

**DANIELLE CARVALHO DE OLIVEIRA COUTINHO**

**EFEITOS DA ATIVAÇÃO DO EIXO ENZIMA CONVERSORA DE  
ANGIOTENSINA 2/ANGIOTENSINA-(1-7)/RECEPTOR MAS NO METABOLISMO  
ENERGÉTICO E NA ELETROFISIOLOGIA DO CORAÇÃO**

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
JANEIRO/2016**

**DANIELLE CARVALHO DE OLIVEIRA COUTINHO**

**EFEITOS DA ATIVAÇÃO DO EIXO ENZIMA CONVERSORA DE  
ANGIOTENSINA 2/ANGIOTENSINA-(1-7)/RECEPTOR MAS NO METABOLISMO  
ENERGÉTICO E NA ELETROFISIOLOGIA DO CORAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências.

**Área de concentração:** Biologia Celular

**Orientador:** Dr. Anderson José Ferreira

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
JANEIRO/2016**

Este trabalho foi realizado nos seguintes laboratórios:

- Laboratório de Biologia Cardíaca (Departamento de Morfologia), Laboratório de Hipertensão (Departamento de Fisiologia e Biofísica) e Laboratório de Membranas Excitáveis (Departamento de Bioquímica e Imunologia) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.
- Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular e Laboratório de Físico-Química Biológica Aída Hassón Voloch do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Contou com o auxílio financeiro das seguintes Agências de fomento:

- Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia em Nanobiofarmacêutica (INCTnanobiofar)
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)

**Aos meus amores, Paulo e Dominic.**

## AGRADECIMENTOS

À Deus por me alimentar com a Fé. Com ela tudo é possível.

À minha família. Vocês me permitem transmitir todos os esforços e tensões gerados para a minha edificação para um solo firme. É nessa base que eu me sustento.

À todos os meus professores. Vocês desbravaram os caminhos para que eu chegasse até aqui. A empolgação de cada um de vocês seguirá para sempre comigo.

Aos amigos. A troca de qualquer informação, especialmente as mais simples, fazem vocês fundamentais para a construção e desenvolvimento dos mais complexos projetos.

Aos laboratórios parceiros. Em cada lugar por onde passei encontrei pessoas incríveis. Vocês dão vida a esses ambientes. A acolhida me ofereceu liberdade para ser criativa e experimentar com audácia.

Ao Prof. Anderson José Ferreira, por sua orientação ao longo de todos esses anos. A todos os parceiros deste trabalho. O talento de cada um de vocês ficará registrado nesta Tese.

Ao Artur Santos Miranda, por iniciar esse projeto junto comigo e não titubear em abrir mão dos finais de semana e feriados para realizar os experimentos de eletrofisiologia. Também ao Prof. Jader do Santos Cruz, pela amizade que construímos durante esses anos.

Ao Gustavo Monnerat Cahli, que a partir de uma apresentação em congresso, vislumbrou a construção de uma parceria que se estenderá por muitos anos. Também ao Prof. Emiliano Horacio Medei, por me receber em seu laboratório, confiar em mim e iluminar os caminhos para as análises da função mitocondrial deste trabalho.

Ao Prof. Robson Augusto Souza Santos, pelo esforço dedicado a construção da sua carreira que hoje serve de fonte inspiradora.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	04
<b>2.1 Sistema renina angiotensina</b> .....	04
<b>2.2 Enzima conversora de angiotensina 2</b> .....	08
<b>2.3 Angiotensina-(1-7)</b> .....	14
<b>2.4 Receptor Mas de Angiotensina-(1-7)</b> .....	16
<b>2.5 Isquemia/reperfusão no coração</b> .....	17
<b>2.6 Mitocôndrias e músculo cardíaco</b> .....	19
<b>2.7 Eletrofisiologia cardíaca</b> .....	21
<b>2.8 Diabetes e o remodelamento elétrico cardíaco</b> .....	22
<b>3. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA</b> .....	24
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	25
<b>4.1 Objetivo geral</b> .....	25
<b>4.2 Objetivos específicos</b> .....	25
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	26
<b>5.1 Animais</b> .....	26
<b>5.2 Tratamento com o DIZE</b> .....	26
<b>5.3 Indução da hiperglicemia</b> .....	27
<b>5.4 Genotipagem dos animais transgênicos</b> .....	27
<b>5.5 Perfil das citocinas nos animais Mas-KO</b> .....	29
<b>5.6 Coração isolado</b> .....	30
<b>5.7 Dosagem de ATP ventricular</b> .....	31
<b>5.8 Análise da função mitocondrial cardíaca</b> .....	33
<b>5.8.1 Fibras permeabilizadas</b> .....	33
<b>5.8.2 Mitocôndrias isoladas</b> .....	34
<b>5.9 Eletrofisiologia cardíaca</b> .....	35
<b>5.9.1 Cardiomiócitos não-hiperglicêmicos</b> .....	35
<b>5.9.2 Cardiomiócitos hiperglicêmicos</b> .....	37

5.9.2.1 Eletrocardiografia.....	37
5.9.2.2 Registros do potencial de ação.....	38
5.10 Análise estatística.....	39
6. RESULTADOS.....	40
6.1 Genotipagem dos animais transgênicos por PCR.....	40
6.2 Efeitos da administração crônica do DIZE na isquemia/reperfusão.....	40
6.3 Efeitos da isquemia/reperfusão nos níveis de ATP.....	44
6.4 Efeitos da administração do DIZE na função mitocondrial.....	45
6.5 O eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas modula o potencial de ação.....	46
6.6 Corrente de saída de potássio ativada por despolarização de miócitos ventriculares de camundongos Mas <i>knockout</i> .....	48
6.7 Perfil das citocinas nos animais Mas-KO.....	50
6.8 Papel do eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas no KATP cardíaco.....	52
6.9 Efeitos da ativação da ECA2 na densidade de corrente do KATP cardíaco.....	53
6.10 Efeitos da ativação da ECA2 na corrente de cálcio do tipo L.....	54
6.11 Efeitos do DIZE na glicemia e no peso corporal de ratos hiperglicêmicos.....	55
6.12 A ativação da ECA2 reverte as alterações elétricas cardíacas induzidas pela hiperglicemia.....	56
6.13 Ativação da ECA2 pelo DIZE não induziu eventos arrítmicos....	61
7. DISCUSSÃO.....	63
8. CONCLUSÃO.....	73
9. REFERÊNCIAS.....	74
10. ANEXOS.....	103

## LISTA DE ABREVIATURAS

AAA	Aneurisma de aorta abdominal
A-779	Antagonista seletivo do receptor de angiotensina-(1-7)
ACE2	<i>Angiotensin Converting Enzyme 2</i>
AEC	Acoplamento excitação contração
Akt	Proteína quinase B
AGT	Angiotensinogênio
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
AMPK $\alpha$	Subunidade alfa da proteína quinase ativada por AMP
AMPK $\beta$ 1	Subunidade beta 1 da proteína quinase ativada por AMP
Ang	Angiotensina
Ang-(1-7)	Angiotensina-(1-7)
APA	Amplitude do potencial de ação
AT1R	Receptor do tipo 1 de angiotensina II
AT2R	Receptor do tipo 2 de angiotensina II
BCL	Comprimentos de ciclos básicos
bpm	Batimentos por minuto
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CMI	Cardiomiopatia isquêmica
CMNI	Cardiomiopatia não isquêmica
CS	Citrato sintase
CMD	Cardiomiopatia diabética
DCV	Doença cardiovascular
DIZE	Aceturato de Diminazeno
DM	Diabetes Mellitus
DM1	Diabetes Mellitus do tipo 1
DM2	Diabetes Mellitus do tipo 2
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOCA	Acetato de desoxicorticosterona
DPA	Duração do potencial de ação
ECA	Enzima conversora de angiotensina



ECA2	Enzima conversora de angiotensina 2
ECG	Eletrocardiograma
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGTA	Ácido etilenoglicoltetracético
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
FC	Frequência cardíaca
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
G-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos
HP	Hipertensão pulmonar
IBCCF	Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IM	Infarto do miocárdio
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
I/R	Isquemia e reperfusão
ISA	Índice de severidade da arritmia
KATP	Canal de potássio sensível ao ATP
KCOs	Abridores de canais de potássio
Kir6.x	Subunidades de canais de potássio retificadoras de entrada
KO	<i>Knockout</i>
LAD	Artéria coronária descendente anterior esquerda
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
Mas	Proto-oncogene Mas (receptor Mas)
Mas-KO	Animais <i>knockouts</i> para o Mas
MEC	Matriz extracelular
mitoKATP	Canais de K <sup>+</sup> sensíveis ao ATP em mitocôndrias
MONICA	Monitoramento das tendências e determinantes de doenças cardiovasculares
mtNOS	Óxido nítrico sintase mitocondrial
NEP	Endopeptidase neutra
NIH	Institutos Nacionais de Saúde

NMDG	N-metil-D-glucamina
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NSA	Nodo sinoatrial
OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	Potencial de ação
PBS	Tampão salina-fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PIP2	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PMSF	Fluoreto fenilmetilsulfonil
PR	Potencial de repouso
PRM	Potencial de repouso de membrana
rhECA2	Enzima conversora de angiotensina 2 recombinante humana
RLU	Unidades relativas de luz
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPA	Repolarização do potencial de ação
sarckATP	Canais de potássio sensíveis ao ATP do sarcolema
SD	Ratos Sprague-Dawley
SEM	Erro padrão da média
SRA	Sistema renina angiotensina
STZ	Streptozotocina
SUR1	Receptor sulfonilureia sensível ao diazoxide
SUS	Sistema Único de Saúde
TG	Transgênicos
TNB	Ácido tionitrobenzoico
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
Vmax	Velocidade máxima de despolarização
VP	Vazamento de prótons
WT	<i>Wild type</i>

XNT	1[[2(dimetilamino) etil]amino]-4-(hidroximetil)-7- [[(4-metilfenil)sulfonyl]oxi]-9H-xantona-9
+dT/dt	Pico da primeira derivada positiva de pressão no ventrículo esquerdo
-dP/dt	Pico da primeira derivada negativa de pressão no ventrículo esquerdo

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Visão simplificada da cascata do sistema renina-angiotensina (SRA). Abreviaturas: ECA, enzima conversora da angiotensina; ECA2, enzima conversora da angiotensina 2; Amp, aminopeptidase; Ang I, angiotensina I; Ang II, angiotensina II; Ang III, angiotensina III; Ang IV, angiotensina IV; Ang-(1-7), angiotensina (1-7); Ang-(1-9), angiotensina (1-9); Ang A, angiotensina A; DC, descarboxilase; NEP, endopeptidase neutra (neprilisina); PEP, prolilendopeptidase (Passos-Silva *et al.*, 2015)..... 06
- Figura 2:** Doenças cujas histórias naturais são influenciadas pelas atividades dos eixos do sistema renina-angiotensina (Modificado de Passos-Silva *et al.*, 2015)..... 08
- Figura 3:** Ações cardiovasculares da Ang-(1-7). A figura ilustra as conhecidas ações da Ang-(1-7). NO: óxido nítrico; VSMC: células do músculo liso vascular (Modificado de Santos, 2014)..... 16
- Figura 4:** Via de sinalização do receptor Mas (Bader *et al.*, 2014)..... 17
- Figura 5:** Figura representativa de gel de agarose 1 % com brometo de etídio do PCR da genotipagem. Em (A) resultado da análise de amostras das caudas de animais [TGR(A1-7)3292], n=5, e em (B) dos animais *knockout* para o receptor Mas, n=5. Ambos os resultados confirmam a transgenia dos animais utilizados..... 40
- Figura 6:** Efeitos do tratamento crônico com o DIZE na função cardíaca de corações isolados isquemiados e reperfundidos de ratos. Registros representativos da força de contração (tensão em gramas): estabilização (1), isquemia durante a oclusão da LAD (2) e após a reperfusão (3). (A) Um curso temporal típico de fibrilação ventricular irreversível na fase de reperfusão pode ser visto no traçado representativo de coração isolado do grupo salina. (B) Traçado temporal representativo da força de contração em coração isolado de animal do grupo DIZE mostrando uma reversão espontânea para o ritmo sinusal normal. (C) Fluxo coronário dos corações isolados de

ratos perfundidos antes da oclusão, durante a oclusão e após a reperfusão, mostrando uma redução de ~50% no fluxo coronariano (mL/min) no período da oclusão..... 41

**Figura 7:** Efeitos do tratamento crônico com o DIZE nos parâmetros de função cardíaca de corações isolados. (A) Tensão sistólica (g), (B) Tensão diastólica (g), (C) +dT/dt (g/s), (D) -dT/dt (g/s) e (E) Frequência cardíaca (bpm) de ratos. Dados expressos em média ± S.E.M. \*p < 0,05 comparado com o grupo salina. Teste T de Student não pareado..... 43

**Figura 8:** Efeito antiarrítmico do tratamento crônico com o DIZE avaliado em corações isolados de ratos. Índice de severidade de arritmias (ISA) e a relação de arritmias irreversíveis (>30 min) na fase de reperfusão após 15 min de oclusão da artéria coronária descendente esquerda de ratos. Os números acima das barras indicam a incidência de arritmias irreversíveis durante o período de reperfusão. O tratamento com DIZE causou redução significativa no ISA. Dados expressos como média ± S.E.M, \*p < 0,05. Teste T de Student não pareado..... 43

**Figura 9:** Efeitos do DIZE nos níveis cardíacos de ATP nos animais controles ou com I/R. RLU: unidades relativas de luz. Dados expressos como média ± SEM, \*p < 0,05 comparado com todos os grupos. One way ANOVA seguido do pós teste de Bonferroni..... 45

**Figura 10:** Efeitos do tratamento crônico com o DIZE na função mitocondrial. Os experimentos foram realizadas utilizando piruvato (5 mM), malato (5 mM), ADP (3 mM), citocromo C (10 uM), succinato (10 mM), oligomicina (1 µg/mL), FCCP (10 mM), rotenona (3mm) e KCN (10 mM). (A) Síntese de ATP; (B) Vazamento de prótons; e (C) Atividade específica da citrato sintase (CS). Dados expressos como média ± S.E.M, \*p < 0,05 em relação ao grupo salina. Teste T de Student não pareado..... 46

**Figura 11:** Papel do eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas na duração do potencial de ação (PA). Traçados representativos do PA de ventrículos esquerdos ilustrando um encurtamento desse parâmetro produzido pelo (A) tratamento com DIZE e (C) em ratos que superexpressam Ang-(1-7) e (E) a ausência de efeito em camundongos *knockout* para o Mas (Mas-KO). Os gráficos de barras (B), (D) e (F) resumem a duração do PA a 90% da repolarização (DPA90) nessas 3 diferentes estratégias, respectivamente. Salina (n=25), DIZE (n=40), SD (n=28), TG (n=31), Controle (n=26), Mas-KO (n=21). Os resultados são expressos como média  $\pm$  SEM. \*p < 0,05. Teste T de Student não pareado..... 47

**Figura 12:** As correntes de saída de potássio do miócito foram evocadas por pulsos de 4 seg, que variavam de potenciais entre -80 mV a +60 mV, com incrementos de +10 mV. Os registros das células controle (n=14) estão do lado esquerdo da figura e os registros das células do Mas-KO (n=21) estão do lado direito. (A) e (B) foram obtidos a partir da mesma célula, assim como os registros em (C) e (D). As correntes foram registradas a partir de um potencial fixado em -90 mV (A) e (D) e -40 mV (B) e (E). As formas das ondas de (C) e (F) foram obtidas pela subtração digital *offline* dos registros dos potenciais fixados em -90 mV e -40 mV..... 49

**Figura 13:** Registros de Ito de miócitos ventriculares de camundongos (A) controle (n=14) e (B) Mas-KO (n=21). As densidades das correntes estão representadas graficamente em (C), demonstrando que as células ventriculares dos camundongos Mas-KO apresentaram um aumento da corrente de Ito. As barras indicam média  $\pm$  SEM, p <0,05 \* em relação ao controle. Teste T de Student não pareado..... 50

**Figura 14:** Perfil das citocinas nos animais Mas-KO. (A) G-CSF; (B) IL-1B; (C) IL-6; (D) IL-10; (E) IL-17; (F) RANTES; (G) VEGF; e (H) TNFa.

As barras indicam média $\pm$ SEM, $p < 0,05$ * em relação ao controle. Teste T de Student não pareado.....	51
<b>Figura 15:</b> Efeitos dos moduladores de canais KATP na duração do potencial de ação ventricular cardíaco. (A e B) Animais tratados com o DIZE; (C e D) Ratos que superexpressam Ang-(1-7) (TG) e seu controle; e (E e F) Camundongos Mas-KO e seu controle. Os resultados são expressos como média $\pm$ SEM, * $p < 0,05$ . Teste T de Student não pareado.....	53
<b>Figura 16:</b> Efeitos do DIZE no KATP de cardiomiócitos isolados. (A) Traçados representativos da subtração digital de correntes registradas antes e após a aplicação do antagonista do KATP, Glibenclamida 100 $\mu$ M. A seta indica o potencial de membrana utilizado para a análise. (B) O gráfico de barras representa as médias das densidades de correntes (pA/pF) do KATP medidas a 30 mV em animais controle (salina) e tratados com o DIZE. Os resultados são expressos como média $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ . Teste T de Student não pareado.....	54
<b>Figura 17:</b> Efeitos da ativação da ECA2 na corrente de cálcio de cardiomiócitos isolados. (A) Traçados representativos. As setas indicam os pontos utilizados para as análises. (B) O gráfico de barras representa as médias das densidades de corrente de cálcio dos canais do tipo L (pA/pF) medidas em animais controles (salina) e tratados com DIZE. Os resultados são expressos como média $\pm$ SEM. Teste T de Student não pareado.....	55
<b>Figura 18:</b> Remodelamento elétrico cardíaco <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> após quatro semanas de indução de hiperglicemia. (A) Traçados representativos de eletrocardiograma (ECG) mostrando um prolongamento do intervalo QT em ratos hiperglicêmicos. (B) Os gráficos de barras resumem os parâmetros do ECG. (C) Os traçados representativos do potencial de ação de ventrículos esquerdos	

demonstram um prolongamento do potencial de ação induzido pela hiperglicemia. (D) O gráfico resume o DPA90 sob diferentes comprimentos de ciclo básicos (BCL) de estimulação (300, 500, 800 e 1000 ms). (E e F) Duração da triangulação e inclinação negativa máxima de repolarização de ratos normais e hiperglicêmicos. Os resultados são expressos como média  $\pm$  SEM. C: não-hiperglicêmico + salina (n=4) e HG: hiperglicêmico + salina (n=6). \*p < 0,01. Teste T de Student não pareado..... 58

**Figura 19:** O DIZE reverteu o remodelamento elétrico cardíaco induzido pela hiperglicemia. (A) Traçados representativos de eletrocardiograma (ECG) após 4 semanas de tratamento com o DIZE. (B) Os gráficos de barras resumem os parâmetros do ECG. (C) Traçados representativos do potencial de ação de todos os grupos avaliados. (D) O gráfico resume o DPA90 de todos os grupos sob diferentes comprimentos de ciclo básicos (BCL) de estimulação (300, 500, 800 e 1000 ms). (E-F) Triangulação e inclinação negativa máxima de repolarização de todos os grupos avaliados. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  SEM. C: não-hiperglicêmico + salina (n=7); C + DIZE: não-hiperglicêmico + DIZE (n=5); HG: hiperglicêmico + salina (n=7) e HG + DIZE: hiperglicêmico + DIZE (n=7). #p < 0,01 vs C e C + DIZE, \*p < 0,05 vs HG + DIZE; \*\*p < 0,01 vs todos os outros grupos, e \*\*\*p < 0,001 vs todos os outros grupos. One way ANOVA seguido do pós teste de Bonferroni para as análises de ECG e Two way ANOVA seguido do pós teste de Bonferroni para os registros de PA. Os valores de registros de PA da quarta semana de avaliação foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn..... 59

**Figura 20:** O tratamento com o DIZE não promoveu arritmias cardíacas nos ratos normais ou hiperglicêmicos..... 62



## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1:</b> Parâmetros do processo de ciclagem térmica para os animais transgênicos [TGR(A1-7)3292].....	28
<b>Quadro 2:</b> Parâmetros do processo de ciclagem térmica para os animais transgênicos Mas-KO.....	29

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Avaliação do potencial de ação cardíaco de ventrículos esquerdos dos modelos experimentais utilizados para estudar o eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas. One way ANOVA seguido do pós teste de Newman-Keuls.....	48
<b>Tabela 2:</b> Níveis de glicose no sangue e peso corporal de ratos normais e hiperglicêmicos tratados ou não com DIZE. One way ANOVA seguido do pós teste de Bonferroni.....	56
<b>Tabela 3:</b> Parâmetros do potencial de ação cardíaco de ventrículos esquerdos de ratos normais e hiperglicêmicos tratados ou não com DIZE. Two way ANOVA seguido do pós teste de Bonferroni para os registros de PA.....	60

## RESUMO

Vários estudos demonstram os efeitos benéficos da ativação do eixo enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2)/Angiotensina(Ang)-(1-7)/receptor Mas do sistema renina-angiotensina nas doenças cardiovasculares. O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da ativação desse eixo no metabolismo energético e eletrofisiologia cardíaca. Foram utilizados ratos Wistar normais ou hiperglicêmicos tratados ou não com o ativador da ECA2 aceturato de diminazeno (DIZE; 1 mg/kg diluído em solução salina; ~0,5 mL por animal, 1 vez por dia via gavagem durante trinta dias), ratos transgênicos [TGR (A1-7) 3292] e seu controle Sprague-Dawley e camundongos Mas *Knockout* e seu controle C57BL6. A hiperglicemia foi induzida com estreptozotocina (60 mg/kg/iv). Após o tratamento dos ratos Wistar normais, os parâmetros de função cardíaca após isquemia/reperfusão (I/R), função mitocondrial e perfil eletrofisiológico dos miócitos foram avaliados. O tratamento com o DIZE foi capaz de proteger o coração contra as lesões de I/R, bem como das arritmias de reperfusão, protegeu a função mitocondrial após a isquemia e aumentou a habilidade das mitocôndrias de gerar ATP, reduzindo o vazamento de prótons sem alterar a atividade específica da citrato sintase. Além disso, a ativação do eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas (tratamento com o DIZE e modelos transgênicos) modulou os parâmetros de potencial de ação (PA), encurtando a duração do PA a 90%, reduzindo a sensibilidade do KATP ao seu agonista diazoxide e aumentando a sensibilidade do KATP ao seu antagonista glibenclamida, resultando em um aumento na densidade de corrente de KATP. O tratamento com o DIZE não alterou as correntes de cálcio do tipo L. Em ratos hiperglicêmicos, o tratamento com o DIZE não foi capaz de normalizar a glicemia nem o peso corporal. No entanto, o DIZE reverteu as alterações na atividade elétrica cardíaca induzidas pela hiperglicemia na repolarização ventricular. Especificamente, animais tratados com o DIZE apresentaram menores intervalos QT e QTc. Além disso, o DIZE foi capaz de encurtar a duração do PA a 90% desses animais, bem como normalizar os marcadores arrítmicos. A ativação da ECA2 não induziu eventos arrítmicos em condições normais ou hiperglicêmicas.

Assim, esses resultados evidenciam o papel cardioprotetor da ativação do eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas através da preservação a função mitocondrial e modulação da atividade elétrica cardíaca.

## ABSTRACT

Several studies have reported many beneficial effects of the activation of the angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2)/Angiotensin(Ang)-(1-7)/Mas receptor axis of the renin-angiotensin system in cardiovascular diseases. The aim of this study was to evaluate the effects of the activation of this axis in the energetic metabolism and cardiac electrical physiology. Normal and hyperglycemic Wistar rats treated or not with the ACE2 activator diminazene acetate (DIZE; 1 mg/kg diluted in saline; ~0.5 mL per animal, once a day by gavage for 30 days), [TGR (A1-7) 3292] transgenic rats and their controls (Sprague-Dawley rats), and Mas Knockout (Mas-KO) mice and their controls (C57BL6 mice) were used. Hyperglycemia was induced by streptozotocin (60 mg/kg/iv). After the treatment of normal rats, cardiac function parameters following ischemic/reperfusion (I/R), mitochondria function and electrophysiological profile of myocytes were assessed. DIZE treatment was able to protect the heart against I/R injuries and reperfusion arrhythmias, preserved the mitochondria function after ischemia and increased the ability of mitochondria in generating ATP, reducing proton leak without changing the specific citrate synthase activity. Moreover, the activation of the ACE2/Ang-(1-7)/Mas axis (treatment with DIZE and transgenic models) modulated the action potential (AP) parameters, shortening AP duration at 90%, reducing the sensibility of KATP to its agonist diazoxide and increasing the sensibility of KATP to its antagonist glybenclamide, resulting in an increase in the KATP density current. Treatment with DIZE did not change L-Type  $Ca^{2+}$  current. In hyperglycemic rats, the treatment with DIZE was not able to normalize neither hyperglycemia nor body weight loss. However, DIZE reversed hyperglycemia-induced cardiac electrical changes in the ventricular repolarization. Specifically, animals treated with DIZE showed a shorter QT and QTc intervals. In addition, DIZE was capable to short the AP duration at 90% in these animals, as well as to normalize the arrhythmic markers. ACE2 activation did not induce arrhythmic events in normal or hyperglycemic conditions. Thus, these results demonstrated a cardioprotective role of the activation of the ACE2/Ang-(1-7)/Mas axis by preserving mitochondrial function and modulating the

cardiac electrical activity.

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) serão, segundo as previsões, a causa mais comum de morte em todo o mundo até 2020 (Crackower *et al.*, 2002). As disfunções cardiovasculares têm sido apontadas como as maiores causas de morte gerada pelo diabetes mellitus (DM), correspondendo a aproximadamente 80% desses óbitos (Stamler *et al.*, 1993). Segundo a Federação Internacional de Diabetes, a cada 7 segundos uma pessoa morre no mundo em decorrência das complicações do diabetes, sendo que, no Brasil existem 133,8 milhões de diabéticos na idade entre 20 e 79 (Atlas do Instituto Federal de Diabetes, 2014).

A cardiomiopatia diabética (CMD) é caracterizada principalmente pelo remodelamento elétrico cardíaco provocado pelas alterações na estrutura cardíaca e na atividade dos canais iônicos que regulam o potencial de ação (PA) do cardiomiócitos, ambos essenciais para o bom funcionamento do coração como um sincício funcional (Veglio *et al.*, 2004). O remodelamento elétrico cardíaco é uma das complicações mais graves no diabetes, criando um microambiente que evoca arritmias ventriculares fatais (Kahn *et al.*, 1987, Magyar *et al.*, 1992). Pacientes diabéticos apresentam alterações no traçado do eletrocardiograma (ECG), incluindo prolongamento nos intervalos QT e QTc (Arildsen *et al.*, 1999). Dessa forma, essas alterações eletrocardiográficas pró-arrítmicas são o resultado do prolongamento da duração do PA (Kahn *et al.*, 1987; Magyar *et al.*, 1992) como consequência do remodelamento elétrico cardíaco que ocorre nesta doença.

O metabolismo energético celular possui um papel essencial na eletrofisiologia cardíaca (Minners *et al.*, 2003). O mal funcionamento do coração em doenças metabólicas se dá especialmente por alterações no metabolismo energético da célula (An e Rodrigues, 2006). Por ser o coração um órgão de alta demanda energética, isso explica, pelo menos em parte, o fato das DCV serem as maiores complicações do diabetes e o maior mecanismo de morte dessa patologia. Especificamente, as mitocôndrias, grande fonte geradora de energia no coração, tem as suas funções comprometidas no diabetes tornando-se ineficientes na produção de ATP e gerando uma grande quantidade de espécies reativas de

oxigênio (ROS) (Lowell e Shulman, 2005).

Moeda energética importante, o ATP regula um plantel de funções no organismo, seja na fosforilação, na hidrólise ou na oxidação de diversas proteínas do metabolismo celular. Um outro papel importante do ATP é a ativação e inativação de canais iônicos no coração (Neubauer, 2007). O canal de potássio sensível ao ATP (KATP) tem demonstrado exercer um papel cardioprotetor (Brown *et al.*, 2005; Olson e Terzic, 2010). Em relação aos mecanismos protetores, o interessante é agir de forma a prevenir as doenças metabólicas e cardiovasculares. Sendo assim, a indicação de exercícios físicos regulares, uma dieta alimentar e um estilo de vida saudáveis são essenciais. O principal tratamento atual para o diabetes é a base de insulino-terapia. No entanto, para as complicações cardíacas do diabetes associa-se fármacos que tem como principal alvo o Sistema Renina Angiotensina (SRA).

O SRA foi descrito há mais de um século e desde então vêm sendo considerado o principal regulador da pressão arterial e da homeostase hidroeletrólítica, fundamentais para a manutenção da função cardíaca (Tiegerstedt e Bergman 1898; Campbell, 2008). Sendo assim, fármacos que atuam controlando a atividade enzimática, a formação de peptídeos e as ações dos receptores que compõem esse sistema são considerados excelentes estratégias terapêuticas no tratamento de disfunções cardiovasculares. Seja inibindo a formação de fibrose, que compromete a estrutura cardíaca, seja modulando a função de organelas ou mesmo a atividade de canais iônicos, que compromete a atividade elétrica cardíaca, os efeitos benéficos dos tratamentos via SRA atuais são importantes (Ishiyama *et al.*, 2004).

Há cerca de três décadas foi descrito a Angiotensina-(Ang)(1-7), causando mudanças conceituais importantes relacionadas ao tratamento das DCV (Santos *et al.*, 1988; Santos, 2014). Mais tarde, com a descrição da principal enzima formadora desse peptídeo, a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) (Donoghue *et al.*, 2000; Vickers *et al.*, 2002), e do receptor de Ang-(1-7), o Mas (Santos *et al.*, 2003), criou-se o conceito de um novo eixo dentro do SRA. No sentido de estimular as ações desses componentes, estratégias terapêuticas



inéditas têm sido propostas, como a utilização de um ativador da ECA2, o Aceturato de Diminazeno (DIZE), no tratamento das disfunções endoteliais em decorrência do diabetes (Zhang *et al.*, 2015). O DIZE tem demonstrado ser eficaz no tratamento de infarto do miocárdio (IM), síndrome metabólica e glaucoma, dentre outras doenças. No entanto, o mecanismo pelo qual esses efeitos benéficos do DIZE se dão ainda é pouco descrito. Deve-se destacar que, até o momento, nenhum estudo foi realizado em relação à modulação do metabolismo energético e da eletrofisiologia cardíaca por essa estratégia (ativação da ECA2). Portanto, mais estudos fazem-se necessários para a elucidação desses mecanismos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Sistema renina angiotensina

O clássico SRA é um sistema complexo composto por vários peptídeos, enzimas e receptores que estão envolvidos principalmente na regulação da pressão arterial e na homeostase hidroeletrólítica. A ativação deste sistema promove um aumento da atividade simpática, reabsorção tubular de sódio e excreção de potássio nos rins, secreção de aldosterona pela glândula adrenal reforçando os efeitos renais, secreção do hormônio antidiurético da neurohipófise e vasoconstrição direta nas artérias. Todos estes efeitos contribuem para uma reabsorção e retenção de sódio que regula negativamente a secreção de renina. A superatividade deste sistema leva a um aumento na pressão arterial e de suas consequências (Mendoza e Lazartigues, 2015).

A cascata do SRA começa com a liberação da glicoproteína angiotensinogênio (AGT) gerada no fígado. O AGT é convertido em Ang I (Asp<sup>1</sup>-Arg<sup>2</sup>-Val<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup>-His<sup>9</sup>-Leu<sup>10</sup>) pela renina (Page e Helmer, 1940; Skeggs *et al.*, 1958), que por sua vez é liberada a partir das células justaglomerulares dos rins em situações de privação de sal, desequilíbrio de fluidos e ativação do sistema nervoso simpático. Esta etapa ocorre na circulação, mas também em diversos tecidos e órgãos (Passos-Silva *et al.*, 2015). Na próxima etapa, o território vascular pulmonar desempenha um papel crucial, onde a Ang I, um decapeptídeo biologicamente inativo, serve de substrato para a enzima conversora de angiotensina (ECA), uma dipeptidil carboxipeptidase que é amplamente expressa em muitos tecidos, incluindo o endotélio, uma localização estratégica para a formação do octapeptídeo Ang II (Asp<sup>1</sup>-Arg<sup>2</sup>-Val<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup>) (Ng e Vane, 1967). A Ang II é o mais importante componente efetor do SRA e sua principal via de sinalização é por meio do receptor do tipo 1 (AT1) (De Gasparo *et al.*, 2000) que é acoplado à proteína G e promove vasoconstrição, aumento do tônus simpático, liberação de vasopressina e aldosterona. Todos estes efeitos aumentam o volume do fluido de forma eficiente a ponto de elevar a

pressão arterial. Ações diretas da Ang II, mediadas principalmente pelo receptor AT1, foram relatadas no coração e foram correlacionadas com mudanças no influxo de cálcio intracelular e na fase de platô do PA cardíaco (Dempsey *et al.*, 1971; Hoffmann *et al.*, 2001). Além disso, a Ang II também foi associada com o comprometimento da função contrátil em cardiomiócitos isolados e hipertrofia cardíaca (Ichihara *et al.*, 2001; Domenighetti *et al.*, 2005).

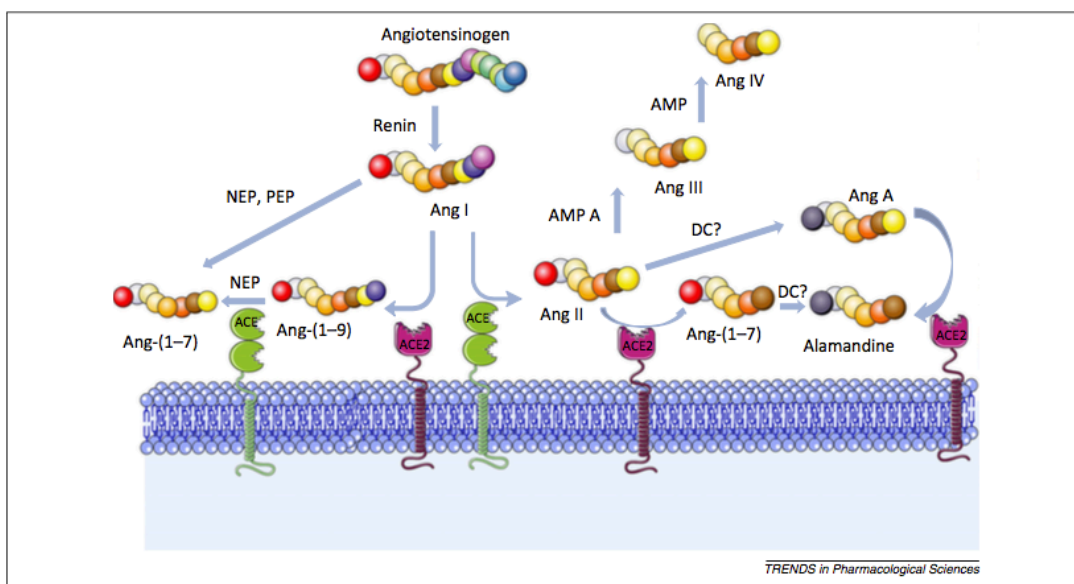
Em menor grau, a Ang II também se liga a um segundo receptor acoplado à proteína G, o receptor do tipo 2 de Ang II (AT2), promovendo efeitos vasodilatadores, opostos ao AT1, em alguns leitos vasculares em concentrações acima de 1 µM, tanto em vasos de resistência quanto em vasos de condutância (Toda e Miyazaki, 1981; Katada e Majima, 2002; Fukada *et al.*, 2004; Fukada *et al.*, 2005). Esta vasodilatação é principalmente mediada por prostaglandinas, óxido nítrico (NO) e abertura de canais de potássio (Israel *et al.*, 2000; Fukada *et al.*, 2005). Entretanto, evidências experimentais sugerem que peptídeos derivados da metabolização da Ang II podem estar envolvidos no seu efeito vasodilatador (Tirapelli *et al.*, 2006).

Além da Ang II, outros peptídeos biologicamente ativos são formados. Outra carboxipeptidase homóloga a ECA, a ECA2 pode clivar a Ang II em Ang-(1-7) (Asp<sup>1</sup>-Arg<sup>2</sup>-Val<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>) (Donoghue *et al.*, 2000; Vickers *et al.*, 2002). Assim, a formação de Ang-(1-7) é principalmente dependente da hidrólise da Ang II pela ECA2, mas também pode ser gerada pela hidrólise de Ang I por outras peptidases, incluindo a prolilendopeptidase (PEP) e endopeptidase neutra (NEP). Além disso, prolilcarboxipeptidase (PCP) e PEP podem também contribuir para a formação de Ang-(1-7) agindo diretamente na Ang II (Passos-Silva *et al.*, 2015) (Figura 1).

Paralelamente, a Ang II também pode ser clivada na sua extremidade amino-terminal pela aminopeptidase A formando Ang III (Arg<sup>2</sup>-Val<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup>). A Ang III, por sua vez, pode ser clivada pela aminopeptidase N e formar Ang IV (Val<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup>). Fragmentos ainda menores, como Ang-(5-8) (Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup>), Ang-(4-8) (Tyr<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup>), Ang-(2-7) (Arg<sup>2</sup>-Val<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>), Ang-(3-7) (Val<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>), Ang-(1-5) (Asp<sup>1</sup>-Arg<sup>2</sup>-Val<sup>3</sup>-

Tyr<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>), Ang-(1-4) (Asp<sup>1</sup>-Arg<sup>2</sup>-Val<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>) e Ang-(3-4) (Val<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>), bem como as enzimas envolvidas na suas formações, são muito pouco estudados até o momento (Welches *et al.*, 1991; Matsufuji *et al.*, 1995; Neves *et al.*, 1995; Ardaillou, 1997; Axelband *et al.*, 2009).

Ademais, recentemente outros dois peptídeos, Ang A e Alamandina, os quais podem ser formados por uma substituição do ácido aspártico por alanina, um processo que envolve a descarboxilação do resíduo de aspartato, foram descritos. A Alamandina também pode ser formada por meio da hidrólise da Ang A pela ECA2 (Lautner *et al.*, 2013; Villela *et al.*, 2014; Etelvino *et al.*, 2014).



**Figura 1:** Visão simplificada da cascata do sistema renina-angiotensina (SRA). Abreviaturas: ECA, enzima conversora da angiotensina; ECA2, enzima conversora da angiotensina 2; Amp, aminopeptidase; Ang I, angiotensina I; Ang II, angiotensina II; Ang III, angiotensina III; Ang IV, angiotensina IV; Ang-(1-7), angiotensina (1-7); Ang-(1-9), angiotensina (1-9); Ang A, angiotensina A; DC, descarboxilase; NEP, endopeptidase neutra (neprilisina); PEP, prolilendopeptidase (Passos-Silva *et al.*, 2015).

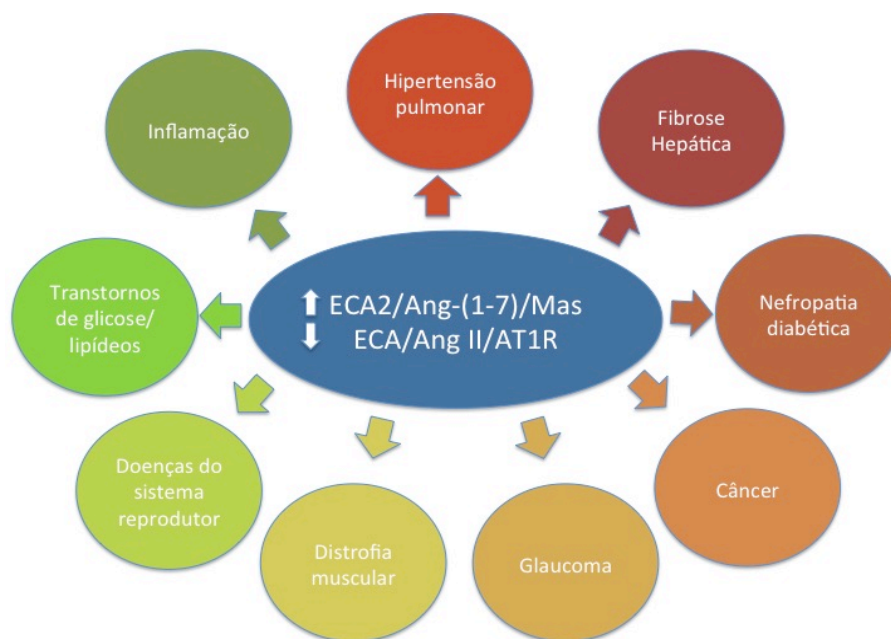
Embora o SRA seja classicamente descrito como um sistema endócrino, atualmente considera-se que esse sistema possui funções parácrina e autócrina,

tendo em vista que diversos componentes do sistema têm sido identificados localmente em vários tecidos, incluindo coração, pulmão, glândulas supra-renais, rins, vasos sanguíneos e cérebro (Lavoie e Sigmund, 2003; Paul *et al.*, 2006; Mendoza *et al.*, 2015).

A demonstração de que a atividade da renina prediz eventos cardiovasculares indicou a participação de componentes do SRA nestes eventos (Alderman *et al.*, 1991; Campbell *et al.*, 2005). Assim, drogas que agem no SRA vêm sendo largamente estudadas e utilizadas no controle e tratamento de DCV. As principais classes de drogas que modulam o SRA já utilizadas são: a) Inibidores do sistema nervoso simpático (beta bloqueadores), que suprimem a formação da Ang II por inibição da liberação de renina pelos rins; b) Inibidores da ECA, que reduzem a formação de Ang II a partir de Ang I; e c) Bloqueadores de receptores de Ang II do tipo 1, que antagonizam a ligação de Ang II ao seu receptor AT1 (Campbell *et al.*, 2001). Como novos componentes estão sendo incorporados a este sistema, por exemplo, a ECA2, a Ang-(1-7) e o receptor Mas, outras possibilidades terapêuticas são pesquisadas. Assim, drogas capazes de ativar a ECA2, como o 1[[2(dimetilamino) etil]amino]-4-(hidroximetil)-7-[[4-metilfenil]sulfonil]oxi]-9H-xantona-9 (XNT) e o DIZE, têm demonstrado bons resultados no tratamento de DCV, como hipertensão, hipertrofia e fibrose cardíaca em animais (Gjymishka *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2011; Haga *et al.*, 2015).

Em síntese, considerado um regulador chave da função cardiovascular, o SRA é formado por diversos peptídeos biologicamente ativos que atuam na regulação da pressão arterial, na homeostase hidroeletrolítica, no tônus vascular e na função celular (Handa, 2000). Ele tem participação comprovada em diversas doenças, como hipertensão arterial sistêmica, hipertensão pulmonar (HP), cardiomiopatia dilatada, doença arterial coronariana e diabetes (Bojestig *et al.*, 2000; Kobori *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2009; Murça *et al.*, 2012; Coutinho *et al.*, 2014). Acredita-se que o SRA seja constituído por dois eixos contra regulatórios (Ferreira e Santos, 2005). O primeiro formado pela ECA, Ang II e pelo receptor AT1 e está associado à vasoconstrição, proliferação celular, hipertensão e fibrose (Ferreira *et al.*, 2010).

O outro eixo composto pela ECA2, Ang-(1-7) e pelo Mas e, uma vez ativado, induz mecanismos protetores (Santos *et al.*, 2013) (Figura 2).



**Figura 2:** Doenças cujas histórias naturais são influenciadas pelas atividades dos eixos do sistema renina-angiotensina (Modificado de Passos-Silva *et al.*, 2015).

## 2.2 Enzima conversora de angiotensina 2

A ECA2, traduzida do termo em inglês *Angiotensin Converting Enzyme 2* (ACE2), foi descrita inicialmente no ano 2000. A ECA2 é uma zinco-metaloprotease associada à membrana (Donoghue *et al.*, 2000; Tipnis *et al.*, 2000). Sua atividade é de carboximonopectidase, pois retira um aminoácido da extremidade carboxi-terminal de seus substratos (Donoghue *et al.*, 2000). Dessa maneira, a degradação da Ang II por meio da remoção da fenilalanina da porção carboxi-terminal da Ang II resulta na formação da Ang-(1-7). Esta conversão é eficientemente realizada pela ECA2 (Donoghue *et al.*, 2000).

Essa enzima, o primeiro homólogo humano conhecido da ECA, foi identificado a partir do sequenciamento 5' de uma biblioteca de cDNA de ventrículo humano com insuficiência cardíaca (Donoghue *et al.*, 2000). A análise da expressão gênica

no desenvolvimento da insuficiência cardíaca revelou que a cardiomiopatia isquêmica (CMI) e não isquêmica (CMNI) compartilham 41 genes envolvidos no crescimento celular e na transdução de sinal em comparação com um coração sadio (Kittleson *et al.*, 2005), enquanto que uma supra-regulação do gene da ECA2 foi observado na CMNI mas não na CMI (Kittleson *et al.*, 2005). Amplamente distribuída nos tecidos, mas pouco presente na circulação, a ECA2 é mais abundantemente encontrada no coração e nos rins, o que sugere importantes efeitos desta enzima na regulação local das funções cardíacas e renais (Donoghue *et al.*, 2000; Tan *et al.*, 2011).

A primeira atividade descrita da ECA2 foi a da hidrólise da Ang I para formar Ang-(1-9) (Donoghue *et al.*, 2000), um peptídeo que não tem uma atividade biológica até então estabelecida. Em miocárdio infartado de ratos, a ECA2 se correlaciona mais fortemente com a Ang-(1-9) do que com a Ang-(1-7) (Ocaranza *et al.*, 2006). Em túbulo proximal isolado de ratos, a Ang I, em vez de Ang II, contribui mais fortemente para a formação de Ang-(1-7) pela ECA2 (Li *et al.*, 2005), enquanto que no túbulo proximal de ovelhas a Ang II, mas não a Ang I, é o substrato preferencial para a ECA2 formar Ang-(1-7) (Shaltout *et al.*, 2007). Esses achados demonstram a singularidade do SRA em cada microambiente e espécie.

Várias observações e evidências experimentais sugerem um papel benéfico para ECA2 na função cardiovascular (Keidar *et al.*, 2007). Por exemplo, em modelo experimental, ratos com indução de IM pela técnica de oclusão da artéria coronária esquerda, apresentaram níveis aumentados de RNAm da ECA e da ECA2 em relação ao controle (Burrell *et al.*, 2005). A expressão de ambas as ECAs nas bordas/área infartada foi significativamente maior do que na área viável. Quatro semanas após o IM, a expressão do RNAm da ECA2 na área viável foi significativamente maior em relação ao controle. Essa elevada expressão da ECA2 pode indicar um papel protetor (Burrell *et al.*, 2005). A evidência bioquímica indica que a ECA e a ECA2 podem ter funções complementares, onde o resultado da hidrólise por uma enzima pode ser metabolizado pela outra. Assim, a ECA gera a Ang II e a ECA2, por sua vez, degrada a Ang II em outros componentes do SRA (Vickers *et al.*, 2002).

A presença da ECA2 em cardiomiócitos sustenta a ideia de uma formação local de Ang-(1-7) no coração de diferentes espécies (Donoghue *et al.*, 2000; Crackower *et al.*, 2002; Zisman *et al.*, 2003). É importante salientar que outras enzimas capazes de formar a Ang-(1-7), direta ou indiretamente, também estão presentes no coração, incluindo a prolilendopeptidase e a catepsina A (Santos, 2014).

Nas últimas duas décadas, uma gama de achados vêm contribuindo para o entendimento da função desta importante enzima. A manipulação genética da expressão da ECA2, seja a deleção ou a superexpressão direcionada, contribuíram para a elucidação das diversas ações da ECA2 no sistema cardiovascular (Keidar *et al.*, 2007).

Em relação ao coração, Crackower *et al.* (2002) foram um dos primeiros a sugerir o envolvimento da ECA2 na função do miocárdio. Camundongos deficientes para ECA2 desenvolveram uma função cardíaca anormal, que progrediu com a idade e foi mais acentuada no gênero masculino (Crackower *et al.*, 2002), demonstrando a importância desta enzima no desenvolvimento embrionário. A escassez de ECA2 comprometeu gravemente a função cardíaca. Os valores da fração de encurtamento do ventrículo esquerdo e da velocidade de encurtamento circunferencial da fibra foram 50% menores do que o medido em camundongos selvagens da mesma idade. Embora apresentando um ligeiro afinamento da parede e aumento das dimensões da câmara cardíaca, não houve evidência de hipertrofia cardíaca, cardiomiopatia dilatada ou fibrose em decorrência da reduzida contratilidade cardíaca (Crackower *et al.*, 2002).

Em outro modelo deficiente para a ECA2 (Yamamoto *et al.*, 2006), os animais apresentaram função cardíaca normal e possuíam corações morfologicamente normais. No entanto, em resposta a uma sobrecarga de pressão induzida por constrição da aorta, os camundongos desenvolveram hipertrofia cardíaca e dilatação com diminuição da contratilidade cardíaca. Além disso, desenvolveram congestão pulmonar e aumento da incidência de morte cardíaca em comparação com camundongos controle. Ainda, a ativação de uma resposta hipóxica induzida



pela Ang II foi maior em cardiomiócitos isolados de camundongos knockout para a ECA2 do que os isolados de animais controle.

Em ambos os modelos onde a expressão/atividade da ECA2 está comprometida, o nível de Ang II demonstrou-se aumentado e os genes relacionados a indução de hipóxia apresentaram-se supra-regulados. Uma função cardíaca prejudicada, espontaneamente ou induzida por sobrecarga de pressão, provavelmente está relacionada ao acúmulo de Ang II. No primeiro modelo, a deleção concomitante da ECA aboliu completamente o fenótipo de disfunção cardíaca dos camundongos deficientes para ECA2. No segundo modelo, a inibição do AT1 atenuou a resposta hipertrófica. Estes resultados sugerem um papel importante da ECA2 em contra-regular os efeitos advindos do acúmulo de Ang II (Keidar *et al.*, 2007).

Numa situação contrária onde o gene da ECA2 foi superexpresso por meio do uso de um vetor lentiviral no tecido cardíaco de ratos Sprague-Dawley (SD), uma proteção dos animais contra a hipertrofia cardíaca ou fibrose induzida por Ang II foi observada (Huentelman *et al.*, 2005).

Pacientes com insuficiência cardíaca isquêmica apresentaram um aumento da imunoreatividade da ECA e da ECA2 no tecido cardíaco em comparação com indivíduos normais (Burrell *et al.*, 2005). Em pacientes com insuficiência cardíaca por cardiomiopatia idiopática, quer dilatada ou por hipertensão pulmonar primária, um aumento da atividade da ECA2 nos ventrículos cardíacos foi observado (Zisman *et al.*, 2003). De maneira curiosa, parâmetros de associação com polimorfismos da ECA2 foram observados em indivíduos com hipertrofia ventricular esquerda. Quatro nucleotídeos polimórficos foram associados a um maior índice de massa ventricular esquerda, maior espessura da parede septal e aumento da probabilidade de hipertrofia ventricular esquerda (Lieb *et al.*, 2006).

O uso de inibidores específicos é considerado uma abordagem experimental para verificar se aqueles efeitos observados estão diretamente relacionados a atividade de uma determinada enzima/receptor. Inibidores específicos da ECA2 foram desenvolvidos (Dales *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2003) e são amplamente utilizados para inibir a atividade da enzima.

Uma forma de aumentar a atividade da ECA2 é utilizar a ECA2 recombinante humana (rhECA2). Ela atenua a nefropatia diabética, diminuindo a Ang II e aumentando os níveis de Ang-(1-7) (Oudit *et al.*, 2010). Recentemente, Patel *et al.* (2015) demonstraram que, ao inibir a ação da Ang-(1-7), os efeitos benéficos da rhECA2 foram abolidos e potencializou-se o remodelamento miocárdico mediado pela Ang II (Mendoza-Torres *et al.*, 2015; Patel *et al.*, 2015). Ainda nesse sentido, alguns ativadores da ECA2 vêm sendo testados, tais como o XNT, o NCP-2454 e o DIZE. Fraga-Silva *et al.* (2013) demonstraram que o XNT melhora a função endotelial de ratos hipertensos e diabéticos pela diminuição da produção de ROS. Estas ações se deram pela via de sinalização do receptor Mas (Fraga-Silva *et al.*, 2013). Outros efeitos do XNT incluem a diminuição da pressão arterial, reversão do remodelamento cardíaco e renal e melhora da função cardíaca de ratos hipertensos e diabéticos (Hernández Prada *et al.*, 2008; Murça *et al.*, 2012). Já o NCP-2454 previniu a HP pela inibição de cascatas inflamatórias restaurando a expressão de caveolin 1 (Haga *et al.*, 2015).

O DIZE (C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>N<sub>7</sub>.2C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>3</sub>) é uma diamidina aromática, um grupo de inseticidas, que foi desenvolvido há mais de seis décadas e tem sido comercializada para o controle da tripanossomíase (da Silva Oliveira e Freitas, 2015). Em 2011, Kulemina e Ostrov identificaram o DIZE como um ativador da ECA2. Os autores utilizaram uma estratégia de análise molecular estrutural para identificar possíveis ativadores dessa enzima a partir de drogas depositadas em uma biblioteca química da Food and Drug Administration (FDA). O método, baseado na conformação estrutural por acoplamento molecular utilizando o DOCK, um sistema computacional, permitiu identificar uma série de drogas aprovadas pelo FDA que melhoram a eficiência catalítica da ECA2 *in vitro*.

Mecca *et al.* (2011), utilizando um modelo de constrição da artéria cerebral média induzida pela endotelina 1, observaram que tanto a administração do DIZE quanto da Ang-(1-7) foram capazes de atenuar significativamente o tamanho do infarto cerebral e os déficits neurológicos avaliados 72 horas após o insulto. Esses efeitos protetores foram dependentes do Mas, uma vez que eles foram abolidos quando administrado o antagonista seletivo do receptor de Ang-(1-7), o A-779

(Mecca *et al.*, 2011). Além disso, Shenoy *et al.* (2013), Foureaux *et al.* (2013) e Qi *et al.* (2013) demonstraram que o DIZE promove efeitos benéficos em modelos de HP, glaucoma e isquemia cardíaca, respectivamente.

Outros autores também contribuíram para o entendimento dos efeitos do DIZE como ativador da ECA2 em diferentes doenças. Por exemplo, após indução de isquemia e reperfusão (I/R) renal, o DIZE recuperou a função deteriorada dos rins por meio do aumento nos níveis de NO e de uma ação antioxidante em ratos machos (Malek e Nematbakshs, 2014). Um efeito modulador da resposta inflamatória pelo DIZE foi observada em um modelo de uveíte, doença inflamatória ocular, induzida por lipopolissacarídeo (LPS) (Qiu *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2015). Em um modelo de aneurisma de aorta abdominal (AAA), Thatcher *et al.* (2014) demonstraram uma ação benéfica da administração do DIZE no controle da expansão e ruptura do AAA (Thatcher *et al.*, 2014). Entretanto, Raffai *et al.* (2014) descreveram uma limitação do DIZE em ativar a ECA2 endotelial a ponto de produzir níveis suficientes de Ang-(1-7) que pudesse influenciar o tônus vascular promovendo uma vasodilatação e Velkoska *et al.* (2015) não verificaram a ativação da ECA2 pelo DIZE em experimentos *ex vivo* de lesão renal.

Recentemente, foi demonstrado que o DIZE promove efeitos positivos em um modelo experimental de síndrome metabólica, melhorando o perfil metabólico e reduzindo a deposição de gordura e os marcadores de lipogênese em ratos (de Macedo *et al.*, 2015). Em células CD34(+), o DIZE aumentou a proliferação e a migração dessas células, efeitos esses que foram bloqueados pelo DX600, um inibidor da ECA2 (Singh *et al.*, 2015), revelando ser uma estratégia promissora para melhorar os resultados de terapias celulares. Um estratégia interessante de liberação contínua/controlada de DIZE foi desenvolvida por Foureaux *et al.* (2015), a qual foi testada em modelo de glaucoma induzido por ácido hialurônico. O tratamento utilizando o dispositivo foi capaz de reduzir a pressão intra-ocular e mantê-la baixa por um mês (Foureaux *et al.*, 2015). Do ponto de vista do mecanismo de ação do DIZE, Fraga-Silva *et al.* (2015), Zhang *et al.* (2015) e De Maria *et al.* (2016) em modelos de disfunção erétil, diabetes e vaso isolado (aorta abdominal), respectivamente, observaram um papel essencial do NO e da inibição

do estresse oxidativo nos efeitos positivos da administração do DIZE. Essas observações estão de acordo com o papel antioxidante da Ang-(1-7) (Patel *et al.*, 2015).

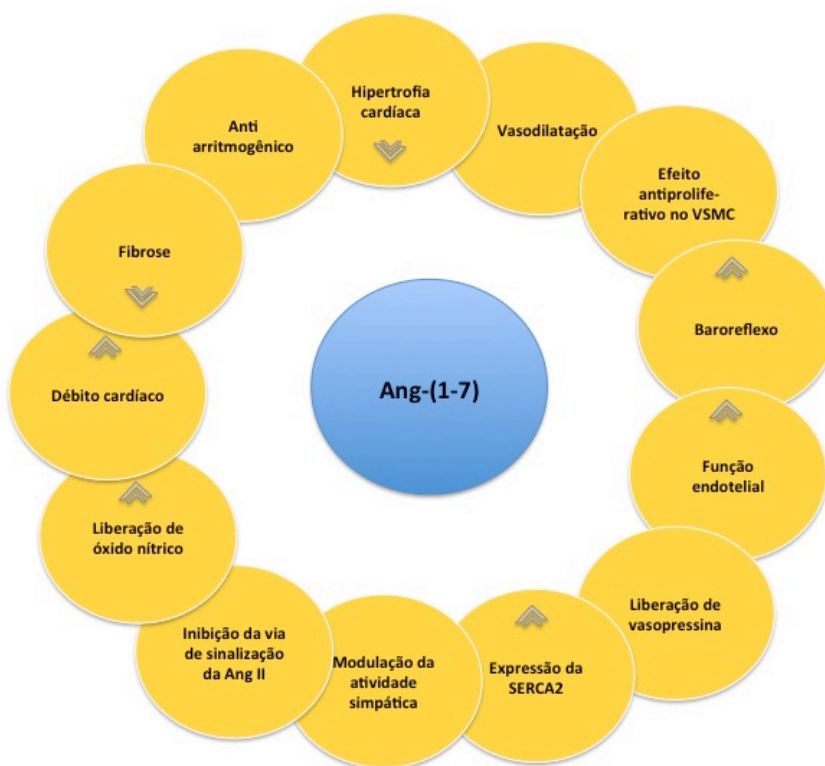
### **2.3 Angiotensina-(1-7)**

Atualmente, importância crescente tem sido atribuída a Ang-(1-7) na função cardíaca, principalmente devido aos seus efeitos opostos às ações vasoconstritoras e proliferativas da Ang II. No sistema cardiovascular, além de promover vasodilatação, a Ang-(1-7) inibe ou reduz respostas como: hipertrofia cardíaca, arritmia cardíaca de reperfusão, inflamação, fibrose, agregação plaquetária e estresse oxidativo (Ferreira *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2004; Tallant *et al.*, 2005; Ferrario, 2006; Oudit *et al.*, 2007; Fraga-Silva *et al.*, 2008). Estudos sugerem que a Ang-(1-7) pode ainda ser um modulador importante de canais iônicos (Gironacci *et al.*, 1994; Bevilaqua *et al.*, 2002). O protooncogene Mas é considerado o receptor funcional desse peptídeo (Santos *et al.*, 2003). Assim, a demonstração de que a Ang-(1-7) é um componente-chave do SRA representou uma das mudanças conceituais mais significativas nesse importante sistema hormonal (Santos, 2014). Diversos trabalhos vêm demonstrando vários efeitos cardioprotetores deste peptídeo, opostos às ações da Ang II, estabelecendo o eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas como um regulador endógeno do eixo ECA/Ang II/AT1R.

Nesse sentido, a Ang-(1-7) produziu um efeito antihipertrófico em cultura de cardiomiócitos tratados com Ang II (Gomes *et al.*, 2010; Flores-Muñoz *et al.*, 2012), vasopressina (Flores-Muñoz *et al.*, 2012) ou endotelina (Gallagher *et al.*, 2008). Em modelo experimental de I/R, Ferreira *et al.* (2001 e 2002) descreveram um papel antiarritmogênico e cardioprotetor da Ang-(1-7) ao melhorar a função cardíaca após I/R. Além disso, Grobe *et al.* (2006 e 2007) mostraram que 28 dias de infusão intravenosa de Ang-(1-7) atenuou a fibrose cardíaca induzida por acetato de desoxicorticosterona (DOCA)-sal ou hipertensão causada por Ang II, sem alterar o grau de hipertrofia cardíaca ou os níveis de pressão arterial. No entanto, em relação a hipertrofia cardíaca, Mercure *et al.* (2008) mostraram que

camundongos transgênicos com superexpressão de Ang-(1-7) seletivamente no coração apresentam menor hipertrofia ventricular e fibrose em resposta à infusão de Ang II (Mercure *et al.*, 2008).

Uma estratégia experimental desenvolvida para se estudar melhor os efeitos da Ang-(1-7) foi o desenvolvimento de ratos transgênicos [TGR(A1-7)3292] (TG) que superexpressam esse peptídeo aumentando a sua concentração no plasma (Methot *et al.*, 1997; Santos *et al.*, 2004). Por exemplo, Santiago *et al.* (2010) observaram que os animais DOCA-TG ficam hipertensos, porém com menores níveis de pressão arterial, não desenvolvem hipertrofia cardíaca e não alteram a função ventricular. Além disso, os animais DOCA-TG apresentaram atenuação na expressão do RNAm de colágenos tipo I e tipo III em comparação com os animais controles. Por fim, DOCA-TG possuíam uma redução nos níveis de Ang-(1-7) no plasma, porém esses níveis eram 3 vezes maiores quando comparado com animais não TG.



**Figura 3:** Ações cardiovasculares da Ang-(1-7). A figura ilustra as conhecidas ações da Ang-(1-7). NO: óxido nítrico; VSMC: células do músculo liso vascular (Modificado de Santos, 2014).

#### **2.4 Receptor Mas de Angiotensina-(1-7)**

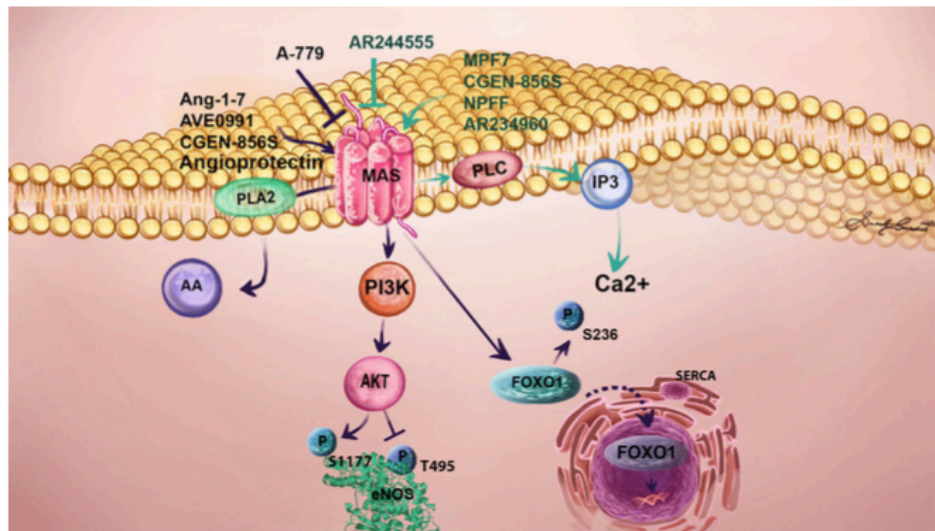
O protooncogene Mas, caracterizado inicialmente pelas suas propriedades tumorais (Young *et al.*, 1986; Rabin *et al.*, 1987), codifica uma proteína com sete domínios transmembrana acoplado a proteína G (Zohn *et al.*, 1998). Os primeiros estudos utilizando o A-779 (Santos e Campagnole-Santos, 1994), evidenciaram a existência de um sítio de ligação específico para este peptídeo distinto dos receptores AT1 e AT2 de Ang II (Santos e Campagnole-Santos, 1994; Ferrario *et al.*, 1998). Entretanto, foi em 2003 que Santos *et al.* (2003) demonstraram que este sítio de ligação correspondia ao receptor Mas.

O Mas é expresso em vários órgãos e tecidos relacionados ao sistema cardiovascular, incluindo o cérebro (hipotálamo e tronco cerebral) (Becker *et al.*, 2007; Freund *et al.*, 2012), coração (Santos *et al.*, 2006; Dias-Peixoto *et al.*, 2008), rins (Santos *et al.*, 2003; Pinheiro *et al.*, 2004) e vasos sanguíneos (Sampaio *et al.*, 2007). No coração, a expressão do Mas foi detectada em cardiomiócitos (Tallant *et al.*, 2005) e fibroblastos cardíacos (Iwata *et al.*, 2011) e, mais recentemente, também no NSA (Ferreira *et al.*, 2011).

A Ang-(1-7), agindo através do Mas, libera NO por uma via dependente do fosfatidilinositol-3 kinase/proteína quinase B (Akt), causando vasodilatação, inibição do crescimento celular e contra regulando os efeitos proliferativos e vasoconstritores da Ang II via AT1 (Santos *et al.*, 2003; Sampaio *et al.*, 2007; Dias-Peixoto *et al.*, 2008; Patel *et al.*, 2015).

Camundongos Mas-KO apresentam função cardíaca alterada, com diminuição da tensão sistólica, da velocidade tanto de contração quanto de relaxamento, da pressão no ventrículo esquerdo e da frequência cardíaca, além de aumento da resistência vascular (Gembardt *et al.*, 2003; Castro *et al.*, 2006). Cardiomiócitos provenientes desses animais possuem um menor pico da corrente transitória de

Ca<sup>2+</sup> e uma captação mais lenta de Ca<sup>2+</sup>, provavelmente devido à diminuição da expressão da SERCA2 (Gomes *et al.*, 2012). Esse perfil foi associado à diminuição da função cardíaca observada nos animais Mas-KO (Santos *et al.*, 2006; Botelho-Santos *et al.*, 2012; Gava *et al.*, 2012). Essas alterações nas proteínas envolvidas na dinâmica do cálcio estão em paralelo com alterações na maquinaria de produção do NO (Dias-Peixoto *et al.*, 2008; de Almeida *et al.*, 2013), uma vez que cardiomiócitos desses camundongos apresentam níveis normais da proteína óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), mas um aumento de 70% na expressão da caveolina 3 e uma diminuição na proteína heat shock 90 (Dias-Peixoto *et al.*, 2008). Estas duas alterações podem levar a uma diminuição na atividade da eNOS, já que a caveolina 3 impede a interação da calmodulina com a óxido nítrico sintase (NOS) e a proteína heat shock 90 funciona como um scaffold para Akt (Wu, 2002).



**Figura 4:** Via de sinalização do receptor Mas (Bader *et al.*, 2014).

## 2.5 Isquemia/reperfusão no coração

As lesões por I/R miocárdica ocorrem quando o fluxo sanguíneo para o miocárdio é obstruído e seguido pelo restabelecimento do sangue para o coração isquêmico (Frank *et al.*, 2012; Zuo *et al.*, 2013). A isquemia em uma região

específica do corpo pode provocar danos nos tecidos devido a falta de oxigênio e nutrientes. O coração é particularmente vulnerável, por ter uma alta demanda energética para o seu funcionamento (Frank *et al.*, 2012; Raedschelders *et al.*, 2012).

A isquemia miocárdica é definida como um desequilíbrio entre a captação de oxigênio e a taxa de oxidação celular. Após a cessação do fluxo sanguíneo, os estoques de oxigênio são rapidamente consumidos com consequente depleção do ATP, diminuindo a contratilidade manifestada, primeiramente, como deficiência diastólica e, dentro de segundos, como disfunção sistólica (Théroux, 1999). Embora a restauração do fluxo sanguíneo a um órgão isquêmico seja essencial para prevenir injúria celular irreversível, a reperfusão por si pode aumentar a injúria tecidual provocada pela isquemia. Dano celular após a reperfusão de tecidos isquêmicos, previamente viáveis, é definido como lesão de I/R (Collard e Gelman, 2001).

Os efeitos deletérios da isquemia seguida de reperfusão envolve uma resposta inflamatória local e sistêmica caracterizada pela produção de oxidantes, ativação do complemento, adesão de leucócitos a células endoteliais, migração de leucócitos transendotelial, agregação plaquetária leucocitária, aumento da permeabilidade microvascular e diminuição do relaxamento endotélio-dependente (Carden e Granger, 2000). No entanto, os mecanismos moleculares envolvidos na lesão por I/R parecem ser multifatoriais e várias hipóteses ainda estão sendo propostas para estabelecer a patogênese da I/R no miocárdio (Parlakpinar *et al.*, 2013; Kalogeris *et al.*, 2014).

A primeira descrição de um efeito antiarritmogênico da Ang-(1-7) foi feita por Ferreira *et al.* (2001) que observaram que uma baixa concentração de Ang-(1-7) (230 pmol/L) produz uma redução significativa na duração e na severidade das arritmias cardíacas induzidas por I/R em corações isolados de ratos (Ferreira *et al.*, 2001). Porém, numa concentração 10 vezes superior (27nM), é possível que a Ang-(1-7) facilite o surgimento de arritmias de reperfusão (Neves *et al.*, 1997). Esses resultados são corroborados pelo estudo de Donoghue *et al.* (2003) que verificaram um aumento da mortalidade em decorrência de arritmias cardíacas em



camundongos que superexpressam ECA2 no coração (Donoghue *et al.*, 2003).

De acordo com estas observações, De Mello *et al.* (2007) relataram um efeito bifásico da Ang-(1-7) na propagação do impulso e nas arritmias cardíacas, ou seja, a 10 nmol/L, um efeito antiarritmogênico foi observado, ao passo que, na concentração 10 vezes mais elevada, a Ang-(1-7) foi proarritmogênica. Em ratos TG que apresentam um aumento de 2,5 vezes na concentração da Ang-(1-7) circulante, foi observada uma redução na duração das arritmias cardíacas de reperfusão e uma melhora na função cardíaca pós-isquêmica (Santos *et al.*, 2004). Segundo De Mello *et al.* (2007), o mecanismo do efeito antiarritmogênico da Ang-(1-7) parece envolver a bomba de sódio.

## **2.6 Mitocôndrias e músculo cardíaco**

Durante o IM, o metabolismo dos cardiomiócitos é severamente alterado devido a ausência de oxigênio, nutrientes e acidificação celular, além das lesões em decorrência da reperfusão sanguínea (Thygesen *et al.*, 2008). Neste contexto, as mitocôndrias têm surgido como uma organela chave em cardiomiócitos devido ao seu papel fundamental como principal fonte geradora de ATP, necessário para a contração do músculo cardíaco e sobrevivência (Zepeda *et al.*, 2014).

As mitocôndrias representam 1/3 da massa total do coração, sendo a organela responsável por gerar a maior parte da energia na forma de ATP que a célula precisa para se manter funcionando (Stanley *et al.*, 2004; Murray *et al.*, 2007). A produção de energia envolve diversas vias metabólicas e a oxidação fosforilativa é a maior responsável pela produção do ATP consumido pela célula. A incapacidade da mitocôndria em suprir adequadamente os níveis de ATP para a célula leva a um estado de depleção energética (Neubauer, 2007), que é fator crucial para perda de função contrátil dos cardiomiócitos (Tuunanen *et al.*, 2008). Muitas das vezes, as relações dos níveis de ATP se correlacionam mais fortemente com a mortalidade do que a fração de ejeção do ventrículo esquerdo (Neubauer *et al.*, 1997).

Dada a alta densidade de mitocôndrias em cardiomiócitos e a dependência

absoluta da fosforilação oxidativa mitocondrial para a produção de ATP a ser utilizado para a contração cardíaca, não é de se estranhar que as alterações patológicas no coração estão frequentemente associadas a alterações na função ou no metabolismo mitocondrial cardíaco (Kuzmicic *et al.*, 2011). Vários estudos indicam que as mitocôndrias desempenham um papel crítico no coração durante a I/R. Mecanicamente, a lesão provocada pela I/R surge da disfunção mitocondrial induzida pelo estresse oxidativo, o que leva à morte de miócitos e IM (Halestrap, 2006; Webster, 2007; Akar e O'Rourke, 2011).

A análise volumétrica da ultraestrutura de corações de camundongos com deleção do Mas revelou que esses animais apresentam um número aumentado de mitocôndrias em relação aos seus controles (Coutinho, 2011). O fato do coração possuir alta dependência do metabolismo oxidativo sugere uma forte relação entre o funcionamento cardíaco e a estrutura das mitocôndrias (DiMauro e Hirano, 1998). Essa alteração no número de mitocôndrias observada nos animais *knockout* para o Mas poderia sugerir uma deficiência energética no coração desses animais. De fato, alguns estudos tem sugerido que as mitocôndrias são altamente dinâmicas e que alterações na forma mitocondrial pode afetar uma gama de processos biológicos, como a apoptose, a respiração, a mitose e o desenvolvimento (Dimmer e Scorrano, 2006, Hausenloy e Scorrano, 2007). As mitocôndrias modificam a sua morfologia por meio dos processos de fusão e fissão, resultando em formatos do tipo alongada, tubular, em redes mitocondriais interconectadas ou em mitocôndrias fragmentadas e descontínuas (Dimmer e Scorrano, 2006, Hausenloy e Scorrano, 2007). Esta alteração na forma pode resultar em uma alteração no número de mitocôndrias e na função mitocondrial, modulando os níveis de ATP. O processo de fusão mitocondrial está relacionado com um aumento nos níveis intracelulares de ATP, enquanto o processo de fissão com uma diminuição nas concentrações de ATP intracelular (Parra *et al.*, 2014).

A AMPK é considerada um sensor do equilíbrio energético da célula e, por isto, está diretamente relacionada com a síntese de ATP (Zhang *et al.*, 2006). Resultados da análise proteica da AMPK em corações de camundongos deficientes para o Mas revelaram que a AMPK $\alpha$ , a subunidade catalítica do

complexo proteico, está significativamente diminuída nos animais Mas-KO. Por outro lado, a expressão da AMPK $\beta$ 1, uma subunidade regulatória do complexo proteico, apresentou um aumento significativo nos animais deficientes para o Mas quando comparado com os animais controle (Coutinho, 2011). Estes dados indicam que a produção e/ou consumo de ATP podem estar alterados nestes animais. Sabendo que a ativação da AMPK é importante na prevenção da disfunção cardíaca pós-isquêmica (Daniels *et al.*, 2010; Paiva *et al.*, 2011), esses dados sugerem que as lesões observadas após a isquemia/reperfusão de corações de camundongos Mas-KO (Castro *et al.*, 2006) podem estar relacionadas com uma função mitocondrial deficiente.

## **2.7 Eletrofisiologia cardíaca**

A fisiologia contrátil da célula cardíaca se deve à movimentação de íons através da membrana plasmática, que permite que ocorram mudanças no potencial de repouso da célula, favorecendo a ocorrência da contração celular, decorrente da geração do PA. (Nerbonne and Kass, 2005)

O fluxo de íons através dos canais permite que estruturas especializadas dentro das células sejam ativadas e ocorra a liberação de cálcio a partir de estoques intracelulares. O cálcio liberado é responsável pela ativação da maquinaria contrátil da célula, que, ao trabalhar de forma cooperativa, permite a deflagração da contração celular. Para a finalização do processo contrátil, o cálcio é recapturado e extruído por sistemas especializados, os quais permitem que a contração celular seja encerrada (Bers, 2001).

O fenômeno em que o PA é capaz de induzir a célula a aumentar de modo transiente os valores de cálcio no citoplasma durante o processo de sístole, é denominado de acoplamento excitação-contração (AEC). Este acoplamento é um dos principais mecanismos responsáveis pelo funcionamento adequado da contratilidade celular. Resumidamente, as fases do PA podem ser assim caracterizadas (Nerbonne e Kass, 2005): i) Fase 0: despolarização da célula cardíaca com abertura dos canais de sódio e início da abertura dos canais de

potássio transiente rápidos ( $I_{tO,f}$ ); ii) Fase 1: ativação dos canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L ( $I_{Ca,L}$ ), mais frequentes, e do tipo T ( $I_{Ca,T}$ ), menos frequentes. Nessa fase, contribuem de forma mais ativa o  $I_{tO,f}$ ; iii) Fase 2: a ativação da corrente de cálcio iniciada na fase 1 é mantida na fase 2, o que caracteriza o platô do PA. Além disso, nesta fase, outros canais de potássio dependentes de voltagem, mas com uma cinética de ativação mais lenta, começam a ser ativados, contribuindo para a repolarização; iv) Fase 3: a corrente de cálcio é inativada e, agora, as correntes de potássio restantes contribuem para o final da repolarização do PA (RPA). Nesta fase, os canais de potássio do tipo retificadores de entrada ( $I_{K1}$ ) possuem papel fundamental, já que eles são ativados por hiperpolarização; v) Fase 4: esse estágio equivale ao potencial de repouso da célula. Nessa fase, contribuem ativamente os  $I_{K1}$  e os KATP.

Essencial na resposta ao estresse, o KATP funciona como um sensor metabólico, o qual interliga o estado metabólico intracelular à excitabilidade da membrana (Ashcroft, 1988; Miki e Seino, 2005; Nichols, 2006) e tem um extenso papel homeostático que vai desde a regulação da glicose no sangue até a cardioproteção (Olson e Terzic, 2010). Eles promovem o encurtamento do PA, impedindo, assim, a sobrecarga de cálcio durante a isquemia (Halestrap, 2006). A atividade do KATP é regulada pela concentração local de nucleotídeos, sendo tipicamente ativada por uma diminuição no balanço  $[ATP]/[ADP]$  (Babenko, 2005). Assim, o KATP pode atuar como um elo entre a excitabilidade da membrana e um sensor do estado metabólico da célula. O'Rourke *et al.* (1994) observaram a relação dinâmica entre a ativação do KATP e o estado metabólico do cardiomiócito (O'Rourke *et al.*, 1994).

## **2.8 Diabetes e o remodelamento elétrico cardíaco**

O diabetes é uma doença metabólica caracterizada por hiperglicemia, deficiência e/ou resistência à insulina. O DM do tipo 1 é iniciado por um mecanismo autoimune e é responsável por cerca de 5% a 10% dos casos de diabetes. O DM do tipo 2 representa 90% a 95% dos casos de diabetes e é

iniciado pela interação de fatores genéticos, ambientais e de estilo de vida (Laakso e Kuusisto, 2014).

A DCV é a principal causa de morbidade e mortalidade em pacientes com diabetes, respondendo por cerca de 80% de todas as mortes de diabéticos da América do Norte (Glass *et al.*, 2010). No coração, o diabetes aumenta o metabolismo dos ácidos graxos, suprime a oxidação da glicose e modifica a sinalização intracelular, levando a deficiência em vários estágios do acoplamento excitação-contração, uma produção de energia ineficiente e aumento da susceptibilidade a lesão por I/R. Danos e perda da microcirculação normal e o remodelamento cardíaco desfavorável da MEC também resultam em uma disfunção contrátil dos corações diabéticos (Miki *et al.*, 2013). Isquemia e infarto resultam na perda irreversível de cardiomiócitos seguido de fibrose nas regiões afetadas (Cai e Kang, 2003; Miki *et al.*, 2013). Assim, independente de outras complicações cardiovasculares, uma gama de fatores indica que o diabetes está associado a uma cardiomiopatia específica conhecida como CMD (Rubler *et al.*, 1972).

Neste contexto, a CMD é uma importante causa de morbidade e mortalidade (Garcia *et al.*, 1974), englobando a neuropatia autonômica (Kahn *et al.*, 1987; Vinik e Ziegler, 2007; Murça *et al.*, 2012), a disfunção mecânica (Dhalla *et al.*, 1998; Murça *et al.*, 2012), a utilização anormal de energia (An e Rodrigues, 2006) e o remodelamento elétrico cardíaco (Cassis *et al.*, 2000). Esse último é uma das complicações mais graves, criando um microambiente que evoca arritmias ventriculares fatais (Kahn *et al.*, 1987, Magyar *et al.*, 1992). Pacientes diabéticos apresentam alterações no traçado do ECG, incluindo prolongamento nos intervalos QT e QTc (Arildsen *et al.*, 1999). Dessa forma, essas alterações eletrocardiográficas pró-arrítmicas são o resultado do prolongamento na duração do PA (Kahn *et al.*, 1987; Magyar *et al.*, 1992). Alterações nos canais iônicos estão fortemente relacionadas a alterações nas propriedades eletromecânicas presente na CMD (Casis e Echevarria, 2004).

### **3. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA**

O SRA exerce um papel importante nas doenças DCV. Estudos demonstram que a Ang II atua de forma deletéria devido, principalmente, a suas ações proliferativas, vasoconstritoras e indutoras de estresse oxidativo. Por outro lado, sabe-se que várias ações da Ang-(1-7) são contrárias às da Ang II, principalmente no que se refere aos seus efeitos no sistema cardiovascular. Assim, considerando a comprovada relevância das ações protetoras do eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas no sistema cardiovascular, nós hipotetizamos neste presente estudo que os efeitos cardíacos benéficos observados em decorrência da ativação deste eixo podem estar diretamente relacionados com o desempenho das funções das mitocôndrias do coração, tendo em vista que essas organelas desempenham um papel crucial na função e na eletrofisiologia deste órgão.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo geral**

Avaliar os efeitos do eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas em situações fisiológicas e patológicas no contexto do metabolismo energético e da eletrofisiologia cardíaca.

### **4.2 Objetivos específicos**

- Avaliar os efeitos do tratamento crônico com o DIZE na função cardíaca de ratos submetidos a I/R regional;
- Avaliar os efeitos do tratamento crônico com o DIZE nos níveis de ATP em corações de ratos submetidos ou não a I/R regional;
- Avaliar os efeitos do tratamento crônico com o DIZE na função mitocondrial de fibras cardíacas;
- Avaliar os efeitos do tratamento crônico com o DIZE na função mitocondrial de mitocôndrias cardíacas isoladas;
- Avaliar os efeitos da ativação do eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas no PA de cardiomiócitos isolados;
- Avaliar os efeitos da ativação do eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas em canais de potássio cardíacos sensíveis ao ATP (KATP);
- Avaliar a densidade de corrente de saída de potássio em animais Mas-KO;
- Avaliar o perfil de citocinas no coração de animais Mas-KO;
- Avaliar os efeitos do tratamento crônico com o DIZE em canais de cálcio cardíacos;
- Avaliar os efeitos do tratamento crônico com o DIZE no remodelamento elétrico cardíaco induzido pelo diabetes em ratos.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos fornecidos pelo Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Além disso, também foram utilizados ratos Sprague-Dawley (SD) e [TGR(A1-7)3292] e camundongos C57Bl/6 (Controle) e C57Bl/6 *knockout* para o Mas (Mas-KO), todos provenientes do Biotério de Animais Transgênicos do Laboratório de Hipertensão – Departamento de Fisiologia e Biofísica – ICB/UFMG. Para os experimentos com os animais diabéticos foram utilizados ratos Wistar machos provenientes do biotério do Centro de Ciências da Saúde – Departamento de Biofísica – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF)/Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Todos os animais tinham 12 semanas de idade.

Os animais foram alojados em biotério apropriado com temperatura controlada (22-23°C) e ciclo claro-escuro de 12-12 h. Água e comida foram fornecidos *ad libitum*. Os protocolos experimentais foram realizados de acordo com as diretrizes institucionais aprovadas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil (CETEA-UFMG), que estão de acordo com os Institutos Nacionais de Saúde (NIH) para o cuidado e uso de animais de laboratório (protocolo #130/11). O protocolo de indução de hiperglicemia foi aprovado pelo Comitê de Ética do Uso de Animais em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde do IBCCF da UFRJ (IBCCF217-09/16 e IBCCF 26).

### 5.2 Tratamento com o DIZE

O composto ativador da ECA2 endógena utilizado neste estudo foi o DIZE. O DIZE foi identificado recentemente como um eficaz ativador da ECA2 por Kulemina e Ostrov (2011). O DIZE foi administrado oralmente (1 mg/kg, gavagem) diluído em salina (Foureaux *et al.*, 2013). A gavagem controle foi realizada com



salina em volume equivalente ao do DIZE. O tratamento foi realizado diariamente por 30 dias.

### **5.3 Indução da hiperglicemia**

Ratos Wistar machos ( $118,6 \pm 8,0$  g) foram mantidos a uma temperatura constante ( $22-23^{\circ}\text{C}$ ) e luz padrão com ciclo claro/escuro de 12h/12 h, com livre acesso à ração e água. A hiperglicemia foi induzida por uma única injeção de estreptozotocina (STZ) em tampão de citrato de sódio (10 mmol/L, pH 4,5) (60mg/kg/iv; Sigma-Aldrich MO, EUA), como descrito anteriormente (Sharma *et al.*, 2011). Ratos não-hiperglicêmicos receberam injeção de ~0,2 mL de tampão de citrato de sódio. Níveis de glicose no sangue foram determinados usando uma tira reagente à glicose e um glicosímetro automático padrão (One-Touch, Jhonson & Jhonson, Brasil). Quatro semanas após o estabelecimento da hiperglicemia (glicose no sangue superior a 300 mg/dL), os ratos foram tratados com solução salina (~0,5 mL por animal, uma vez por dia por gavagem) ou DIZE (1 mg/kg diluído em solução salina, ~0,5 mL por animal, uma vez por dia por gavagem). Os seguintes grupos de animais foram utilizados neste estudo: (i) não-hiperglicêmicos + salina (C), (ii) não-hiperglicêmicos + DIZE (C + DIZE), (iii) hiperglicêmicos + salina (HG), e (iv) hiperglicêmico + DIZE (HG + DIZE).

### **5.4 Genotipagem dos animais transgênicos**

Animais [TGR(A1-7)3292] e camundongos Mas-KO devidamente identificados tiveram um pequeno pedaço da cauda coletado para a confirmação da respectiva transgenia por meio da extração do DNA genômico seguido de reação em cadeia da polimerase (PCR). Em um microtubo contendo o tecido coletado foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de tampão com 10  $\mu\text{L}$  de proteinase K na concentração de 20 mg/mL. Incubou-se o tubo à temperatura de  $55^{\circ}\text{C}$  por 2 h ou até que tivesse ocorrido total digestão do tecido. Na sequência, adicionou-se 750

μL de tampão Tris-ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (1X) e incubou-se novamente as amostras por 10 min à temperatura de 95°C. Do produto final, foram utilizados 2 μL para realização da PCR. Foram utilizados *primers* sense e anti-sense específicos para cada transgênico em análise, [TGR(A1-7)3292] ou Mas-KO. Todas as reações foram realizadas em um volume final de 50 μL em tubos resistentes a temperaturas elevadas com os seguintes reagentes: 1 μL (10 μM) de cada *primer* (sense e anti-sense), tampão para PCR (concentrações finais: Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM), 2 μL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, dNTPs (deoxinucleotídeos trifosfato: dATP, dCTP, dGTP e dTTP; 0,2 mM de cada) e 2,5 UI de Taq DNA polimerase.

Para o processo de ciclagem térmica, realizou-se as seguintes etapas de acordo com cada tipo de transgênico.

**Quadro 1:** Parâmetros do processo de ciclagem térmica para os animais transgênicos [TGR(A1-7)3292].

<b>Etapa</b>	<b>Ciclo</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Duração</b>
1	1	95	4 min
2	35	95	30 seg
		56	30 seg
		72	1 min
3	1	72	7 min
		4	infinito

**Quadro 2:** Parâmetros do processo de ciclagem térmica para os animais transgênicos Mas-KO.

Etapa	Ciclo	Temperatura(°C)	Duração
1	1	95	3 min
2	35	95	30 seg
		60	30 seg
		72	40 seg
3	1	72	5 min
		4	infinito

Uma alíquota de 8 µL de cada amostra foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio (0,64 µg/mL). As bandas correspondentes foram visualizadas em transiluminador sob luz ultravioleta para verificação da presença ou ausência de amplificação. O peso molecular dos produtos da PCR foi determinado pela comparação com um marcador de massa molecular.

### 5.5 Perfil das citocinas nos animais Mas-KO

O ensaio para determinação das citocinas no ventrículo esquerdo foi realizado conforme instruções do fabricante (*Mouse Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel, Milliplex Map Kit* - Merk Millipore®, EUA) utilizando a tecnologia xMAP® (Milliplex - Merk Millipore®, EUA) de leitura de microesferas magnéticas. Aproximadamente 100 mg de tecido foram triturados utilizando-se um homogeneizador (IKA T10 basic, SP, Brasil) com 1000 µL de tampão de extração [tampão salina-fosfato (PBS) (0,4 M de NaCl e 10 mM de NaPO<sub>4</sub>) contendo inibidor de proteases (0,1 mM de fluoreto fenilmetilsulfonil – PMSF, 0,1 mM de benzethonium chloride, 10 mM de EDTA e 20 KI de aprotinina A) e 0,05% Tween 20] na proporção de 0,1 g de tecido para cada mL de solução.

Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 20 min a 4°C em centrífuga Hermle modelo Z326K (Hermle Labortechnik GmbH, Alemanha). O sobrenadante foi coletado e, para utilização no experimento, uma alíquota de 30 µL foi diluída (1:2) em PBS (1X). Para o ensaio, foram pipetados 25 µL do branco, padrões, controles e amostras em duplicata, de acordo com o desenho da placa previamente delineado. Aos poços do branco, padrões e controles foram pipetados 25 µL de PBS (1X), enquanto que aos poços referentes às amostras foram pipetados 25 µL do tampão de ensaio. Em seguida, foram adicionados a cada poço 25 µL da mistura de microesferas magnéticas, previamente preparada de acordo com as instruções do fabricante (*Mouse Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel, Milliplex Map Kit* - Merk Millipore®, EUA). A placa foi incubada sob agitação a 4°C por 16 a 18 h para se atingir o estado ótimo de sensibilidade, precisão e acurácia do ensaio. Após o período de incubação, o conteúdo da placa foi removido, seguido de duas sessões de lavagem com tampão apropriado. Foram adicionados 25 µL do anticorpo de detecção em cada poço e subsequente incubação da placa sob agitação por 1 h em temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 25 µL de estreptavidina-ficoeritrina e reincubado por 30 min sob agitação em temperatura ambiente. O conteúdo da placa foi removido gentilmente e, posteriormente, a placa foi lavada duas vezes com tampão apropriado. Por último, foram adicionados 150 µL de *drive fluid* para subsequente leitura da placa. A leitura das microesferas magnéticas foi realizada pelo equipamento MagPix através do software xPONENT (Luminex Corporation, EUA).

## **5.6 Coração isolado**

Um sistema de Langendorff com pressão constante (65 mmHg) e oxigenado (95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>) foi utilizado para avaliar a função cardíaca em corações isolados de ratos. Os animais foram heparinizados (400 UI ip) 10 min antes da eutanásia por decapitação. Foi realizada a toracotomia, o coração foi cuidadosamente dissecado, removido e colocado em uma solução fria de Krebs-

Ringer (em mM: 118,4 de NaCl, 4,7 de KCl, 1,2 de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,2 de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2,5 de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 11,7 de  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$  e 26,5 de  $\text{NaHCO}_3$ ) para preservar o coração antes da perfusão. A aorta ascendente foi seccionada em sua primeira ramificação e canulada no sistema de perfusão. O coração foi perfundido através da aorta com solução de Krebs-Ringer a  $37 \pm 1$  °C. Um pequeno gancho foi introduzido no ápice do ventrículo esquerdo e conectado a um transdutor de força para registrar a força contractil. A tensão de  $1,0 \pm 0,2$  g foi aplicada ao coração (tensão diastólica) e foi mantida constante durante o experimento. A FC e a  $\pm dT/dt$  foram calculadas a partir dos valores de tensão e armazenadas utilizando um sistema de aquisição e análise de dados analógicos convertidos para digitais (MP100 AcqKnowledge, Biopac Systems Inc., EUA). O fluxo coronariano foi medido diretamente a partir do efluente coletado durante 1 min a cada 5 min. Os corações dos grupos controle (n=7) e DIZE (n=6) foram perfundidos durante um período inicial de 30 min com solução de Krebs-Ringer para estabilização. Após esse período, a LAD foi ocluída juntamente com as veias adjacentes. A oclusão foi mantida durante 15 min e a reperfusão foi realizada durante 30 min adicionais. As arritmias cardíacas foram definidas como a presença de taquicardia ventricular e/ou fibrilação ventricular durante a reperfusão. Para obter uma medida quantitativa, as arritmias foram classificadas arbitrariamente de acordo com a sua duração. Uma arritmia com uma duração de 30 min foi considerada irreversível. À ocorrência de arritmias cardíacas por menos de 3 min foi atribuído o *score* 2; 3-6 min foi atribuído o *score* 4; 6-10 min foi atribuído o *score* 6; 10-15 min foi atribuído o *score* 8; 15-20 min foi atribuído o *score* 10; 20-25 min foi atribuído o *score* 11; e de 25-30 min foi atribuído o *score* 12. Assim, um valor de 0-12 foi obtido em cada experimento e foi designado como índice de severidade da arritmia (ISA), como descrito anteriormente (Ferreira *et al.*, 2001).

## 5.7 Dosagem de ATP ventricular

Amostras dos ventrículos isquêmicos e não isquêmicos foram coletados para a detecção dos níveis de ATP (Chida *et al.*, 2012). Os tecidos foram pesados

e 3 mL de tampão de homogeneização frio foi adicionado para cada 150 mg de tecido. Todas as diluições foram feitas com água deionizada de alta pureza (resistividade 18 MΩcm) obtido a partir de um sistema de purificação de água MilliQ (Millipore, Bedford, MA, EUA) e os produtos químicos utilizados foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Um mL de homogenato foi transferido para um eppendorf de 2 mL contendo 200 µL de clorofórmio e 150 µL de água deionizada. O homogenato foi cuidadosamente agitado durante 20 seg e centrifugado a 10.000 rpm durante 5 min a 4°C. À alíquota final, foi adicionado 0,1 µM de ortovanadato e, imediatamente, armazenado em nitrogênio líquido. No momento do experimento, a amostra foi diluída 500 vezes com água livre de ATP (Millipore, Bedford, MA, EUA) e 10 µl da alíquota diluída foi utilizada para o ensaio de bioluminescência por meio da reação de luciferina-luciferase.

A detecção do ATP liberado pelas células foi realizada utilizando o *ENLITEN® ATP Bioluminescence Assay Detection System Kit* (Promega Corporation, Madison, WI, EUA), seguindo as instruções do fabricante. A luciferase catalisa a seguinte reação quimioluminescente de oxidação-redução:



A cinética foi monitorada através do *Varioskan flash multimode Reader* (Thermo Scientific®, MA, EUA) durante 10 min, com uma leitura de minuto a minuto e com um tempo de exposição de 10 seg por poço a 25 °C após uma pipetagem automática, programada pelo dispositivo, da solução contendo as enzimas para o início da reação. Os dados foram normalizados e os pontos máximos da luz emitida pelas amostras foram utilizadas para análise. A relação de luz emitida pela atividade da luciferase é linear ao longo de, pelo menos, oito ordens de grandeza de unidades relativas de luz (RLU) (Turner *et al.*, 2010).

## 5.8 Análise da função mitocondrial cardíaca

### 5.8.1 Fibras permeabilizadas

A respiração mitocondrial foi avaliada *in situ* em fibras permeabilizadas com saponina, como descrito anteriormente (Pesta *et al.*, 2012). Depois de removido o coração, fragmentos do ventrículo esquerdo foram imediatamente imersos em solução fria de BIOPS (EGTA 10mM, K-Mes 0,1 mM, DTT 0,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 6,56 mM, ATP 5,77 mM, fosfocreatina 15 mM, pH 7,1). Utilizando duas pinças, as fibras foram separadas e permeabilizadas sobre gelo com solução de BIOPS contendo 50 µg/mL de saponina durante 30 min. Depois de permeabilizadas, as fibras foram lavadas por 10 min em uma solução fria de tampão de respiração mitocondrial MIR05 (EGTA 0,5 mM; MgCl<sub>2</sub> 3 mM, K-lactobionato 60 mM; taurin 20 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM; HEPES 20 mM, sacarose 110 mM, BSA 1 g/L; pH 7,1). As fibras musculares permeabilizadas foram utilizadas imediatamente. Utilizando o método de respirometria de alta precisão (*High-Resolution respirometry*), fibras permeabilizadas (3,5 - 4,5 mg) foram secas em papel filtro, pesadas e colocadas em uma câmara do Oxygraph 2k (Oroboros Instruments, Innsbruck, Áustria) com 2 mL de MIR05 a 37°C. O protocolo de adição dos substratos avaliando o fluxo de O<sub>2</sub> foi realizado sequencialmente da seguinte forma: piruvato (5 mM) e malato (5 mM), ADP (3 mM), citocromo C (10 µM), succinato (10 mM), oligomicina (1 µg/mL), FCCP (10 mM), rotenona (3 mM) e KCN (10 mM).

O consumo de oxigênio da síntese de ATP e o vazamento de prótons (VP) foram calculados a partir das equações: (síntese de ATP = fluxo de O<sub>2</sub> do estado três da respiração (ST3<sub>PMS</sub>) – fluxo de O<sub>2</sub> da oligomicina; VP = fluxo de O<sub>2</sub> da oligomicina – fluxo de O<sub>2</sub> do KCN). Cada passo foi intercalado por um período de estabilização entre as injeções. A concentração de oxigênio e o fluxo de oxigênio por massa [pmolO<sub>2</sub>/(seg\*mg)] foram registrados *online* utilizando o *software* DatLab (Oroboros Instruments, Innsbruck, Áustria).

### 5.8.2 Mitocôndrias isoladas

Para o isolamento das mitocôndrias do coração, imediatamente após a sua remoção do tórax, o coração foi imerso em uma solução tamponada isotônica mantida em gelo [manitol 225 mM, sacarose 75 mM, Hepes 10 mM, Tris (pH 7,4), EDTA 1 mM e EGTA 1 mM], o ventrículo esquerdo cuidadosamente dissecado e os fragmentos dissociados mecanicamente. A esses fragmentos foram adicionados 10 mL da solução anterior e homogeneizados manualmente de maneira suave utilizando um homogeneizador de vidro com um bastão de teflon. O homogenato foi centrifugado de acordo com o protocolo de centrifugação diferencial padrão descrito por Rosenthal *et al.* (1987), com algumas modificações, para se obter uma fração com uma maior concentração de mitocôndrias possível. O homogenato foi então centrifugado durante 5 min a 600g e a 4°C em centrífuga SCR 20B utilizando um rotor Hitachi RPR20. Após centrifugação, o sobrenadante foi novamente centrifugado durante 10 min a 12.000 g e 4°C. O *pelet* foi ressuspenso em 10 mL de tampão de isolamento e centrifugado novamente durante 10 min a 12.000 g e 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* final contendo as mitocôndrias foi ressuspenso em 300 µL de tampão de respiração (Tris HCL 10 mM, manitol 320 mM, fosfato inorgânico 8 mM, MgCl<sub>2</sub> 4 mM, EDTA 0,08 mM, EGTA 1 mM, BSA *fatty-free* 0,2 mg/mL). A concentração de proteína na alíquota contendo as mitocôndrias isoladas foi determinada pelo método de Folin-Lowry utilizando BSA como padrão (Lowry *et al.*, 1951). A atividade da citrato sintase (CS) foi determinada basicamente como descrito por Short *et al.* (2005) com pequenas modificações utilizando-se as mitocôndrias isoladas. Alíquotas das mitocôndrias foram transferidas para o tampão de incubação que continha 0,1 mmol/L de 5,59-ditiobis-(2-ácido nitrobenzóico); 0,12 mmol/L de acetil-Co-A; 0,5 mmol/L de oxaloacetato; 100mmol/L de TRIZMA; 0,1% Triton X-100, pH=8,1. A reação foi iniciada pela adição de 10 µg de proteína e a atividade da CS foi monitorada por 5 min a 30°C. A absorbância foi determinada em 412 nm e expressa como moles de ácido tionitrobenzóico (TNB)/min/mg de proteína.



## 5.9 Eletrofisiologia cardíaca

### 5.9.1 Cardiomiócitos não-hiperglicêmicos

Os cardiomiócitos ventriculares foram enzimaticamente isolados, como descrito anteriormente (Shioya, 2007) com algumas modificações. Apenas o endocárdio foi utilizado para o procedimento experimental a fim de se evitar resultados discrepantes devido às diferenças nas propriedades elétricas dos miócitos ao longo do miocárdio (Nerbonne e Kass, 2005). Registros de *whole-cell* foram obtidos à temperatura ambiente (20-25°C) utilizando um amplificador de *patch-clamp* EPC-9.2 (HEKA Electronics, Rheinland-Pfalz, Alemanha). Após estabelecida a configuração *whole-cell*, as células foram mantidas durante 3 min em repouso para permitir o equilíbrio entre a solução da pipeta e o meio intracelular. Os registros foram filtrados em 2,9 kHz e configurados digitalmente a 5-10 kHz. As pipetas tinham resistências nas pontas de 0,8-1,8 mOhms e os miócitos que apresentavam resistência em série acima 8.0 MΩ não foram utilizados nas análises. Durante os registros de PA e de correntes de potássio, os cardiomiócitos foram colocados em uma solução de banho de Tyrode contendo (em mM) 140 de NaCl, 5,4 de KCl, 0,5 de MgCl<sub>2</sub>, 0,33 de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,8 de CaCl<sub>2</sub>, 5 de HEPES e 11 de glicose, pH 7,4 ajustado com NaOH.

Para avaliar os efeitos do diazoxide, agonista do KATP, e da glibenclamida, antagonista do KATP, no PA, as pipetas foram preenchidas com uma solução interna contendo 130 mM de K-aspartato, 20 mM de KCl, 5 mM de NaCl, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de HEPES e 5 mM de EGTA, pH ajustado em 7,2 com KOH. As células foram fixadas em um potencial de -100 mV e os PA foram induzidos por curtos pulsos (3-5 ms) de corrente a 1 nA na frequência de 1 Hz. Depois de registrados 50 pulsos de PA estáveis, diazoxide 100 μM + 0,01% de dimetilsulfóxido (DMSO) ou glibenclamida 100 μM + DMSO 0,01% solubilizado em solução normal de Tyrode foram perfundidos durante 12 ou 5 min, respectivamente, antes da droga ser lavada. Durante a aquisição do PA controle, as células foram perfundidas com solução de Tyrode contendo 0,01% de DMSO.

Para a medida da densidade da corrente de saída transitória de potássio, as correntes de saída de potássio do miócito foram evocados por pulsos de 4 seg que variavam de potenciais entre -80 mV a +60 mV, com intervalos de +10 mV. As correntes foram registradas a partir de um potencial fixado em -90 mV e -40 mV. As formas das ondas foram obtidas por uma subtração digital *offline* dos registros dos potenciais fixados em -90 mV para -40 mV. Os íons de sódio foram substituídos na solução do banho por N-metil-D-glucamina, a fim de eliminar a corrente de sódio cardíaca. As correntes de cálcio tipo L foram bloqueados por 100  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$ .

Para investigar o KATP no PA cardíaco, foi aplicado um pulso de rampa de -70 mV para +30 mV (200 mV/s) a fim de se obter todo o perfil da corrente de saída de potássio a partir de um potencial fixado a -60 mV a cada 15 seg. Os miócitos foram perfundidos com uma solução de Tyrode modificada na qual o NaCl foi substituído por N-metil-D-glucamina (NMDG) (para abolir corrente de sódio) e acrescida de 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  (para bloquear a corrente de cálcio do tipo L). Glibenclamida 100 $\mu\text{M}$  + DMSO 0,01% foi aplicada por 5 min até que o seu efeito máximo fosse alcançado, seguido de lavagem. As correntes obtidas durante o efeito máximo da glibenclamida foram digitalmente subtraídas de um pulso controle, antes da exposição à droga. A corrente obtida (considerada a corrente de KATP) foi comparada ao longo dos grupos experimentais. As pipetas foram preenchidas com uma solução interna contendo 130 mM de K-aspartato, 20 mM de KCl, 5 mM de NaCl, 2 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM de HEPES e 5 mM de ácido etilenoglicoltetracético (EGTA), pH ajustado para 7,2 com KOH. Um potencial de junção calculado de -20 mV entre a solução interna e a solução do banho foi considerado para os registros de PA e KATP.

A corrente cardíaca de cálcio do tipo L foi investigada utilizando um pulso de 0 mV (300 ms) precedido por um pré-pulso de -40 mV (50 ms) a partir de um potencial fixado a -80 mV a cada 10 seg. As pipetas foram preenchidas com uma solução interna contendo 140 mM de TEA-Cl, 2 mM de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 10 mM de glicose, 10 mM de HEPES, 1,8 mM de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e 0,01 mM de Tetrodotoxina, pH ajustado para 7,4 com TEA-OH. Após estabelecida a configuração de *whole-*

*cell*, as células foram perfundidas com uma solução externa contendo 130 mM de CsCl, 10 mM de HEPES, 10 mM de EGTA, 0,5 mM de Na<sub>2</sub>GTP, 5 mM de Mg-ATP e 5 mM de fosfocretaina, pH ajustado para 7,2 com CsOH. Os miócitos foram deixados em repouso durante 3 min para permitir a diálise. Compensação eletrônica de 40-65 % foi aplicada para todas as células.

## **5.9.2 Cardiomiócitos hiperglicêmicos**

### **5.9.2.1 Eletrocardiografia**

Para aquisição do ECG de superfície, foram inseridos 2 eletrodos de arame de aço, modelo max mole 304 (Cavallo Aços, RJ, Brasil), com diâmetro de 0,4 milímetros no tórax do animal previamente anestesiado com isoflurano 72 h antes da aquisição do registro. Para a avaliação da função elétrica do coração *in vivo*, foi registrado o ECG com os animais não anestesiados utilizando um método não invasivo. Para se registrar o ECG, um cabo suficientemente longo para ser conectado ao sistema de registro do ECG foi usado. Os eletrodos foram posicionados espacialmente em derivação DI. Todos os registros foram realizados em um ambiente silencioso, no mesmo período da manhã (7:00-9:00 h), visando à minimização de estressores externos e de possíveis variações circadianas.

Os eletrodos foram conectados às entradas de um amplificador AC diferenciais de 4 canais (Model 1700<sup>®</sup>, AM Systems, EUA). Os sinais foram amplificados e filtrados (frequência passa-banda: 0,1 Hz - 1 kHz). A conversão analógica-digital dos sinais foi obtida com o programa Axoscope 9 (Axon Instruments<sup>®</sup>, EUA) e interface analógica-digital Minidigi 1b (Axon Instruments<sup>®</sup>, EUA) com resolução A/D de 16 bits. A frequência de amostragem foi de 1 kHz. Os registros foram armazenados digitalmente para posterior processamento e análise *offline* no programa AxoScope 9 (Axon Instruments<sup>®</sup>, EUA). Os seguintes parâmetros foram analisados: QT, QTc, RR e QRS.

### 5.9.2.2 Registros do potencial de ação

Para avaliação da função elétrica cardíaca *in vitro*, foi registrado o PA cardíaco com o sistema de microeletrodo intracelular. Os animais foram heparinizados (400 IU, i.p.) anestesiados com isoflurano e eutanasiados. O coração foi retirado, lavado em solução de Tyrode e dissecado para obtenção de fatias da parede do ventrículo esquerdo. Estas foram fixadas com pequenos alfinetes de aço inoxidável à camada de Sylgard<sup>®</sup> (Sylgard<sup>®</sup>, EUA) no fundo de uma cuba de acrílico (volume de aproximadamente 6 mL), mantendo a superfície endocárdica voltada para cima. As preparações teciduais foram continuamente perfundidas com solução de Tyrode contendo 150,8 mM de NaCl, 5,4 mM de KCl, 1,8 mM de CaCl<sub>2</sub>, 2,1 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2,11 mM de D-glucose, 10 mM de HEPES (pH 7,4 ajustado com NaOH a 37 ± 0,5°C) e saturada com mistura carbogênica para oxigenação do tecido e manutenção do pH a 7,45. A entrada de solução na cuba ocorria através de um tubo de vidro envolto por uma resistência alimentada por uma fonte DC, controlada manualmente, mantendo a temperatura do banho em 36 ± 0,5°C. O fluxo foi mantido constante em 5 mL/min por uma bomba peristáltica (Gilson MiniPuls 3<sup>®</sup>, EUA). Durante os experimentos, o tecido foi estimulado por pulsos retangulares de corrente com duração de 0,5 a 3 ms e intensidade de cerca de duas vezes o valor limiar determinado para cada músculo, aplicado através de um par de eletrodos de prata cloretado (Ag/AgCl) e conectado a um estimulador (DS2, Digitimer, UK).

Para o registro do potencial transmembrana foi utilizado um microeletrodo convencional de vidro (Ling e Gerard, 1949) fabricado a partir do estiramento de um tubo de vidro de boro silicato de 1 mm de diâmetro em um estirador vertical (PP-83, Narishige<sup>®</sup>, Japão), formando dois microeletrodos. Cada microeletrodo foi preenchido com solução de KCl 2,7M, na qual se inseriu um fio de Ag/AgCl conectado ao estágio de entrada de um pré-amplificador de alta impedância (MEZ-7200, NihonKohde<sup>®</sup>, Japão). Com o auxílio de um micro manipulador (Narishige<sup>®</sup>, Japão), o tecido foi empalado pelo microelétrodo com resistência de ponta entre 10-40 MΩ DC. O eletrodo de referência foi formado por um fio de Ag/AgCl

mergulhado diretamente no banho e conectado à entrada “terra” do pré-amplificador. O sinal obtido na saída do pré-amplificador foi enviado a um condicionador de sinal e depois digitalizado por um sistema de aquisição de dados (Digidata 1440 e *software* Axotape 10.2, Axon Instruments<sup>®</sup>, EUA) controlado por um microcomputador, no qual os sinais foram armazenados para posterior análise através do *software* LabChart 7 (AD Instruments<sup>®</sup>, Austrália).

Para o estudo do PA, foram avaliados o PR, a amplitude do potencial de ação (APA), a duração nos níveis de 30% (DPA30) e 90% (DPA90) da repolarização e triangulação do potencial de ação (DPA90–DPA40) e os potenciais de ação registrados sob ciclos de estimulação de 1000, 800, 500 e 300 ms. Além desses parâmetros, foi analisado a velocidade máxima da descida da repolarização do potencial de ação (*maximal negative slope*). A velocidade máxima de despolarização ( $V_{max}$ ) foi calculada por meio de regressão linear de cinco pontos da amostra. A inclinação máxima negativa (*max. neg. slope*) foi calculada pela inclinação da queda a 5 ms após o pico utilizando uma regressão linear durante uma janela de 4 ms.

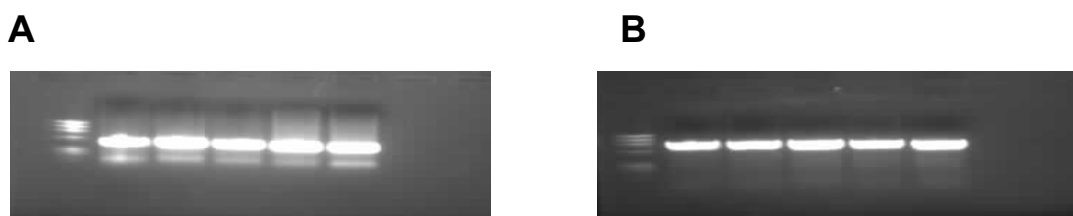
### **5.10 Análise estatística**

Os dados foram analisados pelo teste *t* de Student ou One-way ANOVA seguido do pós teste de Newman-Keuls ou Bonferroni. Dados que demonstraram uma distribuição não Gaussiana (teste Kolgomorov-Smirnov) foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn. O nível de significância foi de  $p < 0,05$  e os resultados expressos como médias  $\pm$  erro padrão da média (SEM). Todas as análises foram realizadas utilizando os programas Graph Pad Prism 4.0 (GraphPad Software, CA, EUA) e Microsoft Excel 2007 (Microsoft, WA, EUA).

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Genotipagem dos animais transgênicos por PCR

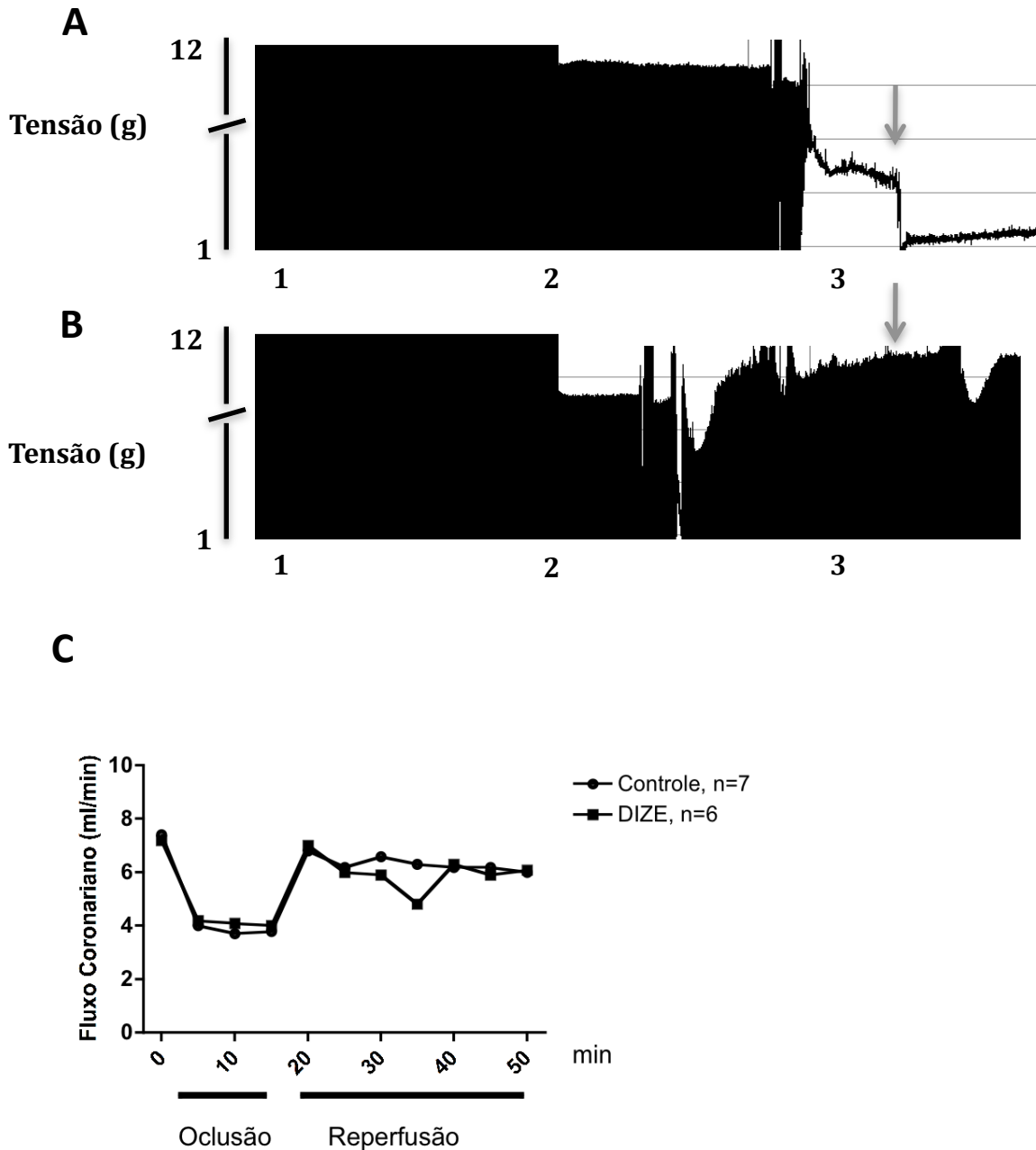
A fim de verificar a transgenia dos animais utilizados para estudar o papel do eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas na eletrofisiologia cardíaca, foi realizado a genotipagem dos animais [TGR(A1-7)3292] e Mas-KO (Figura 5).



**Figura 5:** Figura representativa de gel de agarose 1 % com brometo de etídio do PCR da genotipagem. Em (A) resultado da análise de amostras das caudas de animais [TGR(A1-7)3292], n=5, e em (B) dos animais *knockout* para o receptor Mas, n=5. Ambos os resultados confirmam a transgenia dos animais utilizados.

### 6.2 Efeitos da administração crônica do DIZE na isquemia/reperfusão

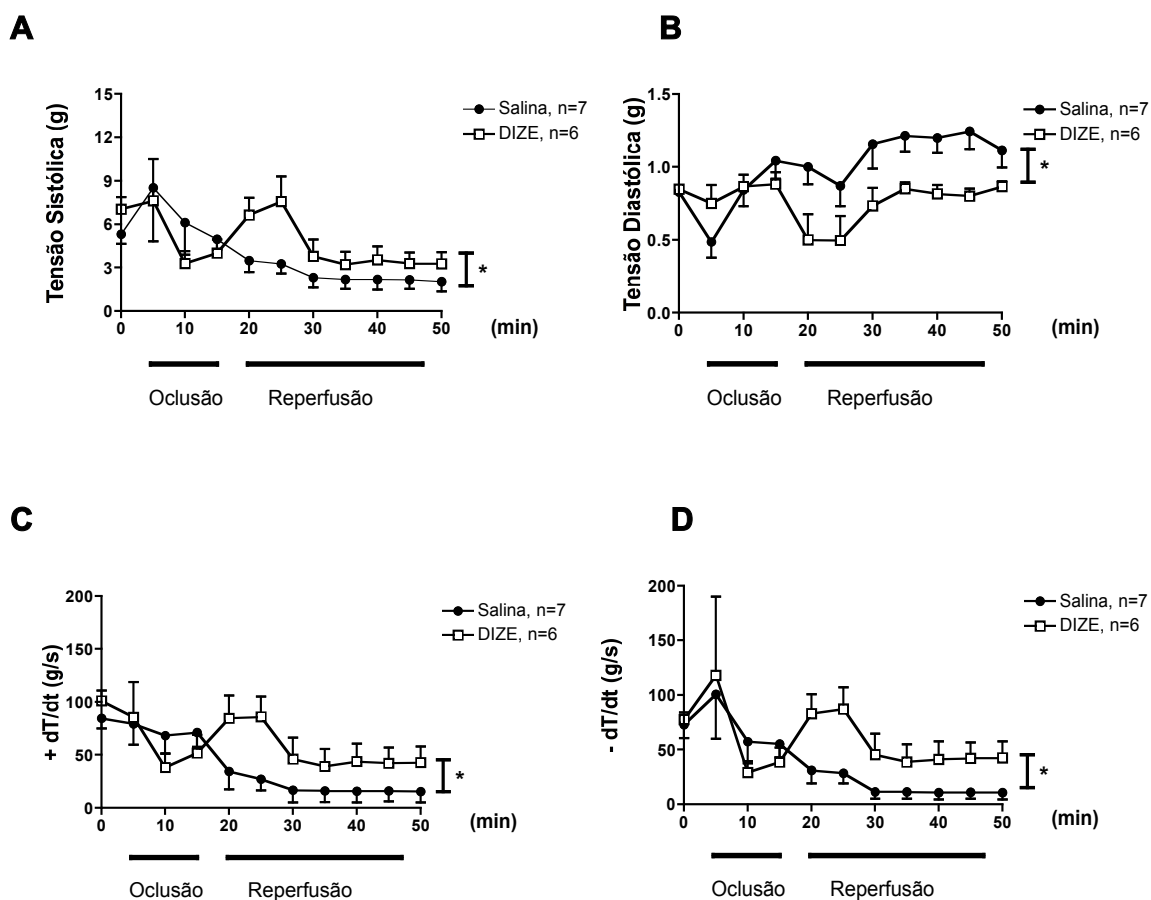
Para avaliar os efeitos cardíacos do tratamento crônico com DIZE, foi utilizado um sistema de coração isolado do tipo Langendorff. A Figura 6 representa um traçado temporal típico do protocolo de I/R do grupo salina (A) e do grupo DIZE (B), enquanto a Figura 6C mostra o resultado das mudanças no fluxo coronário de ambos os grupos. A oclusão da artéria coronária resultou numa redução de fluxo de cerca de 50%, que foi mantido durante o período isquêmico. Na reperfusão, o fluxo coronário retornou para valores mais elevados.



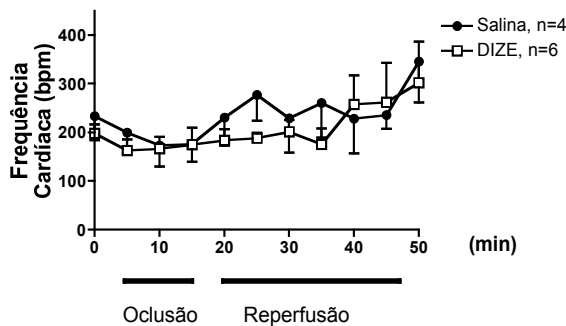
**Figura 6:** Efeitos do tratamento crônico com o DIZE na função cardíaca de corações isolados isquemiados e reperfundidos de ratos. Registros representativos da força de contração (tensão em gramas): estabilização (1), isquemia durante a oclusão da LAD (2) e após a reperusão (3). (A) Um curso temporal típico de fibrilação ventricular irreversível na fase de reperusão pode ser visto no traçado representativo de coração isolado do grupo salina. (B) Traçado temporal representativo da força de contração em coração isolado de animal do

grupo DIZE mostrando uma reversão espontânea para o ritmo sinusal normal. (C) Fluxo coronário dos corações isolados de ratos perfundidos antes da oclusão, durante a oclusão e após a reperfusão, mostrando uma redução de ~50% no fluxo coronariano (mL/min) no período da oclusão.

Os resultados desse experimento mostraram que o DIZE preservou a tensão sistólica ( $3,8 \pm 0,6$  g no grupo salina vs  $4,8 \pm 0,5$  g no grupo DIZE; Figura 7A), a  $+dT/dt$  ( $40,5 \pm 8,7$ g/s no grupo salina vs  $60,2 \pm 7,1$  g/s no grupo DIZE; Figura 7C) e a  $-dT/dt$  ( $36,5 \pm 9,3$  g/s para o grupo salina vs  $58,6 \pm 8,5$  g/s no grupo DIZE; Figura 7D). Em termos de tensão diastólica, o tratamento impediu um aumento desse parâmetro ( $1,0 \pm 0,06$  g no grupo salina vs  $0,7 \pm 0,04$  g no grupo DIZE; Figura 7B). A administração crônica do DIZE não causou alteração significativa na FC ( $235,5 \pm 14.4$  bpm nos animais salina vs  $206,8 \pm 13.8$  bpm nos animais DIZE; Figura 7E).

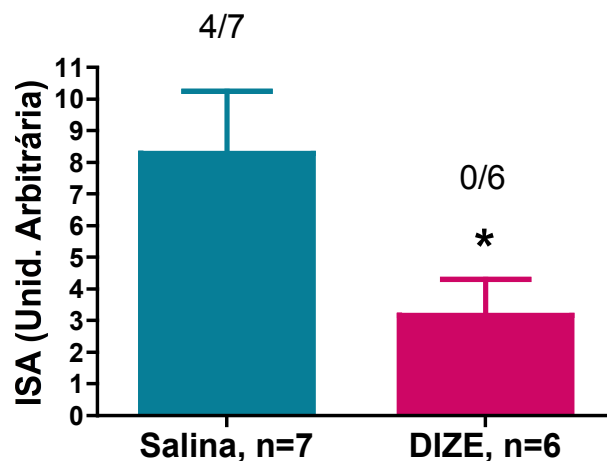




**E**

**Figura 7:** Efeitos do tratamento crônico com o DIZE nos parâmetros de função cardíaca de corações isolados. (A) Tensão sistólica (g), (B) Tensão diastólica (g), (C)  $+dT/dt$  (g/s), (D)  $-dT/dt$  (g/s) e (E) Frequência cardíaca (bpm) de ratos. Dados expressos em média  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0,05$  comparado com o grupo salina. Teste T de Student não pareado.

De maneira importante, o DIZE apresentou um efeito antiarritmogênico evidenciado por uma diminuição significativa no ISA ( $8,2 \pm 1,9$  au salina vs  $3,1 \pm 1,1$  au DIZE; Figura 8). Além disso, a ocorrência de arritmias irreversíveis diminuiu de 57,1% em corações de animais que receberam salina para 0% em corações de animais que receberam DIZE (Figura 8).

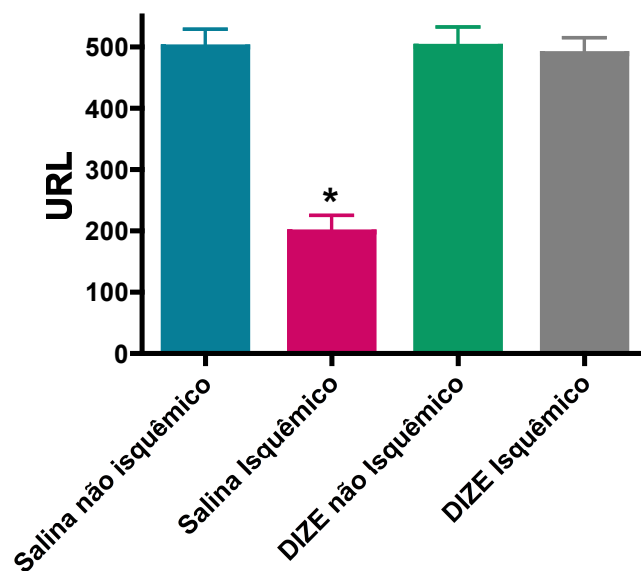


**Figura 8:** Efeito antiarrítmico do tratamento crônico com o DIZE avaliado em corações isolados de ratos. Índice de severidade de arritmias (ISA) e a relação de

arritmias irreversíveis (>30 min) na fase de reperfusão após 15 min de oclusão da artéria coronária descendente esquerda de ratos. Os números acima das barras indicam a incidência de arritmias irreversíveis durante o período de reperfusão. O tratamento com DIZE causou redução significativa no ISA. Dados expressos como média  $\pm$  S.E.M, \* $p < 0,05$ . Teste T de Student não pareado.

### 6.3 Efeitos da isquemia/reperfusão nos níveis de ATP

Para avaliar os efeitos do tratamento crônico com DIZE no produto mais importante da mitocôndria, o ATP, foi utilizado a reação de luciferina-luciferase. O resultado demonstrou que o tratamento foi capaz de manter os níveis de ATP, depois de um período de isquemia seguido de reperfusão, em extratos de tecido cardíaco ventricular (Figura 9). Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos DIZE isquêmico, DIZE não-isquêmico e salina não-isquêmico ( $489,2 \pm 57,0$  RLU,  $n=5$ ;  $501,1 \pm 62,0$  RLU,  $n=4$ ; e  $499,9 \pm 57,0$  RLU,  $n=4$ , respectivamente). No entanto, no grupo salina isquêmico observamos uma redução significativa nos níveis de ATP após a I/R ( $198,6 \pm 53,0$  RLU,  $n=4$ ).

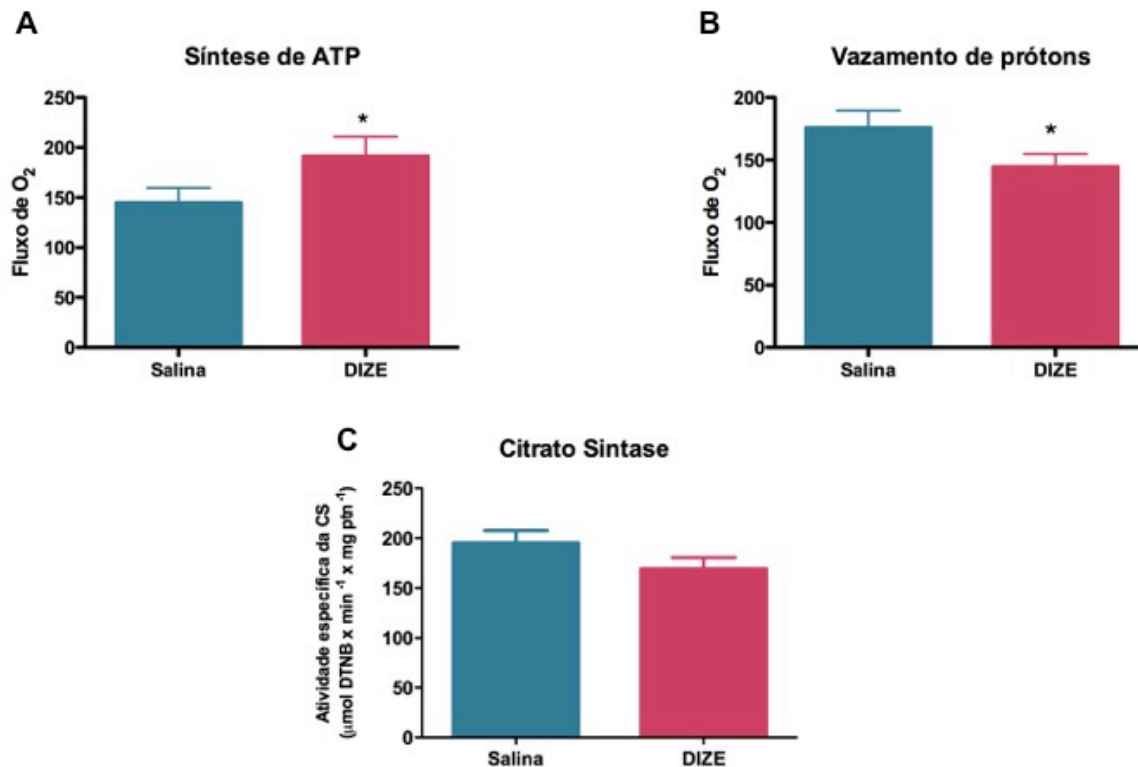


**Figura 9:** Efeitos do DIZE nos níveis cardíacos de ATP nos animais controles ou com I/R. RLU: unidades relativas de luz. Dados expressos como média  $\pm$  SEM, \* $p < 0,05$  comparado com todos os grupos. One way ANOVA seguido do pós teste de Bonferroni.

#### **6.4 Efeitos da administração do DIZE na função mitocondrial**

Observamos que os animais controles tratados com o DIZE foram capazes de sintetizar mais ATP do que animais que receberam salina (Salina:  $144,9 \pm 14,8$  fluxo de  $O_2$ ,  $n=15$  vs DIZE:  $191,5 \pm 19,2$  fluxo de  $O_2$ ,  $n=19$ , Figura 10A). Curiosamente, este efeito foi acompanhado por uma redução no VP nos animais tratados com o DIZE (Salina:  $175,8 \pm 13,8$  fluxo de  $O_2$ ,  $n=16$  vs DIZE:  $144,7 \pm 10,0$  fluxo de  $O_2$ ,  $n=23$ ; Figura 10B).

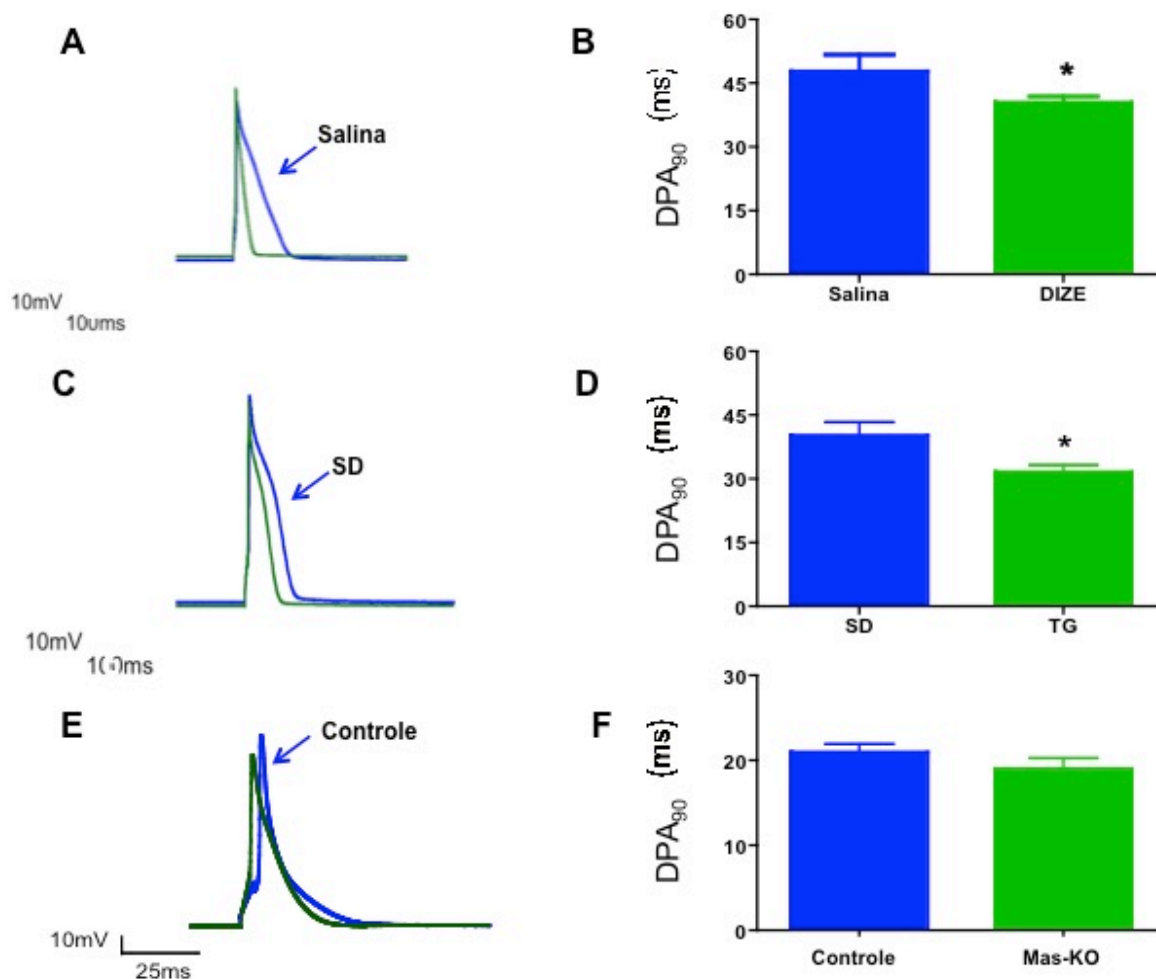
Outra característica importante a ser analisada em relação a função mitocondrial é a atividade específica da CS. A atividade da CS é comumente relacionada com a biogênese mitocondrial. Realizamos esta análise para verificar se os resultados anteriores dos níveis de ATP estavam relacionados a um possível aumento na quantidade de mitocôndrias, e não a um aumento na função dessas organelas. Assim, verificamos que o tratamento com DIZE não alterou a atividade específica da CS, sobressaindo a hipótese de que o DIZE modula a função mitocondrial (Salina:  $195,1 \pm 12,5$   $\mu\text{mol}$ ,  $n=9$  vs DIZE:  $169,2 \pm 11,3$   $\mu\text{mol}$ ,  $n=7$ ; Figura 10C).



**Figura 10:** Efeitos do tratamento crônico com o DIZE na função mitocondrial. Os experimentos foram realizadas utilizando piruvato (5 mM), malato (5 mM), ADP (3 mM), citocromo C (10 uM), succinato (10 mM), oligomicina (1 μg/mL), FCCP (10 mM), rotenona (3mm) e KCN (10 mM). (A) Síntese de ATP; (B) Vazamento de prótons; e (C) Atividade específica da citrato sintase (CS). Dados expressos como média ± S.E.M, \*p < 0,05 em relação ao grupo salina. Teste T de Student não pareado.

### 6.5 O eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas modula o potencial de ação

Observamos que o tempo de duração do PA foi encurtado pelo tratamento com DIZE e que miócitos derivados de ratos TG apresentam uma duração menor desse parâmetro. Por outro lado, a ausência do receptor Mas (Mas-KO) não alterou a duração do PA (Figura 11).



**Figura 11:** Papel do eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas na duração do potencial de ação (PA). Traçados representativos do PA de ventrículos esquerdos ilustrando um encurtamento desse parâmetro produzido pelo (A) tratamento com DIZE e (C) em ratos que superexpressam Ang-(1-7) e (E) a ausência de efeito em camundongos *knockout* para o Mas (Mas-KO). Os gráficos de barras (B), (D) e (F) resumem a duração do PA a 90% da repolarização (DPA<sub>90</sub>) nessas 3 diferentes estratégias, respectivamente. Salina (n=25), DIZE (n=40), SD (n=28), TG (n=31), Controle (n=26), Mas-KO (n=21). Os resultados são expressos como média  $\pm$  SEM. \*p < 0,05. Teste T de Student não pareado.

É importante notar que o PRM e a APA não foram alterados nesses grupos avaliados (Tabela 1).

**Tabela 1:** Avaliação do potencial de ação cardíaco de ventrículos esquerdos dos modelos experimentais utilizados para estudar o eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas.

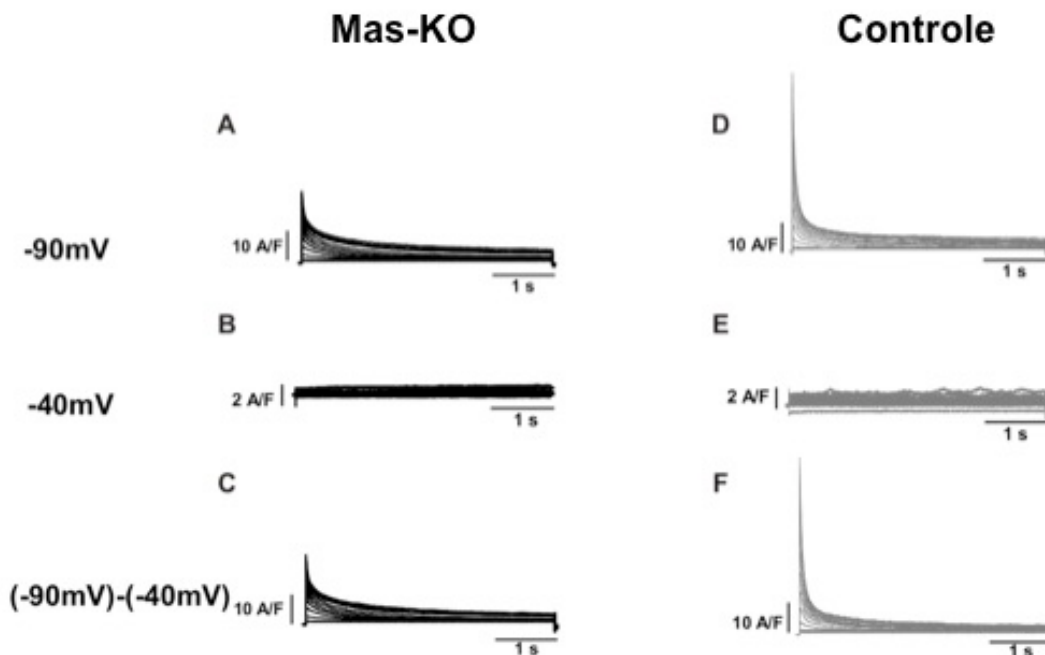
Parâmetros	Grupos					
	Salina (n=25)	DIZE (n=40)	SD (n=28)	TG (n=31)	Controle(n=26)	Mas-KO(n=21)
PRM (mV)	-69.27 ± 0.52	-70.00 ± 0.44	-66.90 ± 0.80	-66.16 ± 0.57	-66.52 ± 0.66	-65.76 ± 1.53
APA (mV)	125.60 ± 0.46	124.32 ± 0.98	124.17 ± 0.8	124.72 ± 0.82	124.73 ± 1	125.36 ± 0.81
DPA <sub>10</sub> (ms)	2.57 ± 0.32	2.30 ± 0.13	1.91 ± 0.17	1.45 ± 0.09 <sup>#</sup>	0.84 ± 0.05	0.75 ± 0.06
DPA <sub>50</sub> (ms)	26.88 ± 2.84	22.32 ± 1,19	21.48 ± 2.25	14.68 ± 1,29 <sup>#</sup>	5.71 ± 0.48	5.21 ± 0.60
DPA <sub>90</sub> (ms)	47.88 ± 3.82	40.58 ± 1,36 <sup>*</sup>	40.24 ± 3.09	31.69 ± 1,56 <sup>#</sup>	20.97 ± 0.93	19.02 ± 1,27

APA: Amplitude do potencial de ação; DPA: Duração do potencial de ação; PRM: Potencial de repouso da membrana. Os dados são expressos como média ± SEM. \*p < 0.05 vs Salina e # P < 0.05 vs SD. SD: Sprague-Dawley; TG: TGR(A1-7)3292; Controles: C57BL6 e Mas-KO: *knockout* para o receptor Mas. One way ANOVA seguido do pós teste de Newman-Keuls.

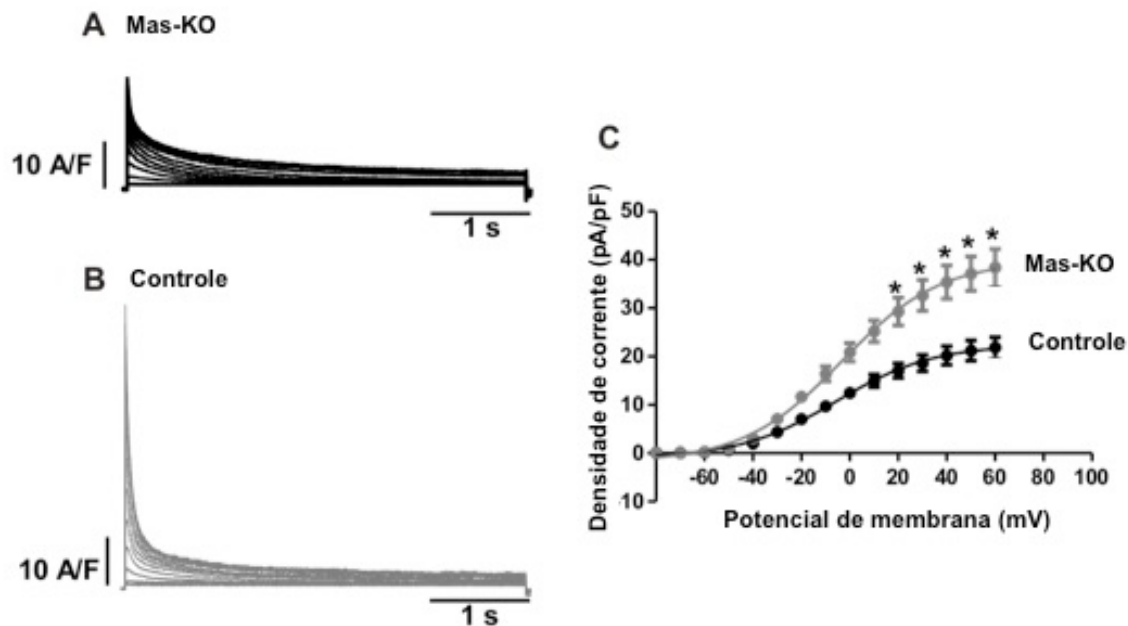
## 6.6 Corrente de saída de potássio ativada por despolarização de miócitos ventriculares de camundongos Mas *knockout*

Considerando os resultados do traçado do PA dos animais Mas-KO, avaliamos a densidade da corrente de saída de potássio (I<sub>to</sub>) nesses animais. Realizamos um protocolo de rampa para verificar a densidade de corrente em dois potenciais fixados a -90 mV e a -40 mV e observamos o pico da densidade de corrente (Figura 12). O traçado da rampa e o valor da subtração dos potenciais que resultou na densidade de corrente estão mostrados na Figura 13.

Observamos que a corrente transitória de saída de potássio estava aumentada em miócitos ventriculares de camundongos Mas-KO.



**Figura 12:** As correntes de saída de potássio do miócito foram evocadas por pulsos de 4 seg, que variavam de potenciais entre -80 mV a +60 mV, com incrementos de +10 mV. Os registros das células controle (n=14) estão do lado esquerdo da figura e os registros das células do Mas-KO (n=21) estão do lado direito. (A) e (B) foram obtidos a partir da mesma célula, assim como os registros em (C) e (D). As correntes foram registradas a partir de um potencial fixado em -90 mV (A) e (D) e -40 mV (B) e (E). As formas das ondas de (C) e (F) foram obtidas pela subtração digital *offline* dos registros dos potenciais fixados em -90 mV e -40 mV.



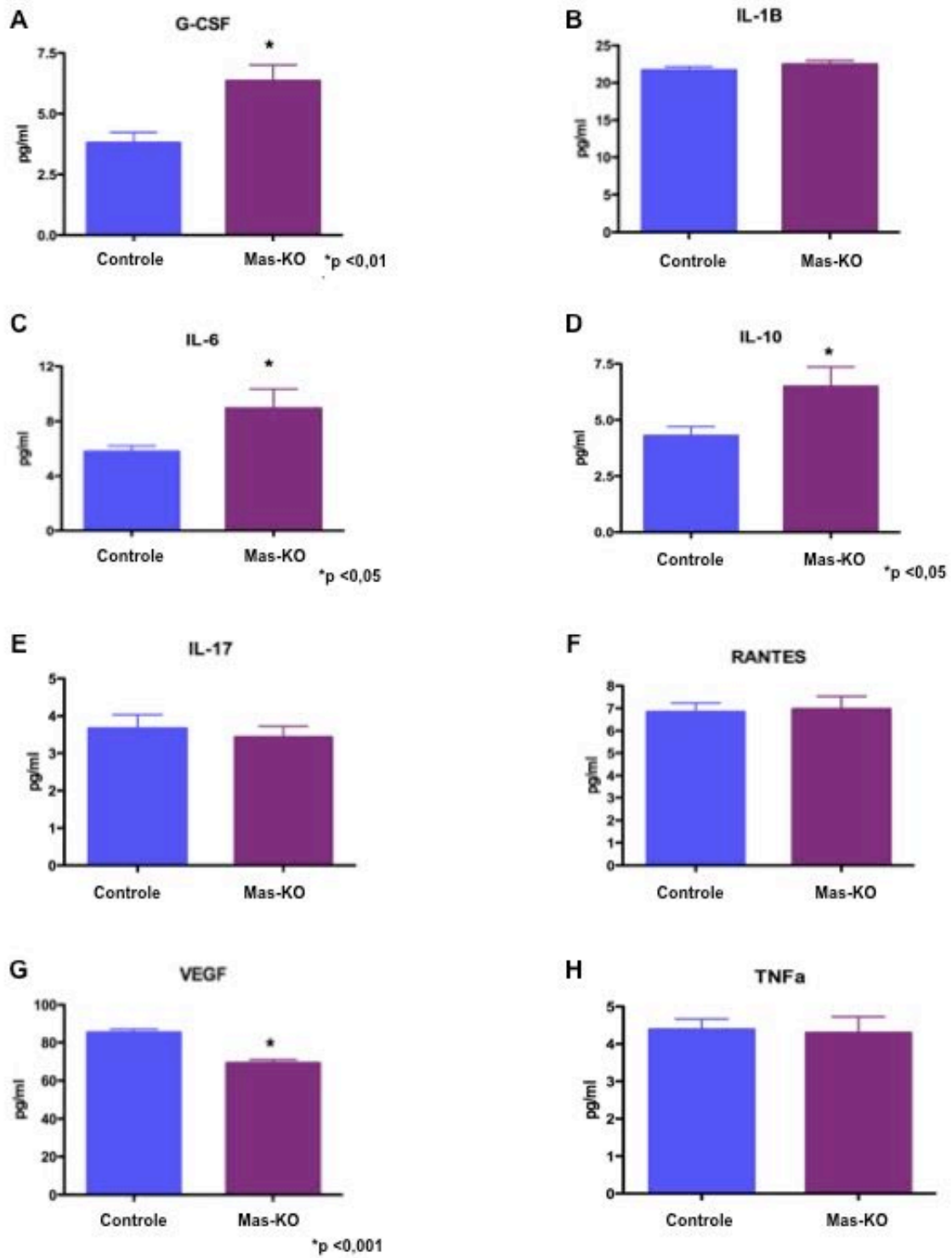
**Figura 13:** Registros de  $I_{to}$  de miócitos ventriculares de camundongos (A) controle (n=14) e (B) Mas-KO (n=21). As densidades das correntes estão representadas graficamente em (C), demonstrando que as células ventriculares dos camundongos Mas-KO apresentaram um aumento da corrente de  $I_{to}$ . As barras indicam média  $\pm$  SEM,  $p < 0,05$  \* em relação ao controle. Teste T de Student não pareado.

### 6.7 Perfil das citocinas nos animais Mas-KO

Foi possível observar uma quantidade significativamente maior das citocinas IL-6 e IL-10 e do fator de crescimento de granulócitos (G-CSF) nos animais Mas-KO (n=8), quando comparados aos animais controle (n=8). Por outro lado, animais Mas-KO apresentaram uma quantidade significativamente menor do



fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) em comparação aos animais controle (Figura 14).

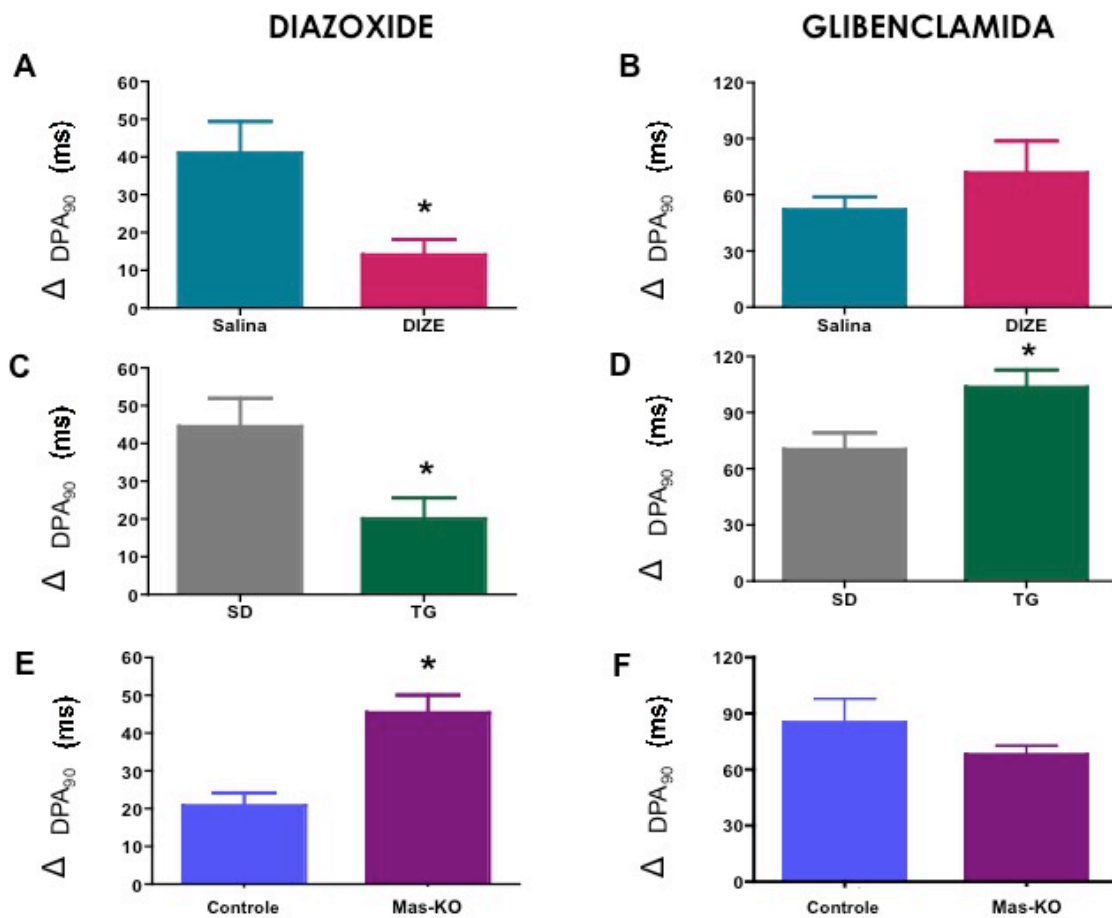


**Figura 14:** Perfil das citocinas nos animais Mas-KO. (A) G-CSF; (B) IL-1B; (C) IL-6; (D) IL-10; (E) IL-17; (F) RANTES; (G) VEGF; e (H) TNFa. As barras indicam média  $\pm$  SEM,  $p < 0,05$  \* em relação ao controle. Teste T de Student não pareado.

### 6.8 Papel do eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas no KATP cardíaco

A figura 15 demonstra que o Diazoxide encurtou o DPA90 em menor proporção nos ratos tratados com DIZE ( $14,12 \pm 4,12$  ms,  $n=23$ , Figura 15A) e em ratos que superexpressam Ang-(1-7) ( $20,15 \pm 5,53$  ms,  $n=18$ , Figura 15C) comparado com os seus respectivos controles, salina ( $41,14 \pm 8,30$  ms,  $n=10$ ) e SD ( $44,60 \pm 7,43$  ms,  $n=11$ ). Por outro lado, o Diazoxide foi capaz de aumentar o DPA90 de camundongos *knockout* para o receptor de Ang-(1-7) ( $45,47 \pm 4,70$  ms,  $n=10$ , Figura 15E) quando comparado com seu controle ( $20,85 \pm 3,36$  ms,  $n=15$ ).

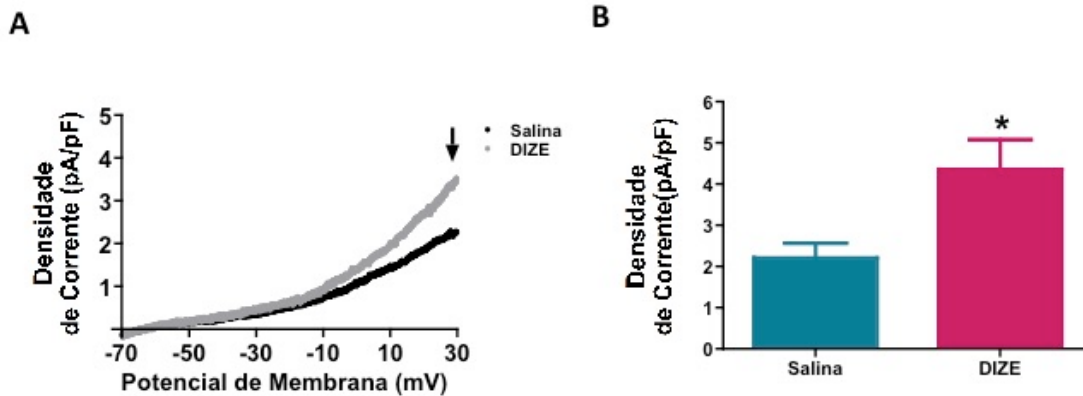
Quando os cardiomiócitos foram incubados com o antagonista do KATP, a Glibenclamida, foi observado uma tendência em prolongar o DPA90 dos ratos tratados com o DIZE ( $71,81 \pm 17,09$  ms  $n=18$ , Figura 15B) e um prolongamento de fato nos animais TG ( $103,68 \pm 9,25$ ,  $n=15$ , Figura 15D) em comparação com os seus respectivos controles Salina ( $52,31 \pm 6,83$ ,  $n=13$ ) e SD ( $70,56 \pm 8,80$  ms,  $n=16$ ). Além disso, quando miócitos derivados de camundongos Mas-KO foram expostos a Glibenclamida, foi observado uma redução não significativa na DPA90 ( $68,09 \pm 4,64$  ms,  $n=10$ , Figura 15F) quando comparado com o DPA90 de miócitos de camundongos controles ( $85,36 \pm 12,57$ ,  $n=8$ ).



**Figura 15:** Efeitos dos moduladores de canais KATP na duração do potencial de ação ventricular cardíaco. (A e B) Animais tratados com o DIZE; (C e D) Ratos que superexpressam Ang-(1-7) (TG) e seu controle; e (E e F) Camundongos Mas-KO e seu controle. Os resultados são expressos como média  $\pm$  SEM, \* $p < 0,05$ . Teste T de Student não pareado.

### 6.9 Efeitos da ativação da ECA2 na densidade de corrente do KATP cardíaco

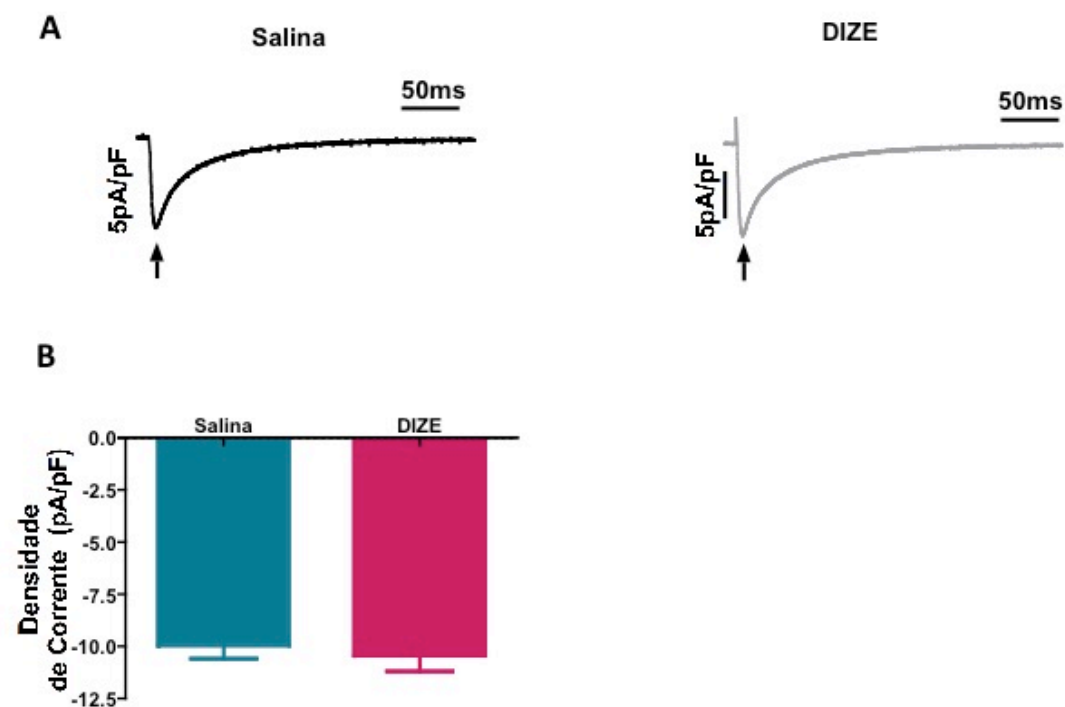
O tratamento com o DIZE provocou um aumento na corrente de KATP quando comparado com ratos que receberam salina (Salina:  $2,21 \pm 0,36$  pA/pF,  $n=10$  vs DIZE:  $4,36 \pm 0,72$  pA/pF,  $n=10$ , Figura 16).



**Figura 16:** Efeitos do DIZE no KATP de cardiomiócitos isolados. (A) Traçados representativos da subtração digital de correntes registradas antes e após a aplicação do antagonista do KATP, Glibenclamida 100  $\mu$ M. A seta indica o potencial de membrana utilizado para a análise. (B) O gráfico de barras representa as médias das densidades de correntes (pA/pF) do KATP medidas a 30 mV em animais controle (salina) e tratados com o DIZE. Os resultados são expressos como média  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ . Teste T de Student não pareado.

### 6.10 Efeitos da ativação da ECA2 na corrente de cálcio do tipo L

A Figura 17 mostra os registros representativos e o pico médio da densidade de corrente de miócitos derivados de animais tratados com DIZE ou com salina. Não foi observada diferença significativa em relação à densidade do pico da corrente de cálcio do tipo L entre os grupos (Salina:  $-9,96 \pm 0,62$  pA/pF,  $n=11$  vs DIZE:  $-10,43 \pm 0,75$  pA/pF,  $n=11$ ).



**Figura 17:** Efeitos da ativação da ECA2 na corrente de cálcio de cardiomiócitos isolados. (A) Traçados representativos. As setas indicam os pontos utilizados para as análises. (B) O gráfico de barras representa as médias das densidades de corrente de cálcio dos canais do tipo L (pA/pF) medidas em animais controles (salina) e tratados com DIZE. Os resultados são expressos como média  $\pm$  SEM. Teste T de Student não pareado.

### 6.11 Efeitos do DIZE na glicemia e no peso corporal de ratos hiperglicêmicos

Como esperado, os animais tratados com STZ apresentaram hiperglicemia 4 semanas após a sua administração. No final do tratamento com o DIZE (8 semanas), a glicemia permaneceu elevada, indicando que a ativação da ECA2 não reverteu o comprometimento da produção de insulina pelo pâncreas. Não foi observado qualquer aumento adicional na glicemia nos animais hiperglicêmicos

tratados com o DIZE quando comparados com os ratos hiperglicêmicos tratados com salina. Em relação ao peso corporal, a hiperglicemia induziu uma perda significativa de peso ao longo do protocolo experimental e o tratamento com o DIZE não reverteu esta condição. Não foram observadas alterações significativas na glicemia, bem como no peso corporal de ratos não-hiperglicêmicos que receberam DIZE (Tabela 2).

**Tabela 2:** Níveis de glicose no sangue e peso corporal de ratos normais e hiperglicêmicos tratados ou não com DIZE.

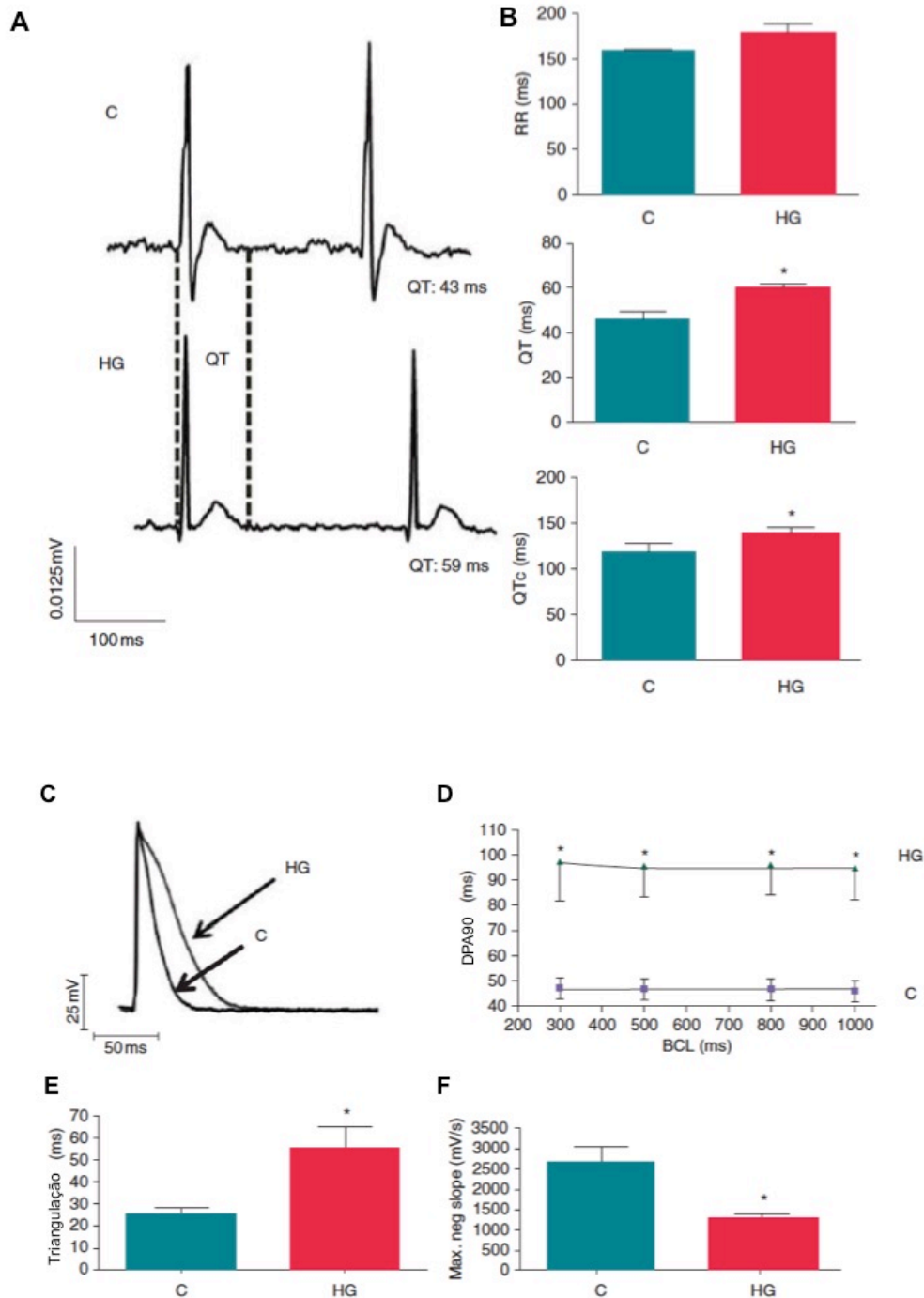
Parâmetros	Grupos			
	C (n=7)	C+DIZE (n=5)	HG (n=7)	HG+DIZE (n=7)
Glicose - d0 (mg/dL)	107,1 ± 4,3	102,1 ± 4,9	112,0 ± 3,1	105,3 ± 3,2
Glicose - s4 (mg/dL)	106,6 ± 4,7	100,6 ± 3,1	489,6 ± 26,4#	481,3 ± 14,8#
Glicose - s8 (mg/dL)	99,1 ± 4,5	101,7 ± 4,5	527,3 ± 18,5#	466,2 ± 27,9#
Peso Corporal -d0(g)	118,6 ± 8,1	114,9 ± 7,8	109,8 ± 3,2	118,0 ± 5,0
Peso Corporal - s4(g)	259,9 ± 8,3	248,3 ± 6,7	159,8 ± 6,1*	167,1 ± 8,9*
Peso Corporal - s8(g)	324,3 ± 7,9	318,5 ± 7,3	147,3 ± 8,3#	172,6 ± 14,1#

Os dados são expressos como média ± SEM. \*p < 0,001 vs C e C + DIZE. #p < 0,01 vs C e C + DIZE. C: não-hiperglicêmico + salina, C + DIZE: não-hiperglicêmico + DIZE; HG: hiperglicêmico + salina, e HG + DIZE: hiperglicêmico + DIZE. d: dia; s: semana. One way ANOVA seguido do pós teste de Bonferroni.

## 6.12 A ativação da ECA2 reverte as alterações elétricas cardíacas induzidas pela hiperglicemia

Observou-se que a administração de STZ causou uma disfunção elétrica cardíaca grave (Figura 18). Especificamente, o ECG demonstrou um prolongamento nos intervalos QT e QTc (Figura 18B), enquanto que as células do ventrículo esquerdo apresentaram um prolongamento da DPA em diferentes

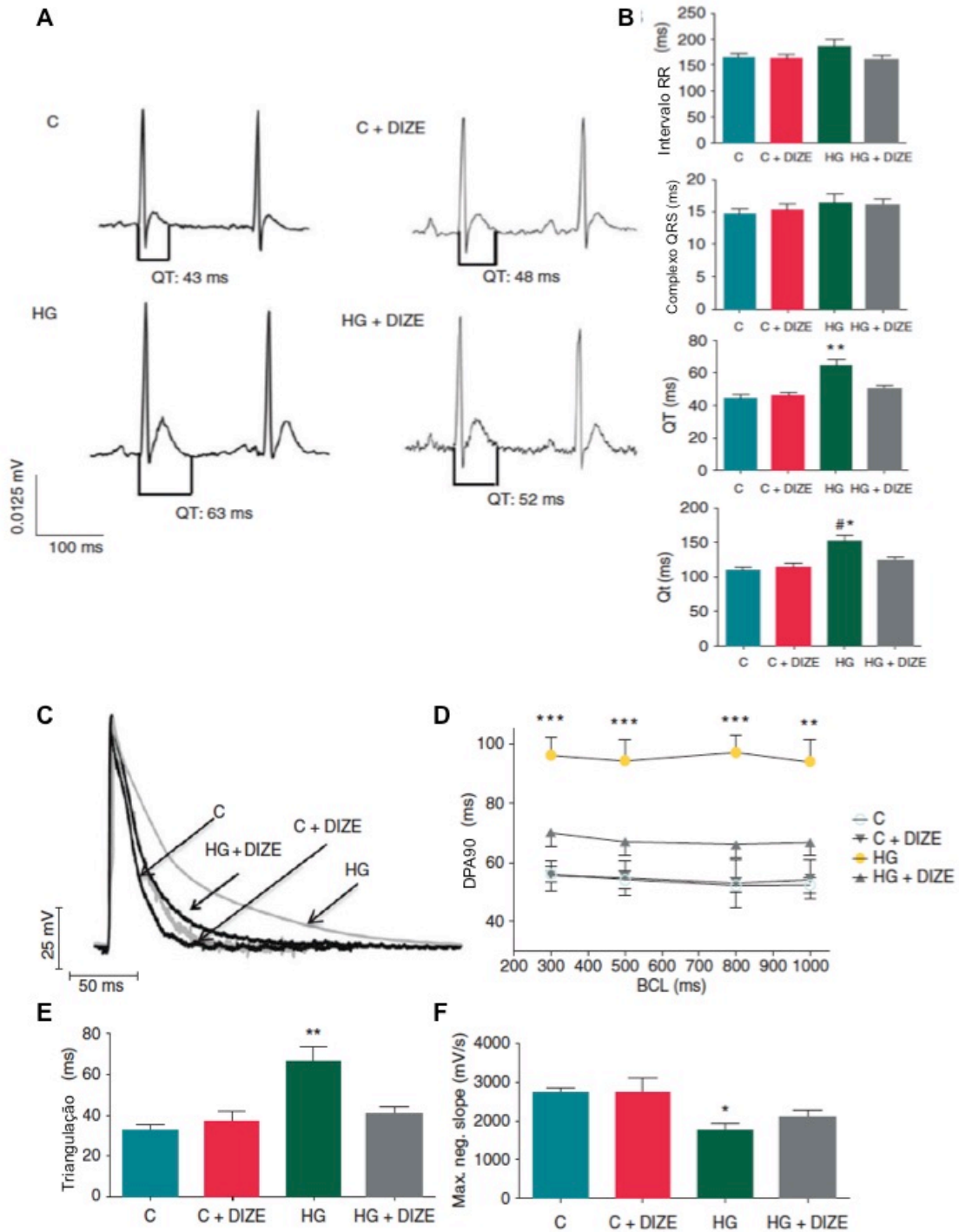
frequências de estimulação à 90% da repolarização (DPA90) (Figuras 18C e D). Além disso, a triangulação foi superior e a inclinação negativa máxima foi inferior nos animais STZ quando comparado com os animais controles (Figuras 18E e F). Nenhuma alteração significativa foi vista no intervalo RR entre os grupos (Figura 18B).



**Figura 18:** Remodelamento elétrico cardíaco *in vivo* e *in vitro* após quatro semanas de indução de hiperglicemia. (A) Traçados representativos de eletrocardiograma (ECG) mostrando um prolongamento do intervalo QT em ratos hiperglicêmicos. (B) Os gráficos de barras resumem os parâmetros do ECG. (C) Os traçados representativos do potencial de ação de ventrículos esquerdos demonstram um prolongamento do potencial de ação induzido pela hiperglicemia. (D) O gráfico resume o DPA90 sob diferentes comprimentos de ciclo básicos (BCL) de estimulação (300, 500, 800 e 1000 ms). (E e F) Duração da triangulação e inclinação negativa máxima de repolarização de ratos normais e hiperglicêmicos. Os resultados são expressos como média  $\pm$  SEM. C: não-hiperglicêmico + salina (n=4) e HG: hiperglicêmico + salina (n=6). \*p < 0,01. Teste T de Student não pareado.

O tratamento dos ratos hiperglicêmicos com o DIZE foi capaz de encurtar o intervalo QT, bem como o QTc (Figura 19), o que resultou no fato de não haver diferenças significativas nos parâmetros eletrocardiográficos entre animais normais e ratos hiperglicêmicos tratados com DIZE (Figura 19B). Não foram observadas alterações significativas no intervalo RR e no complexo QRS (Figura 19B). Além disso, uma redução significativa no DPA90 foi observada em corações de ratos hiperglicêmicos tratados com o DIZE quando comparados com os animais hiperglicêmicos não tratados (Figura 19D). Marcadores pró-arrítmicos, como triangulação e velocidade de inclinação máxima negativa de repolarização, foram também beneficiados pelo tratamento com DIZE (Figuras 19E e F).





**Figura 19:** O DIZE reverteu o remodelamento elétrico cardíaco induzido pela hiperglicemia. (A) Traçados representativos de eletrocardiograma (ECG) após 4 semanas de tratamento com o DIZE. (B) Os gráficos de barras resumem os parâmetros do ECG. (C) Traçados representativos do potencial de ação de todos os grupos avaliados. (D) O gráfico resume o DPA90 de todos os grupos sob

diferentes comprimentos de ciclo básicos (BCL) de estimulação (300, 500, 800 e 1000 ms). (E-F) Triangulação e inclinação negativa máxima de repolarização de todos os grupos avaliados. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  SEM. C: não-hiperglicêmico + salina (n=7); C + DIZE: não-hiperglicêmico + DIZE (n=5); HG: hiperglicêmico + salina (n=7) e HG + DIZE: hiperglicêmico + DIZE (n=7). #p < 0,01 vs C e C + DIZE, \*p < 0,05 vs HG + DIZE; \*\*p < 0,01 vs todos os outros grupos, e \*\*\*p < 0,001 vs todos os outros grupos. One way ANOVA seguido do pós teste de Bonferroni para as análises de ECG e Two way ANOVA seguido do pós teste de Bonferroni para os registros de PA. Os valores de registros de PA da quarta semana de avaliação foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn.

Não houve alterações significativas nos outros parâmetros do PA (PRM, APA, taxa máxima de repolarização e DPA a 30% da repolarização) (Tabela 3). É importante ressaltar que o tratamento com DIZE não promoveu alterações significativas nos parâmetros dos PA de ratos não-hiperglicêmicos.

**Tabela 3:** Parâmetros do potencial de ação cardíaco de ventrículos esquerdos de ratos normais e hiperglicêmicos tratados ou não com DIZE.

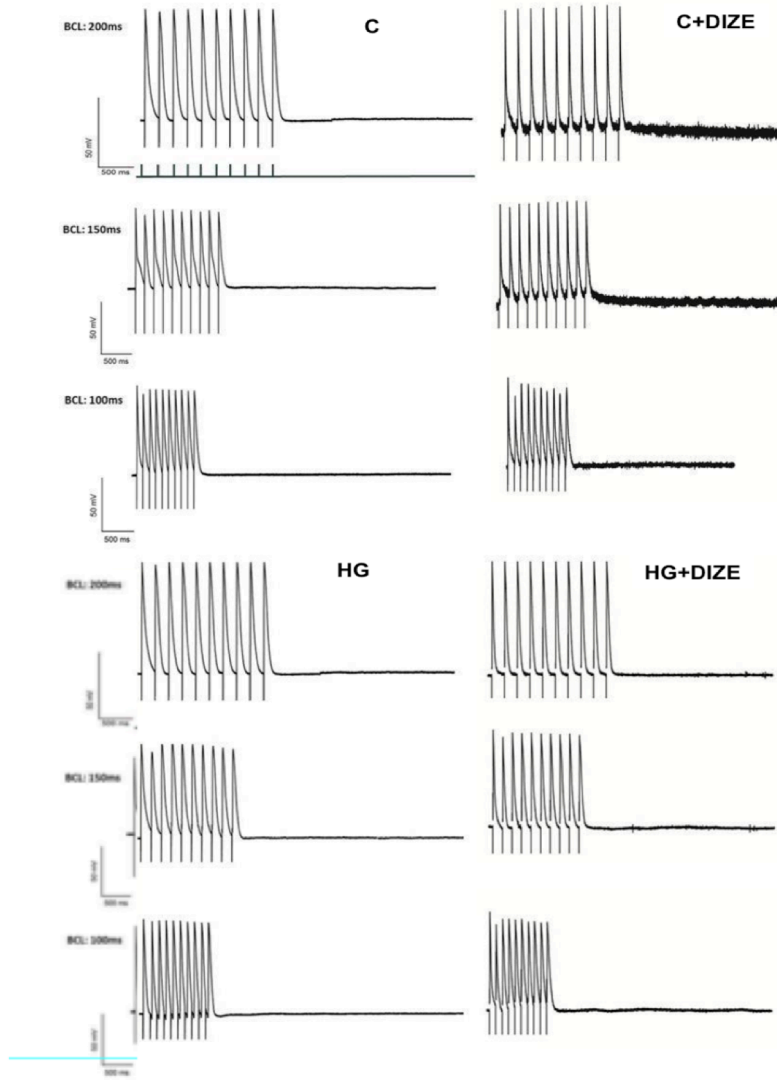
Parâmetros	Grupos			
	C (n=7)	C+DIZE (n=5)	HG (n=7)	HG+DIZE (n=7)
PRM (mV)	-694 $\pm$ 2,8,	-65,7 $\pm$ 3,3	-66,9 $\pm$ 2,8	-65,3 $\pm$ 3,0
APA (mV)	83,0 $\pm$ 3,8	81,0 $\pm$ 5,6	87,6 $\pm$ 5,2	86,5 $\pm$ 4,5
Vmax (mV/s)	106443 $\pm$ 16615	102254 $\pm$ 26147	115173 $\pm$ 28846	114008 $\pm$ 18885
DPA <sub>30</sub> - 1000 (ms)	17,4 $\pm$ 0,7	16,4 $\pm$ 0,7	28,6 $\pm$ 2,7	19,1 $\pm$ 1,1
DPA <sub>30</sub> - 800 (ms)	16,8 $\pm$ 0,6	17,3 $\pm$ 0,8	26,9 $\pm$ 2,8	19,8 $\pm$ 1,2
DPA <sub>30</sub> - 500 (ms)	17,1 $\pm$ 0,7	17,9 $\pm$ 0,7	26,1 $\pm$ 2,5	20,3 $\pm$ 2,9
DPA <sub>30</sub> - 300 (ms)	17,9 $\pm$ 0,8	17,1 $\pm$ 0,9	26,4 $\pm$ 2,6	21,9 $\pm$ 2,9

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. C: não-hiperglicêmico + salina, C + DIZE: não-hiperglicêmico + DIZE; HG: hiperglicêmico

+ salina, e HG + DIZE: hiperglicêmico + DIZE. PRM: Potencial de repouso da membrana; APA: Amplitude do potencial de ação; Vmax: Velocidade máxima de despolarização; DPA: Duração do potencial de ação. Two way ANOVA seguido do pós teste de Bonferroni para os registros de PA.

### **6.13 Ativação da ECA2 pelo DIZE não induziu eventos arrítmicos**

Para finalizar, avaliamos se o tratamento com o DIZE poderia promover arritmias cardíacas em ratos normais e hiperglicêmicos. Uma sequência de pulsos de 10 batimentos de ciclos de comprimentos básicos (BCL) de 200, 150 e 100 ms, seguida por uma pausa, foi realizada nas preparações de ventrículo esquerdo. Como representado na Figura 20, nenhum evento arrítmico foi observado em qualquer um dos grupos avaliados.



**Figura 20:** O tratamento com o DIZE não promoveu arritmias cardíacas nos ratos normais ou hiperglicêmicos.

## 7. DISCUSSÃO

Um dos resultados mais importantes desse presente estudo é que a administração de DIZE por um período de um mês promoveu efetiva cardioproteção, ou seja, no modelo de I/R cardíaca observamos uma ação antiarritmogênica e em ratos hiperglicêmicos esse composto foi capaz de reverter o remodelamento elétrico cardíaco e os marcadores de arritmia.

Diversos estudos mostram que o SRA possui um papel fundamental na função cardíaca, uma vez que ele pode modular os danos teciduais causados pela isquemia (Neves *et al.*, 1997, Ferreira *et al.*, 2001) e pelo diabetes (Murça *et al.*, 2012). Neste contexto, as diversas drogas que atuam sobre o SRA (inibidores da ECA e bloqueadores de AT1) representam uma das maiores e mais eficazes terapias para o controle das doenças cardiovasculares (Chappell *et al.*, 1998; Campbell *et al.*, 2001). Além disso, evidências experimentais tem demonstrado que a Ang-(1-7) possui efeitos cardioprotetores (Ferreira *et al.*, 2001; McMurray e Davie, 2002; Santos *et al.*, 2004). Por essa razão, utilizamos o DIZE, um ativador da ECA2, como estratégia terapêutica.

Diante disso, optamos por induzir uma lesão por I/R para avaliar os efeitos do DIZE nessas condições. A lesão por I/R é vista como um fator etiológico importante da disfunção cardíaca. Após a recuperação do fluxo sanguíneo cardíaco, a lesão por reperfusão é sobreposta à lesão anterior causada pela isquemia. A geração de ROS e a morte por apoptose dos miócitos são os principais precursores da lesão por I/R. Nesta lesão, órgãos como o coração, que possui uma alta demanda metabólica (aeróbica), são os mais afetados. Quando o oxigênio é restaurado, pelo fato da respiração mitocondrial ainda estar em um estado reduzido ou não mais funcional, ocorre um favorecimento à formação dos ROS (Zhou *et al.*, 2015). Esse microambiente é susceptível ao aparecimento de arritmias de reperfusão, que podem ser fatais.

No presente estudo, parâmetros clássicos de função cardíaca foram analisados, incluindo tensão sistólica e diastólica, bem como dT/dt mínima e máxima. As análises dos resultados demonstraram que todos esses parâmetros

foram prejudicados após a lesão por I/R e que, por outro lado, eles foram preservados após a administração do DIZE. Corroborando nossos achados, outros estudos mostraram que camundongos com deleção da ECA2 possuem diversas alterações morfológicas no ventrículo esquerdo, contudo sem apresentar sinais de hipertrofia. Além disso, esses animais apresentaram redução na pressão intraventricular esquerda mínima e máxima, bem como na dP/dt mínima e máxima, evidenciando que a ECA2 atua como um regulador importante da função cardíaca *in vivo* (Crackower *et al.*, 2002; Yamamoto *et al.*, 2006). Ainda, resultados anteriores obtidos pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram que um outro ativador da ECA2, o XNT, foi capaz de melhorar a disfunção cardíaca induzida pelo diabetes (Murça *et al.*, 2012).

Outra característica marcante da lesão por I/R é uma propensão acentuada ao desenvolvimento de arritmias letais (Akar e O'Rourke, 2011). Nesse sentido, nossos resultados mostraram que as arritmias foram mais frequentes em animais isquemiados tratados com salina do que nos ratos tratados com o DIZE, indicando que o DIZE é uma droga antiarritmogênica com efeito na duração e na severidade das arritmias. Assim, nossos dados confirmam achados anteriores publicados por Ferreira *et al.* (2001) que demonstraram que a Ang-(1-7) na concentração de 0,22 nM possui uma ação antiarritmogênica em coração isolado de ratos. Tal efeito foi abolido quando este peptídeo foi incubado com o A-779, um bloqueador do Mas, e pela indometacina, uma inibidora de síntese de prostaglandina. Nesta mesma concentração, a Ang-(1-7) foi capaz de preservar a tensão sistólica em um modelo de I/R, impedindo a sua queda durante a reperfusão. Este efeito também foi bloqueado pelo A-779 (Ferreira *et al.*, 2002). Achados semelhantes também foram encontrados em ratos que superexpressam Ang-(1-7) [TGR(A1-7)3292] (Santos *et al.*, 2004). Coletivamente, os vários efeitos da Ang-(1-7) mencionados anteriormente evidenciam uma contrarregulação às ações mediadas pela Ang II durante a I/R.

Uma grande parte dos danos causados pela lesão por I/R deve-se a um aumento na produção de ROS (Bolli, 1991; Marzocca *et al.*, 2003). Sabe-se que a Ang II é capaz de induzir o estresse oxidativo, o que pode prejudicar a respiração

mitocondrial (Inoue *et al.*, 2012; Lijnen *et al.*, 2012). Neste contexto, está bem estabelecido na literatura que as mitocôndrias desempenham um papel crítico na manutenção da função celular (Dorn *et al.*, 2015). Sendo assim, preservar a função mitocondrial após a I/R pode ser uma estratégia eficiente na manutenção da função cardíaca. Deste modo, investigamos a função mitocondrial avaliando a concentração de ATP em amostras de ventrículos obtidos a partir de animais com corações isquemiados e não isquemiados, tratados com salina ou com DIZE. Diante dos resultados obtidos, observou-se que a quantidade de ATP foi preservada após a I/R naqueles animais que receberam a administração crônica de DIZE. Portanto, este resultado corrobora a hipótese de uma possível inter-relação entre a quantidade de ATP e a presença ou ausência de arritmias (Halestrap, 2006; Webster, 2007). Além disso, Brady *et al.* (2006) descreveram uma extensa fragmentação mitocondrial durante a I/R mediada pela via da p38MAPK. Essa via é ativada pela Ang II/AT1R (Li *et al.*, 2011).

A respiração mitocondrial acontece na presença de substratos ideais de forma a completar todo o ciclo de Krebs (Lehninger *et al.*, 1995). Lançando mão de técnica utilizando fibras cardíacas permeabilizadas com saponina, nós avaliamos a capacidade das mitocôndrias de ratos tratados com o DIZE de produzir ATP e o VP durante um ciclo respiratório na presença dos substratos ideais. Embora não tenham sido observadas diferenças estatísticas entre o grupo salina e o grupo DIZE não isquêmico em relação à quantidade de ATP, foi possível identificar que as mitocôndrias dos animais tratados com o DIZE apresentaram um aumento significativo na síntese de ATP e uma diminuição no VP sem alterar a atividade específica da CS. Dessa forma, esse resultado evidenciou um papel chave do eixo ECA2/Ang-(1-7) na modulação da função mitocondrial. Recentemente, Abadir *et al.* (2011) identificaram e caracterizaram um SRA mitocondrial funcional. Esses autores também mostraram que a ativação desse sistema está acoplado à produção mitocondrial de NO e que ele pode modular a respiração celular (Abadir *et al.*, 2011). Aqui é importante lembrar o papel bem estabelecido do NO na cardioproteção (Jones e Bolli, 2006) e que a Ang-(1-7) é capaz de, por meio do Mas, estimular a ativação da eNOS e a

produção de NO por vias de sinalização dependentes de Akt (Heitsch *et al.*, 2001; Sampaio *et al.*, 2007). A Akt parece possuir um papel central na sinalização da Ang-(1-7) e a fosforilação da eNOS no resíduo de Ser1177 pela Akt resulta em um aumento de duas vezes na atividade catalítica da eNOS (Dimmeler *et al.*, 1999). Um estudo recente demonstrou que a fosforilação da Akt nos sítios regulatórios Ser473 e Thr308 é estimulada pela Ang-(1-7) em células endoteliais humanas *in vitro*, bem como em coração, fígado, músculo esquelético e tecido adiposo de ratos em experimentos *in vivo* (Dominici *et al.*, 2014). Além disso, outros estudos demonstraram que a Ang-(1-7) exerce seus efeitos benéficos por meio da via NO/cGMP (Sampaio *et al.*, 2007; Gomes *et al.*, 2010; Patel *et al.*, 2015).

O equilíbrio redox regula a excitabilidade cardíaca e, em situações patológicas, pode alterar a propagação do PA e causar arritmias (Aggarwal e Makielski, 2013). No presente estudo, o DIZE mostrou ser um importante modulador da atividade elétrica cardíaca. Quando o eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas foi estimulado por meio do tratamento crônico com o DIZE ou utilizando ratos TG, nós observamos um encurtamento da duração do PA de cardiomiócitos. De maneira importante, esse efeito não foi observado em cardiomiócitos isolados de camundongos Mas-KO, provavelmente devido à elevada densidade de corrente de saída de potássio que esses animais apresentaram na análise da densidade de corrente de saída transitória de potássio. Esta corrente pode atuar como um tampão, mantendo o PA curto. Buscando uma causa para essa elevada densidade de corrente de saída de potássio, que até certo ponto é um mecanismo cardioprotetor, nós avaliamos a concentração de algumas citocinas em preparações ventriculares de corações desses animais. A análise dos resultados do perfil de citocinas do ventrículo de animais Mas-KO mostrou que o coração desses animais tem uma maior quantidade de IL-6 e IL-10, citocinas pró e anti-inflamatórias, respectivamente, revelando um perfil regulatório. O G-CSF, fator estimulador de colônias de granulócitos, também estava em maior quantidade nos ventrículos cardíacos dos camundongos Mas-KO. Importante salientar o papel de indutor da diferenciação e proliferação celular desse fator de crescimento. Esse perfil provavelmente pode estar relacionado a uma compensação da disfunção



cardíaca crônica apresentada por esses animais (Castro *et al.*, 2006) acarretando em microlesões crônicas. Por outro lado, observou-se uma diminuição na quantidade de VEGF, fator de crescimento do endotélio vascular, nos ventrículos dos animais Mas-KO. Esse dado sugere uma menor habilidade dos animais Mas-KO nas remodelações compensatórias do órgão. De fato, uma disfunção do eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas pode explicar os valores de VEGF nos animais Mas-KO, tendo em vista o papel antiangiogênico da Ang-(1-7) (Machado *et al.*, 2001). No entanto, detalhes da correlação entre esses resultados e a densidade de corrente de potássio de saída precisa ser melhor investigada.

Tendo em vista as observações que mostram que o eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas modula o PA e que o KATP possui um papel cardioprotetor na I/R (Seubert *et al.*, 2004; Quindry *et al.*, 2010), nós hipotetizamos que a cardioproteção induzida pelo DIZE no modelo de I/R e a sua capacidade de preservar a função mitocondrial poderia ser devido a uma modulação da função dos KATP. Dessa forma, cardiomiócitos isolados foram estimulados com o diazoxide, um agonista do KATP, e com a glibenclamida, um antagonista dos KATP. Observou-se uma menor eficácia do diazoxide em encurtar o PA dos miócitos quando o eixo foi estimulado pelo tratamento com o DIZE ou nos ratos TG. Por outro lado, a glibenclamida provocou um aumento pronunciado na duração do PA em animais tratados com o DIZE e em células de ratos TG quando comparado com os seus respectivos controles. Além disso, os experimentos realizados com camundongos Mas-KO confirmaram que estes efeitos envolvem a via de sinalização do Mas como receptor alvo.

Para aumentar a acurácia dos nossos resultados, foi elaborado um protocolo para avaliar a densidade de corrente do KATP em animais tratados com o DIZE. Com base nos dados obtidos, observamos que os miócitos de animais tratados com o DIZE apresentam um aumento na densidade da corrente de KATP. Estes resultados apoiam fortemente a nossa hipótese de que a habilidade do DIZE de evitar as arritmias de I/R e de recuperar a função cardíaca após a lesão induzida por esse insulto envolve a ativação do KATP, provavelmente em decorrência de uma atividade mitocondrial mais eficiente. Tem sido demonstrado

que a corrente sarcKATP é modulada pelo equilíbrio entre a concentração de ATP/ADP, o que, de fato, reflete a taxa de consumo de ATP pelo metabolismo celular e a produção dessa molécula pelas vias oxidativas (Babenko, 2005). A constatação anterior de que a ativação do eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas encurta a duração do PA e aumenta a densidade da corrente de KATP pode, inicialmente, parecer estar em desacordo com os resultados que indicaram que a ativação desse eixo também aumenta a habilidade das mitocôndrias de sintetizar ATP e de manter a concentração inicial de ATP após a I/R. De fato, os mecanismos que orquestram a concomitante ativação do sarcKATP juntamente com o aumento da quantidade total de ATP após I/R ainda precisam ser melhor esclarecidos. Uma possível explicação para esse fenômeno é que o NO produzido a partir da atividade da iNOS e/ou eNOS induziria uma ativação do sarcKATP (Baker *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2014), o que é consistente com estudos que fornecem evidências de que a ativação do eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas aumenta a produção de NO (Sampaio *et al.*, 2007; Gomes *et al.*, 2010) e com o fato de que o NO pode induzir a abertura dos mitoKATP (Ockaili *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2014).

Além disso, o canal de cálcio também tem um papel estabelecido na disfunção do miocárdio durante a isquemia (Halestrap, 2006; Mattiazzi *et al.*, 2015), por isso investigamos a corrente de cálcio do tipo L em animais tratados com DIZE. Entretanto, não encontramos diferenças significativas no pico da densidade de corrente de  $Ca^{2+}$  do tipo L entre os grupos, revelando que, nessas condições, o DIZE não modula essa corrente. Em cardiomiócitos, a exposição aguda a Ang-(1-7) não causa nenhum efeito demonstrável no transiente de  $Ca^{2+}$ , mas promove a liberação de NO pela ativação da eNOS e da nNOS (Dias-Peixoto *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2010). A passagem do  $Ca^{2+}$  por meio do canal de cálcio do tipo L é importante para o bom funcionamento da maquinaria contrátil das células cardíacas. Dados mostram que esta fonte de  $Ca^{2+}$  é responsável por desencadear a liberação de  $Ca^{2+}$  a partir do retículo sarcoplasmático que, por sua vez, participa da contração do miócito (Bers, 2008). A amplitude do transiente de cálcio evocado durante um evento excitatório pode ser modulada por vários fatores, incluindo a carga de cálcio do retículo sarcoplasmático, a reabsorção de cálcio, a

sensibilidade dos receptores de rianodina (RyRs) ao  $\text{Ca}^{2+}$  e, por último e menos frequente, também pode ser modulada por ROS e NOS (Wang *et al.*, 2015). Diante disso, acreditamos que estudos avaliando os efeitos do tratamento com o DIZE no cálcio celular mediado pelos RyRs, na carga de cálcio/*sparks* de cálcio do retículo sarcoplasmático e no inchaço mitocondrial induzido pelo aumento da  $[\text{Ca}^{2+}]$  devem ser realizados a fim de ajudar a elucidar os mecanismos destas ações antiarrítmicas do DIZE.

Em geral, os resultados discutidos até o momento demonstram que aumentar a atividade catalítica da ECA2, a qual atua sobre a Ang II produzindo Ang-(1-7), resulta em um aumento da resistência/função mitocondrial e em uma modulação das correntes de  $\text{K}^+$ ATP, conferindo cardioproteção em um modelo de lesão por I/R, além de um efeito antiarritmogênico ao DIZE. Portanto, a ECA2 se mostra como um alvo valioso para a proteção do miocárdio devido a sua capacidade de preservar a função mitocondrial após estímulo lesivo e otimizar as propriedades elétricas cardíacas de defesa, bem como pelo seu perfil multifuncional dentro do sistema cardiovascular. Diversas abordagens mitocondriais na proteção contra a I/R já foram descritas (Camara *et al.*, 2011). No entanto, nossa hipótese é que um possível mecanismo de ação do DIZE é regulando a dinâmica mitocondrial que, por sua vez, é capaz de alterar a morfologia mitocondrial entre os estados de fissão e fusão, diminuindo ou aumentando a produção de ATP, respectivamente (Pennanen *et al.*, 2014). Esse mecanismo tem sido amplamente abordado como um potencial alvo terapêutico para as doenças cardiovasculares (Kuzminic *et al.*, 2011). De acordo com esse conceito, foi observado que, inibindo a fissão mitocondrial, ocorre uma proteção contra lesão por I/R no coração (Ong *et al.*, 2010). Além disso, a insulinoterapia regula o metabolismo mitocondrial em cardiomiócitos diabéticos através de um mecanismo que é dependente do aumento da fusão mitocondrial e da via Akt-mTOR NFkB (Parra *et al.*, 2014).

O diabetes é uma síndrome metabólica com uma disfunção energética importante (An e Rodrigues, 2006). Uma das complicações mais graves desta doença é a CMD, que envolve o remodelamento elétrico cardíaco (Cassis *et al.*,

2000), o aumento da prevalência de arritmias fatais (Magyar *et al.*, 1992) e disfunção mitocondrial (Lowell e Shulman, 2005). De fato, pacientes diabéticos apresentam maior incidência de arritmias ventriculares e morte súbita cardíaca (Kahn *et al.*, 1987). Diante da relevância desta doença e da sua relação com o desenvolvimento de cardiomiopatias, utilizamos um modelo de hiperglicemia induzido por STZ no intuito de investigar se o DIZE seria capaz de amenizar os danos cardíacos causados pelo diabetes. Nesse sentido, observamos que ratos hiperglicêmicos apresentaram um prolongamento significativo do intervalo QT, assim como do PA em fragmentos de tecido cardíaco. Estes resultados podem ser explicados por uma regulação negativa da corrente de potássio de saída transitória cardíaca (Ito), como já foi demonstrado previamente por Cassis *et al.* (2000). O tratamento com o DIZE reverteu as alterações elétricas cardíacas na repolarização ventricular (QT, QTc e DPA mais longos) observadas em ratos hiperglicêmicos.

Além disso, no presente estudo, o DIZE não foi capaz de reverter a hiperglicemia observada neste modelo de diabetes. Resultado semelhante foi observado em um estudo utilizando o XNT, outro ativador da ECA2 (Murça *et al.*, 2012). Por outro lado, usando um modelo de ratos transgênicos de DM2 tratados com uma dose elevada de Ang-(1-7) incluída em hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (100 mg/kg), Santos *et al.* (2014) observaram uma redução significativa na hiperglicemia. Assim, considerando que ECA2 é a principal enzima formadora de Ang-(1-7), as aparentes discrepâncias entre estes estudos podem estar relacionadas com a quantidade de Ang-(1-7) disponível após o tratamento com os ativadores da ECA2 (DIZE e XNT), bem como com o tipo de modelo de diabetes utilizado.

Os animais hiperglicêmicos tratados com o DIZE apresentaram uma condição eletrofisiológica normal. Além disso, a ativação crônica da ECA2 não promoveu alterações elétricas cardíacas ou eventos arrítmicos em animais normais, indicando que o esquema de tratamento utilizado não induziu nenhum efeito arritmogênico. Nos últimos anos, a ativação da ECA2 tem mostrado ser uma estratégia terapêutica inovadora e eficiente para o tratamento de DCV, bem como

para outras doenças relacionadas. De fato, Qi *et al.* (2013) demonstraram que o DIZE reduz a área infartada por meio da diminuição das células inflamatórias em regiões peri-infartadas do coração. Outro estudo mostrou que a administração crônica do XNT produz um efeito protetor contra a disfunção autonômica em corações de ratos diabéticos, melhorando a função mecânica e restaurando a atividade das quinases envolvidas na manutenção do equilíbrio energético (Murça *et al.*, 2012). Além disso, o XNT diminuiu a pressão arterial, melhorou a função cardíaca e foi capaz de reverter a fibrose perivascular e do miocárdio em ratos espontaneamente hipertensos (Ferreira *et al.*, 2011), preveniu a HP em ratos tratados com monocrotalina (Ferreira *et al.*, 2009) e atenuou a formação de trombos e reduziu a adesão de plaquetas aos vasos de ratos espontaneamente hipertensos (Fraga-Silva *et al.*, 2010). Recentemente, foi demonstrado que o XNT é capaz de melhorar a disfunção endotelial pela atenuação do estresse oxidativo em ratos diabéticos induzidos por STZ. Os autores verificaram que este efeito é dependente da ativação do eixo Ang-(1-7)/Mas (Fraga-Silva *et al.*, 2013). Interessantemente, o DIZE atenuou a área de infarto cerebral e os déficits neurológicos provocados pela isquemia cerebral (Mecca *et al.*, 2011), preveniu a HP beneficiando a função cardíaca (Shenoy *et al.*, 2013), melhorou a atividade do sistema nervoso autônomo em um modelo de HP induzido por monocrotalina (Rigatto *et al.*, 2013) e diminuiu a pressão intraocular de ratos glaucomatosos (Foureaux *et al.*, 2013).

Assim, de maneira geral, os nossos achados utilizando ratos diabéticos estão de acordo com estudos anteriores que observaram efeitos benéficos da ativação do eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas no diabetes, bem como no remodelamento elétrico cardíaco. Por exemplo, a restauração da atividade da ECA2 em ratos diabéticos restabeleceu a função cardíaca desses animais (Murça *et al.*, 2012; Tikellis *et al.*, 2012; Jarajapu *et al.*, 2013), uma vez que o diabetes está associado com uma redução na expressão e atividade da ECA2 no coração (Tikellis *et al.*, 2012), bem como com um desequilíbrio na relação ECA2/ECA (Murça *et al.*, 2012).

Em relação à eletrofisiologia cardíaca, tem sido demonstrado que a subregulação tanto da expressão do mRNA quanto dos níveis de proteínas de

ECA2 estão associados com o desenvolvimento de fibrilação atrial (Pan *et al.*, 2007). De fato, a Ang-(1-7)/Mas é capaz de modular canais iônicos e correntes elétricas (Bevilaqua *et al.*, 2002) e possui um efeito anti-arritmogênico bem estabelecido durante a lesão por I/R (Ferreira *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2004; De Mello, 2004; Ferreira *et al.*, 2011; Liao *et al.*, 2011). Além disso, recentemente foi descrito que a Ang-(1-7) via NO-cGMP ativa os KATP (Costa *et al.*, 2014). Em acordo com esses dados, a deficiência da ECA2 resultou em aumento dos níveis teciduais e circulantes de Ang II (Crackower *et al.*, 2002; Nakamura *et al.*, 2008), ao passo que os níveis de Ang-(1-7) estavam reduzidos nessa condição (Bernardi *et al.*, 2012). Além disso, a relação da expressão dos receptores Mas/AT<sub>1</sub> no coração de ratos hiperglicêmicos mostrou-se aumentada (Murça *et al.*, 2012).

Em resumo, o presente estudo utilizando ratos diabéticos demonstrou que a ativação da ECA2 possui efeitos benéficos no diabetes, melhorando a função elétrica cardíaca de ratos hiperglicêmicos. Portanto, os nossos resultados sugerem que a ativação da ECA2 intrínseca pode ser uma promissora estratégia terapêutica para tratar a disfunção elétrica cardíaca observada no diabetes.

Finalmente, deve-se mencionar que os dados apresentados nesse trabalho são uma “*proof of concept*” e mais estudos são necessários para estabelecer a ativação da ECA2 como uma estratégia terapêutica para as DCV. Além disso, mais experimentos devem ser realizados para esclarecer como o DIZE modula a função mitocondrial e a via de sinalização pela qual este composto induz as respostas observadas neste estudo em modelo de I/R e de diabetes.

## **8. CONCLUSÃO**

Este estudo demonstrou o papel cardioprotetor do DIZE, utilizado como estratégia terapêutica para aumentar a atividade da ECA2 intrínseca. Os resultados revelaram a habilidade do eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas em promover uma proteção celular direta ao preservar a integridade/função mitocondrial cardíaca, modular o PA por meio do KATP e reverter o remodelamento elétrico cardíaco patológico.

## 9. REFERÊNCIAS

Abadir PM, Foster DB, Crow M, Cooke CA, Rucker JJ, Jain A, *et al.* Identification and characterization of a functional mitochondrial angiotensin system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108:14849-14854.

Aggarwal NT, Makielski JC. Redox control of cardiac excitability. *Antioxid Redox Signal.* 2013;18:432-468.

Akar FG, O'Rourke B. Mitochondria are sources of metabolic sink and arrhythmias. *Pharmacol Ther.* 2011;131:287-294.

Alderman MH, Madhavan S, Ooi WL, Cohen H, Sealey JE, Laragh JH. Association of the renin-sodium profile with the risk of myocardial infarction in patients with hypertension. *N Engl J Med.* 1991;324:1098-1104.

An D, Rodrigues B. Role of changes in cardiac metabolism in development of diabetic cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;291:H1489-H1506.

Ardailou R. Active fragments of angiotensin II: enzymatic pathways of synthesis and biological effects. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 1997;6:28-34.

Arildsen H, May O, Christiansen EH, Damsgaard EM. Increased QT dispersion in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Int J Cardiol.* 1999;71:235-242.

Ashcroft FM. Adenosine 5'-triphosphate-sensitive potassium channels. *Annu Rev Neurosci.* 1988;11:97-118.

Ashcroft SJ, Bassett JM, Randle PJ. Insulin secretion mechanisms and glucose metabolism in isolated islets. *Diabetes.* 1972;2:538-545.



Atlas do Instituto Federal de Diabetes, 2014. Disponível em [www.diamundialdodiabetes.org.br/media/uploads/atlasidf-2014.pdf](http://www.diamundialdodiabetes.org.br/media/uploads/atlasidf-2014.pdf). Acesso em 15 Dez 2015.

Axelband F, Dias J, Miranda F, Ferrão FM, Barros NM, Carmona AK, *et al.* A scrutiny of the biochemical pathways from Ang II to Ang-(3-4) in renal basolateral membranes. *Regul Pept.* 2009;158:47-56.

Babenko AP. K(ATP) channels "vingt ans après": ATG to PDB to Mechanism. *J Mol Cell Cardiol.* 2005;39:79-98.

Bader M, Alenina N, Andrade-Navarro MA, Santos RA. MAS and its related G protein-coupled receptors, Mrgprs. *Pharmacol Rev.* 2014;66:1080-1105.

Baker JE, Contney SJ, Singh R, Kalyanaraman B, Gross GJ, Bosnjak ZJ. Nitric oxide activates the sarcolemmal KATP channel in normoxic and chronically hypoxic hearts by a cyclic GMP-dependent mechanism. *J Mol Cell Cardiol.* 2001;33:331–341.

Becker LK, Etelvino GM, Walther T, Santos RA, Campagnole-Santos MJ. Immunofluorescence localization of the receptor Mas in cardiovascular-related areas of the rat brain. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;293:H1416–H1424.

Bernardi S, Burns WC, Toffoli B, Pickering R, Sakoda M, Tsorotes D, *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 regulates renal atrial natriuretic peptide through angiotensin-(1-7). *Clin Sci.* 2012;123:29-37.

Bers D. Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force. 2 edition, Kluwer Academic Pub, 2001.

Bers DM. Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annu Rev Physiol.*

2008;70:23-49.

Bevilaqua ER, Kushmerick C, Beirão PS, Naves LA. Angiotensin 1-7 increases quantal content and facilitation at the frog neuromuscular junction. *Brain Res.* 2002;927:208-211.

Bojestig M, Nystrom FH, Arnqvist HJ, Ludvigsson J, Karlberg BE. The renin-angiotensin-aldosterone system is suppressed in adults with Type 1 diabetes. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2000;1:353-356.

Bolli R. Oxygen-derived free radicals and myocardial reperfusion injury: an overview. *Cardiovasc Drugs Ther.* 1991;5:249-268.

Botelho-Santos GA, Bader M, Alenina N, Santos RA. Altered regional blood flow distribution in Mas-deficient mice. *Ther Adv Cardiovasc Dis.* 2012;6:201–211.

Brady NR, Hamacher-Brady A, Gottlieb RA. Proapoptotic BCL-2 family members and mitochondrial dysfunction during ischemia/reperfusion injury, a study employing cardiac HL-1 cells and GFP biosensors. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1757:667-678.

Brown DA, Chicco AJ, Jew KN, Johnson MS, Lynch JM, Watson PA, *et al.* Cardioprotection afforded by chronic exercise is mediated by the sarcolemmal, and not the mitochondrial, isoform of the KATP channel in the rat. *J Physiol.* 2005;569:913-924.

Burrell LM, Risvanis J, Kubota E, Dean RG, MacDonald PS, Lu S, *et al.* Myocardial infarction increases ACE2 expression in rat and humans. *Eur Heart J.* 2005;26:369–375.

Cai L, Kang YJ. Cell death and diabetic cardiomyopathy. *Cardiovasc Toxicol.*

2003;3:219–228.

Camara AK, Bienengraeber M, Stowe DF. Mitochondrial approaches to protect against cardiac ischemia and reperfusion injury. *Front Physiol.* 2011;2:13.

Campbell DJ, Aggarwal A, Esler M, Kaye D. beta-blockers, angiotensin II, and ACE inhibitors in patients with heart failure. *Lancet.* 2001;358:1609-1610.

Campbell DJ, Woodward M, Chalmers JP, Colman SA, Jenkins AJ, Kemp BE, *et al.* Prediction of myocardial infarction by N-terminal- pro-B-type natriuretic peptide, C-reactive protein, and renin in subjects with cerebrovascular disease. *Circulation.* 2005;112:110-116.

Campbell DJ. Critical review of prorenin and (pro)renin receptor research. *Hypertension.* 2008;51:1259-1264.

Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol.* 2000;190:255-266.

Cassis O, Gallego M, Iriarte M, Sánchez-Chapula JA. Effects of diabetic cardiomyopathy on regional electrophysiologic characteristics of rat ventricle. *Diabetologia* 2000;43:101-109.

Casis O, Echevarria E. Diabetic cardiomyopathy: electromechanical cellular alterations. *Curr Vasc Pharmacol.* 2004;2:237-48.

Castro, CH, Santos RA, Ferreira AJ, Bader M, Alenina N, Almeida AP. Effects of genetic deletion of angiotensin-(1-7) receptor Mas on cardiac function during ischemia/reperfusion in the isolated perfused mouse heart. *Life Sci.* 2006;80:264-268.

Chappell MC, Iyer SN, Diz DI, Ferrario CM. Antihypertensive effects of angiotensin-(1-7). *Braz J Med Biol Res.* 1998;31:1205-1212.

Chida J, Yamane K, Takei T, Kido H. An efficient extraction method for quantitation of adenosine triphosphate in mammalian tissues and cells. *Anal Chim Acta.* 2012;727:8-12.

Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology.* 2001;94:1133-1138.

Costa A, Galdino G, Romero T, Silva G, Cortes S, Santos R, *et al.* Ang-(1-7) activates the NO/cGMP and ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels pathway to induce peripheral antinociception in rats. *Nitric Oxide.* 2014;37:11-16.

Costa MA, Lopez Verrilli MA, Gomez KA, Nakagawa P, Peña C, Arranz C, *et al.* Angiotensin-(1-7) upregulates cardiac nitric oxide synthase in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010;299:H1205-H1211.

Coutinho DC. Identificação de Alterações Estruturais e de Vias de Sinalização em Corações de Camundongos Knockout para o Receptor Mas de Angiotensina-(1-7). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.

Coutinho DC, Monnerat-Cahli G, Ferreira AJ, Medei E. Activation of angiotensin-converting enzyme 2 improves cardiac electrical changes in ventricular repolarization in streptozotocin-induced hyperglycaemic rats. *Europace.* 2014;16:1689-1696.

Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, Yagil C, Kozieradzki I, Scanga SE, *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature.* 2002;417:822-828.

da Silva Oliveira GL, de Freitas RM. Diminazene aceturate-An antiparasitic drug of antiquity: Advances in pharmacology & therapeutics. *Pharmacol Res.* 2015;102:138-157.

Dales NA, Gould AE, Brown JA, Calderwood EF, Guan B, Minor CA, *et al.* Substrate-based design of the first class of angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) inhibitors. *J Am Chem Soc.* 2002;124:11852–11853.

Daniels A, van Bilsen M, Janssen BJ, Brouns AE, Cleutjens JP, Roemen TH, *et al.* Impaired cardiac functional reserve in type 2 diabetic db/db mice is associated with metabolic, but not structural, remodelling. *Acta Physiol.* 2010;200:11-22.

de Almeida PW, de Freitas Lima R, de Moraes Gomes ER, Rocha-Resende C, Roman-Campos D, Gondim AN, *et al.* Functional cross-talk between aldosterone and angiotensin-(1-7) in ventricular myocytes. *Hypertension.* 2013;61:425–430.

De Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 2000;52: 415–472.

de Macedo SM, Guimaraes TA, Andrade JM, Guimaraes AL, Batista de Paula AM, Ferreira AJ, *et al.* Angiotensin converting enzyme 2 activator (DIZE) modulates metabolic profiles in mice, decreasing lipogenesis. *Protein Pept Lett.* 2015;22:332-340.

De Maria ML, Araújo LD, Fraga-Silva RA, Pereira LA, Ribeiro HJ, Menezes GB, *et al.* Anti-hypertensive Effects of Diminazene Aceturate: An Angiotensin- Converting Enzyme 2 Activator in Rats. *Protein Pept Lett.* 2016;23:9-16.

De Mello WC. Angiotensin (1-7) re-establishes impulse conduction in cardiac muscle during ischaemia-reperfusion. The role of the sodium pump. *J Renin*

Angiotensin Aldosterone Syst. 2004;5:203-208.

De Mello WC, Ferrario CM, Jessup JA. Beneficial versus harmful effects of Angiotensin (1-7) on impulse propagation and cardiac arrhythmias in the failing heart. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2007;8:74-80.

Dempsey PJ, McCallum ZT, Kent KM, Cooper T. Direct myocardial effects of angiotensin II. *Am J Physiol.* 1971;220:477-481.

Dhalla NS, Liu X, Panagia V, Takeda N. Subcellular remodeling and heart dysfunction in chronic diabetes. *Cardiovasc Res.* 1998;40:239–247.

Dias-Peixoto MF, Santos RA, Gomes ER, Alves MN, Almeida PW, Greco L. Molecular Mechanisms Involved in the Angiotensin-(1-7)/Mas Signaling Pathway in Cardiomyocytes. *Hypertension.* 2008;52:542-548.

DiMauro S, Hirano M. Mitochondria and heart disease. *Curr Opin Cardiol.* 1998;13:190-197.

Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature.* 1999;399:601-605.

Dimmer KS, Scorrano L. (De)constructing mitochondria: what for? *Physiology.* 2006;21:233–241.

Domenighetti AA, Wang Q, Egger M, Richards SM, Pedrazzini T, Delbridge LM. Angiotensin II-mediated phenotypic cardiomyocyte remodeling leads to age-dependent cardiac dysfunction and failure. *Hypertension.* 2005;46:426-432.

Dominici FP, Burghi V, Munoz MC, Giani JF. Modulation of the action of insulin by

angiotensin-(1-7). *Clin Sci*. 2014;126:613–630.

Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, *et al*. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res*. 2000;87:E1–E9.

Donoghue M, Wakimoto H, Maguire CT, Acton S, Hales P, Stagliano N, *et al*. Heart block, ventricular tachycardia, and sudden death in ACE2 transgenic mice with downregulated connexins. *J Mol Cell Cardiol*. 2003;35:1043-1053.

Dorn GW 2nd. Mitochondrial dynamism and heart disease: changing shape and shaping change. *EMBO Mol Med*. 2015;7:865-877.

Dorn GW 2nd, Vega RB, Kelly DP. Mitochondrial biogenesis and dynamics in the developing and diseased heart. *Genes Dev*. 2015;29:1981-1991.

Etelvino GM, Peluso AA, Santos RA. New components of the renin–angiotensin system: alamandine and the MAS-related G protein-coupled receptor D. *Curr Hypertens Rep*. 2014;16:433.

Ferrario, CM, Chappell MC, Dean RH, Iyer SN. Novel angiotensin peptides regulate blood pressure, endothelial function, and natriuresis. *J Am Soc Nephrol*. 1998;9:1716-1722.

Ferrario CM. Angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7): an evolving story in cardiovascular regulation. *Hypertension*. 2006;47:515-521.

Ferreira AJ, Santos RAS, Almeida AP. Angiotensin-(1–7): Cardioprotective effect in myocardial ischemia/reperfusion. *Hypertension*. 2001;38:665-668.

Ferreira AJ, Santos RA, Almeida AP. Angiotensin-(1-7) improves the post-ischemic

function in isolated perfused rat hearts. *Braz J Med Biol Res.* 2002;35:1083-1090.

Ferreira AJ, Santos RA. Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). *Braz J Med Biol Res.* 2005;38:499-507.

Ferreira AJ, Shenoy V, Yamazato Y, Sriramula S, Francis J, Yuan L, *et al.* Evidence for Angiotensin-converting Enzyme 2 as a Therapeutic Target for the Prevention of Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;179:1048-1054.

Ferreira AJ, Shenoy V, Qi Y, Fraga-Silva RA, Santos RA, Katovich MJ. Angiotensin-converting enzyme 2 activation protects against hypertension-induced cardiac fibrosis involving extracellular signal-regulated kinases. *Exp Physiol.* 2010;96:287-294.

Ferreira AJ, Moraes PL, Foureaux G, Andrade AB, Santos RA, Almeida AP. The angiotensin-(1-7)/Mas receptor axis is expressed in sinoatrial node cells of rats. *J Histochem Cytochem.* 2011;59:761–768.

Ferreira AJ, Shenoy V, Qi Y, Fraga-Silva RA, Santos RA, Katovich MJ, *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 activation protects against hypertension-induced cardiac fibrosis involving extracellular signal-regulated kinases. *Exp Physiol.* 2011;96:287-294.

Flores-Muñoz M, Godinho B, Almalik A, Nicklin S. Adenoviral delivery of angiotensin-(1-7) or angiotensin-(1-9) inhibits cardiomyocyte hypertrophy via the mas or angiotensin type 2 receptor. *PLoS One* 2012;7:e45564.

Foureaux G, Nogueira JC, Nogueira BS, Fulgêncio GO, Menezes GB, Fernandes SO, *et al.* Antiglaucomatous effects of the activation of intrinsic Angiotensin-converting enzyme 2. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54:4296-4306.



Foureaux G, Franca JR, Nogueira JC, Fulgêncio Gde O, Ribeiro TG, Castilho RO, *et al.* Ocular Inserts for Sustained Release of the Angiotensin-Converting Enzyme 2 Activator, Diminazene Aceturate, to Treat Glaucoma in Rats. *PLoS One.* 2015;10:e0133149.

Fraga-Silva RA, Pinheiro SV, Gonçalves AC, Alenina N, Bader M, Santos RA. The antithrombotic effect of angiotensin-(1-7) involves mas-mediated NO release from platelets. *Mol Med.* 2008;14:28-35.

Fraga-Silva RA, Sorg BS, Wankhede M, Dedeugd C, Jun JY, Baker MB, *et al.* ACE2 activation promotes antithrombotic activity. *Mol Med.* 2010;16:210-215.

Fraga-Silva RA, Costa-Fraga FP, Murça TM, Moraes PL, Martins Lima A, Lautner RQ, *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 activation improves endothelial function. *Hypertension.* 2013;61:1233-1238.

Fraga-Silva RA, Costa-Fraga FP, Montecucco F, Sturny M, Faye Y, Mach F, *et al.* Diminazene protects corpus cavernosum against hypercholesterolemia-induced injury. *J Sex Med.* 2015;12:289-302.

Frank A, Bonney M, Bonney S, Weitzel L, Koeppen M, Eckle T. Myocardial ischemia reperfusion injury: from basic science to clinical bedside. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth.* 2012;16:123-132.

Freund M, Walther T, von Bohlen und Halbach O. Immunohistochemical localization of the angiotensin-(1-7) receptor Mas in the murine forebrain. *Cell Tissue Res.* 2012;348:29–35.

Fukada SY, Iyomasa MM, Cunha FQ, Corrêa FM, de Oliveira AM. Mechanisms of impaired vascular response to ANG II in perivascular injured carotid arteries of

ovariectomized rat. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2004;44:393-400.

Fukada SY, Tirapelli CR, de Godoy MA, de Oliveira AM. Mechanisms underlying the endothelium-independent relaxation induced by angiotensin II in rat aorta. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2005;45:136-143.

Gallagher P, Ferrario C, Tallant E. Regulation of ACE2 in cardiac myocytes and fibroblasts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;295:H2373–H2379.

Garcia MJ, McNamara PM, Gordon T, Kannel WB. Morbidity and mortality in diabetics in the Framingham population. Sixteen year follow-up study. *Diabetes.* 1974;23:105-111.

Gava E, de Castro CH, Ferreira AJ, Colleta H, Melo MB, Alenina N, *et al.* Angiotensin-(1-7) receptor Mas is an essential modulator of extracellular matrix protein expression in the heart. *Regul Pept.* 2012;175:30–42.

Gembardt F, Westermann D, Heringer-Walther S, Schultheiss HP, Tschöpe C, Walter T. Deficiency in the G protein-coupled receptor Mas leads to cardiomyopathy and demonstrates the importance of the endogenous ligand angiotensin-(1-7) for the cardiac function. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch of Pharmacol.* 2003;369:R68.

Gironacci MM, Adler-Graschinsky E, Peña C, Enero MA. Effects of angiotensin II and angiotensin-(1-7) on the release of [<sup>3</sup>H]norepinephrine from rat atria. *Hypertension.* 1994;24:457-460.

Gjymishka AL, Kulemina LV, Shenoy V, Katovich MJ, Ostrov DA, Raizada MK. Diminazene Aceturate Is an ACE2 Activator and a Novel Antihypertensive Drug. *FASEB J.* 2010;24:1032-1033.

Glass CE, Singal PK, Singla DK. Stem cells in the diabetic infarcted heart. *Heart Fail Rev.* 2010;15:581-588.

Gomes ER, Lara AA, Almeida PW, Guimarães D, Resende RR, Campagnole-Santos MJ, *et al.* Angiotensin-(1-7) prevents cardiomyocyte pathological remodeling through a nitric oxide/guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent pathway. *Hypertension.* 2010;55:153-160.

Gomes ER, Santos RA, Guatimosim S. Angiotensin-(1-7)-mediated signaling in cardiomyocytes. *Int J Hypertens.* 2012;2012:493129.

Grobe JL, Mecca AP, Mao H, Katovich MJ. Chronic angiotensin-(1-7) prevents cardiac fibrosis in doca-salt model of hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;290:H2417-H2423.

Grobe JL, Mecca AP, Lingis M, Shenoy V, Bolton TA, Machado JM, *et al.* Prevention of angiotensin II-induced cardiac remodeling by angiotensin-(1-7). *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;292:H736-H742.

Haga S, Tsuchiya H, Hirai T, Hamano T, Mimori A, Ishizaka Y. A novel ACE2 activator reduces monocrotaline-induced pulmonary hypertension by suppressing the JAK/STAT and TGF- $\beta$  cascades with restored caveolin-1 expression. *Exp Lung Res.* 2015;41:21-31.

Handa RK. Metabolism alters the selectivity of angiotensin-(1-7) receptor ligands for angiotensin receptors. *J Am Soc Nephrol.* 2000;11:1377-1386.

Halestrap AP. Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die. *Biochem Soc Trans.* 2006;34:232-237.

Hausenloy DJ, Scorrano L. Targeting cell death. *Clin Pharmacol Ther.*

2007;82:370-373.

Heitsch H, Brovkovich S, Malinski T, Wiemer G. Angiotensin-(1-7)-stimulated nitric oxide and superoxide release from endothelial cells. *Hypertension*. 2001;37:72–76.

Hernández Prada JA, Ferreira AJ, Katovich MJ, Shenoy V, Qi Y, Santos RA, *et al.* Structure-based identification of small-molecule angiotensin-converting enzyme 2 activators as novel antihypertensive agents. *Hypertension*. 2008;51:1312-1317.

Hoffmann S, Krause T, van Geel PP, Willenbrock R, Pagel I, Pinto YM, *et al.* Overexpression of the human angiotensin II type 1 receptor in the rat heart augments load induced cardiac hypertrophy. *J Mol Med*. 2001;79:601-608.

Huang L, Sexton DJ, Skogerson K, Devlin M, Smith R, Sanyal I, *et al.* Novel peptide inhibitors of angiotensin-converting enzyme 2. *J Biol Chem*. 2003;278:15532–15540.

Huentelman MJ, Grobe JL, Vazquez J, Stewart JM, Mecca AP, Katovich MJ, *et al.* Protection from angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and fibrosis by systemic lentiviral delivery of ACE2 in rats. *Exp Physiol*. 2005;90:783–790.

Ichihara S, Senbonmatsu T, Price E Jr, Ichiki T, Gaffney FA, Inagami T. Angiotensin II type 2 receptor is essential for left ventricular hypertrophy and cardiac fibrosis in chronic angiotensin II-induced hypertension. *Circulation*. 2001;104:346-351.

Inoue N, Kinugawa S, Suga T, Yokota T, Hirabayashi K, Kuroda S, *et al.* Angiotensin II-induced reduction in exercise capacity is associated with increased oxidative stress in skeletal muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012;302:H1202-H1210.

Ishiyama Y, Gallagher PE, Averill DB, Tallant EA, Brosnihan KB, Ferrario CM. Upregulation of angiotensin-converting enzyme 2 after myocardial infarction by blockade of angiotensin II receptors. *Hypertension*. 2004;43:970–976.

Israel A, Cierco M, Sosa B. Angiotensin AT(2) receptors mediate vasodepressor response to footshock in rats. Role of kinins, nitric oxide and prostaglandins. *Eur J Pharmacol*. 2000;394:103-108.

Iwata M, Cowling RT, Yeo SJ, Greenberg B. Targeting the ACE2-Ang-(1-7) pathway in cardiac fibroblasts to treat cardiac remodeling and heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. 2011;51:542–547.

Jarajapu YP, Bhatwadekar AD, Caballero S, Hazra S, Shenoy V, Medina R, *et al*. Activation of the ACE2/angiotensin-(1-7)/Mas receptor axis enhances the reparative function of dysfunctional diabetic endothelial progenitors. *Diabetes*. 2013;62:1258-1269.

Jones SP, Bolli R. The ubiquitous role of nitric oxide in cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol*. 2006;40:16-23.

Kahn JK, Sisson JC, Vinik AI. QT interval prolongation and sudden cardiac death in diabetic autonomic neuropathy. *J Clin Endocrinol Metab*. 1987;64:751-754.

Kalogeris T, Bao Y, Korthuis RJ. Mitochondrial reactive oxygen species: a double edged sword in ischemia/reperfusion vs preconditioning. *Redox Biol*. 2014;2:702-714.

Katada J, Majima M. AT(2) receptor-dependent vasodilation is mediated by activation of vascular kinin generation under flow conditions. *Br J Pharmacol*. 2002;136:484-491.

Keidar S, Kaplan M, Gamliel-Lazarovich A. ACE2 of the heart: From angiotensin I

to angiotensin (1-7). *Cardiovasc Res.* 2007;73:463-469.

Kittleson MM, Minhas KM, Irizarry RA, Ye SQ, Edness G, Breton E, *et al.* Gene expression analysis of ischemic and nonischemic cardiomyopathy: shared and distinct genes in the development of heart failure. *Physiol Genomics.* 2005;21:299–307.

Kobori, H, Nangaku M, Navar LG, Nishiyama A. The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev.* 2007;59:251-287.

Kulemina LV, Ostrov DA. Prediction of off-target effects on angiotensin-converting enzyme 2. *J Biomol Screen.* 2011;16:878-885.

Kuzmicic J, Del Campo A, López-Crisosto C, Morales PE, Pennanen C, Bravo-Sagua R, *et al.* Mitochondrial dynamics: a potential new therapeutic target for heart failure. *Rev Esp Cardiol.* 2011;64:916–923.

Laakso M, Kuusisto J. Insulin resistance and hyperglycaemia in cardiovascular disease development. *Nat Rev Endocrinol.* 2014;10:293-302.

Lautner RQ, Villela DC, Fraga-Silva RA, Silva N, Verano-Braga T, Costa-Fraga F, *et al.* Discovery and characterization of alamandine: A novel component of the renin-angiotensin system. *Circ Res.* 2013;112:1104-1111.

Lavoie JL, Sigmund CD. Minireview: overview of the renin-angiotensin system—an endocrine and paracrine system. *Endocrinology.* 2003;144:2179-2183.

Lehninger AL, Nelson, DL, Cox MM. *Principios de bioquímica.* Barcelona; Omega DL, 1995.

Li L, Fan D, Wang C, Wang JY, Cui XB, Wu D, *et al.* Angiotensin II increases periostin expression via Ras/p38 MAPK/CREB and ERK1/2/TGF- $\beta$ 1 pathways in cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res.* 2011;91:80-89.

Li N, Zimpelmann J, Cheng K, Wilkins JA, Burns KD. The role of angiotensin converting enzyme 2 in the generation of angiotensin 1-7 by rat proximal tubules. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005;288:F353-F362.

Liao X, Wang L, Yang C, He J, Wang X, Guo R, *et al.* Cyclooxygenase mediates cardioprotection of angiotensin-(1-7) against ischemia/reperfusion-induced injury through the inhibition of oxidative stress. *Mol Med Rep.* 2011;4:1145-1150.

Lieb W, Graf J, Gotz A, Konig IR, Mayer B, Fischer M, *et al.* Association of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) gene polymorphisms with parameters of left ventricular hypertrophy in men. Results of the MONICA Augsburg echocardiographic substudy. *J Mol Med.* 2006;84:88–96.

Lijnen PJ, Piccart Y, Coenen T, Prihadi JS. Angiotensin II-induced mitochondrial reactive oxygen species and peroxiredoxin-3 expression in cardiac fibroblasts. *J Hypertens.* 2012;30:1986-1991.

Ling G, Gerard RW. The normal membrane potential of frog sartorius fibers. *J Cell Comp Physiol.* 1949;34:383-396.

Lowell BB, Shulman GI. Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science.* 2005;307:384–387.

Machado RD, Santos RA, Andrade SP. Mechanisms of angiotensin-(1-7)-induced inhibition of angiogenesis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2001;280:R994-R1000.

Magyar J, Rusznák Z, Szentesi P, Szûcs G, Kovács L. Action potentials and potassium currents in rat ventricular muscle during experimental diabetes. *J Mol Cell Cardiol.* 1992;24:841-853.

Malek M, Nematbakhsh M. The preventive effects of diminazene aceturate in renal ischemia/reperfusion injury in male and female rats. *Adv Prev Med.* 2014;2014:740647.

Marzocca C, Vannacci A, Cuzzocrea S, Salvemini D, Mannaioni PF, Masini E. Effects of the SOD mimetic, M40403, on prostaglandin production in an in vivo model of ischemia and reperfusion in rat heart. *Inflamm Res.* 2003;52:S23-S24.

Matsufuji H, Matsui T, Ohshige S, Kawasaki T, Osajima K, Osajima Y. Antihypertensive effects of angiotensin fragments in SHR. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1995;59:1398-1401.

Mattiazzi A, Argenziano M, Aguilar-Sanchez Y, Mazzocchi G, Escobar AL. Ca<sup>2+</sup> Sparks and Ca<sup>2+</sup> waves are the subcellular events underlying Ca<sup>2+</sup> overload during ischemia and reperfusion in perfused intact hearts. *J Mol Cell Cardiol.* 2015;79:69-78.

McMurray J, Davie AP. Angiotensin-(1-7) attenuates the development of heart failure after myocardial infarction in rats. *Circulation.* 2002;106:e147.

Mecca AP, Regenhardt RW, O'Connor TE, Joseph JP, Raizada MK, Katovich MJ, *et al.* Cerebroprotection by angiotensin-(1-7) in endothelin-1-induced ischaemic stroke. *Exp Physiol.* 2011;96:1084-1096.

Mendoza A, Lazartigues E. The compensatory renin-angiotensin system in the central regulation of arterial pressure: new avenues and new challenges. *Ther Adv Cardiovasc Dis.* 2015;9:201-208.



Mendoza-Torres E, Oyarzún A, Mondaca-Ruff D, Azocar A, Castro PF, Jalil JE, *et al.* ACE2 and vasoactive peptides: novel players in cardiovascular/renal remodeling and hypertension. *Ther Adv Cardiovasc Dis.* 2015;9:217-237.

Mercure C, Yogi A, Callera GE, Aranha AB, Bader M, Ferreira AJ, *et al.* Angiotensin(1-7) blunts hypertensive cardiac remodeling by a direct effect on the heart. *Circ Res.* 2008;103:1319-1326.

Methot D, LaPointe MC, Touyz RM, Yang XP, Carretero OA, De-schepper CF, *et al.* Tissue targeting of angiotensin peptides. *J Biol Chem.* 1997;272:12994–12999.

Miki T, Seino S. Roles of KATP channels as metabolic sensors in acute metabolic changes. *J Mol Cell Cardiol.* 2005;38:917-925.

Miki T, Yuda S, Kouzu H, Miura T. Diabetic cardiomyopathy: pathophysiology and clinical features. *Heart Fail Rev.* 2013;18:149–166.

Minners J, McLeod CJ, Sack MN. Mitochondrial plasticity in classical ischemic preconditioning-moving beyond the mitochondrial KATP channel. *Cardiovasc Res.* 2003;59:1-6.

Murça TM, Moraes PL, Capuruço CA, Santos CH, Melo MB, Santos RAS, *et al.* Oral administration of an angiotensin-converting enzyme 2 activator ameliorates diabetes-induced cardiac dysfunction. *Reg Pep.* 2012;177:107-115.

Murça TM, Almeida TCS, Raizada MK, Ferreira AJ. Chronic activation of endogenous angiotensin-converting enzyme 2 protects diabetic rats from cardiovascular autonomic dysfunction. *Exp Physiol.* 2012;97:699-709.

Murray AJ, Edwards LM, Clarke K. Mitochondria and heart failure. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2007;10:704–711.

Nakamura K, Koibuchi N, Nishimatsu H, Higashikuni Y, Hirata Y, Kugiyama K, *et al.* Candesartan ameliorates cardiac dysfunction observed in angiotensin-converting enzyme 2-deficient mice. *Hypertens Res.* 2008;31:1953-1961.

Nerbonne JM, Kass RS. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev.* 2005;85:1205-1253.

Neubauer S, Horn M, Cramer M, Harre K, Newell JB, Peters W. Myocardial phosphocreatine-to-ATP ratio is a predictor of mortality in patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation.* 1997;96:2190–2196.

Neubauer S. The failing heart—an engine out of fuel. *N Engl J Med.* 2007;356:1140-1151.

Neves LA, Almeida AP, Khosla MC, Santos RA. Metabolism of angiotensin I in isolated rat hearts. Effect of angiotensin converting enzyme inhibitors. *Biochem Pharmacol.* 1995;50:1451-1459.

Neves LA, Almeida AP, Khosla MC, Campagnole-Santos MJ, Santos RA. Effect of angiotensin-(1-7) on reperfusion arrhythmias in isolated rat hearts. *Braz J Med Biol Res.* 1997;30:801-809.

Ng KK, Vane JR. Conversion of angiotensin I to angiotensin II. *Nature.* 1967;216:762-766.

Nichols CG. KATP channels as molecular sensors of cellular metabolism. *Nature.* 2006;440:470-476.

Ocaranza MP, Godoy I, Jalil JE, Varas M, Collantes P, Pinto M, *et al.* Enalapril attenuates downregulation of angiotensin-converting enzyme 2 in the late phase of ventricular dysfunction in myocardial infarcted rat. *Hypertension.* 2006;48:572-578.

Ockaili R, Emani VR, Okubo S, Brown M, Krottapalli K, Kukreja RC. Opening of mitochondrial KATP channel induces early and delayed cardioprotective effect: role of nitric oxide. *Am J Physiol*. 1999;277:H2425-H2434.

Olson TM, Terzic A. Human K(ATP) channelopathies: diseases of metabolic homeostasis. *Pflugers Arch*. 2010;460:295-306.

Ong SB, Subrayan S, Lim SY, Yellon DM, Davidson SM, Hausenloy DJ. Inhibiting mitochondrial fission protects the heart against ischemia/reperfusion injury. *Circulation*. 2010;121:2012-2022.

Oudit GY, Kassiri Z, Patel MP, Chappell M, Butany J, Backx PH. Angiotensin II-mediated oxidative stress and inflammation mediate the age-dependent cardiomyopathy in ACE2 null mice. *Cardiovasc Res*. 2007;75:29-39.

Oudit GY, Liu GC, Zhong J, Basu R, Chow FL, Zhou J, *et al*. Human recombinant ACE2 reduces the progression of diabetic nephropathy. *Diabetes*. 2010;59:529-538.

O'Rourke B, Ramza BM, Marban E. Oscillations of membrane current and excitability driven by metabolic oscillations in heart cells. *Science*. 1994;265:962-966.

Page IH, Helmer OM. A crystalline pressor substance (angiotonin) resulting from the reaction between renin and renin-activator. *J Exp Med*. 1940;71:29-42.

Paiva MA, Rutter-Locher Z, Gonçalves LM, Providência LA, Davidson SM, Yellon DM, *et al*. Enhancing AMPK activation during ischemia protects the diabetic heart against reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;300:H2123-H2134.

Pan CH, Lin JL, Lai LP, Chen CL, Stephen Huang SK, Lin CS. Downregulation of angiotensin converting enzyme II is associated with pacing-induced sustained atrial fibrillation. *FEBS Lett.* 2007;581:526-534.

Parlakpınar H, Orum MH, Sagir M. Pathophysiology of myocardial ischemia reperfusion injury: a review. *Med-Science.* 2013;2:935–954.

Parra V, Verdejo HE, Iglewski M, Del Campo A, Troncoso R, Jones D, *et al.* Insulin stimulates mitochondrial fusion and function in cardiomyocytes via the Akt-mTOR-NFκB-Opa-1 signaling pathway. *Diabetes.* 2014;63:75-88.

Passos-Silva DG, Brandan E, Santos RA. Angiotensins as therapeutic targets beyond heart disease. *Trends Pharmacol Sci.* 2015;36:310-320.

Patel VB, Takawale A, Ramprasath T, Das SK, Basu R, Grant MB, *et al.* Antagonism of angiotensin 1-7 prevents the therapeutic effects of recombinant human ACE2. *J Mol Med.* 2015;93:1003-1013.

Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev.* 2006;86:747-803.

Pennanen C, Parra V, López-Crisosto C, Morales PE, Del Campo A, Gutierrez T, *et al.* Mitochondrial fission is required for cardiomyocyte hypertrophy mediated by a Ca<sup>2+</sup>-calcineurin signaling pathway. *J Cell Sci.* 2014;127:2659-2671.

Pesta D, Gnaiger E. High-Resolution Respirometry: OXPHOS Protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle. *Methods Mol Biol.* 2012;810:25-58.

Pinheiro SV, Simões e Silva AC, Sampaio WO, de Paula RD, Mendes EP, Bontempo ED, *et al.* Nonpeptide AVE 0991 is an angiotensin-(1-7) receptor Mas

agonist in the mouse kidney. *Hypertension*. 2004;44:490–496.

Qi Y, Zhang J, Cole-Jeffrey CT, Shenoy V, Espejo A, Hanna M, *et al*. Diminazene aceturate enhances angiotensin-converting enzyme 2 activity and attenuates ischemia-induced cardiac pathophysiology. *Hypertension*. 2013;62:746-752.

Qiu Y, Shil PK, Zhu P, Yang H, Verma A, Lei B, *et al*. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) activator diminazene aceturate ameliorates endotoxin-induced uveitis in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55:3809-3818.

Quindry JC, Schreiber L, Hosick P, Wrieden J, Irwin JM, Hoyt E. Mitochondrial KATP channel inhibition blunts arrhythmia protection in ischemic exercised hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;299:H175-H183.

Rabin M, Birnbaum D, Young D, Birchmeier C, Wigler M, Ruddle FH. Human *ros1* and *mas1* oncogenes located in regions of chromosome 6 associated with tumor-specific rearrangements. *Oncogene Res*. 1987;1:169-178.

Raedschelders K, Ansley DM, Chen DD. The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion. *Pharmacol Ther*. 2012;133:230-255.

Raffai G, Khang G, Vanhoutte PM. Angiotensin-(1-7) augments endothelium-dependent relaxations of porcine coronary arteries to bradykinin by inhibiting angiotensin-converting enzyme 1. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2014;63:453-460.

Rigatto K, Casali KR, Shenoy V, Katovich MJ, Raizada MK. Diminazene aceturate improves autonomic modulation in pulmonary hypertension. *Eur J Pharmacol*. 2013;713:89-93.

Rosenthal RE, Hamud F, Fiskum G, Varghese PJ, Sharpe S. Cerebral ischemia

and reperfusion: prevention of brain mitochondrial injury by lidoflazine. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1987;7:752-758.

Rubler S, Dlugash J, Yuceoglu YZ, Kumral T, Branwood AW, Grishman A. New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis. *Am J Cardiol.* 1972;30:595-602.

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

Santiago NM, Guimarães PS, Sirvente RA, Oliveira LA, Irigoyen MC, Santos RA, *et al.* Lifetime overproduction of circulating Angiotensin-(1-7) attenuates deoxycorticosterone acetate-salt hypertension-induced cardiac dysfunction and remodeling. *Hypertension.* 2010;55:889-896.

Santos RA. Angiotensin-(1-7). *Hypertension.* 2014;63:1138-1147.

Santos RA, Brosnihan KB, Chappell MC, Pesquero J, Chernicky CL, Greene LJ, *et al.* Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brainstem. *Hypertension.* 1988;11:1153-7.

Santos RA, Campagnole-Santos MJ. Central and peripheral actions of angiotensin-(1-7). *Braz J Med Biol Res.* 1994;27:1033-1047.

Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de Buhr I, *et al.* Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:8258-8263.

Santos RA, Ferreira AJ, Nadu AP, Braga AN, de Almeida AP, Campagnole-Santos MJ, *et al.* Expression of an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein produces

cardioprotective effects in rats. *Physiol Genomics*. 2004;17:292-299.

Santos RA, Castro CH, Gava E, Pinheiro SVB, Almeida AP, Paula RD, *et al*. Impairment of in vitro and in vivo heart function in angiotensin-(1-7) receptor MAS knockout mice. *Hypertension*. 2006;47:996–1002.

Santos RA, Ferreira AJ, Verano-Braga T, Bader M. Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1-7) and Mas: new players of the renin-angiotensin system. *J Endocrinol*. 2013;216:R1-R17.

Santos SHS, Giani JF, Burghi V, Miquet JG, Qadri F, Braga JF, *et al*. Oral administration of angiotensin-(1-7) ameliorates type 2 diabetes in rats. *J Mol Med*. 2014;92:255–265.

Seubert J, Yang B, Bradbury JA, Graves J, Degraff LM, Gabel S, *et al*. Enhanced postischemic functional recovery in CYP2J2 transgenic hearts involves mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels and p42/p44 MAPK pathway. *Circ Res*. 2004;95:506-514.

Shaltout HA, Westwood B, Averill DB, Ferrario CM, Figueroa J, Diz DI, *et al*. Angiotensin metabolism in renal proximal tubules, urine and serum of sheep: evidence for ACE2-dependent processing of angiotensin II. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007;292:F82-F91.

Sharma V, Sharma A, Saran V, Bernatchez PN, Allard MF, McNeill JH.  $\beta$ -receptor antagonist treatment prevents activation of cell death signaling in the diabetic heart independent of its metabolic actions. *Eur J Pharmacol*. 2011;657:117-125.

Shenoy V, Gjymishka A, Jarajapu YP, Qi Y, Afzal A, Rigatto K, *et al*. Diminazene attenuates pulmonary hypertension and improves angiogenic progenitor cell functions in experimental models. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;187:648-657.

Shioya T. A simple technique for isolating healthy heart cells from mouse models. *J Physiol Sci.* 2007;57:327-335.

Short KR, Bigelow ML, Kahl J, Singh R, Coenen-Schimke J, Raghavakaimal S, *et al.* Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:5618-5623.

Singh N, Joshi S, Guo L, Baker MB, Li Y, Castellano RK, *et al.* ACE2/Ang-(1-7)/Mas axis stimulates vascular repair-relevant functions of CD34+ cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2015;309:H1697-H1707.

Skeggs LT Jr, Lentz KE, Kahn Jr, Shumway NP. The synthesis of a tetradecapeptide renin substrate. *J Exp Med.* 1958;108:283-297.

Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Wentworth D. Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care.* 1993;16:434-444.

Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev.* 2004;85:1093–1129.

Tallant EA, Ferrario CM, Gallagher PE. Angiotensin-(1-7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the mas receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;289:H1560-H1566.

Tan Z, Wu J, Ma H. Regulation of angiotensin-converting enzyme 2 and Mas receptor by Ang-(1-7) in heart and kidney of spontaneously hypertensive rats. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2011;12:413-419.

Thatcher SE, Zhang X, Howatt DA, Yiannikouris F, Gurley SB, Ennis T, *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 decreases formation and severity of angiotensin



II-induced abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34:2617-2623.

Théroux P. Protection of the myocardial cell during ischemia. *Am J Cardiol.* 1999;83:3G-9G.

Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, White HD. Diagnostic application of the universal definition of myocardial infarction in the intensive care unit. *Curr Opin Crit Care.* 2008;14:543–548.

Tiegerstedt R, Bergman PG. Niere und kreislauf. *Skandinävisches Archiev für Physiologie.* 1898;8:223-271.

Tikellis C, Pickering R, Tsorotes D, Du XJ, Kiriazis H, Nguyen-Huu TP, *et al.* Interaction of diabetes and ACE2 in the pathogenesis of cardiovascular disease in experimental diabetes. *Clin Sci.* 2012;123:519-529.

Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem.* 2000;275:33238-33243.

Tirapelli CR, Fukada SY, de Godoy MA, de Oliveira AM. Analysis of the mechanisms underlying the vasorelaxant action of angiotensin II in the isolated rat carotid. *Life Sci.* 2006;78:2676-2682.

Toda N, Miyazaki M. Angiotensin-induced relaxation in isolated dog renal and cerebral arteries. *Am J Physiol.* 1981;240:H247-H254.

Turner DE, Daugherty EK, Altier C, Maurer KJ. Efficacy and limitations of an ATP-based monitoring system. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2010;49:190-195.

Tuunanen H, Ukkonen H, Knuuti J. Myocardial fatty acid metabolism and cardiac performance in heart failure. *Curr Cardiol Rep.* 2008;10:142–148.

Veglio M, Chinaglia A, Cavallo-Perin P. QT interval, cardiovascular risk factors and risk of death in diabetes. *J Endocrinol Invest.* 2004;27:175-181.

Velkoska E, Patel SK, Griggs K, Pickering RJ, Tikellis C, Burrell LM. Short-term treatment with diminazene aceturate ameliorates the reduction in kidney ACE2 activity in rats with subtotal nephrectomy. *PLoS One.* 2015;10:e0118758.

Vickers C, Hales P, Kaushik V, Dick L, Gavin J, Tang J, *et al.* Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J Biol Chem.* 2002;277:14838-14843.

Villela DC, Passos-Silva DG, Santos RA. Alamandine: a new member of the angiotensin family. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2014;23:130–134.

Vinik AI, Ziegler D. Diabetic cardiovascular autonomic neuropathy. *Circulation.* 2007;115:387-397.

Wang Q, Kharche S, Jones G, Luo C, Tang C, Zhang H. Calcium leak induced arrhythmias in mouse sino-atrial node and ventricle cells: A simulation study. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 2015;2015:4487-4490.

Webster KA. Programmed death as a therapeutic target to reduce myocardial infarction. *Trends Pharmacol Sci.* 2007;28:492–499.

Welches WR, Santos RA, Chappell MC, Brosnihan KB, Greene LJ, Ferrario CM. Evidence that prolyl endopeptidase participates in the processing of brain angiotensin. *J Hypertens.* 1991;9:631-638.

Wu KK. Regulation of endothelial nitric oxide synthase activity and gene expression. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;962:122–130.

Yamamoto K, Ohishi M, Katsuya T, Ito N, Ikushima M, Kaibe M, *et al.* Deletion of angiotensin-converting enzyme 2 accelerates pressure overload-induced cardiac dysfunction by increasing local angiotensin II. *Hypertension.* 2006;47:718–726.

Young D, Waitches G, Birchmeier C, Fasano O, Wigler M. Isolation and characterization of a new cellular oncogene encoding a protein with multiple potential transmembrane domains. *Cell.* 1986;45:711-719.

Zepeda R, Kuzmicic J, Parra V, Troncoso R, Pennanen C, Riquelme JA, *et al.* Drp1 loss-of-function reduces cardiomyocyte oxygen dependence protecting the heart from ischemia-reperfusion injury. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2014;63:477-487.

Zhang DM, Chai Y, Erickson JR, Brown JH, Bers DM, Lin YF. Intracellular signalling mechanism responsible for modulation of sarcolemmal ATP-sensitive potassium channels by nitric oxide in ventricular cardiomyocytes. *J Physiol.* 2014;592:971-990.

Zhang L, Frederich M, He H, Balschi JA. Relationship between 5-aminoimidazole-4-carboxamide-ribotide and AMP-activated protein kinase activity in the perfused mouse heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;290:H1235-H1243.

Zhang Y, Liu J, Luo JY, Tian XY, Cheang WS, Xu J, *et al.* Upregulation of Angiotensin (1-7)-Mediated Signaling Preserves Endothelial Function Through Reducing Oxidative Stress in Diabetes. *Antioxid Redox Signal.* 2015;23:880-892.

Zheng C, Lei C, Chen Z, Zheng S, Yang H, Qiu Y, *et al.* Topical administration of diminazene aceturate decreases inflammation in endotoxin-induced uveitis. *Mol Vis.* 2015;21:403-411.

Zhou T, Chuang CC, Zuo L. Molecular Characterization of Reactive Oxygen Species in Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. *Biomed Res Int.* 2015;2015:864946.

Zisman LS, Keller RS, Weaver B, Lin Q, Speth R, Bristow MR, *et al.* Increased angiotensin-(1–7)-forming activity in failing human heart ventricles: evidence for upregulation of the angiotensin-converting enzyme Homologue ACE2. *Circulation.* 2003;108:1707–1712.

Zohn IE, Symons M, Chrzanowska-Wodnicka M, Westwick JK, Der CJ. Mas oncogene signaling and transformation require the small GTP-binding protein Rac. *Mol Cell Biol.* 1998;18:1225-1235.

Zuo L, Roberts WJ, Tolomello RC, Goins AT. Ischemic and hypoxic preconditioning protect cardiac muscles via intracellular ROS signaling. *Front Biol.* 2013;8:305–311.

## 10. ANEXOS

**ANEXO 1:** Coutinho DC, Monnerat-Cahli G, Ferreira AJ, Medei E. Activation of angiotensin-converting enzyme 2 improves cardiac electrical changes in ventricular repolarization in streptozotocin-induced hyperglycaemic rats. *Europace*. 2014;16:1689-1696.



**ANEXO 2:** Monnerat-Cahli G, Trentin-Sonoda M, Guerra B, Manso G, Ferreira AC, Silva DL, Coutinho DC, Carneiro-Ramos MS, Rodrigues DC, Cabral-da-Silva MC, Goldenberg RC, Nascimento JH, Campos de Carvalho AC, Medei E. Bone marrow mesenchymal stromal cells rescue cardiac function in streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Cardiol.* 2014;171:199-208.

**ANEXO 3:** Foureaux G, Nogueira BS, Coutinho DC, Raizada MK, Nogueira JC, Ferreira AJ. Activation of endogenous angiotensin converting enzyme 2 prevents early injuries induced by hyperglycemia in rat retina. *Braz J Med Biol Res.* 2015;48:1109-1114.



**ANEXO 4:** Coutinho DC, Foureaux G, Rodrigues KD, Salles RL, Moraes PL, Murça TM, De Maria ML, Gomes ER, Santos RA, Guatimosim S, Ferreira AJ. Cardiovascular effects of angiotensin A: a novel peptide of the renin-angiotensin system. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst. 2014;15:480-486.

**ANEXO 5:** Dias-Peixoto MF, Ferreira AJ, Almeida PW, Braga VB, Coutinho DC, Melo DS, Gomes Filho A, Melo MB, Greco L, Campagnole-Santos MJ, Lima RF, Santos RA, Guatimosim S. The cardiac expression of Mas receptor is responsive to different physiological and pathological stimuli. *Peptides*. 2012;35:196-201.

**ANEXO 6:** Diminazene Aceturate unveils a new anti arrhythmogenic profile in ischemic reperfusion-induced cardiac injury. Artigo em redação.

**ANEXO 7:** DEPÓSITO DE PATENTE: Ferreira AJ, Foureaux G, Nogueira JC, Fulgencio GO, Nogueira BS, França JR, Faraco AAG, Santos RAS, Raizada MK, Coutinho DCO. Composições Farmacêuticas Contendo Ativadores Do Eixo Enzima Conversora De Angiotensina 2/Angiotensina-(1-7)/Receptor Mas Para Tratamento De Patologias Oculares. 2012.

## **ANEXO 8: APRESENTAÇÕES DE TRABALHOS EM CONGRESSOS**

**ANEXO 9: CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM  
EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL DA UFMG**