mais 15 minutos para a obtenção do valor da FC intrínseca. No segundo dia de avaliação do tônus autonômico, após o registro dos parâmetros cardiovasculares basais, o bloqueio autonômico foi realizado na ordem inversa à do primeiro dia, respeitando os mesmos

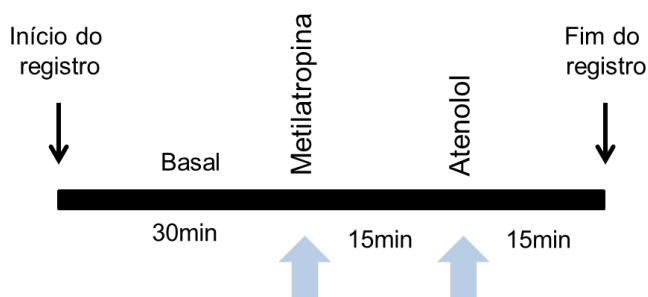


intervalos de tempo para cada injeção. Para o cálculo do tônus parassimpático foi considerada a diferença entre a FC intrínseca (média da FC obtida após a administração dos dois antagonistas em cada dia) e a FC mínima (menor valor de FC obtido após a administração isolada de atenolol), enquanto que para o cálculo do tônus simpático foi considerado a diferença entre a FC máxima (maior valor de FC obtido após a administração isolada de metil-atropina) e a FC intrínseca. Ao final do registro no segundo dia, os animais foram eutanasiados por guilhotinamento para coleta do cérebro e do coração que foram utilizados em análises posteriores (western blot e elisa do PVN e histologia do coração). Os procedimentos descritos até aqui, referentes ao item 3.5, estão resumidos no esquema abaixo.

#### 1° DIA



#### 2° DIA

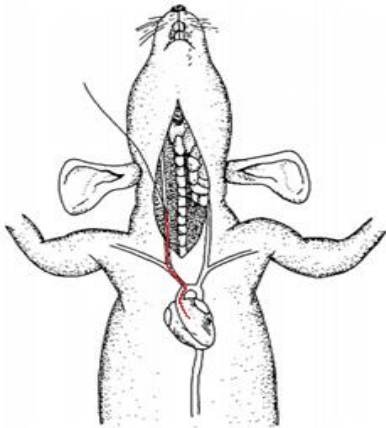


### 3.6. Avaliação ex vivo da função cardíaca no sistema de Langendorff

Para os experimentos de coração isolado, os animais foram previamente heparinizados (heparina sódica 100UI, i.p.) e, após 10 minutos, eutanasiados por decapitação. Foi realizada toracotomia seguida pela rápida remoção do coração, que foi colocado em solução nutritora de *Krebs-Ringer* gelada (4°C). O objetivo do resfriamento é diminuir o metabolismo do miocárdio e o consumo de O<sub>2</sub> nos instantes anteriores à canulação do coração. Em seguida o coração foi dissecado, a aorta ascendente identificada e canulada. A canulação da aorta consistiu em seu acoplamento ao aparato de *Langendorff* (ADInstruments). O tempo gasto do sacrifício até a montagem da preparação foi o menor possível (aproximadamente 3 minutos). Durante todo o registro o coração foi perfundido com volume constante (8 mL/min) 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* (118,4mM NaCl; 4,7mM KCl; 1,2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 2,0mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O; 11,7mM glicose e 26,5mM NaHCO<sub>3</sub>). Um mini-balão de látex foi inserido no ventrículo esquerdo através do átrio esquerdo e da válvula mitral para registrar a pressão sistólica ventricular esquerda (LVSP), pressão diastólica final ventricular esquerda (LVEDP), frequência cardíaca (FC) e dP/dt+ e dP/dt-. Após 30 minutos de estabilização do coração no sistema foi feito um registro basal por mais 30 minutos. Os dados foram adquiridos pelo sistema de aquisição de dados PowerLab, LabChart 7 (ADInstruments). Ao final do registro o coração foi colocado em solução de KCl 10% para garantir que todas as fibras parassem diástole, armazenado em formol 10% por 24h seguido por álcool 70% para, posteriormente, ser realizada a histologia.

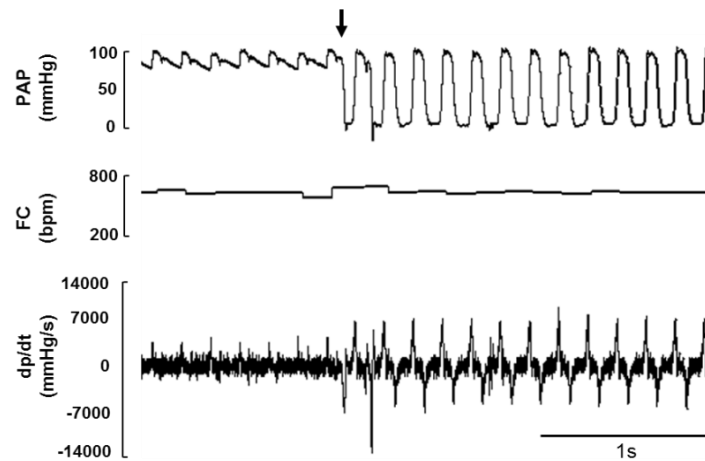
### 3.7. Avaliação in vivo da função cardíaca

Para avaliação da função cardíaca, os animais foram anestesiados com uretana (0,75 g/kg, i.p.). Foi realizada tricotomia e assepsia da região ventral do pescoço, onde foi feita uma pequena incisão, através da qual foi possível ter acesso à artéria carótida direita. Um cateter de polietileno (PE-10), de aproximadamente 5 cm, conectado a outro cateter de polietileno (PE-50), de aproximadamente 30 cm, preenchido com salina foi utilizado para a canulação. A cânula foi cuidadosamente inserida na carótida até atingir o interior do ventrículo esquerdo (Figura 5).



**Figura 5** - Representação esquemática da cirurgia de canulação do ventrículo esquerdo através da artéria carótida direita. Em vermelho o caminho percorrido pela cânula até atingir o ventrículo esquerdo. (Modificado de Smith e cols., 1979).

A extremidade oposta do cateter foi conectada a um transdutor de pressão acoplado ao sistema de aquisição de dados analógico-digital (Biopac Systems MP 150). Através do registro foi possível identificar o momento exato em que a cânula atingiu a luz do ventrículo esquerdo (Figura 6). Os valores de  $dP/dt$  máxima ( $dP/dt+$ ) e  $dP/dt$  mínima ( $dP/dt-$ ) foram coletados após a estabilização do cateter dentro do ventrículo esquerdo e a FC foi calculada a partir do registro da pressão arterial pulsátil. Ao final do registro os animais foram guilhotinados e tiveram o cérebro e o coração retirados para experimentos posteriores.



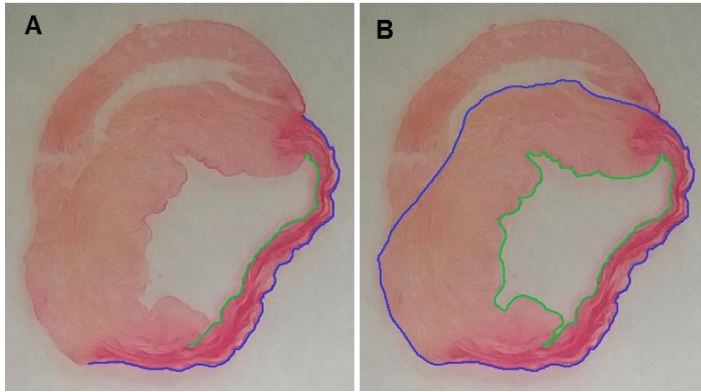
**Figura 6** - Traçado de um registro representativo demonstrando o momento (seta) em que o cateter atinge o interior do ventrículo esquerdo. PAP - pressão arterial pulsátil; FC - frequência cardíaca;  $dp/dt$  – razão entre a derivada de pressão e a derivada do tempo.

### 3.8. Avaliação da hipertrofia cardíaca e da área infartada

A hipertrofia cardíaca foi mensurada através da normalização do peso úmido do coração pelo comprimento da tíbia e também pelo peso corporal de cada animal. Além disso, também foi realizada a análise morfométrica dos cardiomiócitos, através da medida do diâmetro dos mesmos. Assim, após a realização dos experimentos, os animais foram guilhotinados e os corações rapidamente removidos, lavados em salina 0,9% (quando necessário) e colocados em solução KCl 10% gelada, para garantir que todas as fibras cardíacas parassem em diástole. Esse procedimento é importante para a análise do diâmetro dos cardiomiócitos, pois evita que a hipertrofia cardíaca seja subestimada pela medida de fibras que estivessem em sístole. Os corações foram pesados em balança analítica, seccionados próximo ao local onde foi realizada a oclusão coronariana e a porção apical foi colocada em formol 10% por 24h e posteriormente transferida para tubo contendo álcool 70%, onde ficou até que fosse realizada a histologia. A pata esquerda foi

removida para a retirada da tibia, que foi dissecada e medida com o auxílio de um paquímetro para fazer a normalização do peso do coração.

Para a avaliação do diâmetro dos cardiomiócitos, os corações foram desidratados em banhos de concentrações crescentes de álcool, passados por banhos de xilol e emblocados em parafina. Foram feitos cortes histológicos de 5  $\mu\text{m}$ , com espessamento de 40  $\mu\text{m}$  entre cada corte, os quais foram coletados em lâminas de vidro. Para remover a parafina aderida aos cortes, as lâminas foram imersas em banhos de xilol, e hidratadas em banhos com concentrações decrescentes de álcool. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (coloração HE), foram tiradas fotos no aumento de 20x em microscópio de luz e a medida do diâmetro dos cardiomiócitos foi realizada através do *software Image J*. Foram selecionados os cardiomiócitos cortados longitudinalmente, localizados na parede ventricular da região remota ao infarto, que apresentassem núcleo ovalado e centralizado. Foram medidas cerca de 80-100 fibras por coração e o valor final obtido, em  $\mu\text{m}$ , foi igual à média dos valores individuais para cada animal. Para a quantificação da área de infarto, foram realizados os mesmos procedimentos de parafinização, corte e desparafinização descritos acima, no entanto, os cortes foram corados com corante *Picrosirius red*. A área infartada (%VE) foi determinada pela razão entre o tamanho da área infartada pela circunferência total do ventrículo esquerdo, tanto para a região epicardial quanto para a endocardial, incluindo o septo interventricular (Reddy e cols., 2007; Sharma e cols., 2013), conforme demonstrado na Figura 7. O tamanho total do infarto foi calculado pela média aritmética dessas duas regiões e somente os animais que apresentaram infartos maiores que 30% da parede do ventrículo esquerdo foram considerados para análise estatística.



**Figura 7** - Imagem representativa demonstrando a área de infarto do ventrículo esquerdo. **A** - medida da área infartada na porção epicardial (linha azul) e endocardial (linha verde) do ventrículo esquerdo; **B** - medida

da área circunferência total do ventrículo esquerdo na porção epicardial (linha azul) e endocardial (linha verde).

### 3.9. Registro da atividade do nervo simpático renal

Para registro da atividade do nervo simpático renal (RSNA), os animais foram anestesiados com uretana (0,75g/kg, i.p.). A temperatura corporal foi mantida em 37°C durante todo o experimento. A traquéia foi canulada através de uma pequena incisão na superfície ventral do pescoço, possibilitando a aspiração endotraqueal, caso necessária, para manter as vias aéreas livres. Os animais tiveram o flanco lateral esquerdo tricotomizado e uma área delimitada entre a última costela e a pata traseira foi exposta após a retirada da pele. Em seguida, a musculatura da região retroperitoneal foi divulsionada até a localização do rim esquerdo. Com o auxílio de uma lupa o nervo renal foi cuidadosamente localizado, isolado e colocado em eletrodos bipolares para registro da sua atividade através do sistema PowerLab (ADInstruments). O nervo renal foi escolhido pelo fato de representar medida do fluxo neuronal simpático da medula espinhal que inerva um dos maiores leitos vasculares no rato, o fluxo sanguíneo abdominal/mesentérico. Dentro do campo cirúrgico foi adicionado óleo mineral a aproximadamente 37,5°C, para evitar ressecamento do nervo e também para isolar a captação do sinal dos nervos de ruídos

externos. Após período de estabilização foi realizado o registro basal do nervo simpático renal por aproximadamente 1h. Por fim os animais foram eutanasiados com sobredose de uretana e foi realizado o registro do nervo renal por aproximadamente 15 minutos a fim de registrar o ruído do sistema que, durante a análise dos dados, foi subtraído do resultado.

### **3.10. Imunohistoquímica para fosB no PVN**

Animais dos 3 grupos estudados (sham salina, IC salina e IC Ang-(1-7)) tiveram os cérebros removidos e utilizados em experimentos de imunohistoquímica para avaliar a expressão da proteína fosB, um marcador de ativação neuronal crônica, no PVN. Para isso os animais foram profundamente anestesiados com tiopental e perfundidos com 100 mL de tampão fosfato (PB 0,1M pH 7,4) contendo 0,1% de heparina concentrada (5.000 U.I./mL), seguido pela perfusão de 400 mL de paraformaldeído 4% (PFA) em PB 0,1M, ambos na taxa de 10 mL/min. Após a perfusão, os cérebros foram retirados e colocados em PFA 4% *overnight* na geladeira sendo, então, transferidos para solução de sacarose 30% em PB 0,1M, onde ficaram por 48h na geladeira. Posteriormente, foram realizados cortes de 40 µm na região do PVN em criostato de congelamento. Resumidamente, os cortes foram lavados 5 vezes de 5 minutos com PB 0,1M e incubados com solução contendo peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% em PB 0,1M) para o bloqueio das peroxidases endógenas. As ligações inespecíficas foram bloqueadas com solução contendo 1% de soroalbumina bovina (BSA) e 0,1% de Triton x-100 em PB 0,1M, por 2 horas. Os cortes foram incubados, *overnight* a 4°C sob agitação, com anticorpo primário *mouse* anti-Fos B (1:1000; Abcam ab11959). No dia seguinte foram

lavados com PB 0,1M e incubados por 2 horas sob agitação em temperatura ambiente com anticorpo secundário *goat anti-mouse* biotilado (1:500; Vector BA-9200). Em seguida os cortes foram lavados e incubados com solução ABC (1:100, Kit ABC Vectastain, Vector Laboratories), por 2 horas em temperatura ambiente. A imunorreatividade foi visualizada pela subsequente incubação em solução contendo diaminobenzidina (DAB 0,05%; Sigma) por aproximadamente 10 minutos. Os cortes foram mais uma vez lavados, montados em lâminas de vidro, desidratados em banhos de concentrações crescentes de álcool e passados por banhos de xilol. O número de neurônios fosB positivos foi contado em imagens capturadas em microscópio (Olympus BX50) no aumento de 10x, utilizando o programa *Image J*.

### **3.11. Atividade da NADPH-diaforase como um marcador da atividade da nNOS no PVN**

A técnica histoquímica para avaliação da atividade da NADPH-diaforase (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato diaforase), utilizando azul de nitrotetrazólio como cromógeno, permite localizar células que expressam a enzima NOS no sistema nervoso, ou seja, com essa técnica é possível identificar a distribuição de neurônios que produzem NO. Isso é possível porque, na existência da enzima nNOS, ocorre a redução do azul de nitrotetrazólio na presença de  $\beta$ -NADPH ( $\beta$ -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido), que são os dois principais reagentes utilizados nessa técnica, dando origem ao formazan, que é insolúvel e possui cor azul, causando a evidência neuronal (Hope e cols., 1991). Para essa avaliação, os animais foram profundamente anestesiados com tiopental, perfundidos, os cérebros



foram removidos e cortados em criostato de congelamento, conforme descrito no item 3.10. O ensaio histoquímico foi realizado de acordo com Zheng e cols. (2005). Os cortes foram lavados em tampão fosfato 0,1M (pH 7,4) e incubados em solução contendo 0,3% Triton X-100, 0,1 mg/mL de azul de nitrotetrazólio (Sigma) e 1,0 mg/mL de  $\beta$ -NADPH (Sigma) em PB 0,1M, por 90 minutos na estufa a 37°C. Após a reação, os cortes foram novamente lavados em tampão fosfato e montados em lâminas de vidro. A presença de NADPH-diaforase no PVN foi examinada em microscópio de luz (Olympus BX50), no aumento de 10x, e o número de células com marcação positiva foi contado por meio do programa *Image J*.

### **3.12. Micropunch do PVN**

Os *micropunches* do PVN foram realizados para o isolamento do núcleo, que foi utilizado posteriormente nos experimentos de *western blot* e Elisa. Para isso, os animais foram decapitados, os cérebros rapidamente removidos e congelados em nitrogênio líquido. Seis fatias coronais sequenciais do cérebro (100  $\mu$ m) foram obtidas na região do PVN em criostato de congelamento. O isolamento do núcleo foi realizado através de micropunches bilaterias com o auxílio de uma agulha 18G acoplada à uma seringa, conforme descrito por Zheng e cols. (2011) e de acordo com a técnica de Palkovits de microdissecção de núcleos cerebrais. Foram coletados 12 punches por cérebro, que foram armazenados em freezer -80°C até que fossem utilizados.

### 3.13. Análise por western blot do receptor NMDA (NR1) no PVN

A expressão proteica do receptor NMDA foi avaliada nos *punches* de PVN dos três grupos experimentais (sham salina, IC salina e IC Ang-(1-7)). Para isso, as amostras foram homogeneizadas em 50 µL de tampão de lise (Tris-HCl 50mM, NaCl 150mM, EDTA 1mM, Triton x-100 1%, Deoxicolato de sódio 1%, SDS 1% - pH 7,4) contendo coquetel inibidor de proteases (Sigma). O processo de homogeneização foi realizado por 3 vezes de 5 segundos com intervalo de 30 segundos entre cada ciclo, em gelo. Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 14000 rpm por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi pipetado e o pellet descartado. Foi construída uma curva padrão com diferentes concentrações de soroalbumina bovina (0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 mg/mL) que foi utilizada para quantificar o conteúdo proteico do sobrenadante, através de leitura das absorbâncias em espectrofotômetro a 595nm (método de Bradford). Amostras contendo 50µg de proteínas foram solubilizadas em tampão de Laemmli, aquecidas a 95°C por 5 minutos e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) para separação das proteínas de acordo com o seu peso molecular. Logo após, foi realizada a transferência das proteínas do gel para membrana PVDF (fluoreto de polivinilideno, Millipore Immobilon-P<sup>SQ</sup>) com corrente de 100V, durante 1 hora e 40 minutos a 4°C. O bloqueio de ligações inespecíficas foi realizado por meio de uma solução de leite em pó desnatado (5%) diluído em tampão TBS-T (NaCl 160mM, Tris 20M e 1% Tween 20) por 2h com agitação constante. A membrana foi lavada por 3 vezes de 10 minutos em TBS-T e incubada *overnight* com o anticorpo primário anti-NMDAR1 feito em coelho (1:1000, Abcam ab68144), à 4°C sob agitação. No dia seguinte, a membrana foi lavada 3 vezes em TBS-T e incubada com o

anticorpo secundário anti-rabbit IgG (1:5000, Abcam A0545) por 2h em temperatura ambiente com agitação constante. Após ser lavada novamente, a membrana foi revelada por quimioluminescência de acordo com as instruções do fabricante (ECL Prime Western Blotting System, GE *Healthcare*).  $\beta$ -actina foi utilizada como controle. A expressão proteica do receptor NMDA foi quantificada por densidade óptica utilizando o programa *Image J* e os valores expressos como unidades arbitrárias em relação à expressão de  $\beta$ -actina.

### **3.14. Avaliação da expressão de IL-1 $\beta$ no PVN**

A quantificação dos níveis da citocina IL-1 $\beta$  foi realizada no PVN sete semanas após a indução do IM. Pelo fato do PVN ser um núcleo pequeno, a pequena quantidade de tecido permitiu a avaliação de apenas uma citocina. O isolamento do PVN foi realizado por *micropunch* conforme descrito no item 3.13. As amostras de tecido foram pesadas e homogeneizadas em solução adequada para extração de citocinas, contendo inibidor de protease preparada a partir de uma solução de PBS (NaCl 0,4 M; Tween 20 0,05%; Albumina de soro bovino (BSA) 0,5%; Fluoreto de fenilmetilsufonila (PMSF) 0,1mM; Cloreto de benzetônio 0,1 mM; EDTA 10 mM; 20  $\mu$ L de aprotinina). Para cada 5 mg de tecido foi adicionado 50 $\mu$ L de solução para o processo de homogeneização. O homogenato foi centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e estocado a -80°C até o uso. O kit ELISA para dosagem da citocina IL-1 $\beta$  foi obtido da R&D Systems (Minneapolis, USA). O ensaio foi feito em placas de 96 poços (Nunc. Immunosorb, Naperville, Illinois, USA), onde inicialmente foram adicionados 25  $\mu$ L/poço do anticorpo de captura, sendo a incubação mantida por *overnight* a 4°C. Posteriormente, o

anticorpo de captura foi descartado e a placa foi lavada três vezes com PBS/Tween 0,1%. A etapa seguinte consistiu na adição de 100 µl/poço de solução de bloqueio (BSA 1%), seguida de incubação por duas horas. Após o bloqueio houve nova etapa de lavagem das placas e 25µL de cada amostra e a curva padrão (em 7 diferentes concentrações) foram adicionados à placa. As placas foram incubadas *overnight* a 4°C e, posteriormente, lavadas. Em seguida foram adicionados 25 µL/poço de solução de anticorpo de detecção, biotinilado e específico para cada molécula, seguida de incubação de duas horas e uma etapa de lavagem. Transcorrida essa etapa, foram adicionadas a cada placa uma solução contendo estreptavidina ligada à peroxidase. Após 30 minutos, a placa foi novamente lavada e foi adicionado o tampão substrato contendo Dicloridrato de o-fenilenodiamina (OPD) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Após cerca de 30 minutos, a reação foi interrompida com 50 µL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 1M. A leitura das placas foi feita utilizando um leitor de placas a 492 nm (Thermo Plate reader) e a concentração de IL-1β referente a cada amostra foi calculada a partir da curva padrão correspondente.

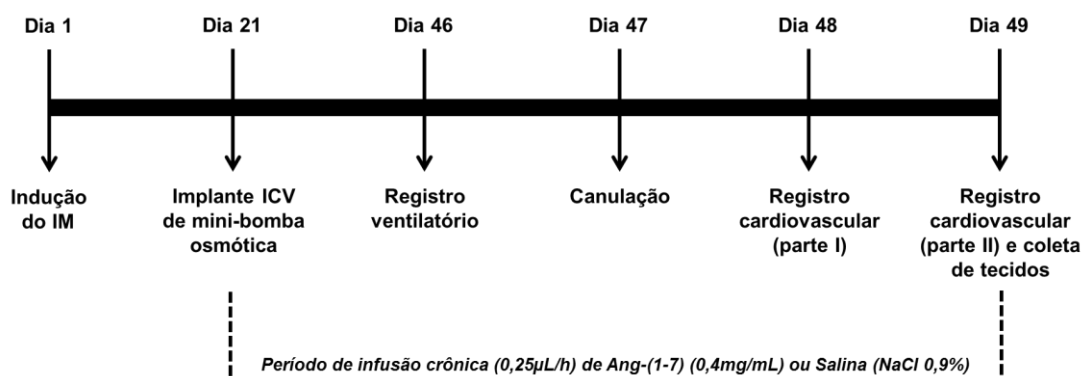
### **3.15. Análise Estatística**

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média ( $x \pm$  EPM). Para comparação entre grupos foi utilizada a análise de variância de uma via (One-Way ANOVA), seguido do pós-teste de Bonferroni, através do *software GraphPad Prism* (versão 8.0). Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando  $p < 0,05$ .

### 3.16. Protocolos experimentais

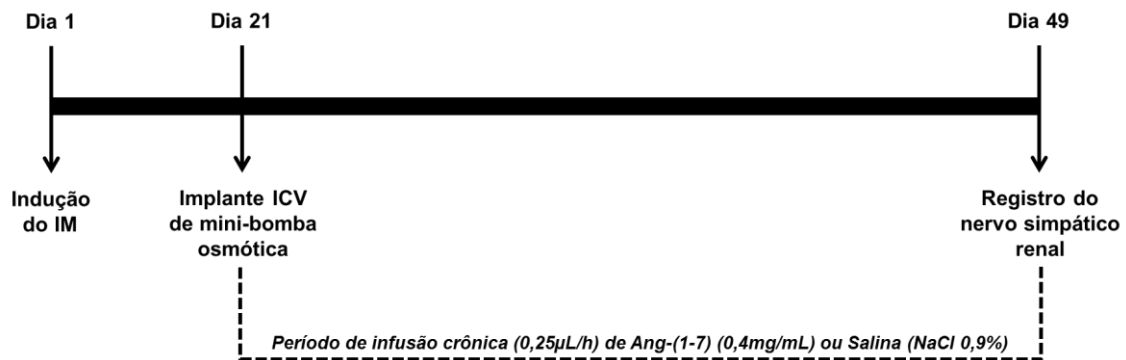
#### **Protocolo 1: Avaliar o efeito da infusão ICV crônica de Ang-(1-7) sobre os parâmetros ventilatórios, os reflexos cardiovasculares e o tônus autonômico cardíaco em modelo animal de IC**

Para este protocolo os animais foram submetidos inicialmente à cirurgia de indução do IM. Após 21 dias foi realizada cirurgia estereotáxica para implante da mini-bomba osmótica no ventrículo lateral cerebral, cujo tratamento com Ang-(1-7), ou o controle salina, durou 28 dias. Antes do término do período de tratamento, os animais foram submetidos à pletismografia de corpo inteiro para avaliação da atividade ventilatória. No dia seguinte, os animais tiveram a artéria e veia femoral canuladas para o registro dos parâmetros cardiovasculares, que foi realizado um dia após a canulação, em animais não-anestesiados. Foram avaliados a PA e FC basais, os reflexos cardiovasculares (barorreflexo e quimiorreflexo) e, por fim, a primeira etapa de avaliação do tônus autonômico cardíaco. No dia seguinte, foi realizado novo registro para completa avaliação do tônus autonômico cardíaco. Ao fim do registro, os animais foram guilhotinados e foi realizada coleta dos cérebros, que foram utilizados nos experimentos de *western blot* e Elisa, e dos corações, que foram pesados e armazenados para posterior análise histológica.



**Protocolo 2: Avaliar o efeito da infusão ICV crônica de Ang-(1-7) sobre a atividade simpática basal em modelo animal de IC**

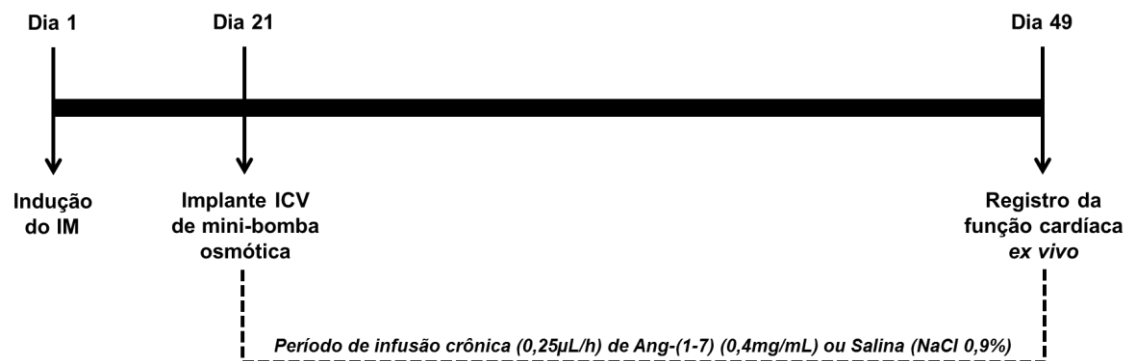
Os animais foram submetidos à cirurgia de indução do IM e, após 21 dias, ao implante da mini-bomba osmótica no ventrículo lateral cerebral, através de cirurgia estereotáxica. O tratamento com Ang-(1-7), ou o controle salina, durou 28 dias. Ao final do tratamento, os animais foram anestesiados com uretana (0,75g/kg, i.p.) e o nervo simpático renal foi isolado para registro da atividade simpática renal basal dos animais. Ao final do registro, os animais foram eutanasiados com sobredose de uretana.



**Protocolo 3: Avaliar o efeito da infusão ICV crônica de Ang-(1-7) sobre a função cardíaca *ex vivo* em modelo animal de IC**

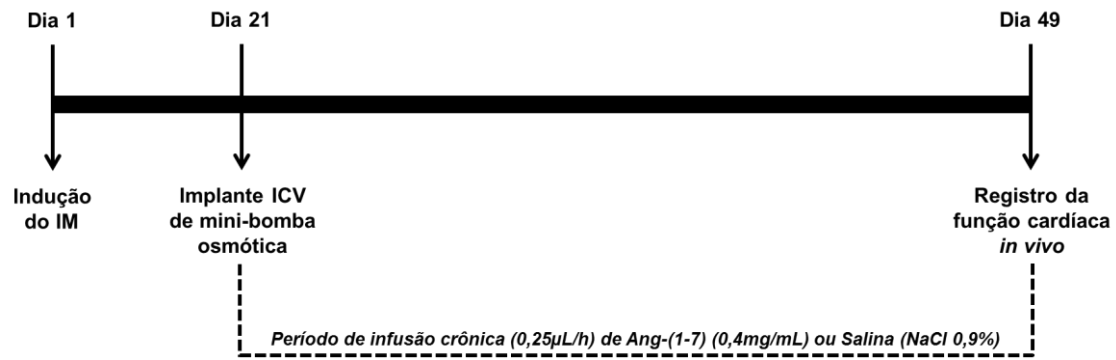
Para este protocolo os animais foram submetidos inicialmente à cirurgia de indução do IM. Após 21 dias foi realizada cirurgia estereotáxica para implante da mini-bomba osmótica no ventrículo lateral cerebral, cujo tratamento com Ang-(1-7), ou o controle salina, durou 28 dias. Ao final do tratamento, os animais foram eutanasiados por decapitação, os corações foram removidos e acoplados ao aparato de Langendorff para avaliação da função cardíaca basal. Os cérebros também foram coletados para, posteriormente, serem utilizados

nos experimentos de *western blot* e Elisa. Ao fim do registro, os corações foram pesados e armazenados para análise histológica.



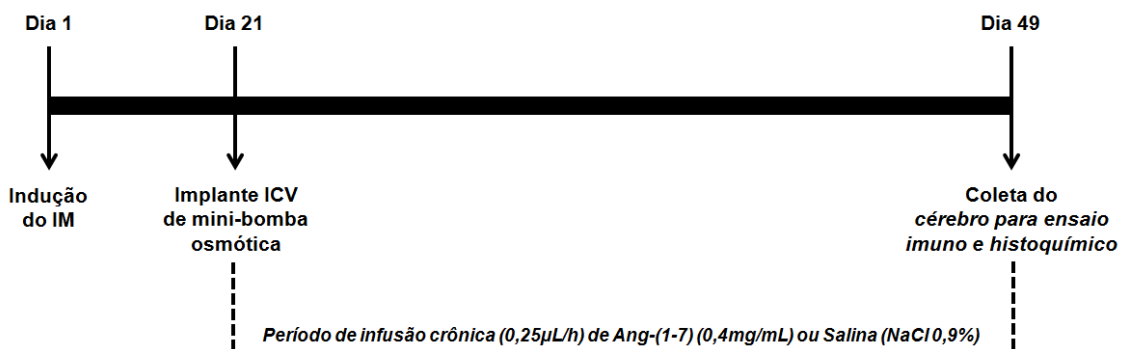
**Protocolo 4: Avaliar o efeito da infusão ICV crônica de Ang-(1-7) sobre a função cardíaca *in vivo* em modelo animal de IC**

Para este protocolo os animais foram submetidos inicialmente à cirurgia de indução do IM. Após 21 dias foi realizada cirurgia estereotáxica para implante da mini-bomba osmótica no ventrículo lateral cerebral, cujo tratamento com Ang-(1-7), ou o controle salina, durou 28 dias. Ao final do tratamento, os animais foram anestesiados com uretana (0,75g/kg, i.p.) e tiveram o ventrículo esquerdo canulado através da carótida direita para registro da função cardíaca basal. Ao final do experimento os animais foram eutanasiados por decapitação e os cérebros coletados e utilizados posteriormente nos experimentos de *western blot* e Elisa.



**Protocolo 5: Avaliar o efeito da infusão ICV crônica de Ang-(1-7) sobre a atividade da enzima nNOS e ativação dos neurônios do PVN em modelo animal de IC**

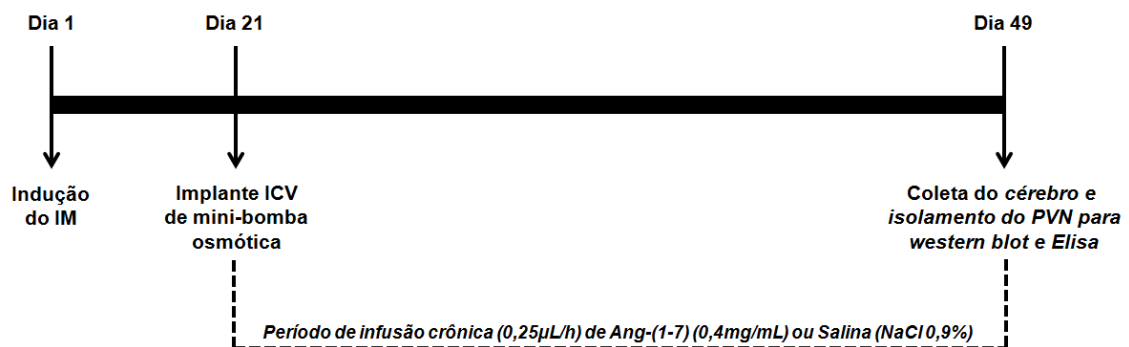
Inicialmente os animais passaram por cirurgia de indução do IM e, após 21 dias, mini-bombas osmóticas foram implantadas no ventrículo lateral cerebral através de cirurgia estereotáxica. O tratamento com Ang-(1-7), ou controle salina, durou 28 dias. Ao final do tratamento, os animais foram anestesiados com tiopental e perfundidos com tampão PB 0,1M seguido de PFA 4%. Os cérebros foram removidos e deixados em sacarose 30% por 48h. Em seguida, os cérebros foram cortados a 40µm em criostato e utilizados em ensaios histoquímicos (para avaliar a atividade da NADPH-diaforase) e imunohistoquímicos (para avaliar a expressão da proteína fosB), ambos no PVN.





**Protocolo 6: Avaliar o efeito da infusão ICV crônica de Ang-(1-7) sobre a expressão proteica do receptor NMDA e sobre os níveis de IL-1 $\beta$  no PVN em modelo animal de IC**

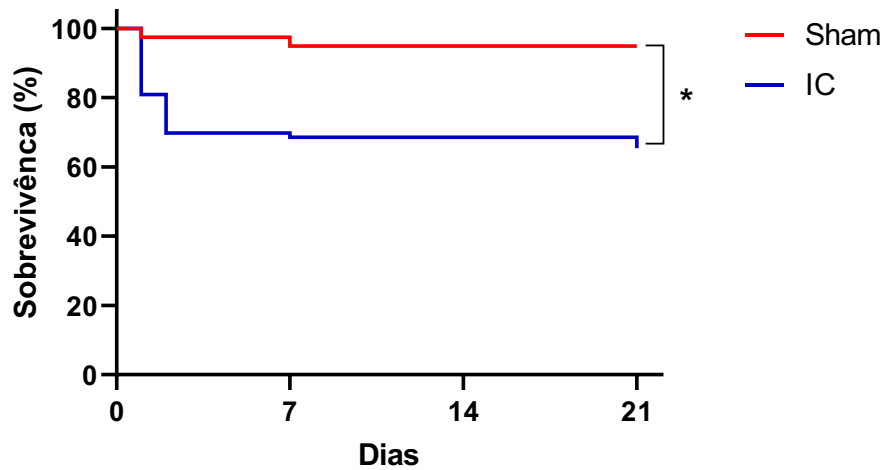
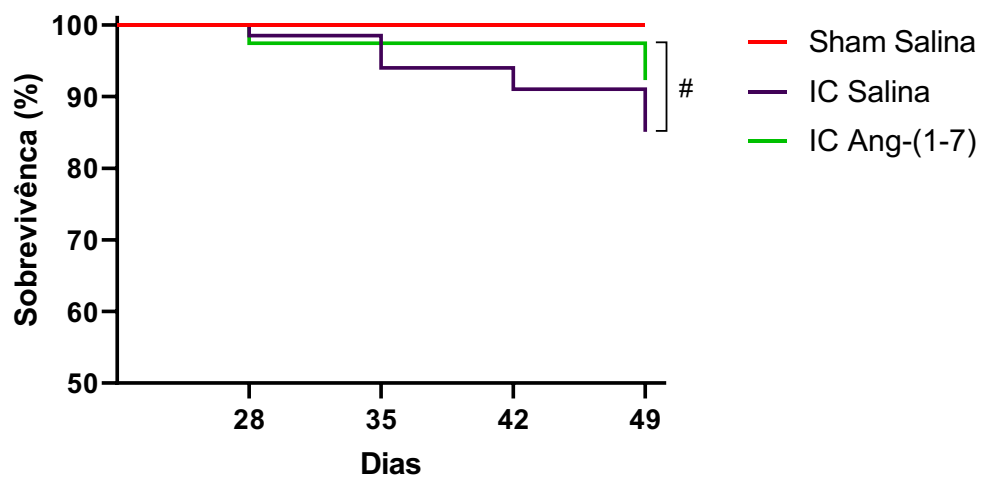
Para este protocolo, os cérebros foram coletados logo após o período de experimentação (7 semanas), ao qual o animal foi previamente submetido. Para isso, os animais foram eutanasiados por decapitação e os cérebros rapidamente removidos e congelados em nitrogênio líquido. Posteriormente, o PVN foi isolado através de *micropunches* bilaterais, em criostato, e armazenado em freezer -80°C até que as análises fossem realizadas. A avaliação da expressão proteica do receptor NMDA foi realizada através da técnica de western blot, enquanto a quantificação da citocina IL-1 $\beta$  no PVN foi realizada por teste Elisa.



## **IV. RESULTADOS**

#### **4.1. Taxa de sobrevivência**

A análise de sobrevivência foi realizada ao longo das sete semanas de estudo. Nas primeiras 3 semanas após o IM, ou seja, antes do início do período de infusão central de Ang-(1-7) ou salina, o percentual de sobrevivência foi de 95% no grupo sham (n=32) e de 65% no grupo IC (n=85) (Figura 8, painel A). O maior número de mortes no grupo IC ocorreu nas primeiras 24h após a indução do infarto (30%). Após o início do tratamento (Figura 8, painel B) a taxa de sobrevivência foi de 85% no grupo IC salina (n=34) e o tratamento com Ang-(1-7) aumentou significativamente a sobrevivência desse grupo para 92% (n=31). Nenhum animal do grupo sham morreu durante o período de tratamento.

**A** - Antes do início da infusão ICV de Ang-(1-7)**B** - Após o início da infusão ICV de Ang-(1-7)

**Figura 8** - Percentual de sobrevivência após o IM em relação ao grupo sham antes do início do tratamento (painel A, sham  $n=32$  e IC  $n=85$ ) e efeito do tratamento central crônico por 28 dias com Ang-(1-7) ( $0,4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) ou salina sobre a taxa sobrevivência (painel B, sham salina  $n=32$ , IC salina  $n=34$  e IC Ang-(1-7)  $n=31$ ). Valores expressos como média  $\pm$  EPM. \* Diferença estatística em relação ao grupo sham salina,  $p<0,05$ . # Diferença estatística em relação ao grupo IC salina,  $p<0,05$ . Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier.

#### **4.2. Características gerais dos grupos avaliados**

As primeiras etapas desse trabalho foram averiguar se os animais submetidos ao infarto do miocárdio apresentavam características cardíacas estruturais e funcionais que caracterizam o modelo de IC e se o tratamento crônico com Ang-(1-7) ICV alterou essas características. A Tabela 1 resume as principais características dos grupos avaliados no presente estudo. Na análise morfométrica do coração, apenas os animais que apresentaram infarto do miocárdio envolvendo mais de 30% da parede do VE foram utilizados neste estudo (Kleiber e cols., 2010; Zheng e cols., 2011; Sharma e cols., 2013). O grupo IC tratado com salina apresentou área infartada média que se estendia por aproximadamente 51% do VE, enquanto o grupo IC tratado com Ang-(1-7) apresentou infarto de cerca de 52% da parede do VE, não havendo diferença estatística entre os dois grupos. Ratos sham não apresentaram danos observáveis no miocárdio. O peso do coração e do pulmão corrigidos tanto pelo peso corporal quanto pelo comprimento da tíbia foram maiores nos grupos IC salina e IC Ang-(1-7) quando comparados ao grupo sham, o que sugere que esses animais desenvolveram hipertrofia compensatória nas regiões não infartadas do miocárdio, além de provável congestão pulmonar. O peso corporal foi similar entre os três grupos ao final das sete semanas de experimento.

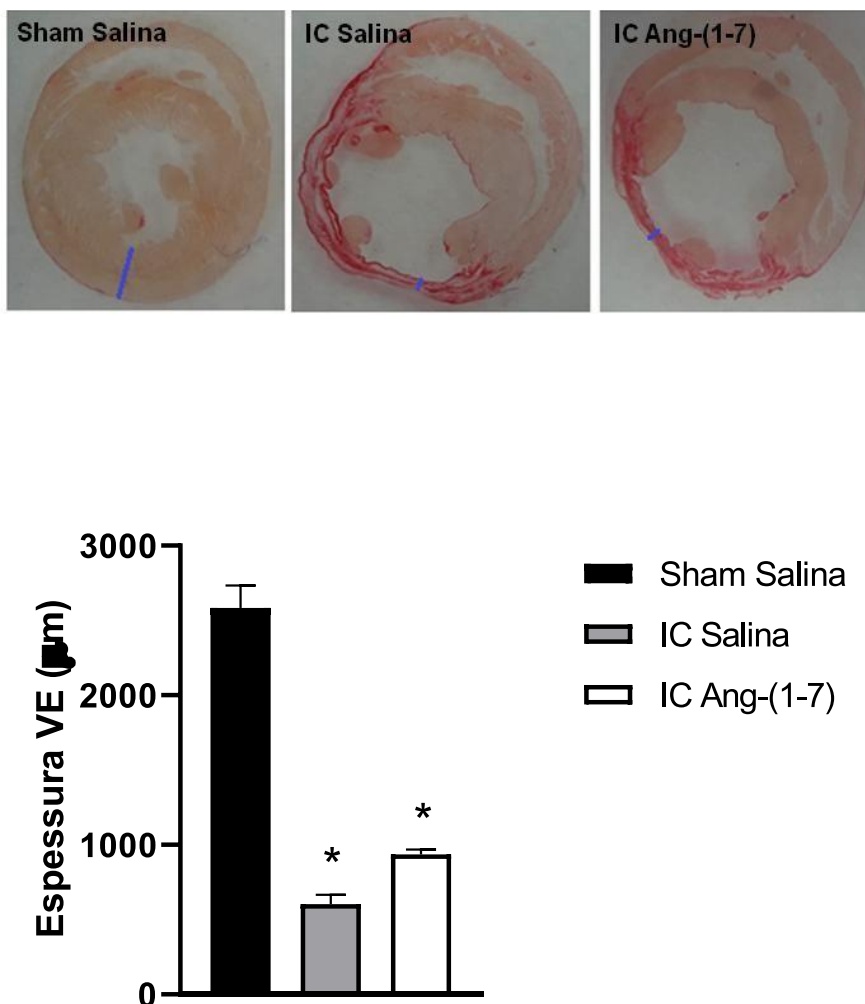
Tabela 1 - Características gerais dos grupos sham e IC tratados ou não com Ang-(1-7)

	Sham Salina	IC Salina	IC Ang-(1-7)
Tamanho Infarto (%VE)	-	51±1	52±3
Peso corporal (kg)	0,387±0,01	0,386±0,01	0,381±0,01
Coração (g)	1,1±0,06	1,7±0,1*	1,5±0,1*
Coração/Tíbia (g/cm)	0,29±0,02	0,43±0,03*	0,38±0,03*
Coração/Peso corporal (g/kg)	2,9±0,1	4,3±0,3*	3,9±0,3*
Pulmão (g)	1,6±0,1	2,5±0,2*	2,1±0,1*
Pulmão/Tíbia (g/cm)	0,4±0,01	0,6±0,05*	0,5±0,04*
Pulmão/Peso corporal (g/kg)	4,3±0,1	6,6±0,5*	5,7±0,5

Valores expressos como média ± EPM,  $p < 0,05$ . \* Diferença estatística em relação ao grupo sham.

#### **4.3. Efeito da infusão intracerebroventricular crônica de Ang-(1-7) sobre a morfologia cardíaca de animais infartados**

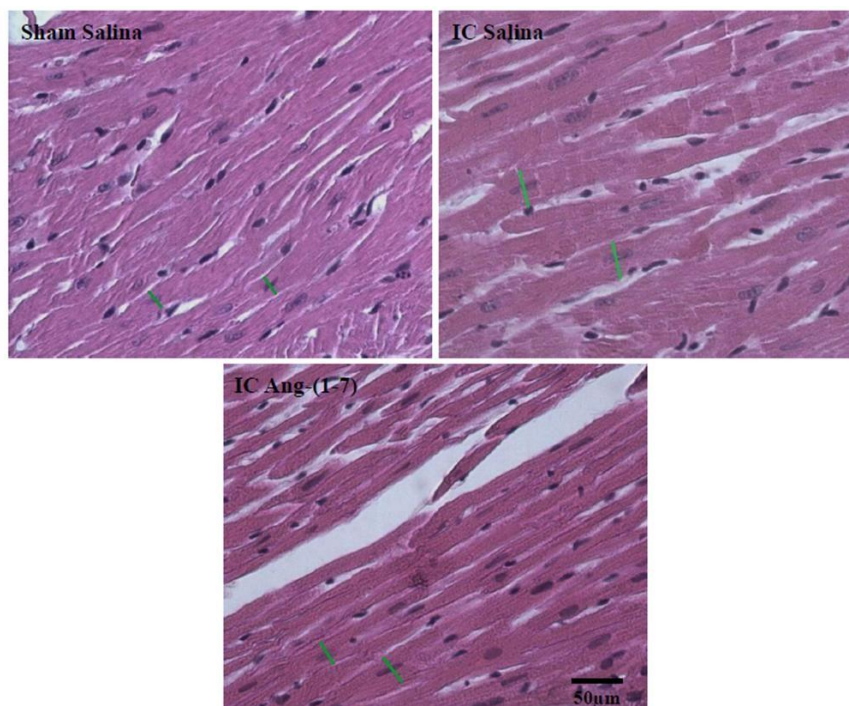
Nos grupos com IC, a análise histológica revelou uma cicatriz densa na parede anterior e lateral do ventrículo esquerdo. A Figura 9 mostra um corte transversal do coração de um animal com IC que recebeu infusão central de salina e outro que recebeu infusão central de Ang-(1-7), indicando a extensa área de cicatrização e afinamento da parede do ventrículo esquerdo. A Figura 8 também mostra a espessura normal da parede do ventrículo esquerdo de um animal sham. A espessura mínima do ventrículo esquerdo foi significativamente menor nos grupos com IC quando comparados ao grupo sham (sham salina  $2583 \pm 151 \mu\text{m}$ ; IC salina  $605 \pm 61$ ; IC Ang-(1-7)  $937 \pm 31 \mu\text{m}$ ), o que é indicativo de infarto transmural. Não foi observada diferença na espessura ventricular entre os grupos IC tratado ou não com Ang-(1-7).



**Figura 9** - Imagens representativas de corte transversal do coração, corado com Picrosirius red, mostrando a espessura mínima da parede do ventrículo esquerdo (indicada pelas barras azuis) de ratos controle (n=5), IC salina (n=5) e IC Ang-(1-7) (n=5) após 28 dias de infusão central crônica de Ang-(1-7) (0,4 µg/µl) ou salina. VE - ventrículo esquerdo. Valores expressos como média ± EPM. \* Diferença estatística em relação ao grupo sham salina,  $p < 0,05$ . Anova One-way seguido de pós-teste de Bonferroni.

O diâmetro dos cardiomiócitos da região remota ao infarto foi significativamente maior nos grupos IC salina e IC Ang-(1-7) quando comparados com o grupo controle (sham salina) (sham salina  $22,4 \pm 0,5$  µm; IC salina  $31,2 \pm 0,5$  µm e IC Ang-(1-7)  $27,2 \pm 0,4$  µm). De forma interessante o tratamento central com Ang-

(1-7) reduziu em 13% o diâmetro dos cardiomiócitos quando comparado ao grupo IC tratado com salina, conforme mostrado na Figura 10.



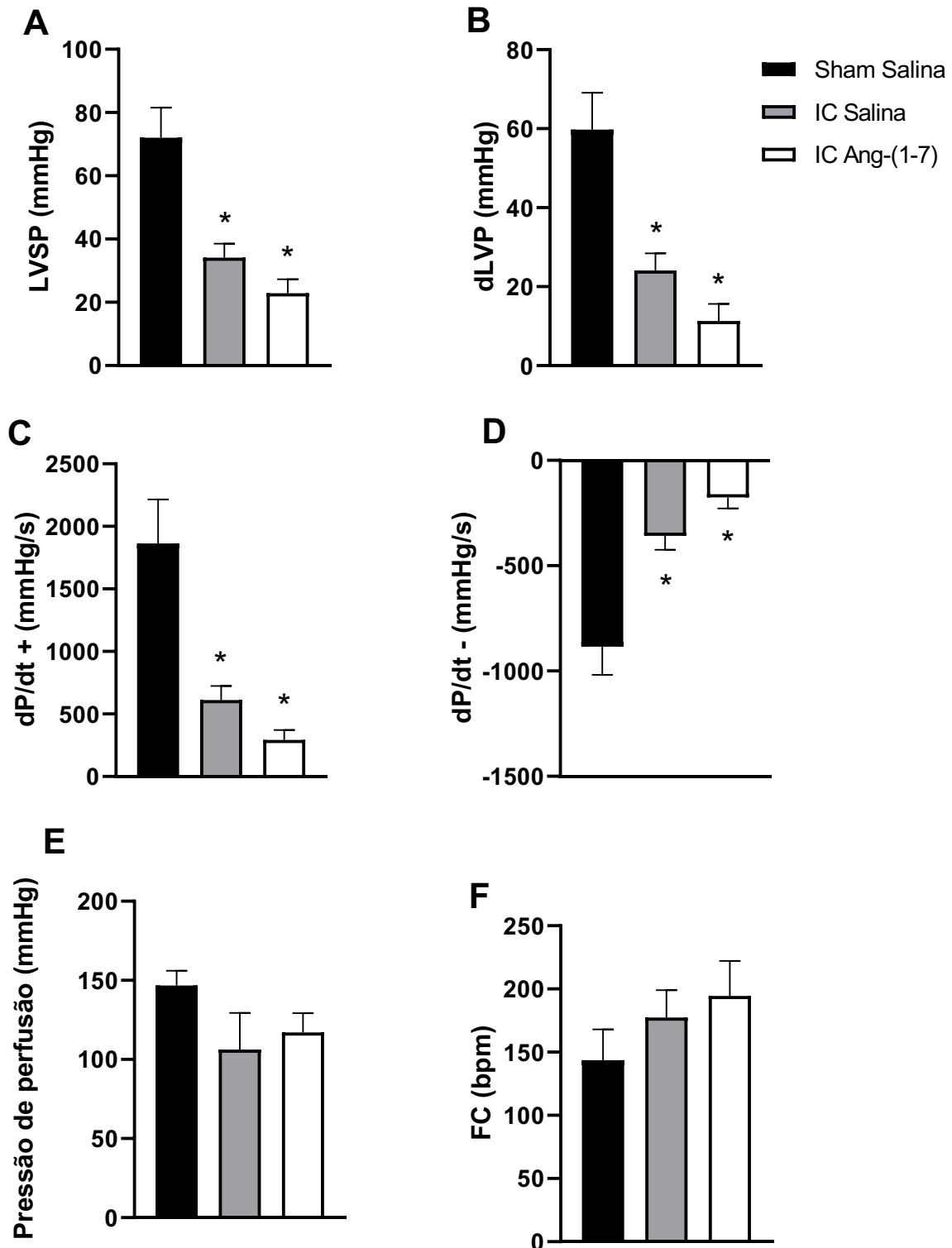
**Figura 10** - Imagens representativas de corte transversal do coração, corado com hematoxilina e eosina, mostrando o diâmetro dos cardiomiócitos (barras verde) da parede livre do ventrículo esquerdo de ratos controle ( $n=5$ ), IC salina ( $n=5$ ) e IC Ang-(1-7) ( $n=5$ ) após 28 dias de infusão central crônica de Ang-(1-7) ( $0,4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) ou salina. Valores expressos como média  $\pm$  EPM. \* Diferença estatística em relação ao grupo sham salina,  $p<0,05$ . # Diferença estatística em relação ao grupo IC salina,  $p<0,05$ . Anova One-way seguido de pós-teste de Bonferroni.



#### **4.4. Efeito da infusão intracerebroventricular crônica de Ang-(1-7) sobre a função cardíaca basal ex vivo de animais infartados**

Para avaliação da função cardíaca foi realizado o protocolo de coração isolado no sistema de Langendorff. O primeiro parâmetro avaliado foi a pressão sistólica do ventrículo esquerdo (LVSP), que está relacionada à capacidade contrátil do coração, e foi captada através do balão inserido no ventrículo esquerdo acoplado a um transdutor de pressão. Tanto o grupo IC tratado com salina quanto o grupo IC tratado com Ang-(1-7) apresentaram valores de LVSP reduzidos quando comparados ao grupo controle (sham salina  $72,1 \pm 9,4$  mmHg; IC salina  $34,1 \pm 4,4$  mmHg e IC Ang-(1-7)  $22,9 \pm 4,4$  mmHg) (Figura 11, painel A). A pressão desenvolvida do ventrículo esquerdo (dLVP), calculada pela diferença entre a pressão sistólica do ventrículo esquerdo e a pressão diastólica final do ventrículo esquerdo, também foi avaliada (painel B). O grupo IC salina apresentou dLVP reduzida em relação ao grupo controle e o tratamento com Ang-(1-7) não reverteu essa redução (sham salina  $59,8 \pm 9,3$  mmHg; IC salina  $24,1 \pm 4,3$  mmHg e IC Ang-(1-7)  $11,4 \pm 4,3$  mmHg). Outro parâmetro analisado foram as derivadas de pressão do ventrículo esquerdo, dP/dt máxima (dP/dt+) e dP/dt mínima (dP/dt-), que mostram a eficiência da contratilidade ou do relaxamento do coração, quanto menos tempo o ventrículo esquerdo leva para aumentar a pressão no seu interior, mais eficaz é sua contratilidade. Observamos que tanto o grupo IC salina quanto o grupo IC Ang-(1-7) apresentaram dP/dt+ e dP/dt- reduzidas em relação ao grupo controle, ou seja, menor eficiência tanto para contrair quanto para relaxar (dP/dt+: sham salina  $1863 \pm 353$  mmHg/s; IC salina  $612 \pm 113$  mmHg/s; IC Ang-(1-7)  $293 \pm 79$  mmHg/s e dP/dt-: sham salina  $-885 \pm 134$  mmHg/s; IC salina  $-358 \pm 67$  mmHg/s; IC Ang-(1-7)  $-176 \pm 52$  mmHg/s) (painel C e D). Sendo assim, o tratamento com Ang-(1-7) não

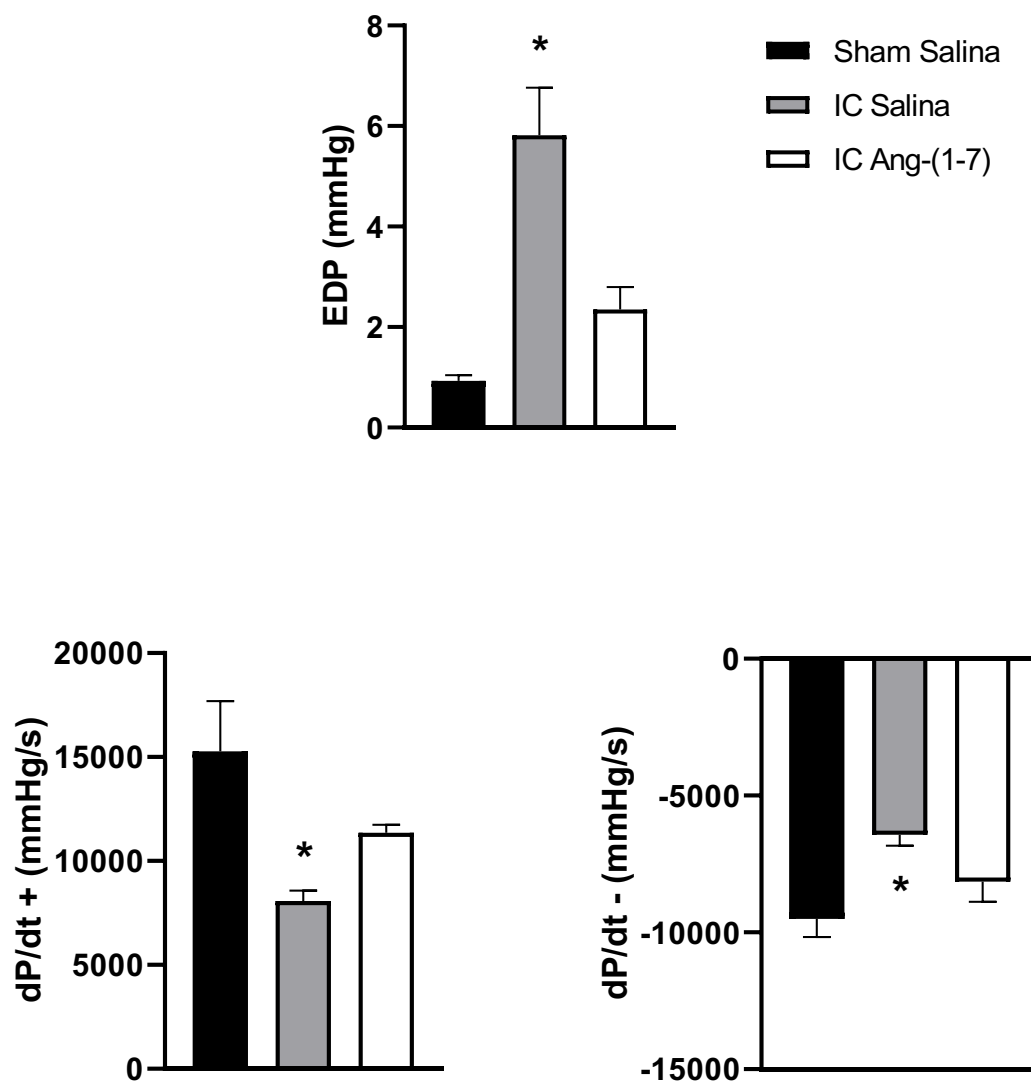
alterou a função cardíaca *ex vivo* dos animais infartados. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos na pressão de perfusão (sham salina  $147\pm 9$  mmHg; IC salina  $106\pm 23$  mmHg e IC Ang-(1-7)  $117,4\pm 12$  mmHg) e na frequência cardíaca (sham salina  $144\pm 24$  bpm; IC salina  $177\pm 22$  bpm e IC Ang-(1-7)  $194\pm 28$  bpm) (painel E e F).



**Figura 11** - Avaliação *ex vivo* da função cardíaca basal dos animais dos grupos sham salina (n=5), IC salina (n=6) e IC Ang-(1-7) (n=5) após 28 dias de infusão central crônica de Ang-(1-7) (0,4 µg/µl) ou salina. Valores expressos como média ± EPM. \* Diferença estatística em relação ao grupo sham salina, p<0,05. Anova One-way seguido de pós-teste de Bonferroni.

#### **4.5. Efeito da infusão intracerebroventricular crônica de Ang-(1-7) sobre a função cardíaca basal in vivo de animais infartados**

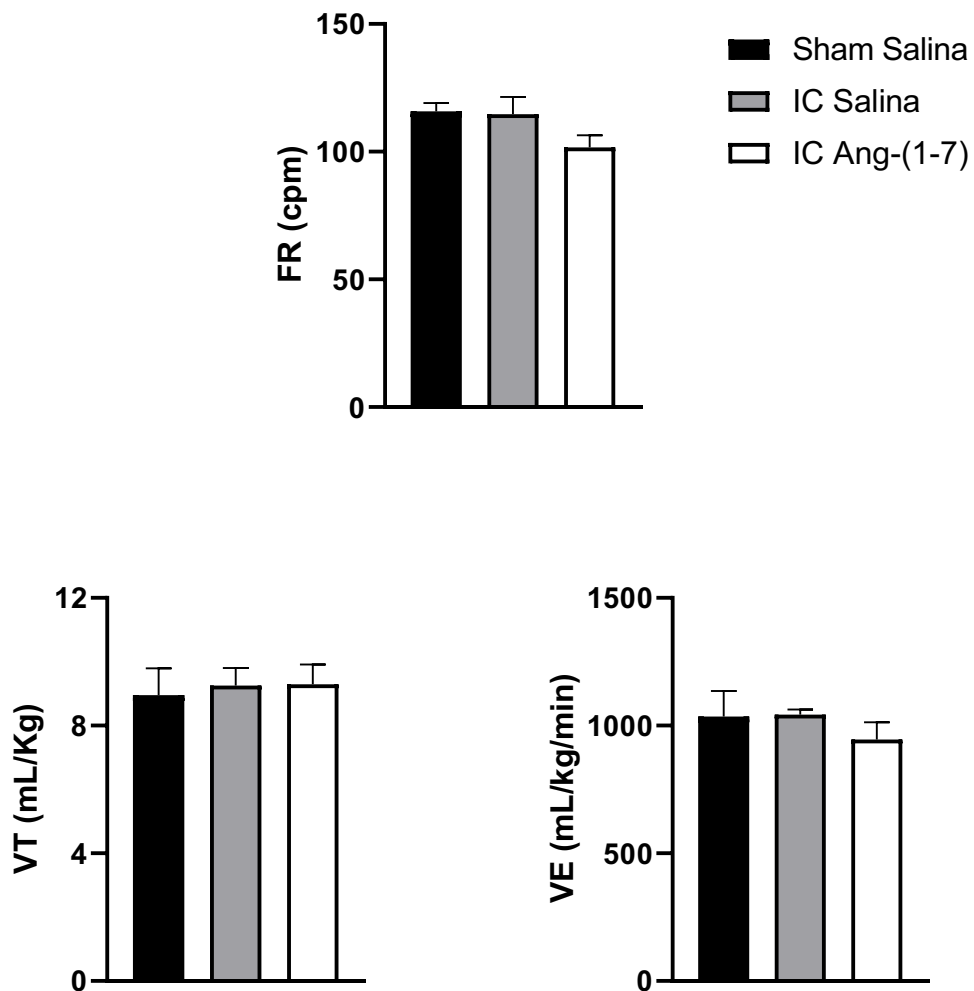
A função cardíaca também foi avaliada nos animais *in vivo*, *anestesiados*, através de um cateter inserido diretamente no ventrículo esquerdo. Comparado com o grupo sham salina, o grupo IC salina apresentou pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (EDP) significativamente elevada, sendo que o tratamento com Ang-(1-7) reverteu parcialmente essa alteração (sham salina  $0,9 \pm 0,1$  mmHg; IC salina  $5,8 \pm 1,0$  mmHg e IC Ang-(1-7)  $2,4 \pm 0,5$  mmHg) (Figura 12). Os valores de dP/dt máxima e mínima estavam reduzidos em animais com IC e o tratamento com Ang-(1-7) também reverteu parcialmente essas alteração (dP/dt+: sham salina  $15280 \pm 2406$  mmHg/s; IC salina  $8081 \pm 496$  mmHg/s; IC Ang-(1-7)  $11366 \pm 370$  mmHg/s e dP/dt-: sham salina  $-9501 \pm 671$  mmHg/s; IC salina  $-6431 \pm 403$  mmHg/s; IC Ang-(1-7)  $-8142 \pm 740$  mmHg/s).



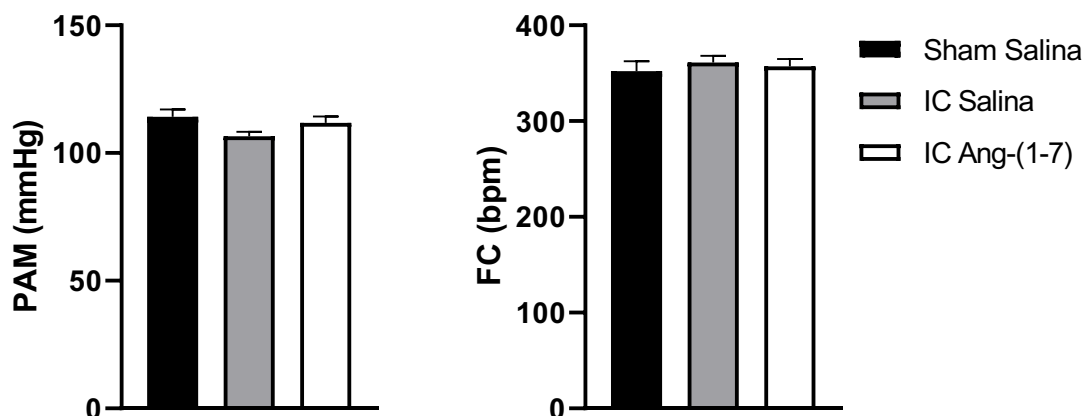
**Figura 12** - Avaliação *in vivo* da função cardíaca basal dos animais dos grupos sham salina (n=3), IC salina (n=5) e IC Ang-(1-7) (n=2) após 28 dias de infusão central crônica de Ang-(1-7) (0,4 µg/µl) ou salina. Valores expressos como média ± EPM. \* Diferença estatística em relação ao grupo sham salina,  $p < 0,05$ . Anova One-way seguido de pós-teste de Bonferroni.

#### **4.6. Efeito da infusão intracerebroventricular crônica de Ang-(1-7) sobre os parâmetros cardioventilatórios basais de animais infartados**

As variáveis cardioventilatórias basais foram avaliadas 7 semanas após a indução do IM em animais não anestesiados. A frequência respiratória basal (FR) não foi estatisticamente diferente entre os grupos avaliados (sham salina  $116 \pm 3$  cpm; IC salina  $115 \pm 7$  cpm e IC Ang-(1-7)  $102 \pm 5$  cpm). Também não observamos diferença estatística no volume corrente (VT) (sham salina  $9,0 \pm 0,8$  mL/kg; IC salina  $9,3 \pm 0,6$  mL/kg e IC Ang-(1-7)  $9,3 \pm 0,6$  mL/kg) e na ventilação por minuto (VE) (sham salina  $1036 \pm 99$  mL/kg/min; IC salina  $1043 \pm 20$  mL/kg/min e IC Ang-(1-7)  $945 \pm 69$  mL/kg/min) nos grupos IC salina e IC Ang-(1-7) em nos grupos infartados em relação ao grupo sham salina (Figura 13). Da mesma forma, não foi observada diferença estatística na PAM (sham salina  $114 \pm 3$  mmHg; IC salina  $107 \pm 2$  mmHg e IC Ang-(1-7)  $112 \pm 2$  mmHg) e FC basal (sham salina  $352 \pm 10$  bpm; IC salina  $361 \pm 7$  bpm e IC Ang-(1-7)  $357 \pm 8$  bpm) entre os grupos avaliados (Figura 14).



**Figura 13** - Valores basais de frequência respiratória (FR), volume corrente (VT) e ventilação por minuto (VE) dos animais dos grupos sham salina (n=6), IC salina (n=6) e IC Ang-(1-7) (n=6) após 28 dias de infusão central crônica de Ang-(1-7) (0,4  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) ou salina. Valores expressos como média  $\pm$  EPM.  $p > 0,05$  Anova One-way seguido de pós-teste de Bonferroni.



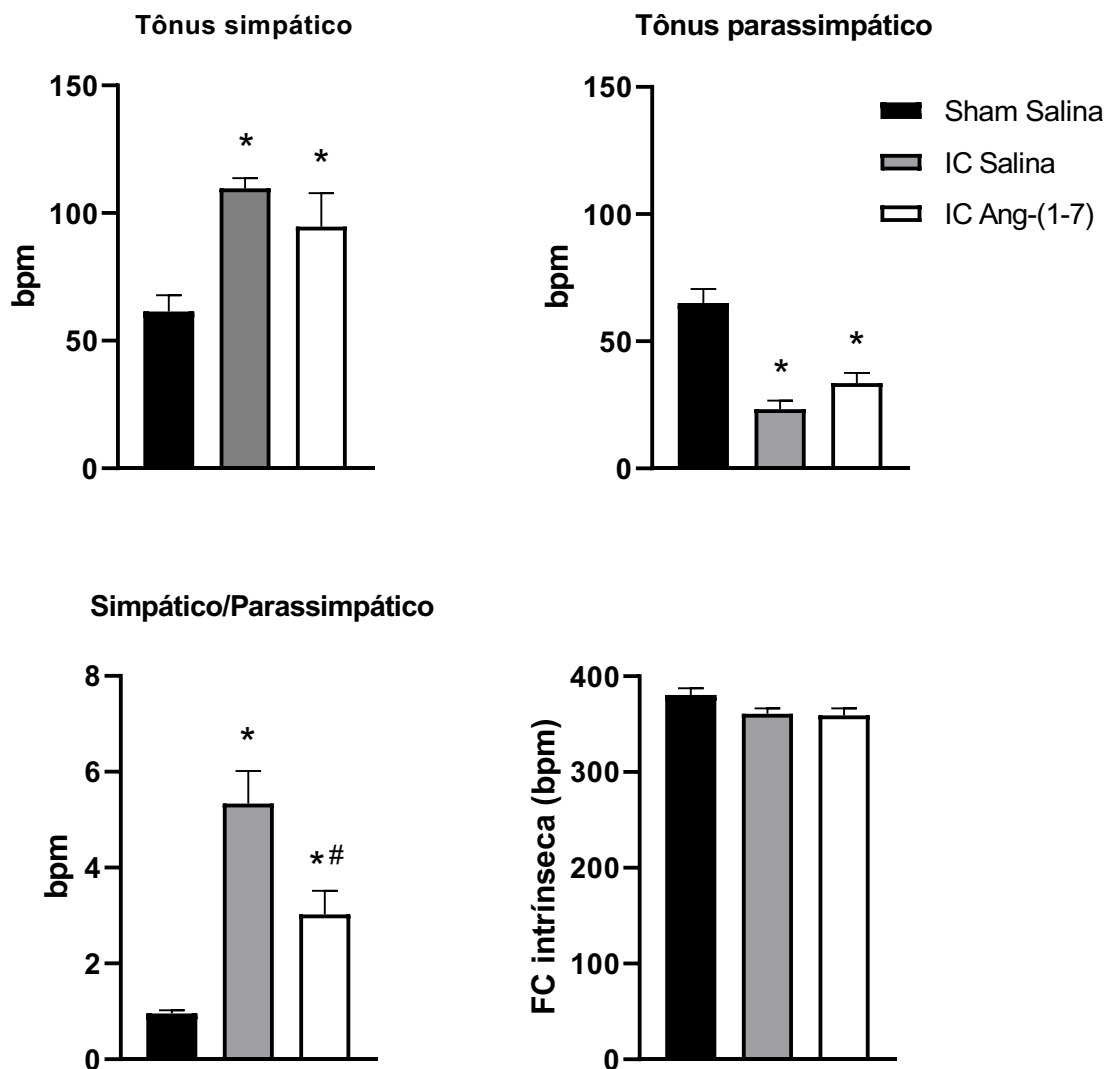
**Figura 14** - Valores basais de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) dos animais dos grupos sham salina ( $n=8$ ), IC salina ( $n=8$ ) e IC Ang-(1-7) ( $n=8$ ) após 28 dias de infusão central crônica de Ang-(1-7) ( $0,4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) ou salina. Valores expressos como média  $\pm$  EPM.  $p>0,05$  Anova One-way seguido de pós-teste de Bonferroni.

#### **4.7. Efeito da infusão intracerebroventricular crônica de Ang-(1-7) sobre o tônus autonômico cardíaco de animais infartados**

Os animais do grupo IC tratados com salina ou com Ang-(1-7) apresentaram tônus simpático cardíaco elevado quando comparados aos animais sham (sham salina  $61,4 \pm 6,4$  bpm; IC salina  $110,0 \pm 4,1$  bpm e IC Ang-(1-7)  $94,7 \pm 13,1$  bpm). Em relação ao tônus parassimpático, este foi significativamente menor tanto no grupo IC salina quanto no tratado com Ang-(1-7) em relação ao grupo controle (sham salina  $65,0 \pm 5,6$  bpm; IC salina  $23,3 \pm 3,5$  bpm e IC Ang-(1-7)  $33,6 \pm 3,9$  bpm). O balanço autonômico cardíaco, obtido pela razão entre o tônus simpático e o parassimpático, mostrou que o tratamento com Ang-(1-7) foi capaz de melhorar o desbalanço autonômico cardíaco dos animais com IC, reduzindo cerca de 43% a razão simpático/parassimpático em comparação ao grupo IC salina (sham salina  $0,96 \pm 0,06$  bpm; IC salina  $5,3 \pm 0,7$  bpm e IC Ang-(1-7)  $3,0 \pm 0,5$  bpm). Por fim, não foi observada



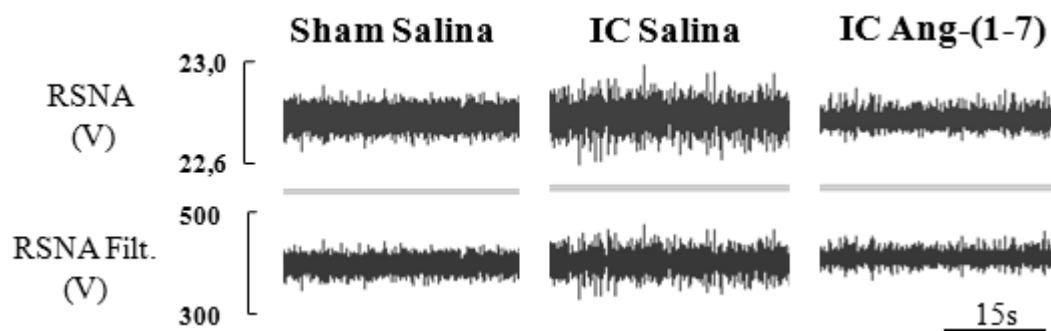
diferença estatística na frequência cardíaca intrínseca entre os grupos (sham salina  $381 \pm 7$  bpm; IC salina  $361 \pm 6$  bpm e IC Ang-(1-7)  $359 \pm 7$ ,  $p > 0,05$ ). Todos esses resultados estão representados na Figura 15.

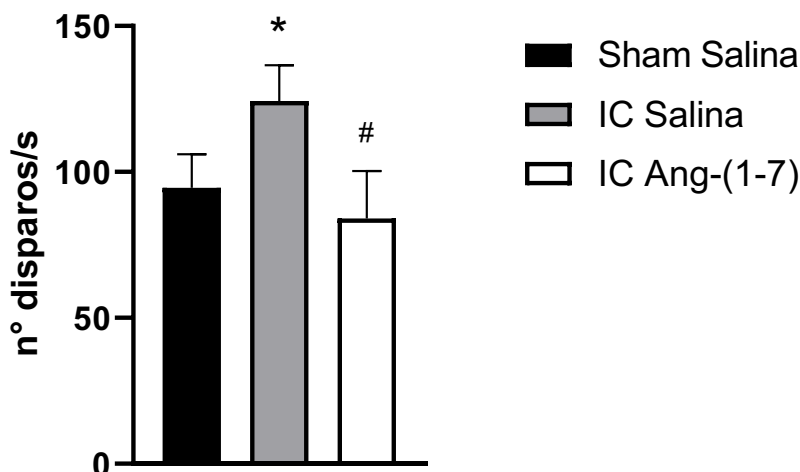


**Figura 15** - Efeito do tratamento crônico com Ang-(1-7) sobre o tônus autonômico cardíaco simpático, parassimpático, razão tônus simpático/parassimpático e frequência cardíaca intrínseca dos animais dos grupos sham salina ( $n=8$ ), IC salina ( $n=8$ ) e IC Ang-(1-7) ( $n=7$ ) após 28 dias de infusão central crônica de Ang-(1-7) ( $0,4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) ou salina. Valores expressos como média  $\pm$  EPM. \* Diferença estatística em relação ao grupo sham salina,  $p < 0,05$ . # Diferença estatística em relação ao grupo IC salina,  $p < 0,05$ . Anova One-way seguido de pós-teste de Bonferroni.

#### **4.8. Efeito da infusão intracerebroventricular crônica de Ang-(1-7) sobre a atividade basal do nervo simpático renal de animais infartados**

O registro da atividade do nervo simpático renal foi realizado em animais anestesiados com o objetivo de avaliar o efeito do tratamento com Ang-(1-7) em animais com IC sobre a atividade nervosa simpática basal. A Figura 16 mostra que os animais infartados tratados com salina apresentaram aumento do número de disparos por segundo do nervo simpático renal em comparação ao grupo controle. Já o tratamento crônico com Ang-(1-7) foi capaz de reverter o aumento do número de disparos, atingindo valores próximos àqueles observados no grupo controle (sham salina  $95 \pm 6$  disparos/s, IC salina  $124 \pm 6$  disparos/s e IC Ang-(1-7)  $84 \pm 8$  disparos/s).





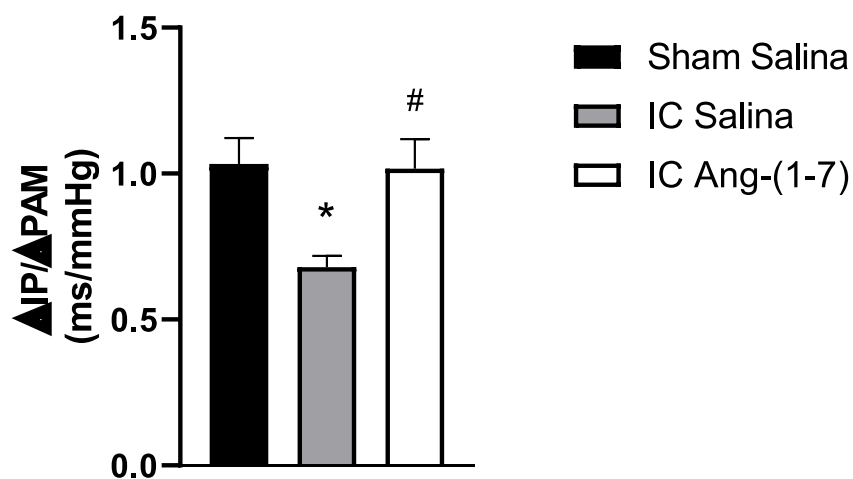
**Figura 16** - Efeito do tratamento crônico com Ang-(1-7) sobre a atividade basal do nervo simpático renal dos animais dos grupos sham salina (n=4), IC salina (n=4) e IC Ang-(1-7) (n=4) após 28 dias de infusão central crônica de Ang-(1-7) (0,4 µg/µl) ou salina. Valores expressos como média ± EPM. \* Diferença estatística em relação ao grupo sham salina,  $p < 0,05$ . # Diferença estatística em relação ao grupo IC salina,  $p < 0,05$ . Anova One-way seguido de pós-teste de Bonferroni.

#### **4.9. Efeito da infusão intracerebroventricular crônica de Ang-(1-7) sobre os reflexos cardiovasculares de animais infartados**

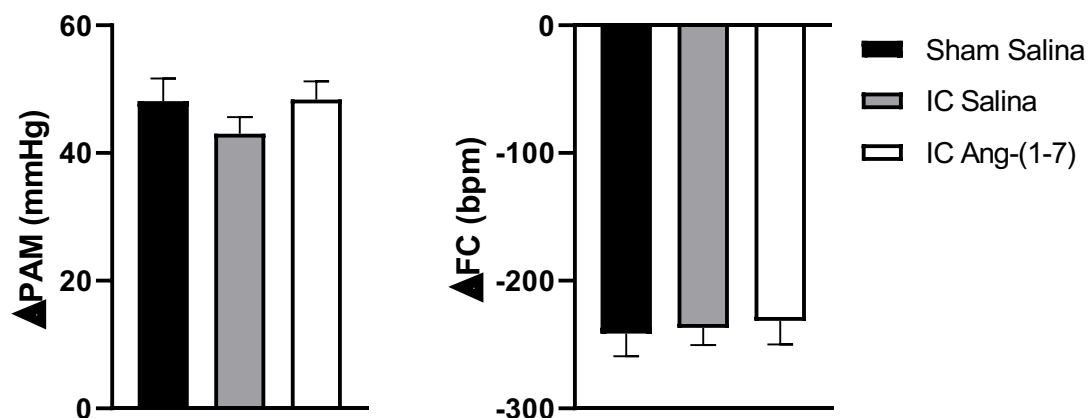
A análise do índice de sensibilidade do barorreflexo (Figura 17) revelou que os animais do grupo IC tratado com salina apresentaram sensibilidade barorreflexa reduzida quando comparados aos animais controle, enquanto o tratamento crônico com Ang-(1-7) restaurou a sensibilidade do barorreflexo dos animais com IC, não havendo diferença estatística em relação ao grupo sham salina (sham salina  $1,0 \pm 0,09$  ms/mmHg; IC salina  $0,68 \pm 0,04$  ms/mmHg e IC Ang-(1-7)  $1,0 \pm 0,1$  ms/mmHg).

A Figura 18 representa os dados relacionados às respostas cardiovasculares à ativação dos quimiorreceptores periféricos com KCN em animais não-

anestesiados. Animais com IC tratados com salina ou com Ang-(1-7) não apresentaram alteração da resposta pressora do quimiorreflexo quando comparados ao grupo controle (sham salina  $+48\pm 4$  mmHg, IC salina  $+43\pm 3$  mmHg e IC Ang-(1-7)  $48\pm 3$  mmHg), assim como também não foi observada diferença significativa na resposta bradicárdica entre os grupos (sham salina  $-241\pm 17$  bpm, IC salina  $-237\pm 13$  bpm e IC Ang-(1-7)  $-231\pm 18$  bpm). Outras doses de KCN foram testadas nesse estudo (200 e 800  $\mu\text{g/mL}$ ), porém as repostas foram similares à dose de 400 $\mu\text{g/mL}$  (KCN 200  $\mu\text{g/mL}$ :  $\Delta\text{PAM}$  sham salina  $42\pm 5$ , IC salina  $37\pm 4$  e IC Ang-(1-7)  $34\pm 7$  mmHg;  $\Delta\text{FC}$  sham salina  $-170\pm 26$ , IC salina  $-176\pm 42$  e IC Ang-(1-7)  $-104\pm 45$  bpm. KCN 800  $\mu\text{g/mL}$ :  $\Delta\text{PAM}$  sham salina  $39\pm 3$ , IC salina  $36\pm 2$  e IC Ang-(1-7)  $41\pm 4$  mmHg;  $\Delta\text{FC}$  sham salina  $-258\pm 10$ ; IC salina  $-246\pm 12$  e IC Ang-(1-7)  $-226\pm 10$  bpm).



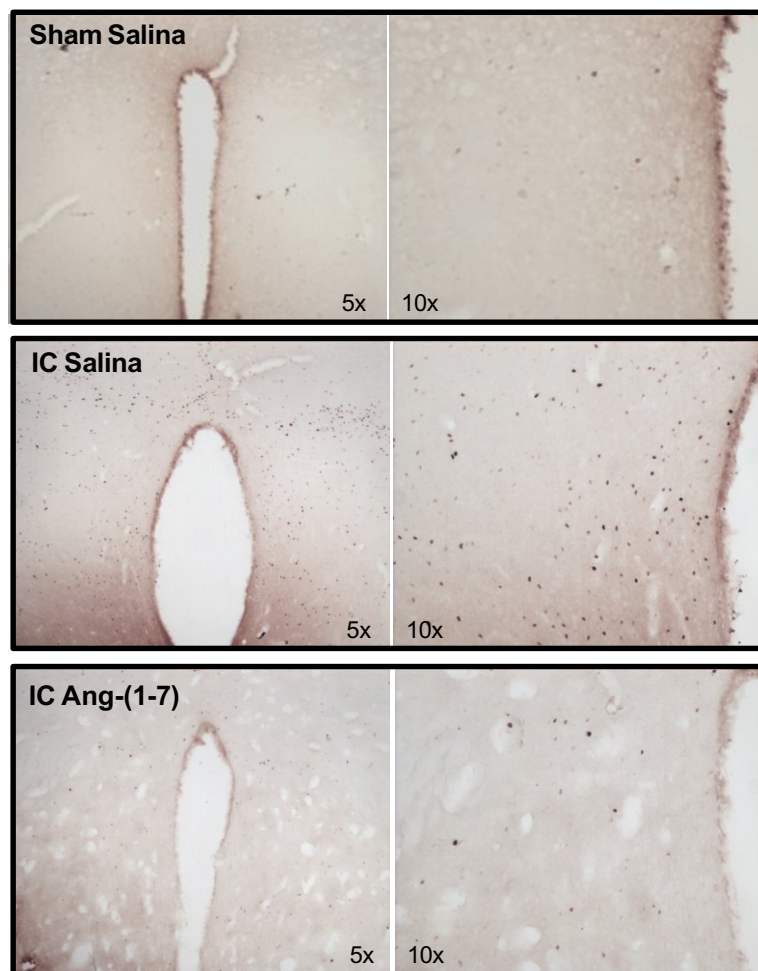
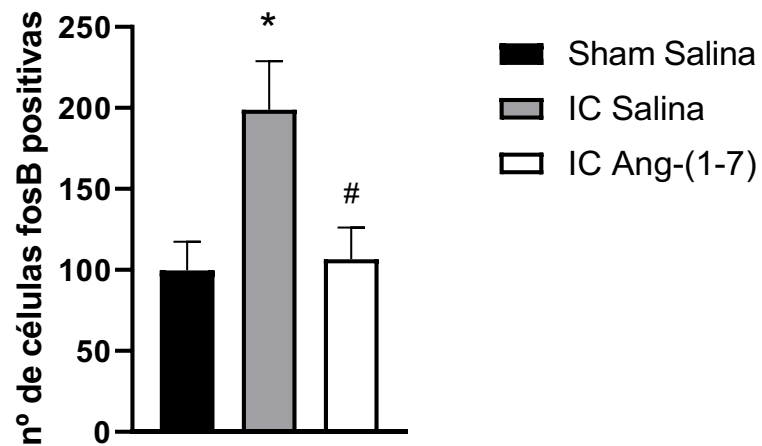
**Figura 17** - Índice de sensibilidade do barorreflexo dos animais dos grupos sham salina ( $n=8$ ), IC salina ( $n=8$ ) e IC Ang-(1-7) ( $n=8$ ) após 28 dias de infusão central crônica de Ang-(1-7) ( $0,4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) ou salina. Valores expressos como média  $\pm$  EPM. \* Diferença estatística em relação ao grupo sham salina,  $p<0,05$ . # Diferença estatística em relação ao grupo IC salina,  $p<0,05$ . Anova One-way seguido de pós-teste de Bonferroni.



**Figura 18** - Alterações na pressão arterial média ( $\Delta$ PAM) e frequência cardíaca ( $\Delta$ FC), produzidas pela injeção i.v. de KCN ( $40\mu\text{g}/0,1\text{ml}$ ) nos animais dos grupos sham salina ( $n=8$ ), IC salina ( $n=8$ ) e IC Ang-(1-7) ( $n=8$ ) após 28 dias de infusão central crônica de Ang-(1-7) ( $0,4\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) ou salina. Valores expressos como média  $\pm$  EPM.  $p>0,05$  Anova One-way seguido de pós-teste de Bonferroni.

#### **4.10. Efeito da infusão intracerebroventricular crônica de Ang-(1-7) sobre a ativação dos neurônios do PVN de animais infartados**

Para avaliar se o tratamento ICV com Ang-(1-7) interferiu na atividade dos neurônios do PVN foi realizada imunohistoquímica para proteína FosB, um marcador da ativação crônica neuronal. A Figura 19 mostra que animais do grupo IC salina apresentaram aumento do número de neurônios marcados para fosB em relação ao grupo sham salina, indicando que um número maior de neurônios do PVN desses animais foram ativados. O tratamento crônico com Ang-(1-7) em animais com IM reduziu a marcação para FosB quando comparado ao grupo IC salina, normalizando o número de neurônios ativados quando comparado ao grupo sham salina (sham salina  $100\pm 18$ ; IC salina  $199\pm 30$  e IC Ang-(1-7)  $107\pm 20$  neurônios fosB positivos), sugerindo que a Ang-(1-7) atua como um inibidor da ativação dos neurônios do PVN.

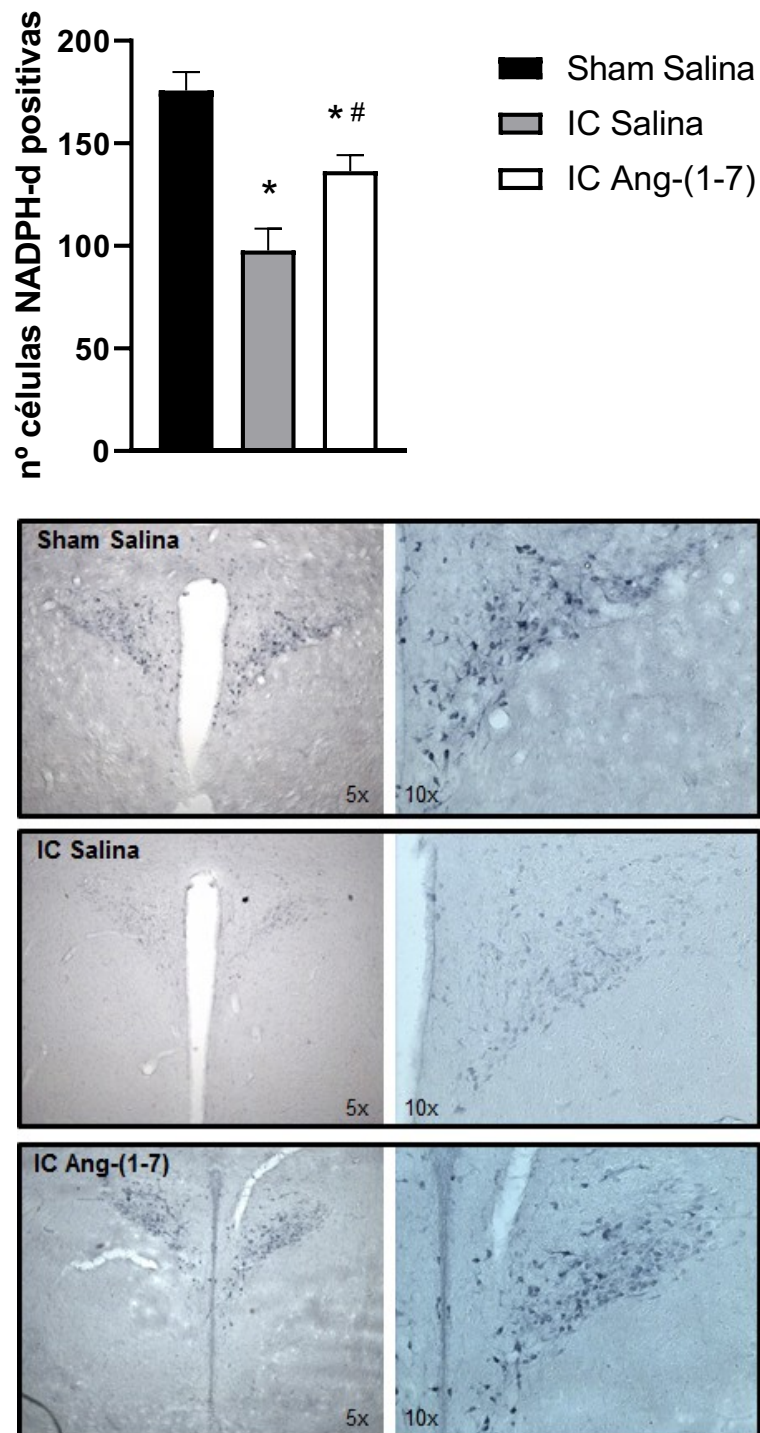


**Figura 19** - Efeito do tratamento crônico com Ang-(1-7) sobre a ativação crônica dos neurônios do PVN dos animais dos grupos sham salina (n=6), IC salina (n=5) e IC Ang-(1-7) (n=6) após 28 dias de infusão central crônica de Ang-(1-7) (0,4 µg/µl) ou salina. Valores expressos como média ± EPM.

\* Diferença estatística em relação ao grupo sham salina,  $p < 0,05$ . # Diferença estatística em relação ao grupo IC salina,  $p < 0,05$ . Anova One-way seguido de pós-teste de Bonferroni.

#### **4.11. Efeito da infusão intracerebroventricular crônica de Ang-(1-7) sobre a atividade da NADPH-diaforase em neurônios do PVN de animais infartados**

A expressão da NADPH-diaforase foi utilizada como uma maneira indireta de avaliar se o tratamento com Ang-(1-7) altera a expressão da enzima NO sintase no PVN de animais com IC. Como mostrado na Figura 20, o PVN dos animais com IC apresentou número significativamente menor de células NADPH-diaforase positivas em relação ao grupo sham, apontando menor atividade da NO sintase nesse núcleo na IC. Já o grupo tratado com Ang-(1-7) apresentou número maior de neurônios NADPH-diaforase positivos em relação ao grupo IC salina, sugerindo que a Ang-(1-7), agindo centralmente, restaura parcialmente a atividade da NO sintase (sham salina  $176 \pm 9$ ; IC salina  $98 \pm 11$  e IC Ang-(1-7)  $136 \pm 8$  neurônios NADPH-d positivos).



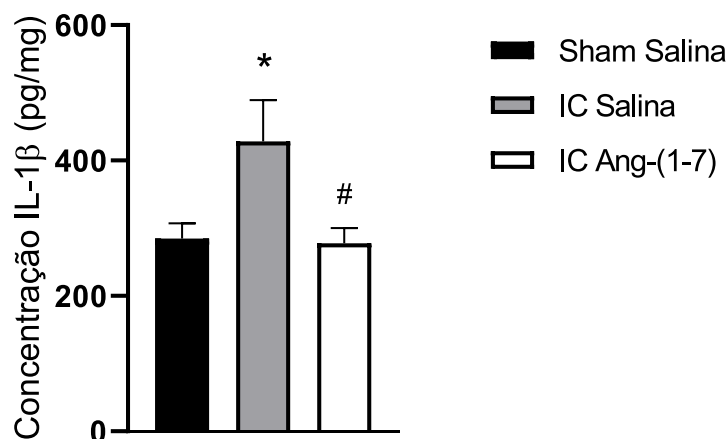
**Figura 20** - Efeito do tratamento crônico com Ang-(1-7) sobre a expressão de enzima NADPH-diaforase nos neurônios do PVN dos animais dos grupos sham salina (n=6), IC salina (n=5) e IC Ang-(1-7) (n=6) após 28 dias de infusão central crônica de Ang-(1-7) (0,4 µg/µl) ou salina. Valores expressos como média ± EPM. \* Diferença estatística em relação ao grupo sham salina,  $p < 0,05$ . # Diferença estatística em relação ao grupo IC salina,  $p < 0,05$ . Anova One-way seguido de pós-teste de Bonferroni.



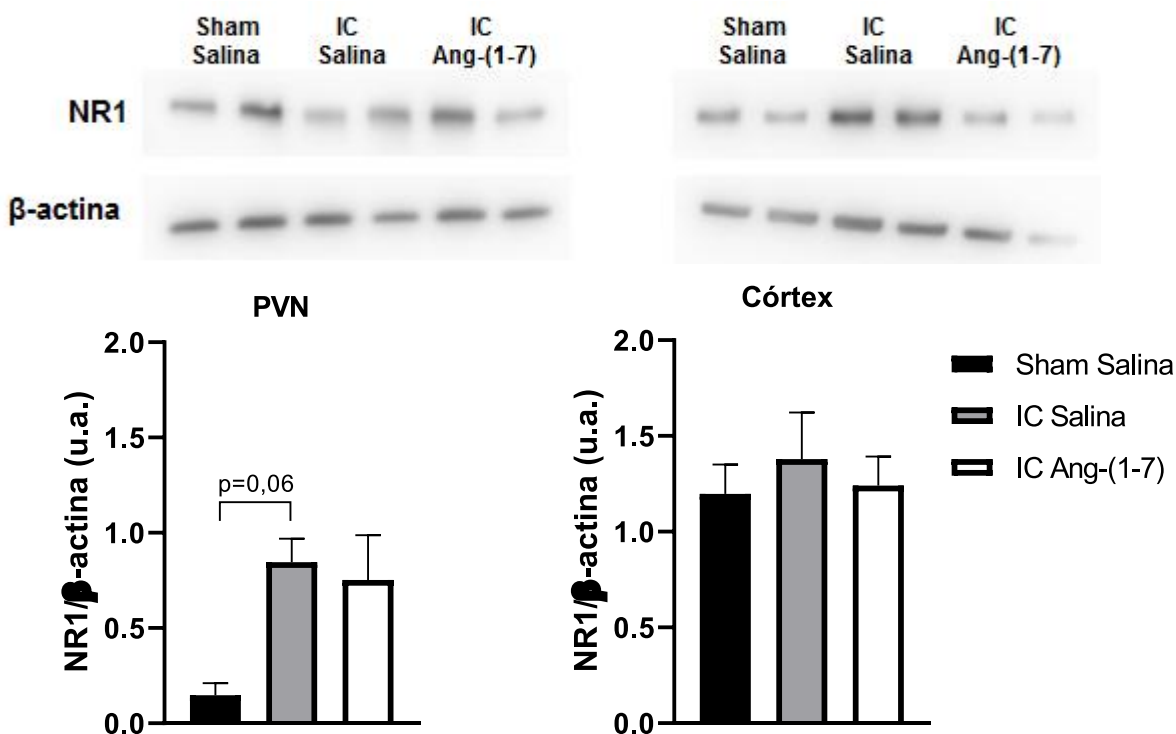
#### **4.12. Efeito da infusão intracerebroventricular crônica de Ang-(1-7) sobre os níveis de IL-1 $\beta$ e a expressão do receptor NMDA no PVN de animais infartados**

Os níveis de IL-1 $\beta$  foram avaliados como um indicador do estado geral da concentração de citocinas pró-inflamatórias no PVN após o IM. Como esperado, os animais com IC que receberam infusão ICV crônica de salina apresentaram aumento significativo dos níveis de IL-1 $\beta$  no PVN em relação ao grupo sham (sham salina 284,7 $\pm$ 22,7 pg/mg; IC salina 428,2 $\pm$ 60,9 pg/mg). De forma interessante, o tratamento com Ang-(1-7) foi capaz de restaurar os níveis de IL-1 $\beta$  a valores similares àqueles observados em animais sem IC (sham salina 284,7 $\pm$ 22,7 pg/mg e IC Ang-(1-7) 277,7 $\pm$ 22,7 pg/mg) (Figura 21).

A análise da expressão proteica da subunidade NR1 do receptor glutamatérgico do tipo NMDA foi realizada no PVN e no córtex (controle) dos animais controle e com IC tratados ou não com Ang-(1-7) por via ICV durante 28 dias. Nossos resultados não apresentaram diferença estatística entre os grupos estudados,  $p=0,06$  (sham salina 0,15 $\pm$ 0,06 u.a.; IC salina 0,85 $\pm$ 0,12 u.a. e IC Ang-(1-7) 0,75 $\pm$ 0,23 u.a.). Da mesma forma, nenhuma alteração significativa foi observada no córtex (sham salina 1,20 $\pm$ 0,15 u.a.; IC salina 1,38 $\pm$ 0,24 u.a. e IC Ang-(1-7) 1,24 $\pm$ 0,15 u.a.) (Figura 22).



**Figura 21** - Efeito do tratamento crônico com Ang-(1-7) sobre a concentração de IL-1 $\beta$  no PVN dos animais dos grupos sham salina (n=7), IC salina (n=5) e IC Ang-(1-7) (n=7) após 28 dias de infusão central crônica de Ang-(1-7) (0,4  $\mu$ g/ $\mu$ l) ou salina. Valores expressos como média  $\pm$  EPM. \* Diferença estatística em relação ao grupo sham salina,  $p < 0,05$ . # Diferença estatística em relação ao grupo IC salina,  $p < 0,05$ . Anova One-way seguido de pós-teste de Bonferroni.



**Figura 22** - Efeito do tratamento crônico com Ang-(1-7) sobre a expressão da subunidade NR1 do receptor glutamatérgico NMDA no PVN e córtex dos animais dos grupos sham salina (n=4), IC salina (n=4) e IC Ang-(1-7) (n=5) após 28 dias de infusão central crônica de Ang-(1-7) (0,4  $\mu$ g/ $\mu$ l) ou salina. Valores expressos como média  $\pm$  EPM.  $P > 0,05$ . Anova One-way seguido de pós-teste de Bonferroni.

## **V. DISCUSSÃO**

A hiperatividade do eixo ECA/Ang II/receptor AT1 no cérebro é um componente essencial para a progressão da IC. Estudos já demonstraram que a Ang-(1-7) possui efeitos que são, em sua maioria, contrários aos efeitos produzidos pela Ang II, podendo agir como um importante neuromodulador, especialmente em áreas relacionadas com o controle cardiovascular. Devido à crescente evidência dos efeitos benéficos produzidos pela Ang-(1-7), vários estudos têm sido realizados com a finalidade de avaliar o seu papel no tratamento de doenças cardiovasculares, tornando-a um alvo potencial para novas abordagens terapêuticas no tratamento da hipertensão e da IC. O presente estudo teve como objetivo principal avaliar os efeitos do aumento crônico dos níveis cerebrais de Ang-(1-7) sobre os parâmetros cardiovasculares, ventilatórios e autonômicos de ratos com IC induzida por infarto agudo do miocárdio. Nossos principais achados foram que o aumento central crônico de Ang-(1-7) em ratos com IC promoveu: 1) aumento dos níveis de NOS no PVN; 2) redução dos níveis de IL-1 $\beta$  no PVN; 3) redução da ativação dos neurônios do PVN; 4) restauração da sensibilidade do barorreflexo; 5) melhora do desbalanço autonômico cardíaco; 6) redução da hiperatividade simpática renal; 7) redução da taxa de mortalidade.

De modo geral, observamos que o método escolhido para induzir a IC foi eficiente, uma vez que os nossos animais apresentaram alterações cardiovasculares (morfológicas e funcionais) e autonômicas típicas da IC, como hipertrofia cardíaca, dano histológico no miocárdio de aproximadamente 50%, redução da função contrátil cardíaca, aumento da EDP, redução da sensibilidade do barorreflexo e aumento da atividade nervosa simpática (DiBona e Sawin, 1995; Kleiber e cols., 2010; Zheng e cols., 2011; Sharma e cols., 2013; Toschi-Dias e cols., 2017).

A oclusão da artéria coronária esquerda em ratos pode gerar infartos da parede livre do ventrículo esquerdo de tamanhos variados. No nosso estudo, a área infartada foi de aproximadamente 50% da parede do ventrículo esquerdo. Pfeffer e cols. (1979) avaliaram se existe alguma relação entre o tamanho do infarto e a disfunção ventricular em ratos, sendo observado que os animais com infartos envolvendo mais de 46% da parede ventricular esquerda apresentaram insuficiência cardíaca congestiva e comprometimento da função ventricular esquerda no estado basal (Pfeffer e cols., 1979). Pfeffer e cols. (1991) também observaram que o peso dos ventrículos em relação ao peso corporal aumenta significativamente apenas em ratos com IM extenso, devido à hipertrofia compensatória do restante do miocárdio (Pfeffer et al. 1991). No nosso estudo os animais do grupo IC apresentaram peso dos ventrículos (normalizado pelo peso corporal e pelo tamanho da tíbia) superiores ao do grupo sham, indicando a obtenção bem-sucedida de grandes infartos do miocárdio que resultam em comprometimento da função cardíaca. Outro método de avaliação do dano ventricular causado pelo infarto é através da medida do afinamento máximo da parede ventricular esquerda. Observamos que os animais com IC apresentam infartos transmuralis, ou seja, que se estenderam desde o epicárdio até o endocárdio, indicando considerável perda da massa muscular cardíaca.

Observamos que o infarto em nossos animais resultou em hipertrofia ventricular, conforme indicado tanto pelos pesos dos ventrículos e quanto pelas medidas das áreas dos cardiomiócitos. Dependendo do tamanho da área infartada, a medida do peso do ventrículo tende a subestimar a presença da hipertrofia ventricular, por isso a medida do diâmetro dos cardiomiócitos é considerada o melhor índice para avaliar a hipertrofia ventricular. O tratamento com Ang-(1-7) não

alterou o peso dos corações, entretanto, promoveu pequena, mas significativa, redução do diâmetro dos cardiomiócitos. Resultado semelhante foi observado por Kangussu e cols. (2015), onde o tratamento ICV com Ang-(1-7) reduziu a hipertrofia e o remodelamento cardíaco de ratos hipertensos, sendo que o tratamento concomitante com o bloqueio do receptor Mas preveniu parcialmente esse efeito (Kangussu e cols., 2015). Guimarães e cols. (2012) avaliaram o efeito do tratamento ICV de Ang-(1-7) por 14 dias sobre os níveis cardíacos desse peptídeo. No entanto, não foi observada alteração nos níveis de Ang-(1-7) no coração em comparação aos animais não tratados, mostrando que não houve difusão do peptídeo para a circulação (Guimarães e cols., 2012). Entretanto, de forma surpreendente, foi observado que o tratamento central com Ang-(1-7) reduziu os níveis cardíacos de Ang II em animais hipertensos, restaurando o balanço entre os eixos Ang II/Ang-(1-7) no coração (Kangussu e cols., 2015). Portanto, é provável que o efeito anti-hipertrófico produzido pela Ang-(1-7) nos cardiomiócitos não foi ocasionado pelo efeito direto do peptídeo no coração, mas sim proveniente da redução da atividade simpática para o coração.

Além das alterações na morfologia cardíaca, também observamos alterações funcionais do coração dos animais com IC, tanto no modelo *ex vivo* quanto *in vivo*. Através do registro do coração isolado observamos prejuízo tanto da função sistólica quanto da função diastólica ventricular ( $dP/dt+$  e  $dP/dt-$ ), sendo que o tratamento com Ang-(1-7) não produziu nenhuma melhora na atividade ventricular. Já o registro da função ventricular no animal anestesiado mostrou que os animais infartados apresentaram EDP aumentada, o que é característico na IC (Zheng e cols., 2011; Sharma e cols., 2013), e também prejuízo da  $dP/dt+$  e  $dP/dt-$ . Entretanto, nessa condição, o tratamento com Ang-(1-7) atenuou parcialmente essas alterações,

sugerindo que, pelo fato do coração estar sob constante modulação do sistema nervoso central, a melhora no balanço autonômico cardíaco induzida pela Ang-(1-7) refletiu em melhora na função cardíaca.

O índice de mortalidade geral nos grupos IC foi de 58%, sendo que a maior ocorrência de morte ocorreu nas primeiras 24h após a cirurgia de infarto, similar a outros estudos da literatura que também induziram o IM através de ligadura da coronária esquerda (Pfeffer e cols., 1979; Loot e cols., 2002; Masson e cols., 2016). Provavelmente as causas de morte desses animais estavam relacionadas ao procedimento cirúrgico em si ou devido ao alto índice de arritmias. Pfeffer e Braunwald (1990) ressaltam que no modelo de infarto do miocárdio em ratos, tanto a função ventricular quanto a sobrevivência dos animais estão relacionadas ao tamanho do infarto do miocárdio. Portanto, é possível que a alta taxa de mortalidade observada em nosso estudo seja devido ao tamanho dos infartos produzidos pela oclusão da coronária. De forma importante, a taxa de mortalidade reduziu quase pela metade após o início do tratamento ICV crônico com Ang-(1-7), passando de 15% no grupo sem tratamento para 8% no grupo tratado. Assim, apesar de não termos observado expressiva reversão sobre o remodelamento cardíaco (ou disfunção cardíaca), o tratamento ICV por 28 dias com Ang-(1-7) promoveu redução importante da mortalidade dos animais com IC.

No nosso estudo, a IC não promoveu alterações da PA e FC basal avaliadas em animais não-anestesiados após 7 semanas da indução do infarto. Apesar de alguns estudos na literatura mostrarem que a IC leva à alterações dos parâmetros cardiovasculares basais, tais como redução da PA e taquicardia (Aires e cols, 2017), resultado similar ao nosso foi encontrado por Sharma e cols. (2013) em animais anestesiados com IC e registro após 8 semanas da ligadura da coronária. Estudos

mostram elevação da FC em ratos não-anestesiados após 1, 3 e 7 dias do IM (Aires e cols., 2017). Entretanto, esses mesmos estudos observaram que após 28 dias da oclusão coronariana não foi observada diferença da FC em relação aos animais sham, devido à recuperação progressiva da modulação vagal dos batimentos cardíacos. Já a PA se mostrou reduzida durante todo o período de avaliação, mas com tendência a normalização após 28 dias de infarto (Aires e cols., 2017). Nossos dados mostraram ainda que a infusão ICV crônica de Ang-(1-7) não modificou os níveis basais da PA e FC. Embora alguns estudos (Silva e cols., 2005; Ren e cols., 2017) tenham demonstrado que a injeção central aguda de Ang-(1-7) produza efeitos excitatórios (aumento da atividade do nervo simpático renal e da pressão arterial) é importante considerar que os estudos com administração crônica deste peptídeo mostram efeitos diferentes. Por outro lado, a infusão ICV crônica de Ang-(1-7) reduziu significativamente a pressão arterial em animais hipertensos (Guimarães e cols., 2012; Kangussu e cols., 2015). Assim, o efeito da Ang-(1-7) sobre a PA depende de fatores como o tipo de administração e o modelo experimental utilizado.

O barorreflexo é um dos mecanismos mais importantes para controlar momento-a-momento a pressão arterial (Guyenet, 2006). Em humanos, o comprometimento da sensibilidade barorreflexa tem sido implicado no aumento do risco de morte após o IM e está associado ao desequilíbrio do balanço autonômico (alta atividade simpática e baixa atividade vagal) (Rovere e cols., 1998). Nossos resultados mostram que 7 semanas após o IM os animais apresentaram sensibilidade barorreflexa reduzida em comparação aos animais sham, enquanto o grupo que recebeu tratamento crônico com Ang-(1-7) essa situação foi revertida, restaurando-se a sensibilidade barorreflexa. Resultado semelhante foi encontrado



por Kar e cols. (2011) em coelhos com IC, onde o tratamento ICV com Ang-(1-7) por apenas 4 dias também restaurou a sensibilidade do barorreflexo. Tem sido sugerido que a função barorreflexa prejudicada na IC seja devido ao aumento central dos níveis da Ang II, o que contribui para o aumento do tônus simpático e diminuição do tônus vagal (Kar e cols., 2011). A melhora da sensibilidade do barorreflexo promovida pela infusão ICV de Ang-(1-7) também foi observada em estudos anteriores do nosso laboratório em animais normotensos (Campagnole-Santos e cols., 1992) e em diferentes modelos de hipertensão arterial, por facilitar o componente bradicárdico desse reflexo (Guimarães e cols., 2012; Kangussu e cols., 2015). Por outro lado, a infusão ICV de Ang II aumentou a pressão arterial e reduziu significativamente a sensibilidade barorreflexa (Campagnole-Santos e cols., 1992). Mais recentemente, Hendricks e cols. (2019) avaliaram o efeito da infusão ICV de Ang-(1-7) por 14 dias em ovelhas com aumento da pressão arterial induzida pela redução dos níveis de Ang-(1-7) no fluido cerebrospinal e observaram redução da pressão arterial e da frequência cardíaca, além de melhora na sensibilidade do barorreflexo em animais acordados, confirmando mais uma vez seu importante papel no controle basal e reflexo da pressão arterial. Assim, nossos resultados fornecem evidência adicional de que a Ang-(1-7) altera a atividade de vias centrais envolvidas no controle reflexo cardiovascular, pois o aumento dos níveis centrais de Ang-(1-7) foi capaz de melhorar a sensibilidade do barorreflexo que se apresentava reduzida em animais com IC.

O mecanismo pelo qual a Ang-(1-7) promove a recuperação da sensibilidade barorreflexa ainda não foi completamente esclarecido na literatura, podendo ser causada por alterações no próprio barorreceptor ou no processamento central das informações aferentes. Estudos anteriores do nosso laboratório mostraram que

camundongos com deleção genética do receptor Mas (Mas-KO) apresentaram bradicardia barorreflexa atenuada em resposta à fenilefrina, sugerindo que a Ang-(1-7) endógena é um importante modulador dos reflexos cardiovasculares (De Moura e cols., 2010). Adicionalmente, a atenuação do barorreflexo observada nos camundongos Mas-KO pode refletir o efeito combinado da redução do efeito facilitatório da Ang-(1-7) e o aumento do efeito inibitório da Ang II. De forma consistente com esse conceito, tem sido sugerido que o desbalanço central entre os níveis de Ang II e Ang-(1-7) é um fator importante do prejuízo do barorreflexo observado em animais transgênicos [TGR(mRen2)] que apresentam níveis elevados de Ang II no SNC (Diz e cols., 2008a) ou induzido pela inibição da ECA2 (Diz e cols., 2008b).

Já é bem estabelecido na literatura que animais com IC apresentam, além de atenuação do barorreflexo, exacerbação da resposta pressora do quimiorreflexo, os quais contribuem, pelo menos em parte, para o aumento da atividade simpática observada nesses animais (Ponikowski e cols., 2001; Schultz e cols., 2013; Del Rio e cols., 2013a). De forma surpreendente, diferente do que é observado na literatura, em nosso estudo os animais com IC não apresentaram alteração da resposta pressora evocada pela estimulação dos quimiorreceptores periféricos com KCN. Resultado semelhante ao nosso também foi observado no trabalho de Calegari e cols. (2016). Uma das possibilidades para explicar esses resultados contraditórios pode estar relacionada ao método utilizado para estimulação dos quimiorreceptores periféricos. Tanto em nosso estudo quando no estudo de Calegari e cols (2016) foi utilizado a injeção intravenosa de KCN, enquanto na maioria dos outros trabalhos a estimulação dos quimiorreceptores foi realizada pela redução dos níveis de O<sub>2</sub> inspirados. Além disso, a condição experimental do animal também pode ter

interferência nos resultados observados. Na maioria dos estudos onde foi observado aumento da resposta pressora do quimiorreflexo na IC foram utilizados ratos anestesiados, enquanto que no nosso estudo e de Calegari e cols. (2016) foram utilizados ratos não anestesiados. No estudo de Reddy e cols. (2007), por exemplo, foi observado em animais com IC aumento exacerbado do quimiorreflexo induzido pelo KCN. No entanto, esse estudo foi realizado em animais anestesiados com uretana.

Os quimiorreceptores periféricos além de participarem do controle cardiovascular, também promovem de forma importante ajustes ventilatórios. No nosso estudo também não observamos diferença significativa nos parâmetros ventilatórios basais avaliados no grupo com IC. Esses dados em conjunto com a observação de não alteração do quimiorreflexo nos animais com IC sugerem que a ausência de alterações nos quimiorreceptores periféricos contribuiu com a ausência de disfunção respiratória nos animais com IC. Outra explicação poderia estar relacionada com a idade dos animais utilizados nesse experimento de análise ventilatória. Em experiência prévia, observamos que animais mais jovens (6 semanas) quando submetidos ao IM não apresentaram alteração nem do barorreflexo ou do tônus autonômico cardíaco. Essas alterações foram observadas apenas em animais submetidos ao IM um pouco mais velhos (8-9 semanas). Entretanto, não foi possível repetir os experimentos ventilatórios em animais mais velhos.

A origem das mudanças na modulação autonômica direcionada ao sistema cardiovascular após o infarto é incerta, podendo surgir de vias eferentes (origem no sistema nervoso central) ou de informações aferentes (origem em órgãos periféricos, como coração, vasos e rim). O importante papel do desbalanço autonômico na IC

indica a importância de uma abordagem terapêutica baseada no entendimento dos mecanismos centrais responsáveis pela simpatoexcitação, visando combater os efeitos adversos da atividade simpática aumentada. O sistema nervoso autônomo contribui para a adaptação do sistema cardiovascular em estados patológicos, produzindo ações compensatórias que são fundamentais para a manutenção das variáveis circulatórias dentro de limites normais no estágio inicial da doença. Assim, após o IM o aumento da atividade simpática é essencial para manter o fluxo sanguíneo adequado às necessidades do organismo. Entretanto, quando cronicamente estimulada ela desempenha efeitos opostos, contribuindo para a progressão da doença (Zucker e cols., 2004). Esses efeitos compensatórios são mediados, pelo menos em parte, pela ativação do SRA, predominando o aumento da produção de Ang II sistêmico e cerebral (Wang e cols., 2012). Na IC, a Ang II periférica promove aumento tanto da síntese quanto da liberação de noradrenalina, contribuindo com o aumento da atividade simpática. No sistema nervoso central a Ang II está aumentada em diferentes locais do encéfalo, como no RVLM, área postrema e PVN, sendo que o bloqueio dos receptores AT1 neste último diminui a atividade simpática em animais com IC (Wang e cols., 2012). Por possuir ações opostas às da Ang II, o eixo ECA2/Ang-(1-7)/receptor Mas tem se tornado promissor no tratamento de doenças cardiovasculares.

Alguns estudos divergem sobre o papel da Ang-(1-7) no SNC, sendo ele dependente da forma como a Ang-(1-7) é administrada (aguda ou cronicamente) e do estado fisiológico do organismo. Em relação ao seu papel no PVN, que é um núcleo importante na manutenção do tônus simpático e da pressão arterial, já foi demonstrado que a microinjeção de Ang-(1-7), assim como a Ang II, promoveu aumento acentuado da atividade do nervo simpático renal via ativação do receptor

Mas, sem alterações da pressão arterial e da frequência cardíaca (Silva e cols., 2005). De forma semelhante, Ren e cols. (2017) observaram em animais com IC que a injeção de Ang-(1-7) no PVN aumentou a atividade do nervo simpático renal e também a pressão arterial pela ativação do receptor Mas. Resultado similar também foi observado por Yu e colaboradores (2018) na hipertensão induzida por excesso de sal, em que o bloqueio do receptor Mas no PVN atenuou o aumento da pressão arterial, da atividade no nervo simpático renal e também reduziu os níveis de citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio. O conjunto desses dados sugere que a Ang-(1-7) tenha efeitos simpatoexcitatórios no PVN e que o aumento da atividade simpática nos animais hipertensos e com insuficiência cardíaca são causados, em parte, pelas ações deste peptídeo no PVN. Em todos os estudos citados acima, a Ang-(1-7) e o antagonista de receptor Mas foram agudamente microinjetados no PVN de animais anestesiados. Por outro lado, outros estudos mostram que o aumento crônico dos níveis centrais de Ang-(1-7) normalizou o desbalanço autonômico cardíaco, melhorou a sensibilidade do barorreflexo e reduziu a pressão arterial de ratos hipertensos (Guimarães e cols., 2012), além de melhorar a sensibilidade do barorreflexo e reduzir a hiperatividade simpática renal em coelhos com IC (Kar e cols., 2011). Dessa forma, o efeito central da Ang-(1-7) sobre o tônus simpático ainda não é claro, podendo ser ele simpatoexcitatório ou simpatoinibitório. Em nosso estudo observamos que o tratamento central crônico com Ang-(1-7) por 28 dias atenuou o desbalanço simpato-vagal cardíaco e reduziu a hiperatividade do nervo simpático renal dos animais com IC, corroborando os resultados obtidos por Kar e colaboradores (2011).

Considerando que o PVN é um importante núcleo que participa de forma direta da modulação simpática, por enviar projeções tanto para o RVLM quanto para

a coluna intermediolateral da medula espinhal, o nosso próximo passo foi avaliar se a infusão ICV crônica de Ang-(1-7) seria capaz de produzir ajustes na atividade de seus neurônios. Também é importante destacar que o PVN fica localizado próximo ao terceiro ventrículo, o que facilita a ação da Ang-(1-7) infundida no ventrículo lateral. Como demonstrado por Zhang e cols. (2002a) o SRA cerebral tem um importante papel na modulação da atividade de neurônios do PVN de animais com IC, principalmente a Ang II, já que o bloqueio dos receptores AT1 desse núcleo reduziu a atividade dos seus neurônios em ratos com IC. Corroborando a ideia que a Ang-(1-7) possui ações opostas às da Ang II, em nosso trabalho observamos que o tratamento ICV crônico com Ang-(1-7) reduziu significativamente a ativação dos neurônios do PVN em 46%.

Vários estudos têm avaliado os mecanismos moduladores da atividade dos neurônios do PVN que são, em parte, responsáveis pelo aumento do tônus simpático. Normalmente, a excitabilidade do PVN é controlada por um balanço entre os mecanismos inibitórios e excitatórios. Alterações nesse equilíbrio podem causar aumento da atividade simpática, como é observado na IC, onde há predomínio dos mecanismos excitatórios sobre os mecanismos inibitórios e, assim, neurônios do PVN tornam-se mais ativados contribuindo com a hiperatividade simpática (Li e Patel, 2003). Já está bem estabelecido na literatura que o óxido nítrico é um dos mecanismos inibitórios do PVN que está atenuado de forma importante na IC (Sharma e cols., 2011).

A enzima nNOS é encontrada em altos níveis em diversas áreas do sistema nervoso central, incluindo aquelas responsáveis pelo controle cardiovascular (Li e Patel, 2003). A NADPH-diaforase é uma enzima dependente de NADPH, assim como a nNOS. No estudo de Hope e cols. (1991) foi investigada a possibilidade da

NADPH-diaforase e da NOS serem a mesma proteína. Foi descoberto que, além de possuírem o mesmo peso molecular, o azul de nitrotetrazólio (substrato da NADPH-diaforase) é capaz de competir com a L-arginina (substrato da NOS) inibindo a NOS. Por isso, células NADPH-diaforase positivas podem ser consideradas células NOS-positivas e, por esse motivo, essa técnica pode ser utilizada para examinar a distribuição da NOS. Além disso, somente neurônios são corados por essa técnica, sendo que macrófagos e células endoteliais não são corados (Hope e cols., 1991).

O NO é considerado um inibidor da atividade simpática no PVN (Zhang e cols., 1997), entretanto, ainda não são completamente conhecidos os mecanismos e as vias celulares pelas quais ele age no PVN modulando a atividade simpática. Em 1994, Horn e colaboradores observaram que a perfusão do PVN com líquido cefalorraquidiano contendo NO ou nitroprussiato de sódio (doador de NO) promoveu redução significativa da pressão arterial em ratos anestesiados (Horn e cols., 1994). Esta foi uma importante descoberta sobre o papel inibitório que o NO desempenha no PVN contribuindo para a regulação do sistema cardiovascular.

No nosso estudo, o PVN de animais sham foi claramente delimitado pelas células NOS-positivas, sendo possível observar células de tamanhos diversificados. No entanto, em animais com IC foi observada redução significativa do número de células marcadas (redução de 44%). Resultado semelhante foi observado no trabalho de Zhang e colaboradores. (1998). Recentemente, McBryde e cols. (2018) mostraram que o NO endógeno do PVN é o principal regulador que suprime à longo prazo a atividade do nervo simpático renal, sendo observado que a maior expressão da nNOS é encontrada na região parvocelular do PVN, sendo essa a mesma região onde observamos aumento da expressão de neurônios NOS-positivos. De forma interessante, a superexpressão da nNOS no PVN de ratos com IC reduziu

significativamente a expressão aumentada do receptor glutamatérgico NMDA (Zheng e cols., 2011a). Assim, esses dados sugerem que a redução da nNOS no PVN de ratos com IC, e conseqüentemente a menor produção de NO, pode contribuir para o aumento da simpatoexcitação observada nessa condição. Isso é consistente com os resultados obtidos em nosso trabalho, pois, como citado anteriormente, observamos aumento tanto da ativação neuronal no PVN dos ratos com IC quanto da atividade simpática renal. Por outro lado, o tratamento central crônico com Ang-(1-7) em animais com IC reverteu parcialmente a redução da nNOS, aumentando em 39% o número de neurônios NOS-positivos. Nesse grupo também foi observado redução da ativação dos neurônios do PVN assim como redução da atividade do nervo simpático renal. Dessa forma, os resultados deste estudo são consistentes com o efeito inibitório que o NO exerce nos neurônios do PVN e que modulam o fluxo simpático, uma vez que a IC está associada a um quadro de simpatoexcitação, o qual foi atenuado pelo tratamento central com Ang-(1-7).

O mecanismo celular pelo qual o NO, agindo no PVN, inibe a simpatoexcitação foi investigado por Zhang e colaboradores (1997), que avaliaram a possibilidade de interação entre o NO e o GABA. O GABA é considerado o neurotransmissor dominante no PVN, contribuindo com a inibição tônica dos seus neurônios. Agindo através dos receptores GABA<sub>A</sub> ou GABA<sub>B</sub>, ocorre a abertura de canais de cloreto na membrana celular, sendo que o influxo de cloreto hiperpolariza a membrana, inibindo o neurônio (Decavel e Van den Pol, 1990). Estudos realizaram a microinjeção de NPS no PVN na presença e na ausência de bicuculina, um antagonista GABAérgico. Na ausência da bicuculina, o NPS promoveu redução da atividade do nervo simpático renal, da pressão arterial e da frequência cardíaca. Já



após o bloqueio dos receptores GABAérgicos, essas respostas foram eliminadas (Zhang e cols., 1997), sugerindo que a ação desencadeada pelo NO no PVN seria mediada pela liberação do GABA. Pelo fato de ser permeável à membrana celular, o NO pode ter efeitos tanto nas células circundantes, bem como nas células em que é formado (Hope e cols., 1991), o que facilita a sua interação com o GABA. Dessa forma, não é possível afirmar que a modulação da atividade simpática mediada pelo NO no PVN de animais com IC seja um efeito direto ou indireto, pois além de poder ser liberado pelos terminais nervosos para atuar sobre as células pós-sinápticas como um neurotransmissor, o NO também pode ser liberado pelos componentes pós-sinápticos para facilitar a liberação pré-sináptica nas sinapses circundantes (Hope, 1991).

Outro mecanismo proposto para explicar as ações do NO envolve sua interação com os neurotransmissores excitatórios glutamato e Ang II. Por ser simpatoexcitatório, a microinjeção de NMDA (agonista glutamatérgico) induz aumento de pressão arterial, frequência cardíaca e atividade simpática renal, sendo esses efeitos potencializados na presença de L-NMMA, um inibidor da NOS. Por outro lado, a resposta simpatoexcitatória provocada pela microinjeção de L-NMMA no PVN foi eliminada na presença de AP-5 (antagonista NMDA). Além disso, a microinjeção de glutamato ou NMDA no PVN induziu aumento na liberação de NO (Li e Patel, 2003). Ou seja, existe um *feedback* negativo onde a ativação de receptores NMDA aumenta a produção de NO, o qual por sua vez, inibe os efeitos simpatoexcitatórios mediados pelo NMDA e, assim, mantém em equilíbrio a atividade simpática. Sugere-se que o receptor NMDA e a nNOS possam estar interconectados através de proteínas específicas (PSD-95) (Li e Patel, 2003), portanto a sua ativação levaria ao aumento da síntese de NO. Por outro lado, o NO,

através da redução ou oxidação de certos resíduos de aminoácidos dos receptores glutamatérgicos, poderia reduzir a atividade dos mesmos, formando um *feedback* negativo (Li e Patel, 2003).

Em contrapartida, já foi relatado que a Ang-(1-7) é capaz de aumentar a produção de NO em células endoteliais (Sampaio e cols., 2007). Em camundongos, a superexpressão crônica de ECA2 no cérebro aumentou a liberação de NO, atenuando o desenvolvimento da hipertensão neurogênica induzida pela infusão crônica de Ang II, provavelmente por prevenir a redução da sensibilidade do barorreflexo e do tônus parassimpático. O antagonismo do receptor Mas reverteu totalmente os efeitos anti-hipertensivos da superexpressão de ECA2 nesses animais (Feng e cols., 2009). Já em animais com IC, a superexpressão de ECA2 no PVN aumentou os níveis proteicos de nNOS, além de atenuar a atividade do nervo simpático renal (Zheng e cols., 2011). Para avaliar como a Ang-(1-7) aumenta os níveis de NO, Yang e colaboradores (2011) utilizaram neurônios catecolaminérgicos que expressam tanto o receptor Mas quanto a enzima nNOS. Após a estimulação desses neurônios com Ang-(1-7) foi observado aumento dos níveis intracelulares de NO, via receptor Mas. Ainda nesse trabalho, foi registrado o efeito da Ang-(1-7) nos canais de potássio dependentes de voltagem dos neurônios catecolaminérgicos. Foi observado que na presença da Ang-(1-7) ou de um doador de NO as correntes de potássio aumentaram significativamente, sendo essa resposta inibida pelo A779 (Yang e cols., 2011). Os autores então sugerem que a Ang-(1-7) foi capaz de aumentar os níveis de NO que, por sua vez, aumentou as correntes de potássio resultando na hiperpolarização celular. Dessa forma, no nosso estudo é possível que o tratamento central com Ang-(1-7) aumente os níveis de nNOS, e conseqüentemente de NO, que por sua vez induz hiperpolarização através do

aumento da permeabilidade dos canais de potássio dos neurônios do PVN, resultando em redução da excitabilidade neuronal e, como resultado, redução da atividade simpática observada nesses animais.

A expressão aumentada do receptor glutamatérgico NMDA no PVN de animais com IC não tratados era esperada (Li e cols., 2003). Contudo, observamos um expressivo, porém não significativo, aumento na expressão da subunidade NR1 do receptor NMDA no PVN dos nossos animais com IC ( $p=0,06$ ), enquanto o tratamento com Ang-(1-7) não produziu qualquer efeito. É possível que a grande variabilidade deste dado associada ao pequeno número de amostras pode ter contribuído para a não detecção de diferença estatística. Assim, novas análises deverão ser realizadas para a confirmação desse resultado.

Tendo em vista que as citocinas pró-inflamatórias também são responsáveis pela hiperativação do PVN, também analisamos o efeito do tratamento crônico com Ang-(1-7) sobre os níveis da citocina pró-inflamatória IL-1 $\beta$  no PVN de animais com IC. Corroborando com o que a literatura mostra, os animais com IC apresentaram níveis aumentados de IL-1 $\beta$ . O tratamento com Ang-(1-7), por sua vez, reverteu totalmente o aumento de IL-1 $\beta$ . Já foi demonstrado que o aumento de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  no PVN de animais com IC é mediado através das aferências simpáticas cardíacas, que detectam alterações mecânicas e químicas no miocárdio através de suas inervações e sinalizam ao cérebro para ativar mecanismos para combater a lesão cardíaca. Dessa forma, estímulos provenientes do coração estimulam o sistema nervoso central para aumentar a produção de citocinas (Francis e cols., 2004a). A síntese aumentada de citocinas induz a síntese local de PGE2 (prostaglandina E2), já tendo sido relatado que a injeção ICV de PGE2 aumentou a atividade de neurônios do PVN, enquanto a injeção de PGE2 diretamente no PVN aumentou a

atividade dos neurônios do RVLM, resultando em aumento da atividade do nervo simpático renal, da pressão arterial e da frequência cardíaca (Zhang e cols., 2003). Essas respostas são as mesmas provocadas pela Ang II, sendo posteriormente observado que existe interação entre as citocinas pró-inflamatórias e a Ang II na IC (Guggilam e cols., 2008). Guggilam e colaboradores (2008) observaram que o bloqueio de citocinas pró-inflamatórias reduziu a expressão do receptor AT1 e aumentou os níveis da enzima nNOS no PVN. Nosso estudo vai de acordo com esse achado, pois concomitante à redução de IL-1 $\beta$  nós também observamos aumento da atividade da nNOS. Dessa forma, o aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias no PVN pode ser considerado um importante fator que leva ao desbalanço entre os mecanismos excitatórios e inibitório nesse núcleo e que contribuem com a simpatoexcitação da IC.

Nesse sentido, no presente estudo nós avançamos o entendimento sobre o importante papel da Ang-(1-7) no sistema nervoso central, em especial no PVN. Mostramos que animais com IC induzida por IM apresentam importantes alterações na modulação dos neurônios do PVN, como redução da NOS, que contribuem com a simpatoexcitação observada nessa condição, e que o tratamento com Ang-(1-7) é capaz de reverter essas alterações, resultando em atenuação do desbalanço autonômico cardíaco, redução da atividade simpática e menor taxa de mortalidade.

Nosso trabalho possui algumas limitações. A primeira delas é que não foi realizada a tempo a análise do exame ecocardiográfico realizado nos animais antes e após o período de tratamento com Ang-(1-7). Contudo, conforme podemos observar na Figura suplementar 1, as imagens representativas do ecocardiograma que foi realizado mostra a ausência de movimentos da parede anterior do ventrículo esquerdo, o que é um forte indício, ainda que qualitativo, de que esses animais

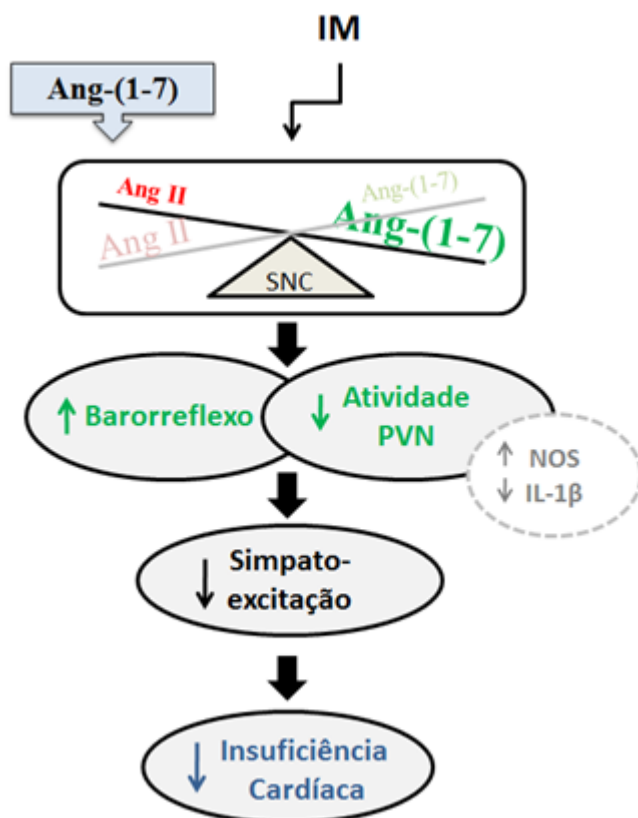
apresentavam disfunção ventricular. Os ratos com IC do presente estudo são comparáveis aos de outros estudos em termos de tamanho do infarto, hipertrofia cardíaca, diminuição da função contrátil, aumento da atividade dos neurônios do PVN e aumento da atividade simpática, o que sugere que eles estavam com IC. Zhang e cols. (1998) e Reddy e cols. (2007) também não avaliaram a função cardíaca dos animais infartados através de exame ecocardiográfico, mas avaliaram a pressão ventricular, e sugerem que o aumento da EDP associado à hipertrofia cardíaca e ao dano histológico no miocárdio é um indicativo de que os ratos do grupo com IC apresentaram diminuição da função contrátil cardíaca e estavam com IC. A segunda limitação se refere ao fato de não termos um grupo IC tratado com Ang-(1-7) juntamente com o antagonista A779, para avaliar se as alterações observadas nesse estudo foram realmente decorrentes da ativação do receptor Mas pela Ang-(1-7). No entanto, trabalhos anteriores observaram que as ações promovidas pela infusão ICV de Ang-(1-7) sobre a morfologia cardíaca, o ganho do barorreflexo e o tônus autonômico cardíaco em ratos hipertensos (Kangussu e cols., 2015) ou coelhos com IC (Kar e cols., 2011) foram mediadas pela ativação do receptor Mas. Por fim, vale ressaltar que iniciamos este trabalho com 4 grupos experimentais (Sham salina, Sham Ang-(1-7), IC salina e IC Ang-(1-7)), porém, como nosso objetivo era avaliar os efeitos da Ang-(1-7) em um modelo de IC e também por já ser descrito na literatura que a infusão ICV crônica de Ang-(1-7) não produz alterações cardiovasculares em animais normais, além de questões financeiras, uma vez que as mini-bombas osmóticas tem alto custo, nós excluímos dos demais protocolos experimentais o grupo sham Ang-(1-7). Alguns resultados que foram obtidos nesse grupo são mostrados nas Figuras suplementares 2, 3 e 4,

sendo que em nenhum dos parâmetros analisados foi observada diferença estatística em relação ao grupo sham salina.

## **VI. CONCLUSÃO**

Em conjunto os resultados desse estudo mostram que o aumento crônico dos níveis cerebrais de Ang-(1-7) modula favoravelmente o tônus autonômico em animais com IC após infarto agudo do miocárdio. Nossos resultados mostram pela primeira vez que a Ang-(1-7) altera o padrão de ativação dos neurônios do PVN em animais com IC, possivelmente relacionado ao aumento dos níveis de NO nesse núcleo, assim como a redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias. A restauração da sensibilidade do barorreflexo e a redução da hiperexcitação dos neurônios do PVN contribuíram para reduzir a hiperatividade simpática e, portanto a taxa de mortalidade nesses animais. Em conjunto essas alterações podem contribuir para controlar a progressão da IC, melhorando a qualidade e a expectativa de vida de indivíduos nessa condição. Entretanto, estudos futuros são necessários para melhorar o nosso entendimento sobre os mecanismos cerebrais que estão envolvidos nos efeitos produzidos pelo tratamento ICV com Ang-(1-7) em ratos com IC. Os novos achados deste estudo podem ter ramificações importantes para o tratamento da IC e reforçam a hipótese do SRA central como um potencial alvo terapêutico para o tratamento de doenças cardiovasculares.





**Figura 23** - Representação esquemática das alterações induzidas pelo aumento dos níveis centrais de Ang-(1-7) em animais com IC, resultando na redução da simpatoexcitação e controlando a progressão da insuficiência cardíaca. IM - infarto do miocárdio; SNC - sistema nervoso central; PVN - núcleo paraventricular do hipotálamo; nNOS - óxido nítrico sintase neuronal; IL-1 $\beta$  - interleucina 1 $\beta$ .

## **VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Aires, R.; Pimentel, E. B.; Forechi, L.; Dantas, E. M.; Mill, J. G. (2017) Time course of changes in heart rate and blood pressure variability in rats with myocardial infarction. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 50(1): e5511.
- Badoer, E. (2001) hypothalamic paraventricular nucleus and cardiovascular regulation. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 28: 95–99.
- Bains, J. S.; Ferguson, A. V. (1997) Nitric oxide regulates NMDA-driven GABAergic inputs to type I neurones of the rat paraventricular nucleus. *J Physiol (Lond)*. 499: 733-746.
- Barros, R. A.; Bonagamba, L. G. H.; Okamoto-Canesin, R.; De Oliveira, M.; Branco, L. G. S.; Machado, B. H. (2002) Cardiovascular responses to chemoreflex activation with potassium cyanide or hypoxic hypoxia in awake rats. *Auton. Neurosci.: Basic Clin*. 97: 110-115.
- Bartlett, D. Jr.; Tenney, S. M. (1970) Control of breathing in experimental anemia. *Respir. Physiol*. 10, 384-395.
- Basu R, Poglitsch M, Yogasundaram H, Thomas J, Rowe BH, and Oudit GY. (2017) Roles of Angiotensin Peptides and Recombinant Human ACE2 in Heart Failure. *J Am Coll Cardio*. 69: 805-819.
- Benarroch, E.E. (2005) Paraventricular nucleus, stress response, and cardiovascular disease. *Clin Auton Res*. 15: 254-263.
- Biscoe, T. J. (1971) Carotid body: structure and function. *Physiology Reviews* 51: 437-495.
- Biscoe, T. J. E. & Duchon, M. R. (1990) Responses of type I cells dissociated from the rabbit carotid body to hypoxia. *Journal of Physiology* 428: 39-59.
- Bowery, N. G.; Smart, T. G. (2006) GABA and glycine as neurotransmitters: a brief history. *Br. J. Pharmacol*. 147 Suppl 1: S109-119.
- Bredt, D. S.; Hwang, P. M.; Snyder, S. H. (1990) Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*. 347(6295): 768–770.
- Calegari, L.; Mozzaquattro, B. B.; Rossato, D. D.; Quagliotto, E.; Ferreira, J. B.; Rasia-Filho, A.; Dal Lago, P. (2016). Exercise training attenuates the pressor response evoked by peripheral chemoreflex in rats with heart failure. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 94(9): 979-986.

- Campagnole-Santos, M. J.; Diz, D. I.; Ferrario, C. M. (1988) Baroreceptor reflex modulation by angiotensin II at the nucleus tractus solitarii. *Hypertension* 11 [Suppl I]: I-167-I-171.
- Campagnole-Santos, M. J.; Heringer, S. B.; Batista, E. N.; Khosla, M. C.; Santos, R. A. (1992) Differential baroreceptor reflex modulation by centrally infused angiotensin peptides. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 263(1): R89–R94.
- Comroe Jr, J. H. (1939) The location and function of the chemoreceptors of aorta. *Am J Physiol.* **127**: 176-190.
- Dampney, R. A. L. (1994) Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. *Physiol Rev.* 74(2): 323-364.
- Danyel, L. A.; Schmerler, P.; Paulis, L.; Unger, T.; Steckelings, U. M. (2013) Impact of AT2-receptor stimulation on vascular biology, kidney function, and blood pressure. *Integr. Blood Press. Control.* 6: 153-161.
- Decavel, C. & Van den Pol, A. N. (1990). GABA: a dominant neurotransmitter in the hypothalamus. *J Comp Neurol.* 302: 1019-1037.
- Del Rio, R.; Marcus, N. J.; Schultz, H. D. (2013a). Inhibition of hydrogen sulfide restores normal breathing stability and improves autonomic control during experimental heart failure. *J Appl Physiol.* 114(9): 1141-1150.
- Del Rio, R.; Marcus, N. J.; Schultz, H. D. (2013b). Carotid chemoreceptor ablation improves survival in heart failure: rescuing autonomic control of cardiorespiratory function. *J Am Coll Cardiol.* 62: 2422-2430.
- De Moura, M. M.; dos Santos, R. A. S.; Campagnole-Santos, M. J.; Todiras, M.; Bader, M.; Alenina, N.; & Haibara, A. S. (2010). Altered cardiovascular reflexes responses in conscious Angiotensin-(1-7) receptor Mas-knockout mice. *Peptides.* 31(10): 1934–1939.
- DiBona G. F.; Sawin L. L. (1995) Increased renal nerve activity in cardiac failure: arterial vs. cardiac baroreflex impairment. *Am J Physiol.* 268: R112–R116.
- Diz, D. I.; Garcia-Espinosa, M. A.; Gallagher, P. E.; Ganten, D.; Ferrario, C. M.; Averill, D. B. (2008a) Angiotensin-(1-7) and baroreflex function in nucleus tractus solitarii of (mRen2)27 transgenic rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 51: 542–548.
- Diz, D.I.; Garcia-Espinosa, M. A.; Gegick, S.; Tommasi, E. N.; Ferrario, C. M.; Tallant, E. A.; Chappell, M. C.; Gallagher, P. E. (2008b) Injections of angiotensin-converting enzyme 2

inhibitor MLN4760 into nucleus tractus solitarii reduce baroreceptor reflex sensitivity for heart rate control in rats. *Experimental Physiology*. 93(5): 694-700.

Feng, Y.; Xia, H.; Cai, Y.; Halabi, C. M.; Becker, L. K.; Santos, R. A. S.; Speth, R. C.; Sigmund, C. D.; Lazartigues, E. (2009). Brain-Selective Overexpression of Human Angiotensin-Converting Enzyme Type 2 Attenuates Neurogenic Hypertension. *Circulation Research*. 106(2): 373–382.

Fortes, L. H. S. (2010) Efeito da ovariectomia sobre o balanço autonômico cardíaco de ratas submetidas à desnutrição proteica. Dissertação (Mestrado em Bioquímica estrutural e Fisiológica) Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.

Franchini, K. G. & Krieger, E. M. (1993) Cardiovascular responses of conscious rats to carotid body chemoreceptor stimulation by intravenous KCN. *Journal of the Autonomic Nervous System* 42: 63-69.

Francis, J.; Chu, Y.; Johnson, A. K.; Weiss, R. M.; Felder, R. B. (2004a) Acute myocardial infarction induces hypothalamic cytokine synthesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 286: H2264–H2271.

Francis, J.; Wei, S. G.; Weiss, R. M.; Felder, R. B. (2004b) Brain angiotensin-converting enzyme activity and autonomic regulation in heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 287: H2138–2146.

Fujisawa, Y.; Nagai, Y.; Lei, B.; Nakano, D.; Fukui, T.; Hitomi, H.; Mori, H.; Masaki, T.; Nishiyama, A. (2011) Roles of central reninangiotensin system and afferent renal nerve in the control of systemic hemodynamics in rats. *Hypertens Res*. 34:1228-1232.

Fung, M. L.; Tipoe, G. L.; Leung, P. S. (2014). Mechanisms of maladaptive responses of peripheral chemoreceptors to intermittent hypoxia in sleep-disordered breathing. *Sheng Li Xue Bao*. 66: 23-29.

Gao, L.; Schultz, H. D.; Patel, K. P.; Zucker, I. H.; Wang, W. (2005) Augmented Input From Cardiac Sympathetic Afferents Inhibits Baroreflex in Rats With Heart Failure. *Hypertension*. 45: 1173-1181.

Gonzales, C.; Almaraz, L.; Obeso, A.; Rigual, R. (1994) Carotid body chemoreceptors: from natural stimuli to sensory discharge. *Physiological Reviews*. 74(4): 829-898.

Gronda, E.; Seravalle, G.; Brambilla, G.; Costantino, G.; Casini, A.; Alsheraei, A.; Lovett, E. G.; Mancina, G.; Grassi, G. (2014) Chronic baroreflex activation effects on sympathetic nerve traffic, baroreflex function, and cardiac haemodynamics in heart failure: a proof-of-concept study. *Eur J Heart Fail.* 16: 977-983.

Gronda, E.; Vanoli, E.; Sacchi, S.; Grassi, G.; Ambrosio, G.; Napoli, C. (2019) Risk of heart failure progression in patients with reduced ejection fraction: mechanisms and therapeutic options. *Heart Fail Rev.* doi:10.1007/s10741-019-09823-z.

Guggilam, A.; Cardinale, J. P.; Mariappan, N.; Sriramula, S.; Haque, M.; Francis, J. (2011) Central TNF inhibition results in attenuated neurohumoral excitation in heart failure: a role for superoxide and nitric oxide. *Basic Res Cardiol.* 106(2): 273–286.

Guggilam, A.; Patel, K. P.; Haque, M.; Ebenezer, P. J. Kapusta, D. R.; Francis, J. (2008) Cytokine blockade attenuates sympathoexcitation in heart failure: cross-talk between nNOS, AT-1R and cytokines in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Eur J Heart Fail.* 10(7): 625–634.

Guimarães, P.S.; Santiago, N. M.; Xavier, C.H.; Velloso, E.P.; Fontes, M. A.; Santos, R. A. S.; Campagnole-Santos, M. J. (2012) Chronic infusion of angiotensin-(1-7) into the lateral ventricle of the brain attenuates hypertension in DOCA-salt rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 303: H393-H400.

Guyenet, P. G. (2006) The sympathetic control of blood pressure. *Nat Rev Neurosci.* 7 (5): 335-46.

Han, T. H.; Lee, K.; Park, J. B.; Ahm, D.; Park, J. H.; Kim, D. Y.; Stern, J. E.; Lee, S. Y.; Ryu, P. D. (2010). Reduction in synaptic GABA release contributes to target selective elevation of PVN neuronal activity in rats with myocardial infarction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 299: R129-R139.

Hedayat, M., Mahmoudi, M. J., Rose, N. R., & Rezaei, N. (2010) Proinflammatory cytokines in heart failure: double-edged swords. *Heart Failure Reviews.* 15(6): 543-562.

Hendricks, A.; Lawson, M. J.; Figueroa, J. P.; Chappell, M. C.; Diz, D. I.; Shaltout, H. A. (2019) Central ANG-(1-7) Infusion Improves Blood Pressure Regulation in Antenatal Betamethasone-Exposed Sheep and Reveals Sex Dependent Effects on Oxidative Stress. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology.* 316(6): H1458-H1467.

Heymans, C.; Bouckaert, J. J. (1930) Sinus caroticus and respiratory reflexes: I. Cerebral blood flow and respiration. Adrenaline apnoea. *Journal of Physiology* 69: 254-266.

Heymans, C.; Neil, E. (1958) Reflexogenic Areas of the Cardiovascular System. *Little, Brown and Co., Boston, Mass.* 34-55, 77-88.

Higgins, C. B.; Vatner, S. F.; Eckberg, D. L.; Braunwald, E. (1972) Alterations in the baroreceptor reflex in conscious dogs with heart failure. *J. CZin. Invest.* 51: 715-724.

Hope, B. T.; Michael, G. J.; Knigge, K. M.; Vincent, S. R. (1991). Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88(7): 2811–2814.

Horn, T.; Smith, P. M.; McLaughlin, B. E.; Bauce, L.; Marks, G. S.; Pittman, Q. J.; Ferguson, A. V. (1994). Nitric oxide actions in paraventricular nucleus: cardiovascular and neurochemical implications. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology.* 266(1): R306-R313.

Huang, B. S.; Leenen, F. H. H. (2009) The Brain Renin-Angiotensin Aldosterone System: A Major Mechanism for Sympathetic Hyperactivity and Left Ventricular Remodeling and Dysfunction After Myocardial Infarction. *Current Heart Failure Reports.* 6: 81–88.

Irigoyen, M. C. C.; Krieger, E. M. (1998) Baroreflex control of sympathetic activity in experimental hypertension. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 31(9): 1213-1220.

Iwai, M. & Horiuchi, M. (2009). Devil and angel in the renin–angiotensin system: ACE–angiotensin II–AT1 receptor axis vs. ACE2–angiotensin-(1–7)–Mas receptor axis. *Hypertension Research.* 32(7): 533–536.

Kang, Y.-M.; Ma, Y.; Elks, C.; Zheng, J.-P.; Yang, Z.-M.; Francis, J. (2008a) Cross-talk between cytokines and renin-angiotensin in hypothalamic paraventricular nucleus in heart failure: role of nuclear factor- B. *Cardiovascular Research.* 79(4): 671-678.

Kang, Y.-M.; Zhang, Z.-H.; Xue, B.; Weiss, R. M.; Felder, R. B. (2008b) Inhibition of brain proinflammatory cytokine synthesis reduces hypothalamic excitation in rats with ischemia-induced heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 295: H227–H236.

Kangussu, L. M.; Guimarães, P. S.; Nadu, A. P.; Melo, M. B.; Santos, R. A. S.; Campagnole-Santos, M. J. (2015) Activation of angiotensin-(1–7)/Mas axis in the brain lowers blood pressure and attenuates cardiac remodeling in hypertensive transgenic (mRen2)27 rats. *Neuropharmacology.* 97: 58-66.

- Kar, S.; Gao, L.; Belatti, D. A.; Curry, P. L.; Zucker, I. H. (2011) Central angiotensin (1-7) enhances baroreflex gain in conscious rabbits with heart failure. *Hypertension* 58: 627-634.
- Kar, S.; Gao, L.; Zucker, I. H. (2010). Exercise training normalizes ACE and ACE2 in the brain of rabbits with pacing-induced heart failure. *Journal of Applied Physiology*. 108(4): 923-932.
- Kirchheim, H. R. (1976) Systemic arterial baroreceptors reflexes. *Physiol Rev* 56: 100-176.
- Kleiber, A. C.; Zheng, H.; Sharma, N. M.; Patel, K. P. (2010) Chronic AT1 receptor blockade normalizes NMDA-mediated changes in renal sympathetic nerve activity and NR1 expression within the PVN in rats with heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 298: H1546–H1555.
- Li, Z.; Ferguson, A. V. (1996) Electrophysiological properties of paraventricular magnocellular neurons in rat brain slices: Modulation of IA by angiotensin II. *Neuroscience*. 71(1): 133-145.
- Li, D.-P.; Pan, H.-L. (2005) Angiotensin II Attenuates Synaptic GABA Release and Excites Paraventricular-Rostral Ventrolateral Medulla Output Neurons. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 313(3), 1035–1045.
- Li, Y. F.; Patel, K. P. (2003) Paraventricular nucleus of the hypothalamus and elevated sympathetic activity in heart failure: the altered inhibitory mechanisms. *Acta Physiol Scand*. 177: 17–26.
- Li, Y.-F.; Cornish, K. G.; Patel, K. P. (2003). Alteration of NMDA NR1 Receptors Within the Paraventricular Nucleus of Hypothalamus in Rats With Heart Failure. *Circulation Research*. 93(10): 990–997.
- Li, Y.-F.; Wang, W.; Mayhan, W. G.; Patel, K. P. (2006). Angiotensin-mediated increase in renal sympathetic nerve discharge within the PVN: role of nitric oxide. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 290(4): R1035-R1043.
- Li, Y.; Li, X.; Yuan, H. (2012) Angiotensin II type-2 receptor-specific effects on the cardiovascular system. *Cardiovasc Diagn Ther*. 2: 56–62.
- Liu, J.-L. & Zucker, I. H. (1999). Regulation of Sympathetic Nerve Activity in Heart Failure : A Role for Nitric Oxide and Angiotensin II. *Circulation Research*, 84(4): 417-423.



- Loot, A. E.; Roks, A. J. M.; Henning, R. H.; Tio, R. A.; Suurmeijer, A. J. H.; Boomsma, F.; van Gilst, W. H. (2002). Angiotensin-(1-7) Attenuates the Development of Heart Failure After Myocardial Infarction in Rats. *Circulation*. 105(13): 1548-1550.
- Marcus, N. J.; Del Rio, R.; Schultz, E. P.; Xia, X. H.; Schultz, H. D. (2014) Carotid body denervation improves autonomic and cardiac function and attenuates disordered breathing in congestive heart failure. *J Physiol*. 592.2: 391-408.
- Masson, G. S.; Borges, J. P.; da Silva, P. P. S.; da Nóbrega, A. C. L.; Tibiriçá, E.; Lessa, M. A. (2016). Effect of continuous and interval aerobic exercise training on baroreflex sensitivity in heart failure. *Autonomic Neuroscience*. 197: 9–13.
- May, C. N.; Yao, S. T.; Booth, L. C.; Ramchandra, R. (2013) Cardiac sympathoexcitation in heart failure. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*. 175: 76-84.
- McBryde, F. D.; Liu, B. H.; Roloff, E. V.; Kasparov, S.; Paton, J. F. R. (2018) Hypothalamic paraventricular nucleus neuronal nitric oxide synthase activity is a major determinant of renal sympathetic discharge in conscious Wistar rats. *Experimental Physiology*. 103(3): 419:428.
- Mechanic, O. J.; Grossman, S. A. Acute Myocardial Infarction. [Updated 2019 Aug 15]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459269/>
- Mendonça, M. M.; Santana, J. S.; da Cruz, K. R.; Ianzer, D.; Ghedini, P. C.; Nalivaiko, E.; Fontes, M. A. P.; Ferreira, R. N.; Pedrino, G. R.; Colugnati, D. B.; Xavier, C. H. (2018) Involvement of GABAergic and Adrenergic Neurotransmissions on Paraventricular Nucleus of Hypothalamus in the Control of Cardiac Function. *Front. Physiol*. 9:670.
- Mendoza-Torres, E.; Oyarzún, A.; Mondaca-Ruff, D.; Azocar, A.; Castro, P. F.; Jalil, J. E.; Chiong, M.; Lavandero, S.; Ocaranza, M. P. (2015). ACE2 and vasoactive peptides: novel players in cardiovascular/renal remodeling and hypertension. *Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease*. 9(4): 217-237.
- Mill, J. G.; Stefanon, L. S.; Baldo, M. P. (2011) Remodeling in the ischemic heart: the stepwise progression for heart. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 44: 890-898.
- Miller, A. J. & Arnold, A. C. (2018). The renin–angiotensin system in cardiovascular autonomic control: recent developments and clinical implications. *Clinical Autonomic Research*. 29(2): 231–243.

Miyawaki, T.; Minson, J.; Arnolda, L.; Chalmers, J.; Llewellyn-Smith, I.; Pilowsky, P. (1996) Role of excitatory amino acid receptors in cardiorespiratory coupling in ventrolateral medulla. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 271(5): R1221-R1230.

Mulla, A. & Buckingham, J. C. (1999) Regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis by cytokines. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 13: 503–521.

Organização Mundial da Saúde (OMS) 2019 - <https://www.who.int>

Pan, W.; Zadina, J. E.; Harlan, R. E.; Weber, J. T.; Banks, W. A.; Kastin, A. J. (1997) Tumor necrosis factor- $\alpha$ : a neuromodulator in the CNS. *Neurosci Biobehav Rev* 21: 603–613.

Passamani, L. M.; Abdala, A. P.; Moraes, D. J. A.; Sampaio, K. N.; Mill, J. G.; Paton, J. F. R. (2014) Temporal Profile and Mechanisms of the Prompt Sympathoexcitation following Coronary Ligation in Wistar Rats. *PLoS ONE* 9(7): e101886.

Patel, K. P. (2000) Role of paraventricular nucleus in mediating sympathetic outflow in heart failure. *Heart Fail. Rev.* 5: 73–86.

Patel, K. P.; Zhang, K.; Kenney, M. J.; Weiss, M.; Mayhan, W. G. (2000) Neuronal expression of Fos protein in the hypothalamus of rats with heart failure. *Brain Research*. 865: 27–34.

Paxinos, G.; Watson, C. (2007) The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th. Amsterdam; Boston, Academic Press/Elsevier.

Pfeffer, M. A.; Braunwald, E. (1990). Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation*, 81(4): 1161-1172.

Pfeffer, M. A.; Pfeffer, J. M.; Fishbein, M. C.; Fletcher, P. J.; Spadaro, J.; Kloner, R. A.; Braunwald, E. (1979) Myocardial Infarct Size and Ventricular Function in Rats. *Circulation Research*. 44(4): 503-512.

Ponikowski, P.; Anker, S. D.; Chua, T. P.; Francis, D.; Banasiak, W.; Poole-Wilson, P. A.; Coats, A. J. S.; Piepoli, M. (1999) Oscillatory breathing patterns during wakefulness in patients with heart failure: clinical implications and role of augmented peripheral chemosensitivity. *Circulation*. 100: 2418-2424.

Ponikowski, P.; Chua, T. P.; Anker, S. D.; Francis, D. P.; Doehner, W.; Banasiak, W.; Poole-Wilson, P. A.; Piepoli, M. F.; Coats, A. J. (2001). Peripheral chemoreceptor hypersensitivity: an ominous sign in patients with chronic heart failure. *Circulation*. 104: 544-549.

Précoma, D. B.; Oliveira, G. M. M.; Simão, A. F.; Dutra, O. P.; Coelho, O. R.; Izar, M. C. O.; Santos, R. M.; Mourilhe-Rocha, R. (2019) Atualização da Diretriz de Prevenção Cardiovascular da Sociedade Brasileira de Cardiologia *Arq Bras Cardiol*. 113(4): 787-891.

Pyner, S. (2009). Neurochemistry of the paraventricular nucleus of the hypothalamus: implications for cardiovascular regulation. *J Chem Neuroanat*. 38: 197–208.

Pyner, S. (2014) The paraventricular nucleus and heart failure. *Exp Physiol*. 99(2): 332-339.

Reddy, M. K.; Schultz, H. D.; Zheng, H.; Patel, K. P. (2007). Altered nitric oxide mechanism within the paraventricular nucleus contributes to the augmented carotid body chemoreflex in heart failure. *Am J Physiol Heart and Circ Physiol*. 292(1): H149–H157

Ren, X.; Zhang, F.; Zhao, M.; Zhao, Z.; Sun, S.; Fraidenburg, D. R.; Tang, H.; Han, Y. (2017). Angiotensin-(1-7) in Paraventricular Nucleus Contributes to the Enhanced Cardiac Sympathetic Afferent Reflex and Sympathetic Activity in Chronic Heart Failure Rats. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 42(6): 2523-2539.

Rovere, M. T. L.; Bigger, J. T.; Marcus, F. I.; Mortara, A.; Schwartz, P. J. (1998). Baroreflex sensitivity and heart-rate variability in prediction of total cardiac mortality after myocardial infarction. *The Lancet*. 351(9101): 478-484.

Sampaio WO, Souza dos Santos RA, Faria-Silva R, da Mata Machado LT, Schiffrin EL, Touyz RM. (2007) Angiotensin-(1–7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. *Hypertension* 49: 185–192.

Santos, R. A. (2014) Angiotensin-(1-7). *Hypertension* 63: 1138-1147.

Santos, R. A. S.; Ferreira, A. J.; Verano-Braga, T.; Bader, M. (2012). Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1-7) and Mas: new players of the renin-angiotensin system. *Journal of Endocrinology*. 216(2): R1-R17.

Santos, R. A. S.; Simões e Silva, A. C.; Maric, C.; Silva, D. M. R.; Machado, R. P.; Buhr, I.; Heringer-Walther, S.; Pinheiro, S. V.; Lopes, M. T.; Bader, M.; Mendes, E. P.; Lemos, V. S.; Campagnole-Santos, M. J.; Schultheiss, H. P.; Speth, R.; Walther T. (2003) Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(14): 8258-63.

- Santos, R. A. S.; Sampaio, W. O.; Alzamora, A. C.; Motta-Santos, D.; Alenina, N.; Bader, M.; Campagnole-Santos, M. J. (2018). The ACE2/Angiotensin-(1–7)/MAS Axis of the Renin-Angiotensin System: Focus on Angiotensin-(1–7). *Physiological Reviews*. 98(1): 505–553.
- Sapru, H. N.; Krieger, A. J. (1977) Carotid and aortic chemoreceptor function in the rat. *Journal of Applied Physiology: Respiratory, Environmental and Exercise Physiology* **42**: 344-348.
- Schultz, H. D.; Li, Y. I. (2007) Carotid body function in heart failure. *Respir Physiol Neurobiol*. 157(1): 171-85.
- Schultz, H. D.; Li, Y. L.; Ding, Y. (2007) Arterial Chemoreceptors and Sympathetic Nerve Activity: Implications for Hypertension and Heart Failure. *Hypertension*. 50(1): 6-13.
- Schultz, H. D. (2011) Angiotensin and carotid body chemoreception in heart failure. *Current Opinion in Pharmacology*. 11(2): 144-149.
- Schultz, H. D.; Marcus, N. J.; Del Rio, R. (2015). Mechanisms of carotid body chemoreflex dysfunction during heart failure. *Experimental Physiology*. 100(2): 124–129.
- Schultz, H. D., Marcus, N. J. e Del Rio, R. (2013) Role of the Carotid Body in the Pathophysiology of Heart Failure. *Curr Hypertens Rep*. 15(4): 356–362.
- Sharma, N. M.; Nandi, S. S.; Zheng, H.; Mishra, P. K.; Patel, K. P. (2017). A novel role for miR-133a in centrally mediated activation of the renin-angiotensin system in congestive heart failure. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 312(5): H968–H979.
- Sharma, N. M.; Zheng, H.; Li, Y.-F.; Patel, K. P. (2012) Nitric oxide inhibits the expression of AT1 receptors in neurons. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 302(8): C1162-C1173.
- Sharma, N. M.; Zheng, H.; Mehta, P. P.; Li, Y. F.; Patel, K. P. (2011) Decreased nNOS in the PVN leads to increased sympathoexcitation in chronic heart failure: role for CAPON and Ang II. *Cardiovasc Res*. 92: 342–357.
- Sharma, N. M.; Llewellyn, T. L.; Zheng, H.; Patel, K. P. (2013) Angiotensin II-mediated posttranslational modification of nNOS in the PVN of rats with CHF: role for PIN. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 305: H843–H855.

Shenton, F. C.; Pyner, S. (2016) Vagal afferents, sympathetic efferents and the role of the PVN in heart failure. *Autonomic Neuroscience*. 199: 38-47.

Silva, A. Q. G.; Santos, R. A. S.; Fontes, M. A. P. (2005). Blockade of Endogenous Angiotensin-(1-7) in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus Reduces Renal Sympathetic Tone. *Hypertension*. 46(2): 341–348.

Spyer, K. M. (1990) The Central Nervous Organization of Reflex Circulatory Control. In: Central Regulation of Autonomic Function, edited by Loewy AD, and Spyer KM. *New York: Oxford University Press*, 169-188.

Sriramula, S.; Cardinale, J. P.; Lazartigues, E.; Francis, J. (2011) ACE2 overexpression in the paraventricular nucleus attenuates angiotensin II-induced hypertension. *Cardiovascular Research*. 92(3): 401-408.

Sun, S. Y.; Wang, W.; Zucker, I. H.; Schultz, H. D. (1999) Enhanced peripheral chemoreflex function in conscious rabbits with pacing-induced heart failure. *J Appl Physiol* 86: 1264–1272.

Tan, J.; Wang, H.; Leenen, F. H. H. (2004) Increases in brain and cardiac AT1 receptor and ACE densities after myocardial infarct in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 286: H1665–H1671.

Toledo, C.; Andrade, D. C.; Lucero, C.; Schultz, H. D.; Marcus, N.; Retamal, M.; Madrid, C.; Del Rio, R. (2017) Contribution of peripheral and central chemoreceptors to sympatho-excitation in heart failure. *J Physiol*. 595(1): 43–51.

Toschi-Dias, E.; Rondon, M. U. P. B.; Cogliati, C.; Paolocci, N.; Tobaldini, E.; Montano, N. (2017) Contribution of Autonomic Reflexes to the Hyperadrenergic State in Heart Failure. *Front. Neuroscience*. 11:162.

Tsutamoto, T.; Wada, A.; Maeda, K.; Mabuchi, N.; Hayashi, M.; Tsutsui, T.; et al. (2000) Angiotensin II type 1 receptor antagonist decreases plasma levels of tumor necrosis factor alpha, interleukin-6 and soluble adhesion molecules in patients with chronic heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*. 35(3): 714-721.

Urbanski, R. W.; Sapru, H. N. (1988) Putative neurotransmitters involved in medullary cardiovascular regulation. *Journal of the Autonomic Nervous System* 25: 181-193.

- Vahid-Ansari, F.; Leenen, F. H. H. (1998) Pattern of neuronal activation in rats with CHF after myocardial infarction. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 275(6): H2140–H2146.
- Wang, W.; Chen, J. S.; Zucker, I. H. (1990). Carotid sinus baroreceptor sensitivity in experimental heart failure. *Circulation*. 81(6): 1959–1966.
- Wang, Y.; Seto, S.-W.; Golledge, J. (2012) Angiotensin II, sympathetic nerve activity and chronic heart failure. *Heart Failure Reviews*. 19(2): 187-198.
- Wu, Y., Yin, X., Wijaya, C., Huang, M.H., McConnell, B.K. (2011) Acute Myocardial Infarction in Rats. *J. Vis. Exp.* (48), e2464.
- Xing, D. T.; May, C. N.; Booth, L. C.; Ramchandra, R. (2014). Tonic arterial chemoreceptor activity contributes to cardiac sympathetic activation in mild ovine heart failure. *Exp Physiol*. 99: 1031-1041.
- Xu, B.; Zheng, H.; Patel, K. P. (2012). Enhanced activation of RVLM-projecting PVN neurons in rats with chronic heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 302: H1700–H1711.
- Yang, R.-F.; Yin, J.-X.; Li, Y.-L.; Zimmerman, M. C.; Schultz, H. D. (2011). Angiotensin-(1–7) increases neuronal potassium current via a nitric oxide-dependent mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol*. 300(1): C58-C64.
- Yoshikawa, M.; Suzumura, A.; Tamaru, T.; Takayanagi, T.; Sawada, M. (1999) Effects of phosphodiesterase inhibitors on cytokine production by microglia. *Mult Scler*. 5: 126-133.
- Yu, X.-J.; Miao, Y.-W.; Li, H.-B.; Su, Q.; Liu, K.-L.; Fu, L.-Y. Kang, Y.-M. (2018) Blockade of Endogenous Angiotensin-(1–7) in Hypothalamic Paraventricular Nucleus Attenuates High Salt-Induced Sympathoexcitation and Hypertension. *Neuroscience Bulletin*. 35(1):47-56.
- Yu, Y.; Cao, Y.; Bell, B.; Chen, X.; Weiss, R. M.; Felder, R. B.; Wei, S.-G. (2019). Brain TACE (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ -Converting Enzyme) Contributes to Sympathetic Excitation in Heart Failure Rats. *Hypertension*. 74(1): 63-72
- Yu, Y.; Wei, S.-G.; Zhang, Z.-H.; Weiss, R. M.; Felder, R. B. (2016) ERK1/2 MAPK signaling in hypothalamic paraventricular nucleus contributes to sympathetic excitation in rats with heart failure after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 310: H732–H739.
- Yun, H.-Y.; Dawson, V. L.; Dawson, T. M. (1997). Nitric oxide in health and disease of the nervous system. *Molecular Psychiatry*. 2(4): 300-310.

- Zelis, R.; Delea, C. S.; Coleman, H. N.; Mason, D. T. (1970) Arterial sodium content in experimental congestive heart failure. *Circulation*. 41(2): 213-216.
- Zhang, K.; Li, Y. F.; Patel, K. P. (2001) Blunted nitric oxide-mediated inhibition of renal nerve discharge within the paraventricular nucleus of rats with heart failure. *Am J Physiol*. 281: H995–H1004.
- Zhang, K.; Li, Y. F.; Patel, K. P. (2002b) Reduced endogenous GABA-mediated inhibition in the PVN on renal nerve discharge in rats with heart failure. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol*. 282: R1006–1015.
- Zhang, K.; Mayhan, W. G.; Patel, K. P. (1997) Nitric oxide within the paraventricular nucleus mediates changes in renal sympathetic nerve activity. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*. 273: R864–R872.
- Zhang, K.; Zucker, I. H.; Patel, K. P. (1998) Altered number of diaphorase (NOS) positive neurons in the hypothalamus of rats with heart failure. *Brain Res* 786: 219–225.
- Zhang, Y.; Lu, J.; Shi, J.; Lin, X.; Dong, J.; Zhang, S.; Liu, Y.; Tong, Q. (2008) Central administration of angiotensin-(1–7) stimulates nitric oxide release and upregulates the endothelial nitric oxide synthase expression following focal cerebral ischemia/reperfusion in rats. *Neuropeptides*. 42: 593–600.
- Zhang, Z. H.; Francis, J.; Weiss, R. M.; Felder, R. B. (2002a) The renin-angiotensin-aldosterone system excites hypothalamic paraventricular nucleus neurons in heart failure. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 283: H423–H433.
- Zhang, Z. H.; Wei, S. G.; Francis, J.; Felder, R. B. (2003) Cardiovascular and renal sympathetic activation by blood-borne TNF- $\alpha$  in rat: the role of central prostaglandins. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 284: R916-R927.
- Zheng, H.; Li, Y. F.; Cornish, K. G.; Zucker, I. H.; Patel, K. P. (2005) Exercise training improves endogenous nitric oxide mechanisms within the paraventricular nucleus in rats with heart failure. *Am J Physiol*. 288: H2332-H2341.
- Zheng, H.; Li, Y. F.; Wang, W.; Patel, K. P. (2009) Enhanced angiotensin-mediated excitation of renal sympathetic nerve activity within the paraventricular nucleus of anesthetized rats with heart failure. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol*. 297: R1364–1374.

Zheng, H.; Liu, X.; Patel, K. P. (2011) Angiotensin-converting enzyme 2 overexpression improves central nitric oxide-mediated sympathetic outflow in chronic heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 301: H2402–H2412.

Zhu, G.-Q.; Gao, L.; Patel, K. P.; Zucker, I. H.; Wang, W. (2004). ANG II in the paraventricular nucleus potentiates the cardiac sympathetic afferent reflex in rats with heart failure. *Journal of Applied Physiology*. 97(5): 1746–1754.

Zornoff, L. A. M.; Paiva, S. A. R.; Minicucci, M. F.; Spadaro, J. (2009). Experimental myocardium infarction in rats: analysis of the model. *Arq Bras Cardiol*. 93(4): 434-440

Zucker, I. H.; Hackley, J. F.; Cornish, K. G.; Hiser, B. A.; Anderson, N. R.; Kieval, R.; Irwin, E. D.; Serdar, D. J.; Peuler, J. D.; Rossing, M. A. (2007). Chronic baroreceptor activation enhances survival in dogs with pacing-induced heart failure. *Hypertension* 50: 904–910.

Zucker, I. H., Schultz, H. D., Li, Y.-F., Wang, Y., Wang, W., & Patel, K. P. (2004). The origin of sympathetic outflow in heart failure: the roles of angiotensin II and nitric oxide. *Prog Biophys Mol Biol*. 84(2-3): 217-232.

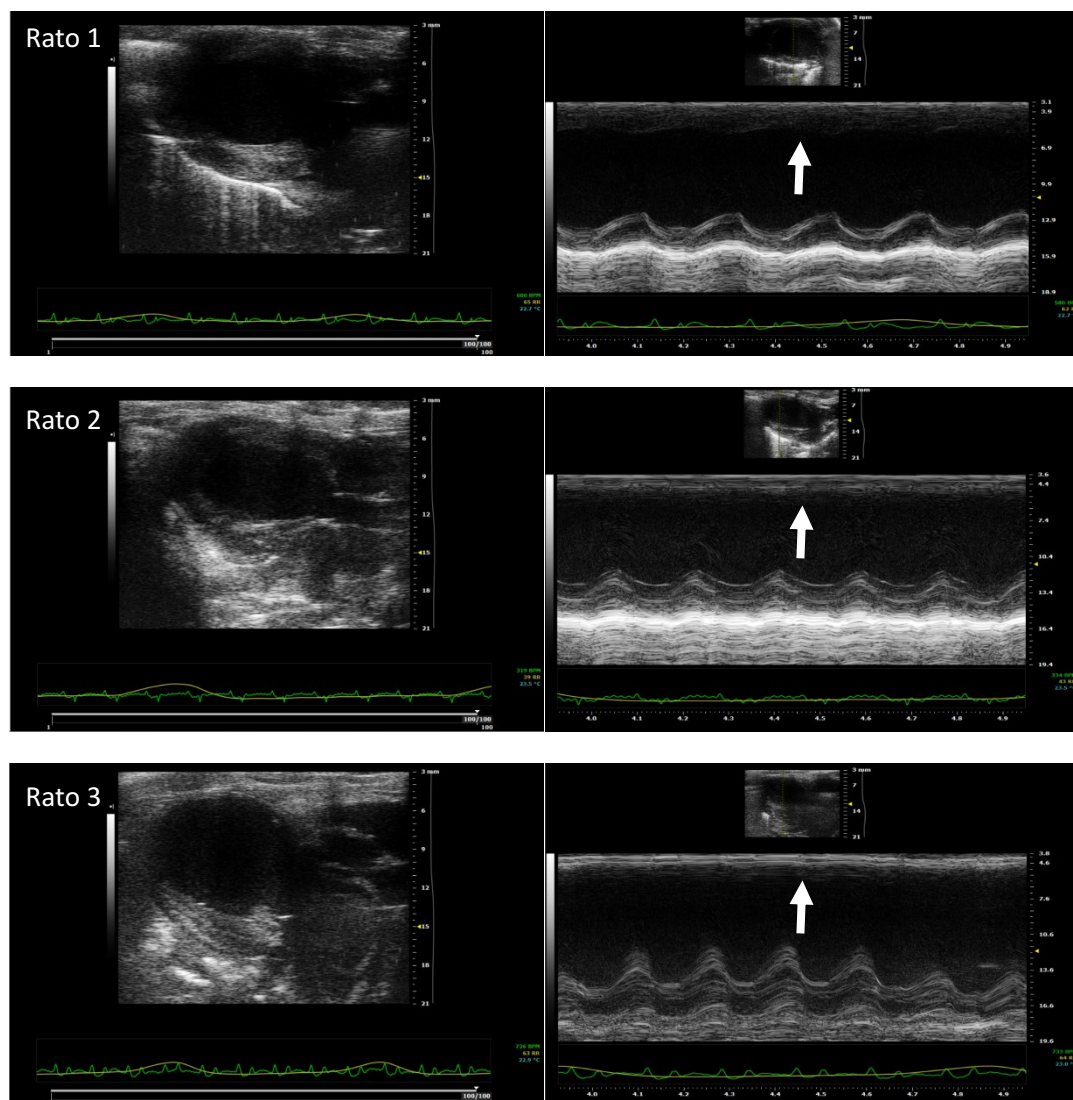
Zucker, I. H.; Wang, W. (1991) Reflex control of renal sympathetic nervous activity in heart failure. *Herz* 16: 82–91.

Zucker, I. H.; Wang, W.; Brindle, M.; Schultz, H. D.; Patel, K. P. (1995) Neural Regulation of Sympathetic Nerve Activity in Heart Failure. *Progress Cardiovascular Diseases*. 37: 397-414.

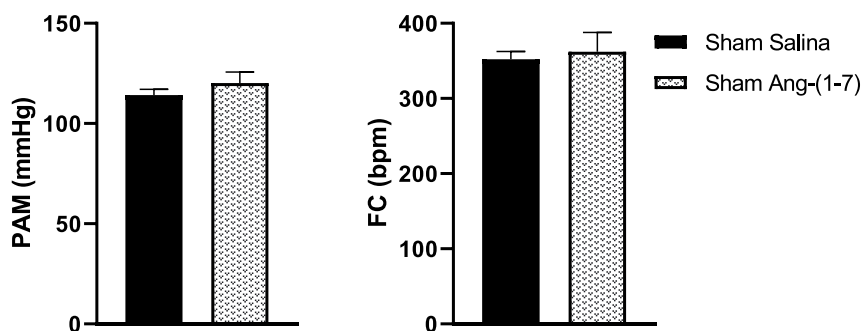
Zucker, I. H.; Xiao, L.; Haack, K. K. V. (2014) The Central RAS and Sympathetic Nerve Activity in Chronic Heart Failure. *Clin Sci (Lond)*. 126(10): 695–706.



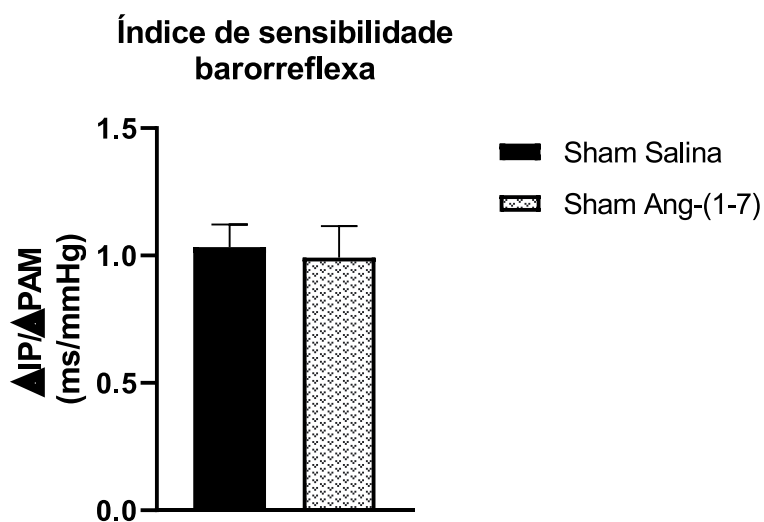
## **VIII. ANEXOS**



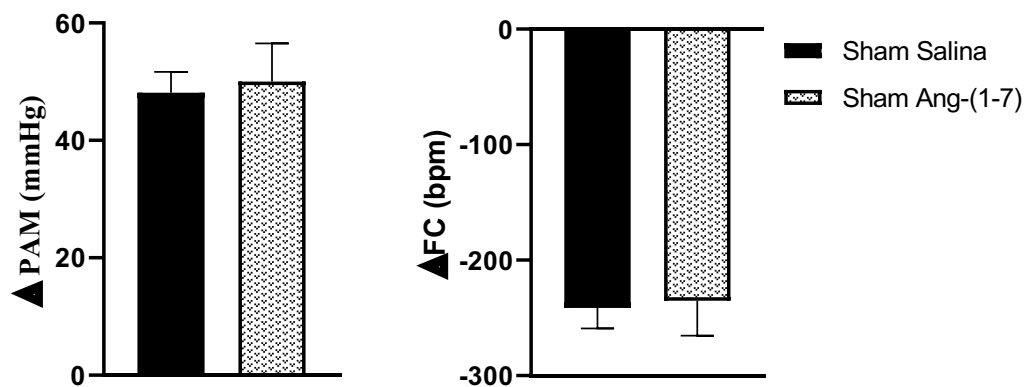
**Figura suplementar 1** - Imagens representativas do exame ecocardiográfico realizado em 3 animais distintos 3 semanas após a indução do IM mostrando a ausência de movimentos da parede anterior do ventrículo esquerdo (setas).



**Figura suplementar 2** - Valores basais de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) dos animais dos grupos sham salina ( $n=8$ ) e sham Ang-(1-7) ( $n=5$ ) após 28 dias de infusão central crônica de Ang-(1-7) ( $0,4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) ou salina. Valores expressos como média  $\pm$  EPM.  $p>0,05$  Teste  $t$ .



**Figura suplementar 3** - Índice de sensibilidade do barorreflexo dos animais dos grupos sham salina ( $n=8$ ) e sham Ang-(1-7) ( $n=5$ ) após 28 dias de infusão central crônica de Ang-(1-7) ( $0,4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) ou salina. Valores expressos como média  $\pm$  EPM.  $p>0,05$  Teste  $t$ .



**Figura suplementar 4** - Alterações na pressão arterial média ( $\Delta$ PAM) e frequência cardíaca ( $\Delta$ FC), produzidas pela injeção i.v. de KCN ( $40\mu\text{g}/0,1\text{ml}$ ) nos animais dos grupos sham salina ( $n=8$ ) e sham Ang-(1-7) ( $n=5$ ) após 28 dias de infusão central crônica de Ang-(1-7) ( $0,4\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) ou salina. Valores expressos como média  $\pm$  EPM.  $p>0,05$  Teste *t*.