

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-graduação em Ciências Biológicas- Fisiologia e Farmacologia

Eduardo Nocchi

**VIAS DE SINALIZAÇÃO ATIVADAS PELO NOVO AGONISTA DO
RECEPTOR MAS, CGEN-856S, EM CARDIOMIÓCITOS**

Belo Horizonte

2015

EDUARDO NOCCHI

Vias de sinalização ativadas pelo novo agonista do receptor MAS, CGEN-856S,
em cardiomiócitos

Dissertação de mestrado apresentada
ao programa de pós-graduação em
ciências biológicas- Fisiologia e
Farmacologia da Universidade Federal
de Minas Gerais como requisito parcial
para obtenção de título de mestre em
ciências.

Orientadora: Prof. Dra. Sílvia Guatimosim

Co-orientador: Prof. Dr. Robson Augusto dos Santos

Belo Horizonte

2015

DEDICATÓRIA

Ao longo da nossa vida, experiências vividas nos provam que não é possível viver de maneira individualista. Em momentos difíceis, queremos ombros amigos para nos ajudar a superar as dificuldades. Nos momentos de alegria, precisamos desses mesmos ombros para podermos compartilhá-la. Por isso, não posso esquecer as pessoas que estão sempre presentes na minha vida. Eu dedico este trabalho à elas, principalmente:

À MINHA AVÓ, que todos os dias me mostra como uma família unida é importante,

À MINHA MÃE, que sempre esteve, está e estará ao meu lado,

AO MEU PAI, que já há algum tempo não está presente fisicamente, mas que preenche a minha memória com exemplos e lembranças felizes,

À FERNANDA, esposa, confidente, companheira, que compartilha comigo os momentos mais tristes e mais felizes da minha vida. Pessoa com a qual estou construindo um futuro sólido e amoroso,

E especialmente **À CATARINA**, minha filhinha, que me permitiu vivenciar um sentimento que até então eu nem sonhava que existia, um amor sem limites, incondicional...

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que me permitiram chegar até aqui, me proporcionando condições afetivas e financeiras para que eu atingisse este objetivo,

À Fernanda, que me tranquilizou e motivou nos momentos mais difíceis,

Ao meu irmão, Vitor, meu parceiro nas dificuldades e das alegrias,

Aos meus tios e primos, pela presença constante na minha vida.

À professora Sílvia Guatimosim, pelo voto de confiança e pela competência Profissional,

Ao professor Robson, pela oportunidade oferecida e confiança depositada,

Ao Pedro e a Mari, que além de grandes amigos, foram excelentes colegas de trabalho me ajudando em tudo que eu precisava,

Ao Serginho, que me ajudou muito na maioria dos experimentos, principalmente as culturas celulares,

À Amanda, pela parceria do dia a dia e pelos isolamentos feitos,

À Cibele, pelas dicas e conselhos que sempre me deu,

À Carol e Isabela, pela alegria no trabalho e espírito de equipe,

Ao Diogão, Bicas, Wallace e Aline, por fazerem do Eletrocel um ambiente tão agradável de se trabalhar.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição das causas de óbito no mundo.....	1
Figura 2: Distribuição das causas de óbitos entre óbitos decorrentes devido a doenças cardiovasculares em homens.....	2
Figura 3: Anormalidades associadas ao remodelamento cardíaco durante a hipertrofia patológica e insuficiência cardíaca.....	5
Figura 4: Visão clássica do sistema renina-angiotensina.....	9
Figura 5: Visão moderna do sistema renina-angiotensina.....	11
Figura 6: Vias de sinalização ativadas pela Ang-(1-7).....	13
Figura 7: CGEN-856S promove o aumento da produção de NO em cardiomiócitos ventriculares adultos.....	23
Figura 8: CGEN-857V é incapaz de promover aumentos significativos na produção de NO.....	24
Figura 9: CGEN-856S promove aumentos dos níveis de NO a partir de 10 minutos de incubação.....	25
Figura 10: Ang-(1-7) e CGEN-856S induzem aumentos semelhantes na produção de NO.....	27
Figura 11: A produção de NO, estimulada por CGEN-856S, está ausente em cardiomiócitos provenientes de camundongos Mas ^{-/-}	28
Figura 12: O tratamento agudo com CGEN-856S aumenta a fosforilação de AKT..	29

- Figura 13:** O tratamento crônico com CGEN-856S previne o aumento da área celular causado por Ang II.....31
- Figura 14:** O tratamento crônico com CGEN-856S previne a translocação de GRK-5 para o núcleo.....32
- Figura 15:** O grupo ANG II + CGEN-856S + A779 promove aumento da área celular semelhante ao grupo ANG II.....33
- Figura 16:** O grupo ANG II + CGEN-856S + A779 promove aumento da razão núcleo/citosol semelhante ao grupo ANG II.....34
- Figura 17:** O grupo ANG II + CGEN-856S + L-NAME promove aumento da área celular semelhante ao grupo ANG II.....35
- Figura 18:** O grupo ANG II + CGEN-856S + L-NAME promove aumento da razão núcleo/citosol semelhante ao grupo ANG II.....36
- Figura 19:** Os tratamentos com CGEN-856S antagonizam os efeitos de Ang II na frequência de contração.....37

LISTA DE ABREVIATURAS

- AKT**- Proteína Cinase B;
- Ang II**- Angiotensina II;
- Ang-(1-7)**- Angiotensina-(1-7);
- ANOVA**- Análise de Variância;
- ARA-C**- Citosina- β -d-arabinofuranosida;
- AT₁**- Receptor de Angiotensina II tipo 1;
- AT₂**- Receptor de Angiotensina II tipo 2;
- A779**- D-ala-(1-7);
- BNP**- Peptídeo cerebral natriurético tipo B;
- BSA**- Albumina de soro bovino;
- β -MHC**- Cadeia pesada de miosina- β ;
- Ca⁺²**- Cálcio;
- [Ca⁺²]_i**- Concentração de cálcio intracelular;
- CaMKII**- Calmodulina Cinase II;
- DAF-FM**- 4-amino-5methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetat;
- DAG**- Diacilglicerol;
- DAPI**- 4',6-diamidino-2-phenylindole;
- DMEN**- Meio de água modificado de Dulbelco;
- ECA**- Enzima Conversora de Angiotensina;
- ECA₂**- Enzima Conversora de Angiotensina 2;
- EDTA**- Ácido etilenodiamino terá-acético;
- eNOS** - Óxido nítrico sintase endotelial;
- ERK**- Cinase regulada por sinal extracelular;
- FOXO₁**- *Forkhead box protein O1*;
- GAPDH**- Gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase;
- GMPc**- Monofosfato cíclico de guanosina;
- GRK-5**- *G protein-coupled receptor kinase 5*;
- GSK-3 β** - Glicogênio Sintase Cinase-3 β ;
- HAT**- Histona acetiltransferase;
- HBSS**- Solução balanceada de Hank's;
- HDAC**- Histona deacetilase;
- IP₃**- Trifosfato de inositol;

JNK- *c-JunN-terminal kinase*;

L-NAME- N^G-nitro-L-arginine methyl ester;

MAPK- *Mitogen-activated protein kinases*;

MEF2- *Fator de crescimento de miócito tipo-2*;

NFAT- Fator nuclear de células T ativadas;

NGS- Soro normal de cabra;

NO- Óxido Nítrico;

PBS- Tampão fosfato salino;

PFA- Paraformaldeído;

PI3K- PI3 Cinase;

PKC- Proteína Cinase C;

PVDF- Fluoreto de Polivinilideno;

SDS- Dodecil sulfato de sódio;

SRA- Sistema renina angiotensina;

WHO- World Health Organization.

RESUMO

Conhecendo o efeito cardioprotetor do eixo angiotensina-(1-7) / Mas, novos agonistas do receptor Mas foram descritos. Shemesh *et al.* (2008) descreveram dois possíveis agonistas do receptor Mas: o CGEN-856S e CGEN-857V. O efeito cardioprotetor in vivo destes peptídeos foi confirmado por Savergnini *et al.* (2010). O objetivo deste trabalho foi investigar efeitos dos peptídeos CGEN-856S e CGEN857V na produção e modulação da via do óxido nítrico (NO) em cardiomiócitos e compará-los com os promovidos pela Ang-(1-7). Neste trabalho utilizou-se uma combinação de biologia molecular, microscopia confocal e um modelo de camundongo geneticamente modificado com deleção do receptor Mas (Mas^{-/-}). Foi avaliada a produção de NO com sonda fluorescente e a localização e expressão de proteínas através das técnicas de *western blot* e imunofluorescência. Também foi avaliado o efeito do tratamento agudo e os efeitos de cardioprotetores do tratamento crônico com os peptídeos. RESULTADOS: Os cardiomiócitos tratados com CGEN-856S apresentaram aumento significativo na produção de NO, não havendo diferenças entre as concentrações utilizadas. O tratamento com CGEN-857V não induziu o aumento da produção de NO. O mesmo aconteceu com cardiomiócitos provenientes de camundongos Mas^{-/-} quando tratados com CGEN-856S. Utilizando a técnica de *western blot*, foi possível observar aumento significativo da fosforilação da AKT no resíduo Serina 473 após o tratamento agudo com CGEN-856S. Paralelamente, cardiomiócitos neonatais tratados com Ang II por 36 horas apresentaram um aumento significativo da área celular, aumento na translocação para o núcleo de GRK-5 e redução na frequência de contração. Estes efeitos foram revertidos quando os cardiomiócitos foram tratados concomitantemente com Ang II e CGEN-856S. Os grupos de células onde o A779 ou o L-NAME foi adicionado ao CGEN-856S na presença de Ang II apresentaram resultados muito semelhantes àqueles encontrados no grupo tratado apenas com Ang II. CONCLUSÕES: O peptídeo CGEN-856S aumenta produção de óxido nítrico semelhante a Ang-(1-7). O mesmo não é observado no tratamento agudo com CGEN-857V. No tratamento crônico, o CGEN-856S antagoniza os efeitos promovidos pela a Ang II através da produção de NO. Os resultados permitem dizer que CGEN-856S age de forma e intensidade muito semelhante à Ang-(1-7), portanto, possui um grande potencial farmacológico.

ABSTRACT

Knowing the cardioprotective effects of angiotensin-(1-7)axis, new receptor agonists have been described. Shemesh et al. (2008) described two possible agonists of the receptor Mas: CGEN-856S and CGEN-857V. The cardioprotective effects of these peptides in vivo were confirmed by SAVERGNINI et al. (2010). The aim of this work was to investigate the effects of CGEN-856S and CGEN-857V peptides in the production and modulation of the nitric oxide pathway in cardiomyocytes and compare them with those promoted by Ang-(1-7). In this work we used a combination of molecular biology, confocal microscopy and a model of genetically modified mice with deletion of MAS receptor. The nitric oxide production was evaluated with a nitric oxide sensitive fluorescent probe. We also assessed the effect of acute treatment and the cardioprotective effects of chronic treatment with the peptides against Angiotensin II. Regardless of the concentration used, cardiomyocytes treated with CGEN-856S showed a significant increase in nitric oxide production, with no differences between the tested concentrations. On the contrary, treatment with CGEN-857V did not increase nitric oxide production. The same happened with cardiomyocytes from MAS knockout mice treated with CGEN-856S. Using western blot, we observed a significant increase in phosphorylation of AKT in the Serine 473 residue after acute treatment with CGEN-856S. We also tested the actions of CGEN-856S against Ang II induced hypertrophic effects. Neonatal cardiomyocytes treated with Ang II for 36 hours showed a significant increase in cell area, increased translocation of GRK5, and reduced the frequency of contractions. All these effects were prevented by concomitant treatment with CGEN-856S. When A779 (Mas receptor antagonist) or L-NAME (an inhibitor of nitric oxide synthases) was added to cells treated with Ang II and CGEN-856S, results similar to those found in cells incubated with Ang II alone were seen. CONCLUSIONS: In cardiac myocytes CGEN-856S peptide increases nitric oxide and is capable of preventing Ang II hypertrophic effects through the production of NO and via receptor Mas activation. These results indicate that CGEN-856S acts very similarly to Ang- (1-7) in cardiac myocytes.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO LITERÁRIA.....	4
2.1 Resposta cardíaca ao estresse.....	4
2.1.1 Hipertrofia Cardíaca.....	4
2.2 Sistema renina-angiotensina.....	8
2.3 Ação da Ang-(1-7) em cardiomiócitos.....	12
2.4 Novos agonistas do receptor Mas.....	13
3. OBJETIVO GERAL.....	15
3.1 Objetivos Específicos.....	15
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
4.1 Peptídeos CGEN.....	16
4.2 Animais.....	16
4.3 Isolamento e incubação dos cardiomiócitos ventriculares provenientes de camundongos adultos.....	17
4.4 Tratamentos de cardiomiócitos ventriculares.....	17
4.5 <i>Western Blot</i>	17
4.6 Medida da produção de óxido nítrico.....	19
4.7 Isolamento e cultura de cardiomiócitos provenientes de ratos neonatais.....	19
4.8 Tratamento crônico das culturas de cardiomiócitos neonatais.....	20
4.9 Imunofluorescência.....	20
4.10 Medida da frequência de contração das culturas de neonatos.....	21
4.11 Análise estatística.....	21
5. RESULTADOS.....	22
5.1 Efeitos da concentração dos peptídeos CGEN na produção de óxido nítrico em cardiomiócitos ventriculares adultos isolados, após um tratamento agudo.....	22

5.2 Efeito do tempo de tratamento na produção de óxido nítrico induzida pelo peptídeo CGEN-856S em cardiomiócitos ventriculares provenientes de camundongos adultos.....	25
5.3 Comparação entre a produção de óxido nítrico induzida pelo CGEN-856S com a da Ang-(1-7) em cardiomiócitos ventriculares adultos.....	26
5.4 Avaliação da participação do receptor Mas no aumento dos níveis de óxido nítrico, em cardiomiócitos ventriculares adultos, após o tratamento com CGEN-856S.....	27
5.5 Investigação da via de sinalização intracelular ativada pelo CGEN-856S envolvida na produção de óxido nítrico em cardiomiócitos ventriculares.....	29
5.6 Avaliação dos efeitos cardioprotetores após o tratamento crônico com o peptídeo CGEN-856S e possíveis vias de sinalização ativadas, em cultura de cardiomiócitos neonatais.....	30
5.7 Efeito do tratamento crônico com CGEN-856S na frequência de contração de culturas de cardiomiócitos neonatos.....	36
6. DISCUSSÃO.....	38
7. CONCLUSÃO.....	44
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

1.INTRODUÇÃO

Segundo a organização mundial da saúde (WHO), em 2008, dos 57 milhões de óbitos ocorridos no mundo, 36 milhões foram decorrentes de doenças não comunicáveis (diabetes melitus, câncer, doenças respiratórias, doenças cardiovasculares, etc.). Entre as doenças não comunicáveis, as doenças cardiovasculares somam 17,3 milhões de mortes, o que representa aproximadamente 30% do total de óbitos de 2008, sendo a maior causa de morte em todo o mundo (Figura 1).



Figura 1: Distribuição das causas de óbito no mundo (WHO,2011).

É possível subdividir as doenças cardiovasculares em:

- Doenças cardíacas isquêmicas, como o infarto agudo do miocárdio;
- Doenças cerebrovasculares, entre elas os acidentes encefálicos;
- Hipertensão arterial;
- Doenças inflamatórias cardíacas, como a miocardite;
- Doenças reumáticas cardíacas.

A figura 2 descreve, entre as doenças cardiovasculares, as causa de óbitos em indivíduos do sexo masculino.

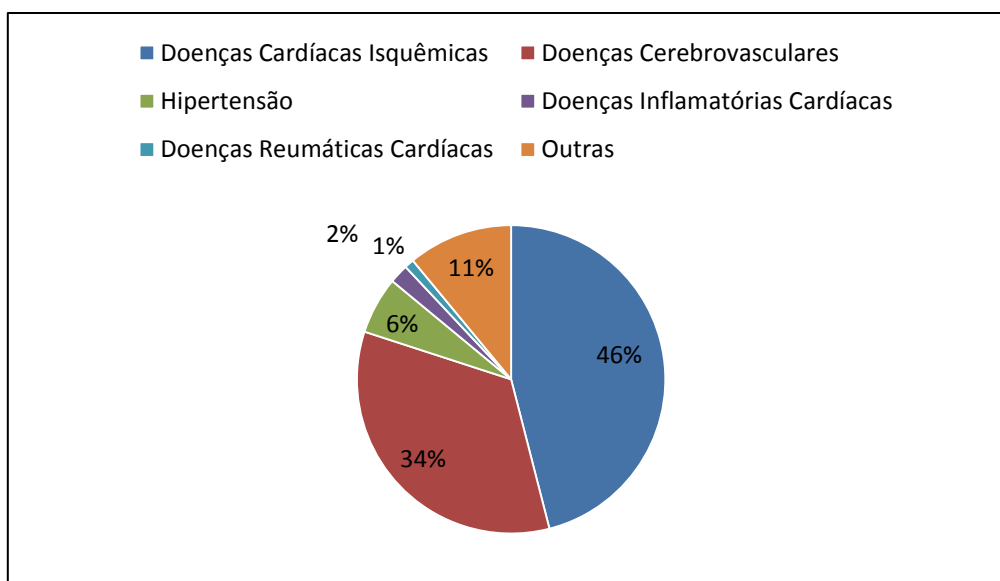


Figura 2: Distribuição das causas de óbitos entre óbitos decorrentes devido a doenças cardiovasculares em homens (WHO, 2011).

Como é sabido, a hipertensão arterial, além ser a causa direta de óbitos, é um fator de risco cardiovascular muito importante que ajuda a promover o desenvolvimento de outros problemas cardiovasculares, como o infarto agudo do miocárdio, a insuficiência cardíaca e os acidentes encefálicos. Mesmo com o refinamento no entendimento da patologia e o surgimento de novas drogas para o combate da mesma, muitos pacientes ainda apresentam a pressão arterial descontrolada (CHOBANIAN, 2009). Entre os fatores que podem levar a hipertensão arterial, o desbalanço do sistema renina-angiotensina tem papel primordial, tanto no seu surgimento, quanto na sua manutenção (UNGER, 2002). Em situações patológicas, o sistema renina-angiotensina está hiperestimulado, o que leva a liberação excessiva de angiotensina II. Esse hormônio peptídico, pode se ligar a dois receptores distintos (AT_1 e AT_2). Em situações fisiológicas e patológicas, a ação da angiotensina II acontece, primordialmente, pela ligação ao receptor AT_1 . Recentemente outro peptídeo, derivado da angiotensina II, demonstrou ter grande importância no sistema cardiovascular, a angiotensina-(1-7) (CAREY; SIRAGY, 2003). Diferentemente da angiotensina II, Ang-(1-7), ao se ligar ao receptor Mas, demonstrou ter um efeito cardioprotetor (FERREIRA; SANTOS, 2005).

Devido ao fato de os cardiomiócitos terem receptores para os componentes do sistema renina-angiotensina, além dos efeitos sistêmicos causados pelo desbalanço do sistema, ele também vai promover efeitos locais, diretamente nos cardiomiócitos, o que posteriormente gerará novos problemas sistêmicos (GOMES *et al.*, 2012). Dentre os efeitos deletérios causados pela exacerbação da produção de angiotensina II estão: o efeito hipertrófico, fibrótico, inflamatório e causador de estresse oxidativo (FERREIRA; SANTOS, 2005). A partir da descoberta da presença do receptor Mas em cardiomiócitos provenientes de ratos neonatais (TALLANT *et al.*, 2005) e em cardiomiócitos ventriculares adultos (DIAS-PEIXOTO *et al.*, 2012) aumentou-se o interesse de investigar o efeito cardioprotetor direto dos novos peptídeos descritos do sistema renina-angiotensina, principalmente a Ang-(1-7).

Conhecendo a influência do sistema renina-angiotensina para a manutenção da homeostase, e a relevância do desbalanço na fisiopatologia de diversas doenças cardiovasculares, investigar peptídeos que possam agir de forma positiva no eixo cardioprotetor Ang-(1-7)/Mas é de grande valia para a evolução de possíveis tratamentos para doenças cardiovasculares.

2.REVISÃO LITERÁRIA

2.1 Resposta cardíaca local ao estresse

Quando o coração é submetido ao estresse, ele passa por diversos processos que procuram manter o bom funcionamento do órgão. Normalmente, o coração sofre remodelamento, acompanhado de hipertrofia cardíaca, perda de função contrátil, reativação de genes fetais em detrimento as isoformas adultas, que em último caso, promove falha no bombeamento de sangue para o corpo (MCKINSEY; OLSON, 2005). Dentre os diversos fatores que podem provocar estas mudanças, podemos citar: hipertensão arterial, infarto agudo do miocárdio, distúrbios endócrinos, perda da eficiência na função contrátil decorrente de mutação de determinadas proteínas relacionadas à contração (PASSIER *et al.*, 2000).

2.1.1. Hipertrofia Cardíaca

A hipertrofia cardíaca patológica é um fenômeno que surge em decorrência de situações crônicas de estresse. Está presente em praticamente todas as doenças cardiovasculares. Ela surge, a princípio, como uma resposta adaptativa para compensar distúrbios de sobrecarga. Entretanto, se estes distúrbios permanecem de forma crônica, a hipertrofia leva a perda da função do miocárdio podendo causar à insuficiência cardíaca e morte súbita. Independentemente do estímulo causador, as consequências são semelhantes: aumento do tamanho do coração, ativação de respostas moleculares que levarão ao aumento do volume do cardiomiócito, aumento da expressão de genes fetais e redução da expressão de genes de adultos.

São vários os fatores que podem desencadear a hipertrofia cardíaca, como: angiotensina II (SADOSHIMA *et al.*, 1995), catecolaminas e agonistas adrenérgicos (ROCKMAN *et al.*, 2002), endotelina, aldosterona (YOUNG; FUNDER, 2000), sobrecarga mecânica (BUSTAMANTE *et al.*, 1991), etc. Apesar de um número elevado de fatores pró-hipertroficantes, o número de vias intracelulares de transdução de sinal é menor. Um dos principais gatilhos para início do processo de hipertrofia é o aumento da concentração de

cálcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$). A sobrecarga mecânica promove a ativação de canais de membrana que permitem a entrada acentuada de Ca^{2+} . A maioria dos fatores hipertróficos humorais age por meio de receptores acoplados à proteína G_q . Já foi demonstrado que a ligação desses fatores leva a ativação da fosfolipase C. Como resultado desta ativação, há a formação o diacilglicerol (DAG) e trifosfato de inositol (IP_3). O IP_3 , por sua vez, estimula a liberação de Ca^{2+} via retículo sarcoplasmático e DAG ativa proteína cinase C (PKC). Estes efeitos, em conjunto, causarão o aumento da $[Ca^{2+}]_i$. A figura 3 descreve as etapas que levam a hipertrofia e consequente perda de função.

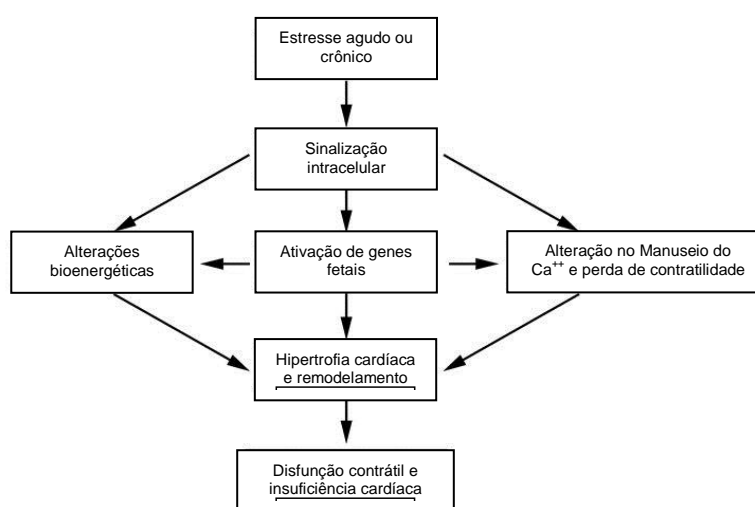


Figura 3: Anormalidades associadas ao remodelamento cardíaco durante a hipertrofia patológica e a insuficiência cardíaca (Adaptado de MCKINSEY; OLSON, 2005).

Entre as vias de sinalização responsáveis por desencadear o processo de hipertrofia, as vias calcineurina/NFAT, PI3K/AKT/GSK-3, MAPK/ERK e MEF2/HDAC são as principais.

CALCINEURINA/NFAT: A calcineurina é uma serina-treonina fosfatase que é expressa em diversos tecidos. É composta por duas subunidades, A subunidade A, que é catalítica, e a subunidade B regulatória. A subunidade B é codificada a partir de apenas um gene, a subunidade A apresenta três diferentes isoformas ($CnA\alpha$, $CnA\beta$, $CnA\gamma$). Essa fosfatase promove a defosforilação do fator de transcrição NFAT. A ativação da calcineurina acontece em decorrência do aumento sustentado de $[Ca^{2+}]_i$ e leva à

defosforilação de NFAT e sua consequente translocação para o núcleo. Ao chegar ao núcleo, o domínio REL de NFAT interage com o segundo dedo de zinco de GATA4. Esta interação promove a transcrição de genes fetais como: β -MHC e BNP, o que posteriormente leva a hipertrofia (MOLKENTIN *et al.*, 1998).

MAPK: Em cardiomiócitos, esta via de sinalização é ativada por receptores acoplados a proteína G, receptores tirosina cinase ou por estresse (SUGDEN; CLERK, 1998). Consiste em uma sequência de reações que, em última estância fosforila e ativa três enzimas p38, *c-JunN-terminal kinases (JNKs)* e *extracellular signaling-regulated kinases (ERKs)*. Depois de ativados, estes três possíveis ramos vão agir em diferentes alvos, incluindo GATA4. Até recentemente, não se sabia qual dos três ramos era o responsável em ativar esse fator de transcrição associado a efeitos hipertróficos. Bueno *et al.*(2000) demonstraram que o ramo MEK1/ERK_{1/2} é responsável pela fosforilação de GATA4 na S105. Esta fosforilação promove uma maior ligação de GATA4 ao DNA e maior transcrição de marcadores de estresse como BNP.

PI3K/AKT/GSK-3 β : Esta via pode ser ativada por receptores acoplados à proteína G, como receptores adrenérgicos, receptores tirosina cinase, como o receptor para IGF-1, quanto por estresse mecânico. O principal alvo da PI3K é a serina-treonina cinase AKT, também conhecida proteína cinase B (PKB). A AKT possui vários alvos intracelulares, dentre eles, dois têm relação direta com o processo de hipertrofia. A ativação de AKT pode ativar mTor, uma serina-treonina cinase implicada na síntese proteica. Outro alvo da ação da AKT é a enzima Glicogênio Sintase Cinase-3 β (GSK-3 β), que é fosforilada pela AKT no resíduo de Ser9. Esta enzima pertence a uma família conservada de serina-treonina cinases presentes em todos eucariotos. Nos cardiomiócitos está prioritariamente no citosol, mas também pode ser encontrada no núcleo (HAQ *et al.*, 2000). Uma característica importante de GSK-3 β é o fato de ela estar cataliticamente ativa, independentemente de estímulo. Desta maneira, a principal forma de controle é por meio da variação da expressão da proteína. Entretanto ela pode sofrer fosforilação no resíduo de tirosina 216, fato este que promove um aumento na ativação. A inibição de GSK-3 β acontece

principalmente pela fosforilação do resíduo de Ser 9. Esta enzima funciona como um regulador negativo da hipertrofia cardíaca, entre seus alvos estão NFAT e GATA4. Em geral, esta fosforilação gera ubiquitinação, transporte do fator do núcleo para o citosol, diminuição da ligação ao DNA, consequentemente redução da transcrição (HARDT; SADOSHIMA, 2002).

MEF2/HDAC: O DNA dos eucariotos é enovelado em forma de cromatina, esse processo impede que fatores de transcrição interajam com o DNA, impedindo a transcrição. A unidade básica desse enovelamento é o nucleossomo, que consiste no empacotamento do DNA ao redor de um octâmero de histonas. Para que haja a transcrição, esse complexo deve ser relaxado, permitindo que os fatores de transcrição entrem em contato direto com os genes alvo. O controle desse empacotamento depende da acetilação das histonas do nucleossomo. Quando estas histonas estão acetiladas o complexo fica relaxado. Duas enzimas controlam esta acetilação: Histona acetiltransferase (HATs), que acetila as histonas, e, portanto possibilita a transcrição gênica e a enzima Histona desacetilase (HDAC) que desacetila as histonas, e dessa maneira reprime a transcrição gênica (MCKINSEY; OLSON, 2005).

Em mamíferos, três classes de HDAC estão presentes, sendo que a classe HDAC II está presente em cardiomiócitos e está relacionada à prevenção da hipertrofia cardíaca induzida por vários agonistas (ZHANG *et al.*, 2002; BUSH *et al.*, 2004; VEGA *et al.*, 2004). A classe HDAC II possui, em sua porção amino terminal, 500 resíduos de aminoácidos que funcionam como sítios de ligação para fatores de transcrição. Um desses fatores de transcrição que interage com HDAC II é MEF2. MEF2 é um fator de transcrição que ativa genes responsáveis pelo crescimento do cardiomiócito. A ação desse fator de transcrição é regulada pela formação de um complexo com HDAC II. O complexo funciona como repressor da transcrição gênica. Quando os cardiomiócitos estão sujeitos a fatores hipertróficos o complexo é dissociado e MEF2 pode interagir com o DNA. Duas vias de sinalização ativadas por agonistas hipertróficos foram descritas como causadoras da dissociação do complexo.

O aumento da $[Ca^{2+}]_i$ causa um aumento da ligação desse íon à proteína calmodulina (CaM). Este complexo ativa a enzima calmodulina cinase

(CaMK) que fosforila HDAC II. Esta fosforilação promove a dissociação do complexo MEF2/HDAC e posterior translocação de HDAC para o citosol. Outro mecanismo de dissociação do complexo ocorre quando receptores acoplados à proteína G_q são ativados, esta ativação promove a translocação de GRK-5 para o núcleo. Esta cinase age fosforilando HDACII. A fosforilação causa a translocação de HDAC II para o citosol (MARTINI *et al.*, 2008).

2.2 Sistema renina-angiotensina

O Sistema renina-angiotensina é formado por um conjunto de hormônios, cuja principal função é ajudar a manter a homeostase da pressão arterial e do equilíbrio eletrolítico do organismo. Para exercer esta função, um conjunto de células especializadas forma o aparelho justaglomerular, composto pela mácula densa, massa de células localizadas na região do ramo ascendente da alça de Henle, e as células justaglomerulares, conjunto de células musculares lisas modificadas da túnica média da arteríola aferente. A mácula densa funciona como um sensor de NaCl, que é estimulado quando há uma redução na concentração do mesmo no filtrado que atinge a alça de Henle. Esta estimulação promove uma ação parácrina sobre as células justaglomerulares induzindo a liberação de renina. A renina é uma enzima que cliva o angiotensinogênio em angiotensina I. A angiotensina I é convertida em angiotensina II pela Enzima conversora de angiotensina (ECA), esta clivagem acontece principalmente no pulmão. Após atingir a corrente sanguínea, este hormônio vai agir após ligação aos receptores específicos para ang II, AT_1 e AT_2 (DE GASPARO *et al.*, 2000). A figura 4 ilustra a visão clássica de atuação do sistema renina-angiotensina, na qual existe apenas um eixo de ação. A ação principal da ang II, no controle da pressão arterial e no balanço eletrolítico, é mediada pelo receptor AT_1 (VOLPE *et al.*, 2003). Além dos túbulos distais, diversos tipos celulares apresentam os receptores para a angiotensina II, dentre elas os cardiomiócitos (FERREIRA; SANTOS, 2005).

Em situações patológicas, onde a ativação do sistema está exacerbada, a angiotensina II tem ações deletérias como: vasoconstrição, aumento do cronotropismo e do inotropismo, ação arritmogênica, proliferação celular, hipertrofia celular, inflamação, ação trombogênica, entre outras

(FERREIRA; SANTOS, 2005). Desta maneira, uma desregulação da função desse eixo tem grandes efeitos deletérios ao sistema cardiovascular, que podem levar o indivíduo ao óbito.

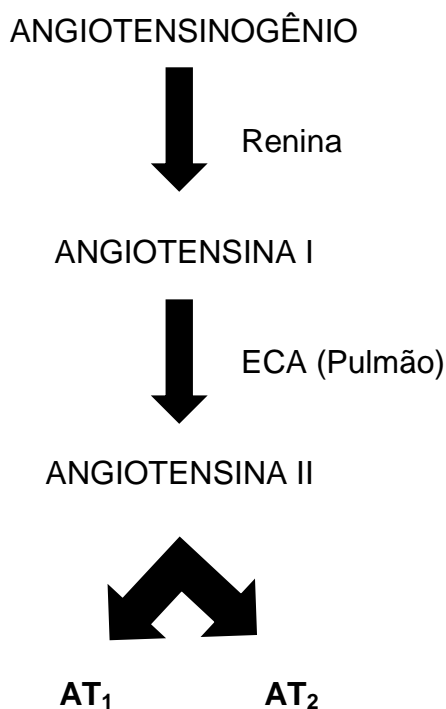


Figura 4: Visão clássica do sistema renina-angiotensina.

Estudos recentes levaram a identificação de novos componentes desse sistema. Foram descritas as angiotensinas III, IV, (2-10), (1-9), (1-7), (1-5), a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), o receptor Mas e o receptor de renina. Entre os novos peptídeos descritos, a Ang-(1-7) tem papel muito relevante (FERREIRA; SANTOS, 2005).

A Ang-(1-7) foi descrita pela primeira vez em cérebros de cães, como sendo apenas um metabólito da angiotensina I (SANTOS *et al.*, 1988). Entretanto, estudos posteriores demonstraram que a Ang-(1-7) teria efeitos opostos a angiotensina II (BENTER *et al.*, 1993; BENTER *et al.*, 1995; CAMPAGNOLE-SANTOS *et al.*, 1989;). Mais tarde, a Ang-(1-7) foi definitivamente reconhecida como biologicamente ativa (CAREY; SIRAGY, 2003; FERREIRA, SANTOS; BRADFORD, 2010; SANTOS; CAMPAGNOLE-SANTOS; ANDRADE, 2000;). Nos últimos anos, foi possível entender como

ocorrem os efeitos biológicos desse pequeno peptídeo derivado da angiotensina II. A recente descoberta da ECA2 (DONOGHUE *et al.*, 2000; TIPNIS *et al.*, 2000;) e a descrição da sua função na clivagem de angiotensina II em Ang-(1-7), e menos eficientemente angiotensina I em Ang-(1-9) (VICKERS *et al.*, 2002) esclareceu como a Ang-(1-7) é formada. A identificação do receptor Mas, receptor acoplado à proteína G, identificou o mecanismo de ação do peptídeo. A figura 5 ilustra a visão atual do sistema renina-angiotensina e seus componentes.

O proto-oncogene que codifica o receptor Mas foi primeiramente detectado por Young *et al.* (1986), como sendo um gene que codifica uma proteína com sete domínios transmembra. Estas características permitiram especular que esta proteína pertencia à classe I dos receptores transmembrana acoplados à proteína G (GPCRs). Em mamíferos, este gene é expresso predominantemente nos testículos e em algumas áreas do cérebro, como: hipocampo e amígdala. Entretanto também é expresso em outras regiões do organismo, como: rins e coração (ALENINA *et al.*, 2002). Utilizando o ensaio de influxo de Ca^{+2} em células transfectadas com o receptor Mas, Jackson *et al.* (1988) sugeriram que esta proteína poderia ser um receptor para Ang II, mais tarde, entretanto, Ambroz *et al.* (1991) demonstraram que o influxo de Ca^{+2} em células transfectadas somente acontecia quando estas células já apresentavam endogenamente o receptor AT_1 . Utilizando camundongos com deleção do proto-oncogene que codifica o receptor Mas e células cotransfectadas, Santos *et al.* (2003) identificaram o heptapeptídeo, Ang-(1-7), como sendo o ligante endógeno para o receptor Mas. Estudos posteriores demonstraram que o receptor Mas tem um grande papel fisiológico antagonizando as ações do receptor AT_1 .

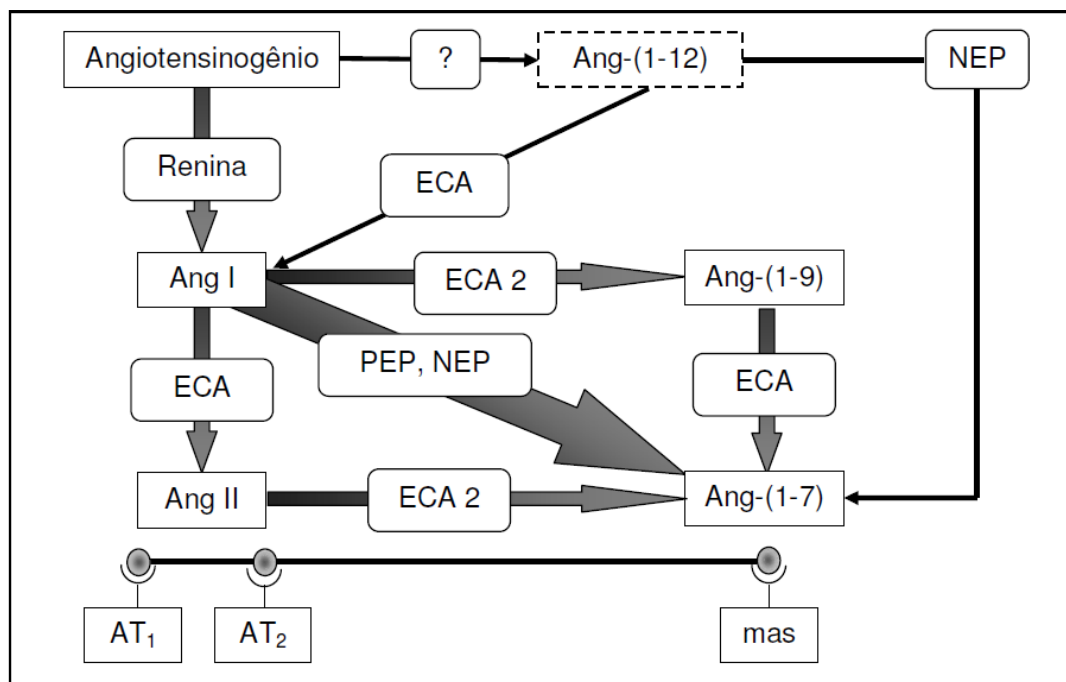


Figura 5: Visão moderna do sistema renina-angiotensina. ECA= enzima conversora de angiotensina, ECA2= enzima conversora de angiotensina 2, NEP= endopeptidase neutra, PEP= prolilendopeptidase (JESSUP, 2008).

A partir dos resultados anteriores, criou-se uma nova visão do sistema renina-angiotensina, na qual é possível perceber dois eixos de atuações antagônicas, o eixo Angiotensina II/AT₁, que promove ações deletérias (vasoconstrição, aumento do cronotropismo e do inotropismo, ação arritmogênica, proliferação celular, hipertrofia celular, inflamação, ação trombogênica) e o eixo Ang-(1-7)/Mas, com ações cardioprotetoras (vasodilatação, potencialização do efeito vasodilatador promovido pela bradicinina, anti-arritmogênico, melhora da função contrátil pós-evento isquêmico e efeito anti-proliferativo) (FERREIRA; SANTOS, 2005).

Tendo em vista a ação cardioprotetora do eixo Ang-(1-7)/Mas, estudos recentes investigaram a possível ação farmacológica destes peptídeos. Foi demonstrado que a formulação oral contendo Ang-(1-7) foi capaz de melhorar a função cardíaca e reduzir a área infartada em animais tratados com isoproterenol (MARQUES *et al.*, 2011). Apesar da descrição das ações sistêmicas da Ang-(1-7), pouco se sabia de sua ação celular. Levando-se em consideração os achados cardioprotetores sistêmicos e a importância do cardiomiócito para a função cardíaca, novos estudos tiveram como objetivo investigar a ação da Ang-(1-7) diretamente no cardiomiócito.

2.3 Ação da Ang-(1-7) em cardiomiócitos

Tallant *et al.* (2005), identificaram através de imunofluorescência e *western blot* a presença do receptor Mas em cardiomiócitos neonatais e demonstraram o efeito direto da Ang-(1-7) na prevenção da hipertrofia celular pela inibição da via MAPK/ERK_{1/2}. Dias-Peixoto *et al.* (2012) identificaram a presença do receptor Mas em cardiomiócitos adultos e que a interação Ang-(1-7)/Mas tem importante função na manutenção da estrutura e da função cardíaca. Dias-Peixoto *et al.* (2008), descreveram que a ligação da Ang-(1-7) ao receptor Mas promove a ativação da enzima PI3K, que por sua vez fosforila AKT no resíduo de serina na posição 473. A AKT fosforilada, ativa a enzima eNOS. A ativação de eNOS leva ao aumento da liberação de óxido nítrico. Dias-Peixoto *et al.* (2008) também observaram que o tratamento agudo com Ang-(1-7) não promove alterações no manejo do cálcio intracelular, entretanto camundongos nocaute para o receptor Mas naturalmente apresentavam redução do transiente de cálcio. Gomes *et al.* (2010), além de confirmar a via demonstrada anteriormente por Dias-Peixoto *et al.* (2008), demonstraram que o efeito cardioprotetor promovido pelo aumento da produção de óxido nítrico acontece via interação com GMPc. Ainda nesse trabalho, os autores demonstraram que a Ang-(1-7) é capaz de prevenir a translocação de NFAT induzida por Ang II, bloqueando o desenvolvimento da resposta hipertrófica. A figura 6 ilustra, de forma resumida, a interação de vias que se interagem durante o processo hipertrófico, como é o caso da translocação do NFAT e a principal via contrarreguladora promovida pelo eixo Ang-(1-7)/Mas.

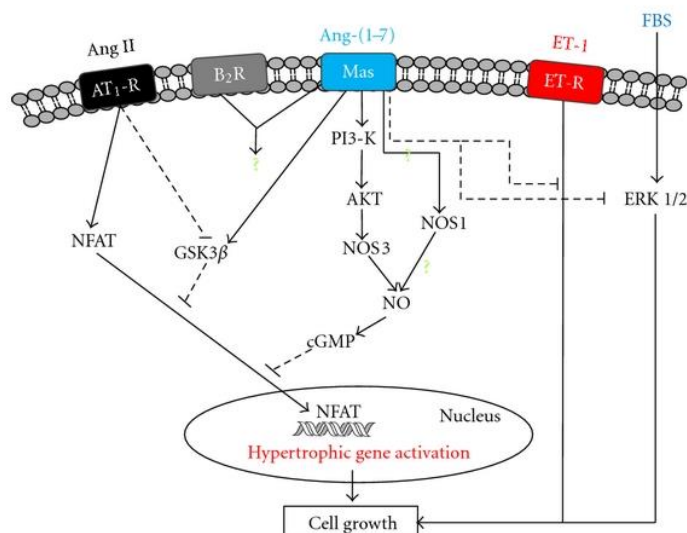


Figura 6: Vias de sinalização ativadas pela Ang-(1-7). O tratamento com Ang-(1-7) promove um aumento na produção de NO via PI3K/AKT. Este NO interage com GMPc inibindo a translocação de NFAT para o núcleo. Ang-(1-7) também ativa GSK-3 β , que promove a translocação de NFAT do núcleo para o citosol e consequentemente inibindo o efeito hipertrofico. Ang-(1-7) inibe a via ERK1/2 e da Endotelina que também têm efeitos hipertroficos. Ang II = Angiotensina II; ANG-(1-7) = Angiotensina 1-7; ET-1 = Endotelina; FBS = soro fetal bovino; AT₁-R = Receptor AT₁; B₂R = Receptor de Bradicinina do tipo 2; Mas = Receptor Mas; ET-R = receptor de endotelina; NFAT = Fator nuclear de ativação de células T; GSK-3 β = Glicogênio sintase cinase 3 β ; PI3K = fosfatidilinositol 3-cinase; AKT = Proteína cinase B; NOS₃ = óxido nítrico sintase 3; NO = óxido nítrico; cGMP = Guanosina monofosfato cíclica; \rightarrow = ativação; $---$ = inativação. (GOMES *et al.*, 2012)

2.4 Novos agonistas do receptor Mas

A superfamília dos receptores acoplados a proteína G é o grupo mais abundante de receptores encontrado na superfície celular, correspondendo aproximadamente 800 genes do genoma humano. Devido a essa presença abundante e da grande importância em processos fisiológicos e fisiopatológicos, eles são grandes alvos de estudos farmacológicos (HUANG, 2005). Desta maneira, várias empresas têm realizado grandes esforços para conhecer novos ligantes a este grupo de receptores. Atualmente, uma das técnicas mais utilizadas para o estudo de novos ligantes é a bioinformática, que utiliza métodos computacionais para prever homologias entre receptores acoplados à proteína G e possíveis ligantes (SHEMESH *et al.*, 2008).

A empresa de biotecnologia *CompugenLtd* (TelAviv, Israel) desenvolveu um método computacional que foi capaz de descobrir novos ligantes de receptores acoplados a proteína G, a partir de proteínas humanas. Este método se baseou em um programa que identificava prováveis peptídeos

endógenos provenientes de clivagens de proteínas secretadas endogenamente (KLIGER *et al.*, 2008; SHEMESH *et al.*, 2008). Ao final do processo de seleção, 33 peptídeos foram descritos (SHEMESH *et al.*, 2008). Esses 33 peptídeos foram avaliados quanto à ativação de 152 receptores com importância clínica. O receptor Mas estava neste seleto grupo de receptores. Para avaliar a ativação do receptor Mas, foi realizado o ensaio de fluxo de cálcio em células ovarianas de hamister (CHO-K1) transfectadas com o receptor Mas. Dos 33 peptídeos testados, apenas dois promoveram o influxo de cálcio, o CGEN-856 e o CGEN-857. Estes peptídeos, cujas sequências de aminoácidos são FLGYCIYLNRRKRRGDPAFKRRLRD (CGEN-856) e SMCHRWSRAVLFPAA HRP (CGEN-857), não apresentam homologia com nenhuma das angiotensinas ou a nenhum outro ligante conhecido. Devido à presença de um resíduo de cisteína na composição de ambos, duas formas para cada peptídeo foi criada. A forma monomérica, na qual a cisteína foi trocada por serina ou valina (CGEN-856S e CGEN-857V, respectivamente) e as formas diméricas (CGEN-856 e CGEN-857). Ambas as formas promoveram o influxo de cálcio nas células CHO.

Com o intuito de investigar os efeitos destes novos agonistas do receptor Mas, Savergnini *et al.* (2010) avaliaram a ação dos peptídeos frente a diferentes parâmetros, tais como: reatividade vascular, a função cardíaca, e as arritmias de reperfusão. A partir dos experimentos realizados foi possível concluir que os novos peptídeos foram capazes de promover vasodilatação, e esta ação foi mediada pelo receptor Mas. Tiveram efeito anti-arritmogênico e melhoraram a função cardíaca pós evento isquêmico. O CGEN-856S reduziu a hipertrofia causada pelo tratamento com isoproterenol e reduziu a pressão arterial de ratos SHR, após o tratamento crônico. Além disso, o CGEN-856S apresenta baixa afinidade de ligação aos receptores de angiotensina II, sendo capaz de competir pelo mesmo sítio de ligação com a Ang-(1-7).

A partir do que foi exposto acima, e da importância da célula cardíaca para o bom funcionamento do sistema cardiovascular como um todo, investigar os efeitos destes novos peptídeos sobre os cardiomiócitos tem grande importância. Desta maneira, efeito dos novos agonistas do receptor Mas, CGEN-856-S e CGEN-857V, sobre os cardiomiócitos serão investigados neste trabalho.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos dos novos agonistas do receptor Mas, CGEN-856S e CGEN-857V, na produção e na modulação da via do Óxido Nítrico em cardiomiócitos.

3.1 Objetivos Específicos

1. Investigar os efeitos do CGEN-856S e CGEN-857V na produção de NO em cardiomiócitos;
2. Comparar os efeitos do CGEN-856S e com o efeito da Ang-(1-7) na produção de NO;
3. Investigar as vias de sinalização envolvidas nos efeitos do CGEN-856S na produção de NO;
4. Investigar os efeitos do CGEN-856S e na modulação de vias hipertróficas em cardiomiócitos;
5. Investigar o efeito do CGEN-856S na frequência de contração do cardiomiócito.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Peptídeos CGEN

Os peptídeos foram produzidos pela companhia *Pepscan Inc.* (Holanda). Os compostos foram purificados por cromatografia líquida de alta pressão (>90% de pureza), confirmado por espectrometria de massa. Todos os compostos são hidrossolúveis. Segue abaixo outras informações importantes dos peptídeos.

CGEN-856S

Peso molecular: 2998,4 g/mol

Pureza: 95% em ácido trifluoroacético (TFA)

Aparência: pó branco

Sequência de aminoácidos: FLGYCIYLNKRKRRGDPAFKRRLRD

CGEN-857V

Peso molecular: 2118,5 g/mol

Pureza: 95% em ácido trifluoroacético (TFA)

Aparência: pó branco

Sequência de aminoácidos: SMCHRWSRAVLFPAAHRP

4.2 Animais

Para realização dos experimentos, foram utilizados camundongos C57BL6, camundongos C57BL6 nocaute para o receptor Mas, de 8 a 12 semanas de idade, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), com livre acesso à água e ração e com ciclo claro/escuro de 14/10 horas. E ratos wistar neonatos de 1 a 3 dias fornecidos pelo CEBIO. Procedimentos que envolvem animais e seus cuidados foram conduzidos conforme (GILES, 1987).

4.3 Isolamento dos cardiomiócitos ventriculares adultos

Para obtenção dos cardiomiócitos, utilizou-se o procedimento padrão para a dissociação enzimática do tecido cardíaco. Os animais, depois de sacrificados, tinham o coração rapidamente retirado e perfundido retrogradamente pelo método de Langendorff, com uma solução livre de Ca^{2+} (solução de digestão), contendo NaCl 130mM, KCl 5,4mM, HEPES 25mM, MgCl_2 0,5mM, NaH_2PO_4 0,33 mM, ácido láctico 1mM, ácido pirúvico 3mM, glicose 22mM e insulina 10 μ /l. O coração foi perfundido com o tampão de digestão até lavar todo o sangue. Após a lavagem, o coração foi perfundido com o tampão de digestão adicionando 50 μ M de CaCl_2 e 1mg/ml de colagenase do tipo II durante quinze minutos. Terminada a digestão enzimática, as câmaras ventriculares foram separadas, dilaceradas e homogeneizadas para a dissociação mecânica. Após a dissociação dos cardiomiócitos, as células foram colocadas em tyrode que contendo NaCl 140mM, KCl 5mM, HEPES 10mM, MgCl_2 1mM, NaH_2PO_4 0,33 mM, CaCl_2 1,8mM e insulina 10 μ /l. As células isoladas eram prontamente utilizadas.

4.4 Tratamentos de cardiomiócitos ventriculares adultos isolados

Após o isolamento dos cardiomiócitos, utilizando o procedimento padrão de dissociação enzimática, as células foram incubadas com CGEN-856S ou CGEN-857V nas concentrações de 1 μ M, 100nM e 10nM, dependendo objetivo do experimento, com o tempo de incubação variando de zero e 35 minutos.

4.5 Western blot

Para análise da expressão proteica, os cardiomiócitos foram homogeneizados em tampão de lise com detergente (1M NaCl; 5M Tris-Base; 5mM EDTA-2Na; 50mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$; 1mM MgCl_2 ; pH=8,0; Nonidet P40 1%; Triton X-100 0,3% e Sodium deoxycholate 0,5%) contendo inibidores de protease (15,7mg/mL de Benzamidina, 1mM Aprotinina, 5 μ M Pepstatina A, 1 mM de PMSF, 1mM Inibidor completo de proteases) e inibidores de fosfatases

(20 mM NaF e 1mM Na₃V₀₄). Após quarenta minutos de homogeneização. As proteínas foram quantificadas utilizando o método de Bradford (BRADFORD, 1976). De 30 a 50mg do homogenato de proteínas foi diluído (5µg/mL) em tampão de amostra (4x TrisHCl/SDS Ph=6,8, 3% glicerol, 1% DE SDS, 0,6% β-mercaptoetanol, Azul de Bromofenol) para separação em gel de SDS-PAGE (Sodium-dodecyl (lauryl) sulfate-poliacrilamida) em concentração de 10%. Para controle da massa molecular das proteínas, foi utilizado um padrão de massa molecular (BIO-RAD).

Após serem separadas em gel, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF. A qualidade da transferência foi avaliada através da coloração da membrana com solução de Ponceau (0,2%). As membranas foram lavadas com TBS-Tween (1%) e colocadas por uma hora em solução de bloqueio (TBS-Tween com 5% de leite desnatado) com o intuito de evitar a formação de ligações inespecíficas. Terminado o bloqueio, as membranas foram lavadas com TBS-Tween, para retirar o excesso de leite, e incubadas *overnight* em câmara fria, com temperatura de 4°C, com anticorpo primário específico.

Foram utilizados os anticorpos: anti-pAkt (1:1000) (CellSignaling), e anti-gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (1:5000) (Santa Cruz Biotechnology). Após a incubação com anticorpo primário, as membranas foram lavadas com TBS-Tween durante trinta minutos com troca de solução a cada cinco minutos e incubadas com o anticorpo secundário conjugado à peroxidase (cabra anti-coelho IgG-HRP 1:10000 ou cabra anti-camundongo IgG-HRP 1:10000, ambos Sigma-Aldrich). As membranas foram lavadas novamente, seguindo o mesmo protocolo utilizado na lavagem do anticorpo primário. As bandas proteicas foram detectadas pelo aparelho ImageQuant LAS 4000 por de reação de quimioluminescência (ECL prime – Amersham Biotechnology). A intensidade das bandas foi avaliada por análise densitométricas utilizando o software ImageQuant TL 8.1. Em todos os experimentos os níveis proteicos foram normalizados pelos níveis de expressão de GAPDH.

4.6 Medida da produção de óxido nítrico

A medida da produção de óxido nítrico em cardiomiócitos ventriculares adultos foi realizada através de uma sonda fluorescente sensível ao óxido nítrico, DAF-FM (4-amino-5methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetat) (Molecular Probes), excitada no comprimento de onda de 488nm e com emissão em 515nm. Para detectar o óxido nítrico citosólico, os cardiomiócitos isolados eram incubados a 37°C com 5µM de DAF-FM por trinta minutos e posteriormente lavados por mais trinta minutos em tyrode. A fluorescência decorrente da produção de óxido nítrico foi captada utilizando microscopia confocal (Zeiss 510 Meta) (ICB, CAPI, UFMG) e a análise realizadas no software ImageJ (NIH).

4.7 Isolamento e cultura de cardiomiócitos ventriculares neonatais

Foram retirados quinze corações de ratos wistar com idade ente um e três dias. Estes corações foram colocados em meio HBSS (Sigma-Aldrich), e posteriormente dilacerados e lavados para evitar a presença excessiva de hemácias. Depois dessa etapa, fragmentos de tecido cardíaco de tamanho aproximado de 1mm eram colocados em uma solução contendo 8mL de meio HBSS e 2mL de solução de tripsina 0,1mg/mL. Estas células, então, eram colocadas em agitação durante dezoito horas, a 4°C. Passadas as dezoito horas, eram acrescentados 1 mL de inibidor de tripsina e uma solução contendo 5ml de meio L15 (Sigma-Aldrich) mais 5mg de Colagenase, Depois deste acréscimo, as células foram mantidas em agitação por quarenta minutos, em temperatura ambiente. Passada a digestão enzimática, foi realizada a digestão mecânica utilizando uma pipeta de vidro de 12 mL. Após a digestão mecânica, as células eram filtradas utilizando um filtro com poros de 0.22µm. O filtrado era centrifugado a 1400 rpm por cinco minutos em temperatura ambiente. Após a centrifugação as células sedimentadas no fundo do tubo eram ressuspendidas em meio DMEM (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100u/mL de penicilina e 100u/mL de estreptomicina. Os cardiomiócitos foram plaqueados em lamínulas pré-tratadas com fibronectina e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Um dia depois do plaqueamento,

adicionou-se ao meio de cultura 20µg de ARA-C para inibir o crescimento de células que não seja cardiomiócitos, principalmente fibroblastos. Após 24 a 48 horas na presença de ARA-C, o meio de cultura foi trocado. O novo meio de cultura era igual o anterior exceto pela ausência de ARA-C. A partir deste estágio as células estavam prontas para o tratamento crônico.

4.8 Tratamento crônico das culturas de cardiomiócitos neonatais

Para análise dos efeitos dos peptídeos sobre a hipertrofia dos cardiomiócitos neonatais, as culturas celulares foram tratadas por 36 horas (um tratamento a cada seis horas). Foram realizados seis tratamentos: controle, Ang II (100nM), Ang II (100nM) mais CGEN-856S (100nM), CGEN-856S (100nM), Ang II(100nM) mais CGEN-856S (100nM) mais A779 (1µM) , Ang II(100nM) mais CGEN-856S (100nM) mais L-NAME (1µM).

4.9 Imunofluorescência

Após o tratamento crônico, os cardiomiócitos neonatais foram lavados rapidamente utilizando tyrode. Em seguida, fixados em paraformaldeído (PFA) 4% durante quinze minutos e permeabilizados com uma solução contendo PBS e Triton X-100 0,5% também por quinze minutos (três períodos de cinco minutos). Terminada a permeabilização, as células foram incubadas com uma solução de bloqueio (PBS, Triton X-100 0,5%, BSA 1% e NGS 5%) durante uma hora. O próximo passo foi a incubação com os anticorpos primários diluídos em solução de bloqueio *overnight* em câmara fria, com temperatura de 4°C. Os anticorpos primários utilizados foram: anti-GRK-5 (Santa Cruz Biotechnology) (1:50) e anti-α-actinina (Santa Cruz Biotechnology) (1:150). Na manhã seguinte, os cardiomiócitos foram lavados com PBS durante trinta minutos com troca de solução a cada cinco minutos. Após a lavagem, foram incubados com os anticorpos secundários (anti-coelho e anti-camundongo conjugado com Alexa 488 e Alexa 633 respectivamente – Molecular Probes) e DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), diluídos em solução de bloqueio, por uma hora. A incubação foi seguida de lavagem com PBS por trinta minutos seguindo o mesmo protocolo da lavagem anterior. As imagens

foram capturadas por microscopia confocal (Zeiss 510 Meta) (ICB, CAPI, UFMG) e analisadas no software ImageJ (NIH).

4.10 Medida da frequência de contração das culturas de neonatos

Após o tratamento crônico, as culturas de neonatos eram filmadas durante cinco minutos em ambiente com temperatura de 37°C e 5% de CO₂. Estes vídeos eram posteriormente assistidos por duas pessoas que contavam o número de contrações realizadas por um determinado sincício de cardiomiócitos. Era considerada contração do sincício, quando todas as células contraíam simultaneamente. Após a contagem, o número de contrações observado durante os cinco minutos era dividido por cinco para se obter a média aritmética das contrações por minuto. Em seguida, era realizada uma média aritmética dos resultados dos dois avaliadores. É importante salientar que os avaliadores eram os mesmos durante todo o processo.

4.11 Análise estatística

Os dados foram apresentados como a média \pm o desvio padrão. Para comparações de duas variáveis foi utilizado o teste *t student* e, para comparação de mais de duas variáveis foi utilizado o teste one way ANOVA seguido do teste de Bonferroni. O nível de significância foi estabelecido para um $*p < 0.05$.

5. RESULTADOS

5.1 Efeitos da concentração dos peptídeos CGEN na produção de óxido nítrico em cardiomiócitos ventriculares, após um tratamento agudo.

Para verificar se o peptídeo CGEN-856S é capaz de elevar a produção de óxido nítrico, cardiomiócitos ventriculares foram isolados de camundongos C57BL6 e divididos em grupos para serem tratados com diferentes concentrações do peptídeo.

Foi observado na figura 7, que independentemente da concentração testada, o peptídeo CGEN-856S foi capaz de promover o aumento da produção de óxido nítrico entre cinco e vinte minutos de tratamento. Entretanto, não houve diferença na produção de óxido nítrico quando a comparação é feita entre as diferentes concentrações utilizadas (1 μ M, 100nM, 10nM).

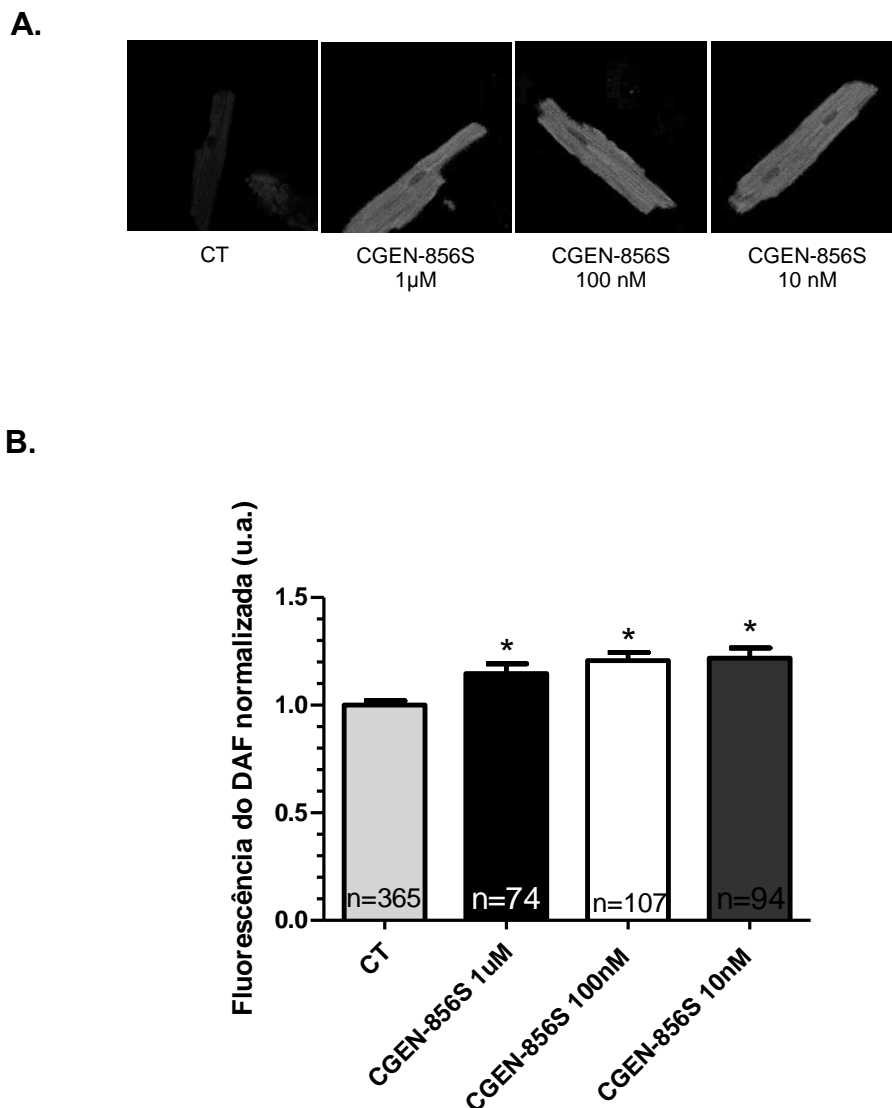


Figura 7: CGEN-856S promove o aumento da produção de NO em cardiomiócitos ventriculares adultos. **A.** Imagens representativas: **CT** – controle; **CGEN-856S 1 μM**; **CGEN-856S 100 nM**; **CGEN-856S 10 nM**. **B.** Gráfico de barras representando a média das medidas de fluorescência, normalizada pela média de fluorescência do grupo controle. n= número de células. * = $p < 0,05$ quando comparado com o grupo **CT**.

Com o intuito de investigar se o CGEN-857V também é capaz de levar a produção de óxido nítrico, cardiomiócitos ventriculares provenientes de camundongos adultos C57BL6 foram tratados durante vinte minutos com o peptídeo CGEN-857V nas mesmas concentrações do experimento apresentado na figura anterior.

Como é possível perceber na figura 8, o tratamento com CGEN-857V promoveu um pequeno aumento na produção de óxido nítrico,

independentemente da concentração utilizada, embora aconteça este ligeiro aumento, em nenhuma concentração utilizada este aumento foi significativo.

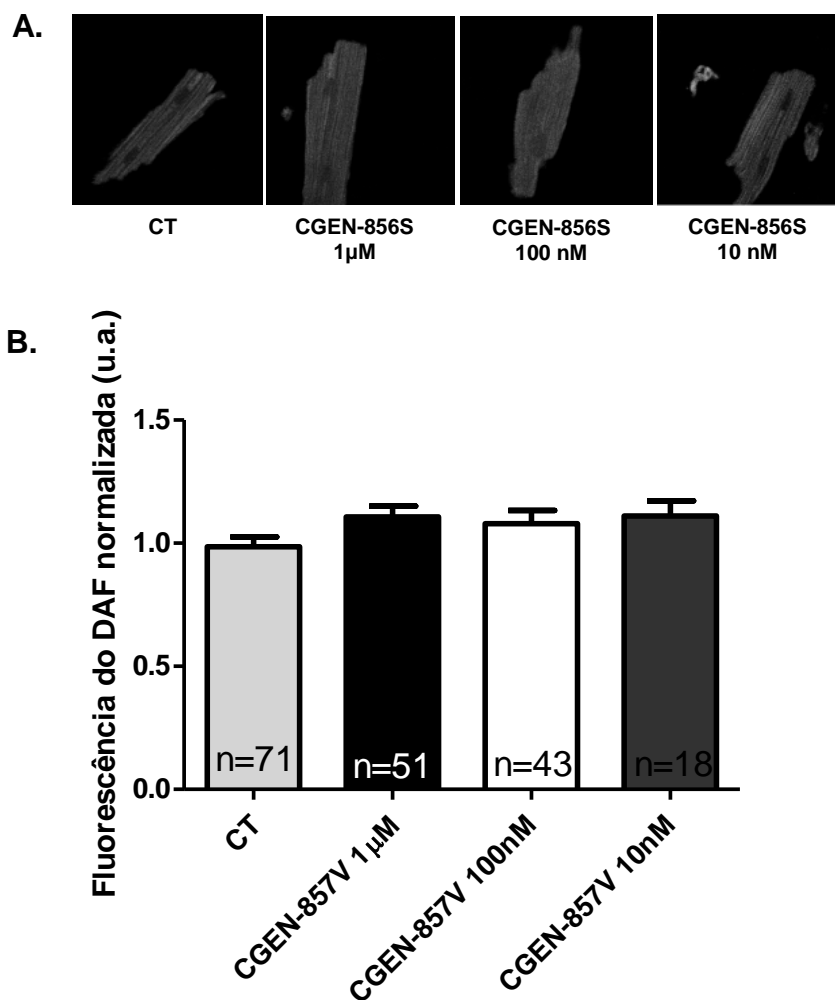


Figura 8: CGEN-857V é incapaz de produzir aumentos significativos na produção de NO. **A.** Imagens representativas: **CT** – controle; **CGEN-857V 1µM**; **CGEN-857V 100nM**; **CGEN-857V 10nM**. **B.** Gráfico de barras representando a média das medidas de fluorescência, normalizados pela média de fluorescência do controle. n= número de células.

A partir dos resultados encontrados em relação à produção de óxido nítrico dos dois peptídeos, foi decidido utilizar somente o CGEN-856S na concentração de 100nM para o restante dos experimentos a serem executados.

5.2 Efeito do tempo de tratamento na produção de óxido nítrico induzida pelo peptídeo CGEN-856S em cardiomiócitos ventriculares provenientes de camundongos adultos.

Para investigar a influência do tempo de incubação com o peptídeo sobre a produção de óxido nítrico em cardiomiócitos, as células isoladas foram incubadas com 100nM de CGEN-856S ao longo de 35 minutos. Os níveis de óxido nítrico foram avaliados durante todo o período, utilizando a fluorescência do DAF como referência.

A figura 9 mostra que o CGEN-856S aumenta os níveis de óxido nítrico logo após a incubação, este aumento começa a se tornar significativo a partir do grupo de dez minutos e permanece significativamente aumentado até o final do experimento. É possível perceber um aumento gradual até vinte minutos de tratamento, período no qual os níveis de óxido nítrico parecem se estabilizar. Apesar do aumento gradual com o tempo, não há diferenças significativas entre os grupos, a exceção do grupo cinco minutos.

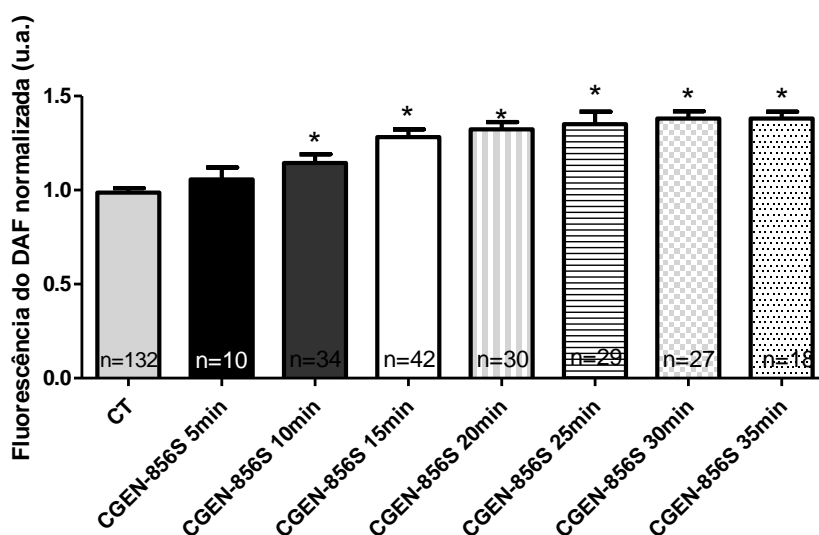


Figura 9: CGEN-856S promove aumentos significativos dos níveis de NO a partir de dez minutos de incubação. **CT**= Controle; **CGEN-856S 5min**= imagens capturadas entre zero e cinco minutos de incubação; **CGEN-856S 10min**= cinco e dez minutos; **CGEN-856S 15min**= dez a quinze minutos; **CGEN-856S 20min**= quinze a vinte minutos; **CGEN-856S 25min**= vinte a 25 minutos; **CGEN-856S 30min**= 25 a trinta minutos; **CGEN-856S 35min**=trinta a 35 minutos de incubação. * = $p < 0,05$ quando comparado com o grupo **CT**. n= número de células.

5.3 Comparação entre a produção de óxido nítrico induzida pelo CGEN-856S com a da Ang-(1-7) em cardiomiócitos ventriculares adultos

Com o objetivo de comparar a produção de óxido nítrico desencadeada por Ang-(1-7) e CGEN-856S, cardiomiócitos adultos isolados foram divididos em três grupos: Controle (CT); Ang-(1-7) 100nM e CGEN-856S 100nM, ambos tratados durante vinte minutos.

Como é possível notar, ambos os tratamentos foram capazes de promover um aumento significativo nos níveis de óxido nítrico quando comparados aos níveis encontrados no controle, e a amplitude deste aumento é semelhante nos dois tratamentos, e a amplitude deste aumento é semelhante nos dois tratamentos.

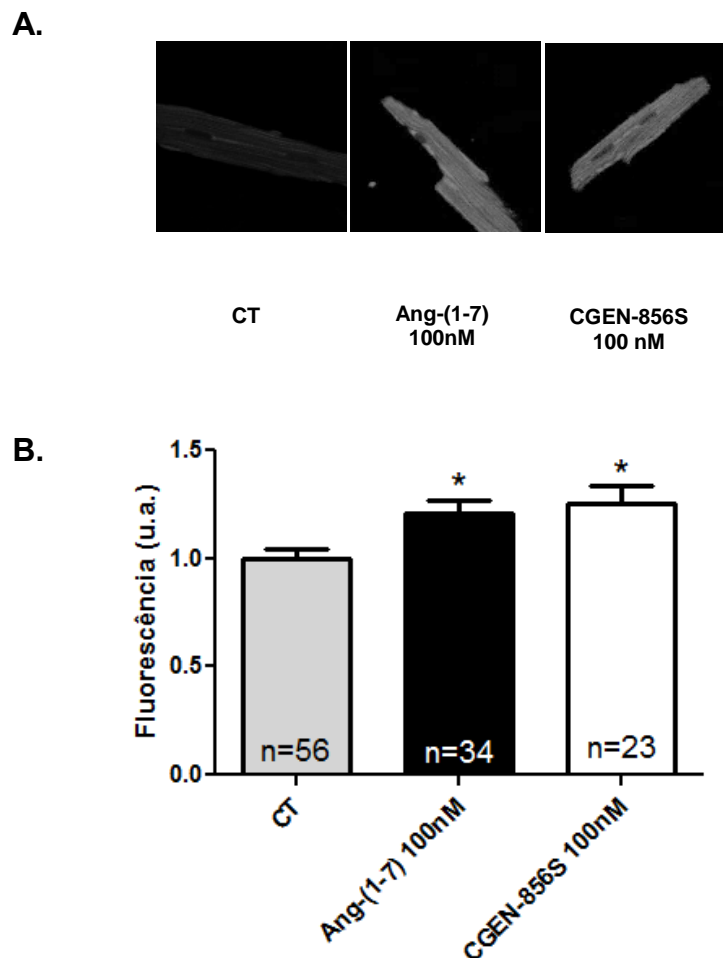


Figura 10: Ang-(1-7) e CGEN-856S produzem aumentos semelhantes na produção de óxido nítrico. **A.** Imagens representativas: **CT** – controle; **Ang-(1-7) 100nM**; **CGEN-856S 100nM**. **B.** Gráfico de barras representando a média das medidas de fluorescência, normalizados pela média de fluorescência do controle. n= número de células. * = $p < 0,05$ quando comparado com o grupo CT.

5.4 Avaliação da participação do receptor Mas no aumento dos níveis de óxido nítrico, em cardiomiócitos ventriculares adultos, após o tratamento com CGEN-856S

Para investigar a participação do receptor Mas no aumento da produção de óxido nítrico, cardiomiócitos ventriculares adultos foram isolados a partir de camundongos nocaute para o receptor Mas e tratados com CGEN-856S nas concentrações: 1 μ M, 100nM e 10nM durante vinte minutos. Imagens dessas células foram capturadas entre cinco e vinte minutos após incubação com CGEN-856S.

A figura 11 mostra que o aumento dos níveis de óxido nítrico não é observado em cardiomiócitos isolados provenientes de camundongos nocaute para o receptor Mas, independentemente da concentração utilizada.

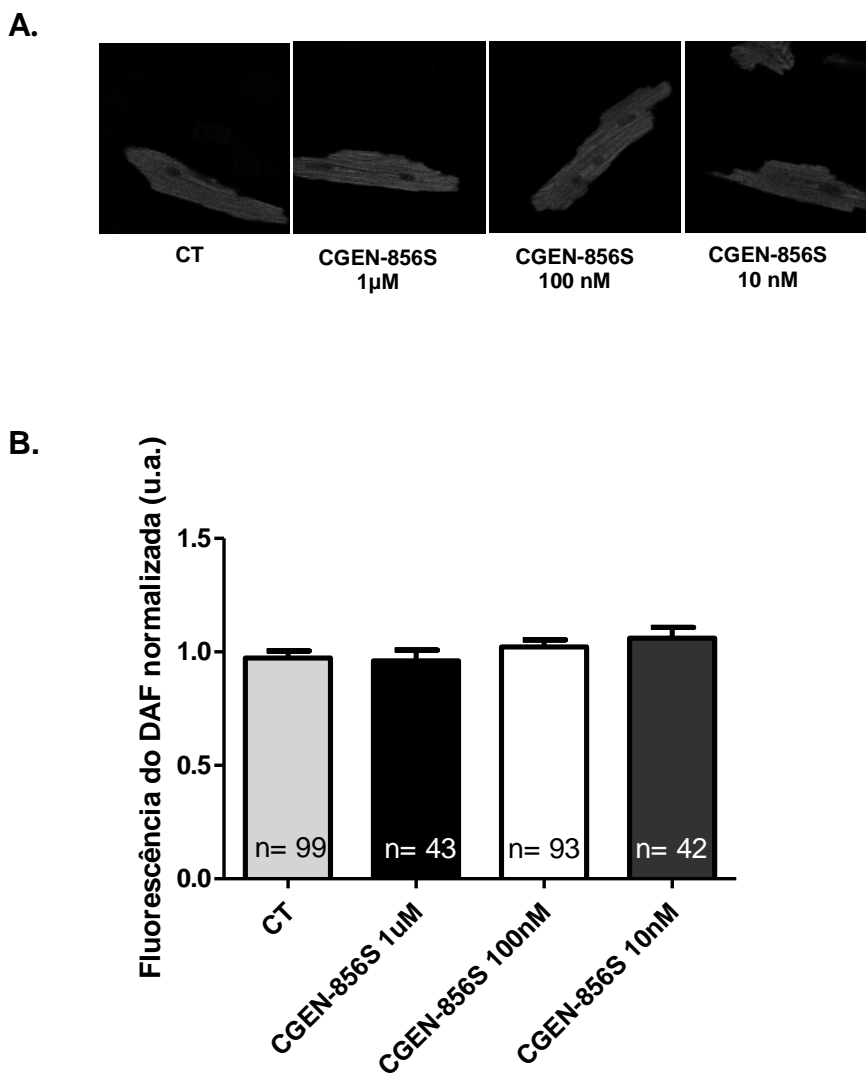


Figura 11: A produção de NO estimulada por CGEN-856S está ausente em cardiomiócitos provenientes de camundongos Mas^{-/-}. **A.** Imagens representativas: **CT**= Controle; **CGEN-856S-1µM**; **CGEN-856S 100nM**; **CGEN-856S 10nM**. **B.** Gráfico das medidas de fluorescência, normalizados pela média de fluorescência do controle. n= número de células.

5.5 Investigação da via de sinalização intracelular ativada pelo CGEN-856S envolvida na produção de óxido nítrico em cardiomiócitos ventriculares.

Para investigar a via de sinalização ativada pela ligação do CGEN-856S ao receptor Mas, proteínas foram extraídas de cardiomiócitos ventriculares adultos. Foi realizada a técnica *Western Blot* para quantificar a fosforilação da AKT no resíduo serina 473, sítio de fosforilação, que quando ativado, leva a ativação das óxido nítrico sintases (NOSs). Como observado na figura 12, o tratamento com CGEN-856S promove um aumento significativo da fosforilação da AKT.

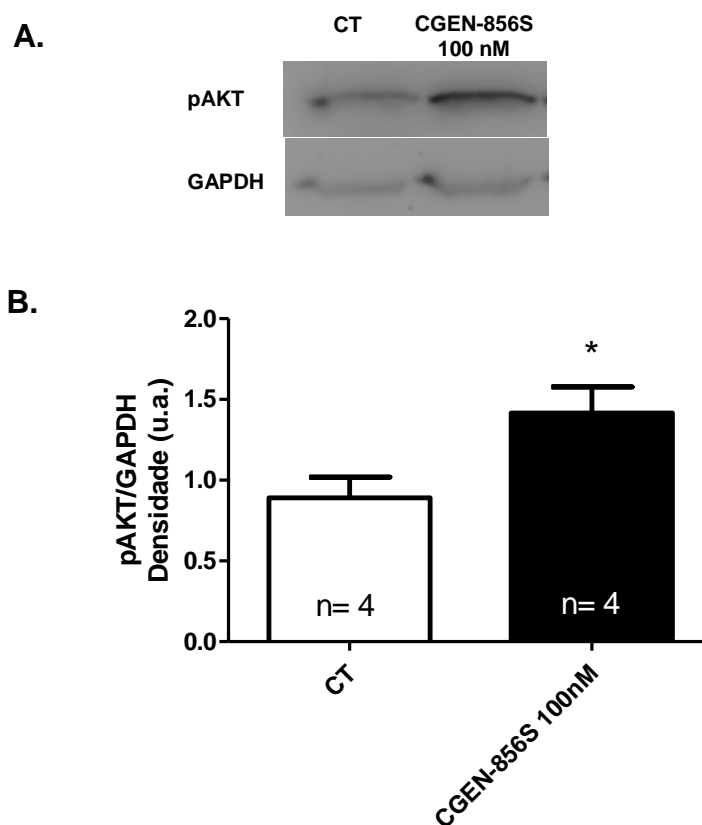


Figura 12: O tratamento agudo com CGEN-856S aumenta a fosforilação de AKT. **A.** Gel representativo da expressão de pAKT. **B.** Gráfico de barras com a média da expressão de pAKT. n= número de experimentos independentes. * = $p < 0,05$ quando comparado com o grupo CT.

5.6 Avaliação dos efeitos cardioprotetores após o tratamento crônico com o peptídeo CGEN-856S e possíveis vias de sinalização ativadas, em cultura de cardiomiócitos neonatais

Após a determinação dos efeitos do CGEN-856S na produção e liberação de óxido nítrico a partir de tratamentos agudos, os efeitos crônicos deste peptídeo foram avaliados em cultura de cardiomiócitos neonatais. Para isso, culturas de cardiomiócitos provenientes de ratos wistar neonatos de um a três dias foram realizadas.

Como o intuito de investigar os efeitos anti-hipertróficos promovidos pelo CGEN-856S, culturas de cardiomiócitos neonatais foram divididas em quatro grupos experimentais: controle (CT); Angiotensina II 100nM (ANG II); Angiotensina II 100nM mais CGEN-856S 100nM (ANG II+CGEN-856S); CGEN-856S 100nM (CGEN-856S). O tratamento teve duração de 36 horas com aplicação dos peptídeos a cada seis horas. Terminado o tratamento, lâminas de imunofluorescência foram confeccionadas e observadas em microscopia confocal. Para avaliação dos efeitos cardioprotetores, foram avaliados dois parâmetros: a área celular e a translocação do fator hipertrófico GRK-5, que quando é ativado em resposta ao tratamento com Ang II, se encaminha para o núcleo, favorecendo a transcrição de genes hipertróficos.

Como o esperado, o tratamento crônico com Ang II promoveu um aumento significativo da área celular em relação ao controle. Este aumento foi prevenido quando o tratamento com Ang II foi concomitante ao tratamento com o CGEN-856S. Quando os cardiomiócitos foram incubados somente com CGEN-856S, não houve aumento da área celular em relação ao grupo controle.

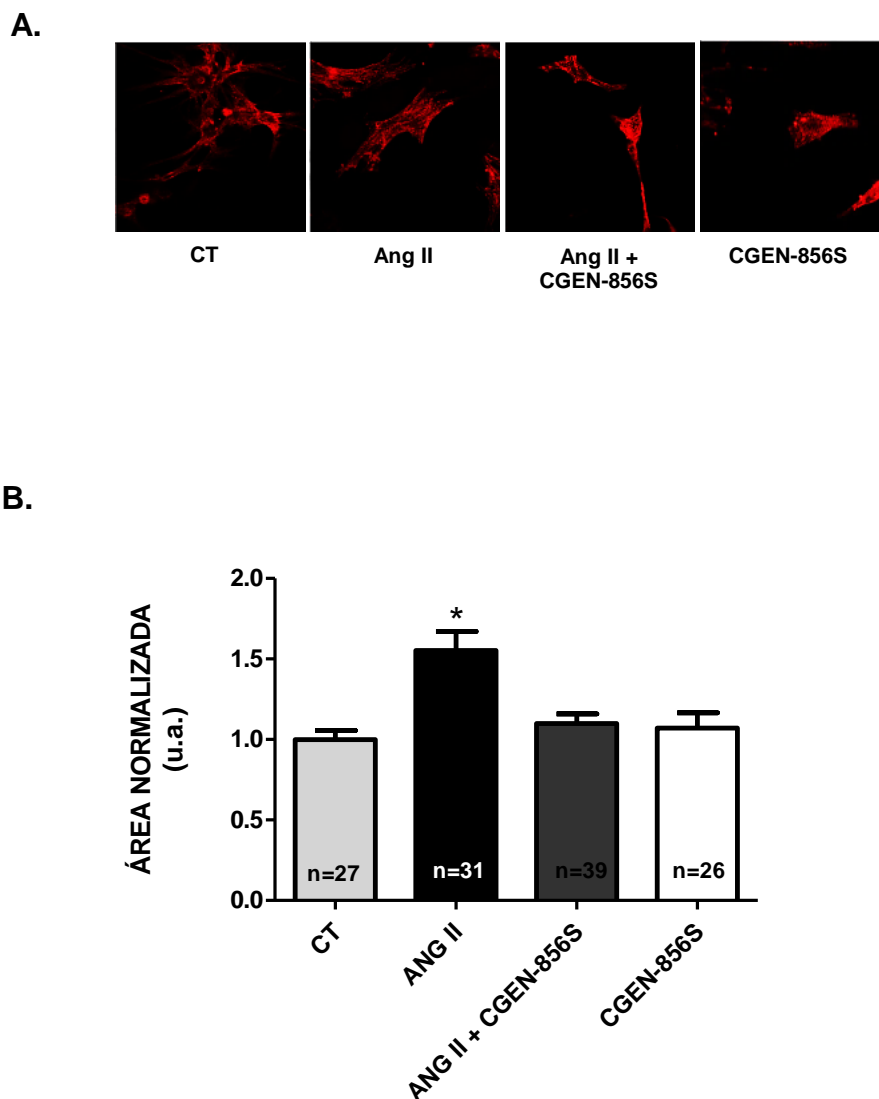


Figura 13: O tratamento crônico com CGEN-856S previne o aumento da área celular promovido por Ang II. **A.** Imagens representativas obtidas a partir da microscopia confocal do citoesqueleto celular, marcado em vermelho (α -actinina). **B.** gráfico de barras com a média da área celular normalizada pelo controle. **CT-** controle; **ANG II-** Angiotensina II 100nM; **ANGII + CGEN-856S-** Angiotensina II 100nM mais CGEN-856S 100nM; **CGEN-856S-** CGEN-856S 100nM. n= número de células. *= $p < 0,05$ quando comparado com os outros grupos experimentais.

Foi possível observar a mesma tendência quando foi avaliada a translocação de GRK-5, o grupo ANG II promoveu um aumento da razão da fluorescência núcleo/citosol, indicando a translocação para o núcleo. Esse aumento foi prevenido no grupo ANG II + CGEN-856S. Não houve diferença significativa no grupo CGEN-856S.

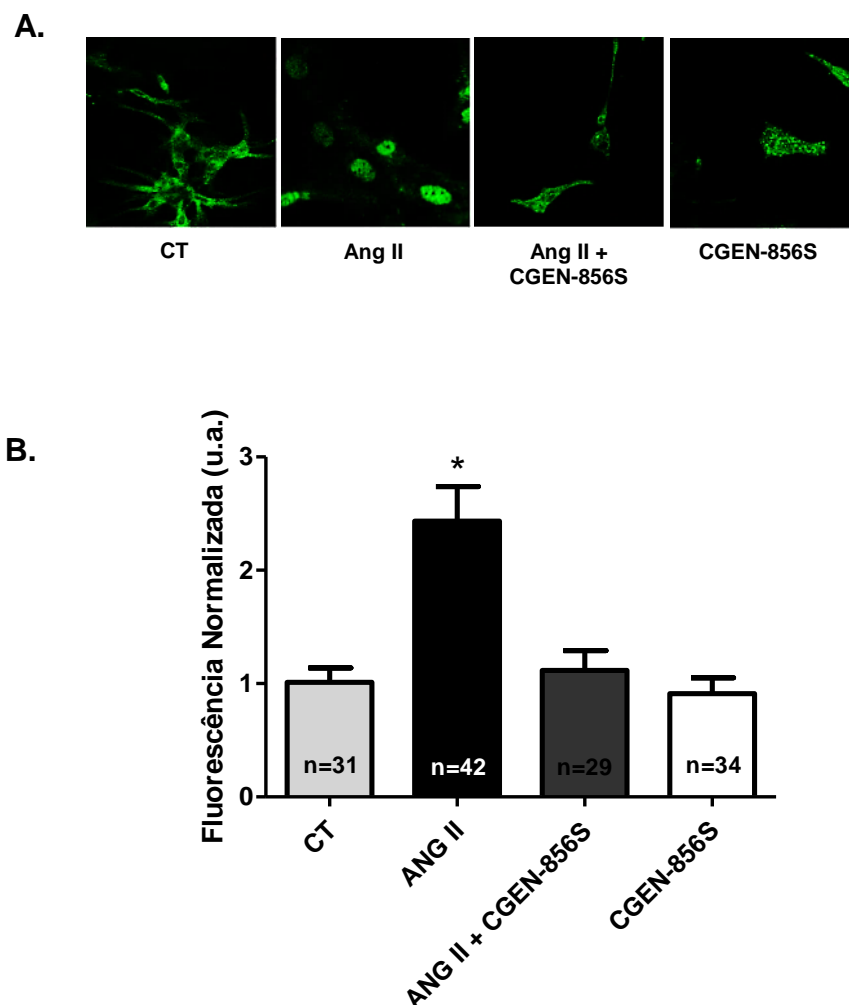


Figura 14: O tratamento crônico com CGEN-856S previne a translocação de GRK-5 para o núcleo. **A.** Imagens representativas obtidas a partir da microscopia confocal de GRK-5 (verde). **B.** Gráfico de barras com a média da razão núcleo/citoplasma encontrados a partir da análise densitométrica. **CT-** controle; **ANG II-** Angiotensina II 100nM; **ANGII+CGEN-856S-** Angiotensina II 100nM mais CGEN-856S 100nM; **CGEN-856S-** CGEN-856S 100nM. n= número de células. *=p<0,05 quando comparado com os outros grupos experimentais.

Após a demonstração do efeito anti-hipertrofico de CGEN-856S, o próximo passo a ser investigado foi a participação do receptor Mas na produção desse efeito cardioprotetor. Para isso, os cardiomiócitos neonatais foram divididos nos seguintes grupos: controle (**CT**); Angiotensina II 100nM (**ANGII**); Angiotensina II 100nM mais CGEN-856S 100nM (**ANGII+CGEN-856S**); D-Ala-Ang-(1-7) 1µM (**A779**). A779 é um conhecido antagonista seletivo de Ang-(1-7).

A figura 15 mostra, como anteriormente, o efeito cardioprotetor de CGEN-856S, este efeito é inibido quando os cardiomiócitos neonatais foram tratados simultaneamente com Ang II, CGEN-856S e A779. O grupo A779 apresentou área celular semelhante ao grupo ANG II.

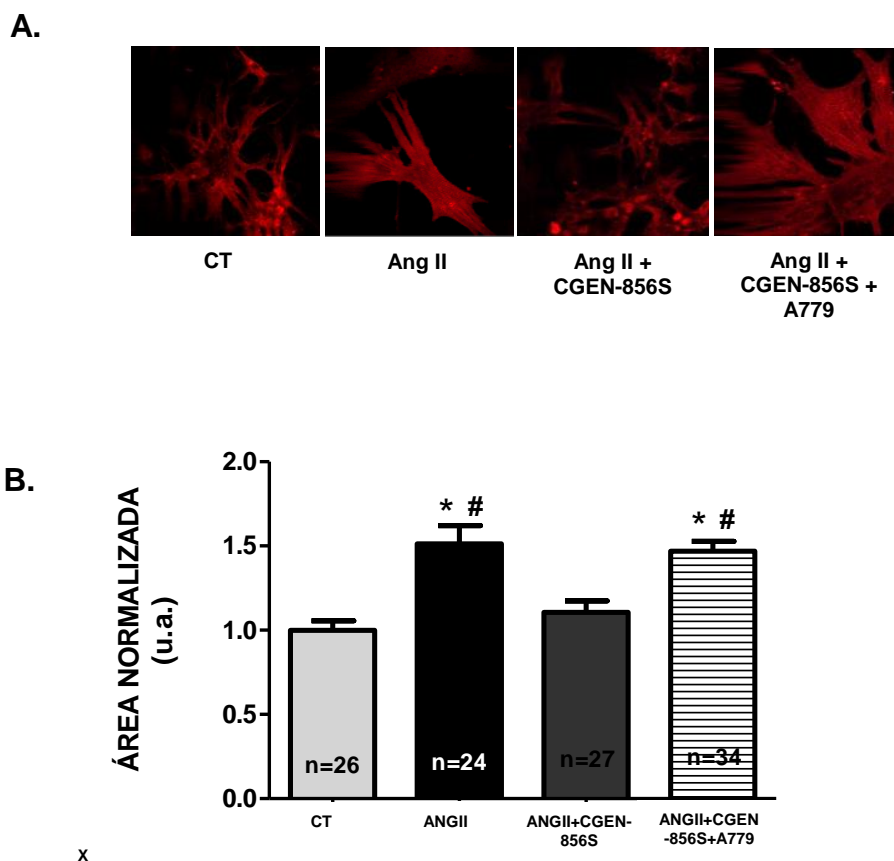


Figura 15: O grupo ANGII + CGEN-856S + A779 promove aumento da área celular semelhante ao grupo ANGII. **A.** Imagens representativas obtidas a partir da microscopia confocal do citoesqueleto celular, marcado em vermelho (α -actinina). **B.** Gráfico de barras com a média da área celular. **CT-** controle; **ANGII-** Angiotensina II 100nM; **ANGII+CGEN-856S-** Angiotensina II 100nM mais CGEN-856S 100nM; **ANGII+CGEN-856S+A779-** Angiotensina II 100nM mais CGEN-856S 100nM + A779 1 μ M. n= número de células. *=p<0,05 quando comparado com o grupo **CT**. #=p<0,05 quando comparado com o grupo **ANGII+CGEN-856S**.

A inibição do efeito cardioprotetor também pode ser comprovada a partir da translocação de GRK-5. A figura 16 indica que razão núcleo/citosol do grupo A779 não apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo ANG II.

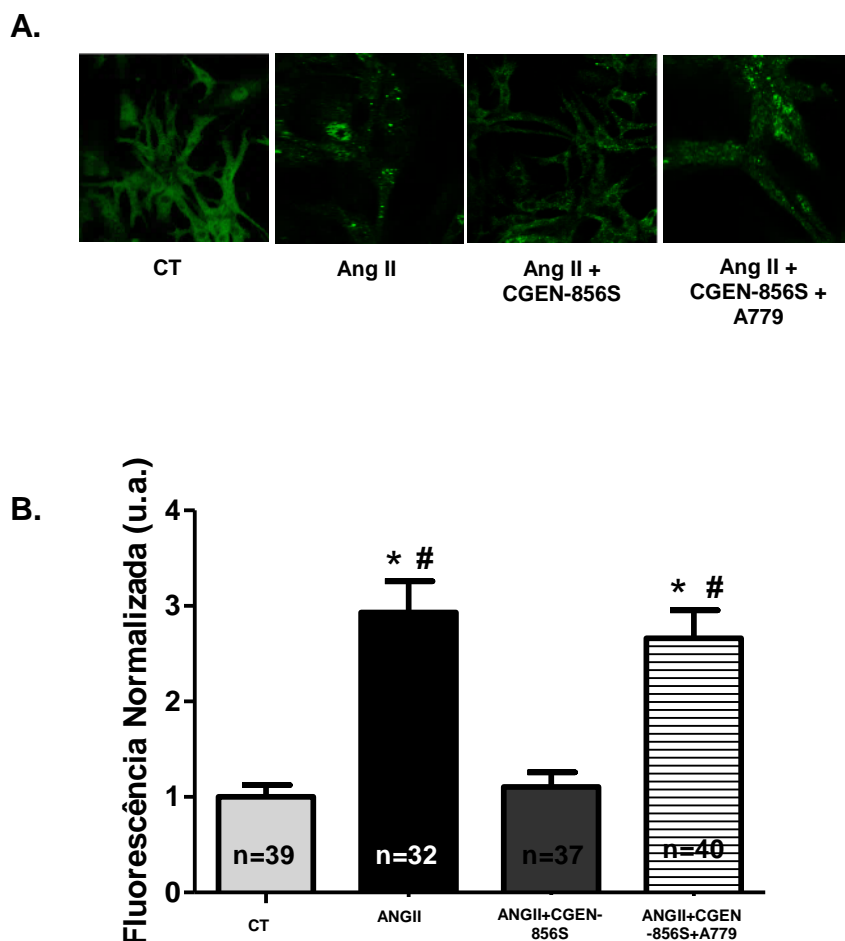


Figura 16: O grupo ANGII + CGEN-856S + A779 promove aumento da razão núcleo/citosol semelhante ao grupo ANGII. **A.** Imagens representativas obtidas a partir da microscopia confocal de GRK-5 (verde). **B.** Gráfico de barras com a média da razão núcleo/citosol encontrados a partir da análise densitométrica. **CT-** controle; **ANG II-** Angiotensina II 100nM; **ANGII+CGEN-856S-** Angiotensina II 100nM mais CGEN-856S 100nM **ANGII+CGEN-856S+A779-** Angiotensina II 100nM mais CGEN-856S 100nM + A779 1µM.. n= número de células. *=p<0,05 quando comparado com o grupo CT. #=p<0,05 quando comparado com o grupo **ANGII+CGEN-856S**.

Como descrito por GOMES *et al.* (2010), o efeito anti-hipertrófico da Ang-(1-7) é dependente de óxido nítrico, que, em última instância aumenta a concentração de GMPc. Desta maneira, o próximo objetivo foi investigar se o efeito anti-hipertrófico de CGEN-856S, como Ang-(1-7), é dependente de óxido

nítrico. Neste experimento, os grupos experimentais foram: controle (CT); Angiotensina II 100nM (ANGII); Angiotensina II 100nM mais CGEN-856S 100nM (ANGII+CGEN-856S); Angiotensina II 100nM mais CGEN-856S mais N^G-nitro-L-arginina metil éster 10 μ M (ANGII+CGEN-856S+L-NAME).

O tratamento realizado no grupo ANGII+CGEN-856S+L-NAME apresentou área celular significativamente maior que o controle e o grupo ANGII+CGEN-856S, efeito semelhante ao ANG II,

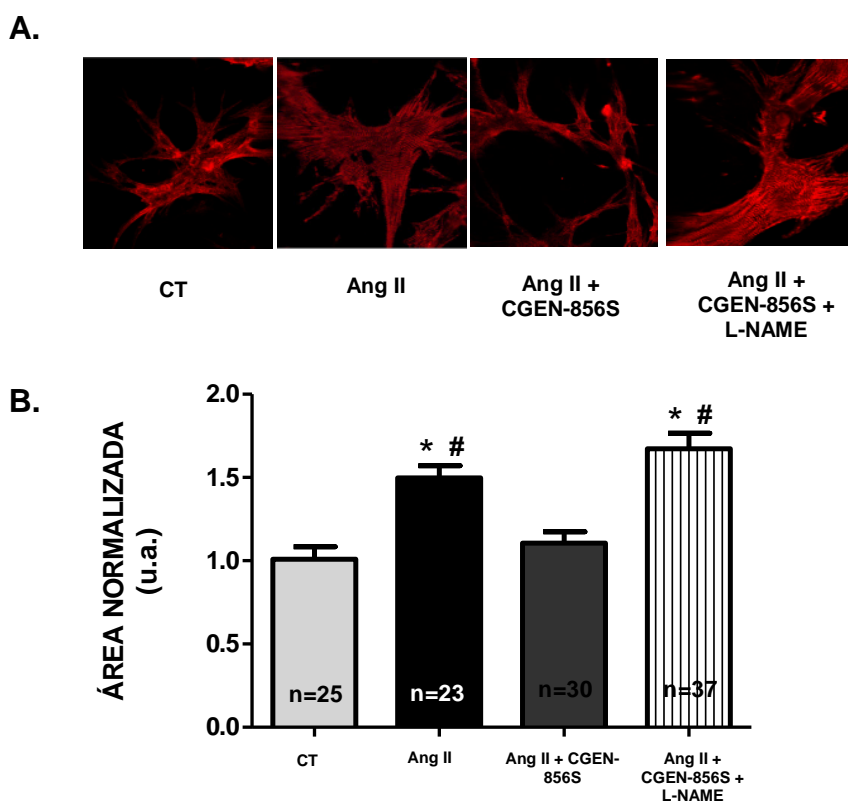
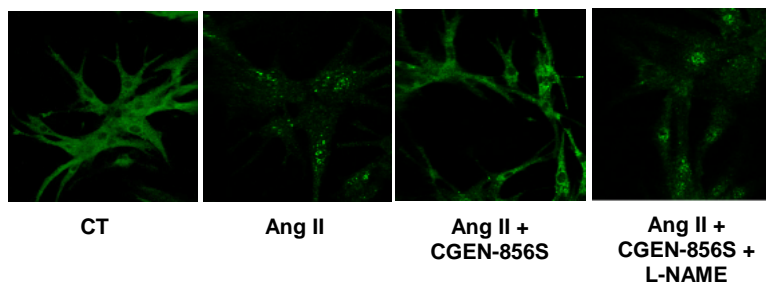


Figura 17: O grupo ANGII+CGEN-856S+L-NAME promove aumento da área celular semelhante ao grupo ANGII. **A.** Imagens representativas obtidas a partir da microscopia confocal do citoesqueleto celular, marcado em vermelho (α -actinina). **B.** Gráfico de barras com a média da área celular. **CT-** controle; **ANGII-** Angiotensina II 100nM; **ANGII+CGEN-856S-** Angiotensina II 100nM mais CGEN-856S 100nM; **ANGII+CGEN-856S+L-NAME-** Angiotensina II 100nM mais CGEN-856S 100nM mais L-NAME 10 μ M. n= número de células. *=p<0,05 quando comparado com o grupo **CT**. #=p<0,05 quando comparado com o grupo **ANGII+CGEN-856S**.

Além do aumento da área observada no grupo L-NAME, a razão núcleo/citosol também está aumentada, comprovando a translocação de GRK-5. Estes dois fatores, em conjunto, demonstram que o tratamento concomitante de Ang II, CGEN-856S e L-NAME inibe o efeito cardioprotetor de CGEN-856S.

A.



B.

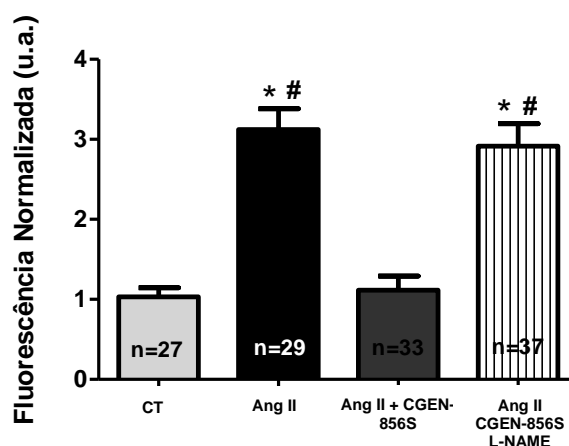


Figura 18: O grupo ANGII+CGEN-856S+L-NAME promove aumento da razão núcleo/citosol semelhante ao grupo ANGII. **A.** Imagens representativas obtidas a partir da microscopia confocal do GRK-5 (verde). **B.** Gráfico de barras com a média da razão núcleo/citosol encontrados a partir da análise densitométrica. **CT-** controle; **ANG II-** Angiotensina II 100nM; **ANGII+CGEN-856S-** Angiotensina II 100nM mais CGEN-856S 100nM; **ANGII+CGEN-856S+L-NAME-** Angiotensina II 100nM mais CGEN-856S 100nM mais L-NAME 10 μ M. n= número de células. *=p<0,05 quando comparado com o grupo CT. #=p<0,05 quando comparado com o grupo ANGII+CGEN-856S.

5.7 Efeito do tratamento crônico com CGEN-856S na frequência de contração de culturas de cardiomiócitos neonatos

Levando em consideração, que, em muitos casos, a exposição crônica a fatores estressantes leva a disfunção cardíaca, o próximo passo do trabalho foi investigar a influência do tratamento crônico de um agente estressante, a Ang II, e do peptídeo CGEN-856S na frequência de contração de culturas de cardiomiócitos neonatais. Neste experimento, os cardiomiócitos neonatais foram divididos em cinco grupos experimentais: controle (CT); Angiotensina II

100nM (ANG II); Angiotensina II 100nM mais CGEN-856S 100nM (ANG II+CGEN-856S); CGEN-856S 100nM (CGEN-856S); Angiotensina II 100nM mais CGEN-856S 100nM mais L-NAME 10 μ M (ANG II+CGEN-856S + L-NAME). O tratamento utilizado foi semelhante ao realizado nos experimentos anteriores. A medida da frequência e da força de contração foi realizada após as 36 horas de tratamento.

Como observado na figura 19, o tratamento crônico com Ang II promove uma redução significativa na frequência de contração em relação ao grupo controle. Esta mesma redução também é observada no grupo A779. O grupo ANG II +CGEN-856S apresenta um aumento significativo da frequência em relação ao controle. Aumento semelhante acontece no grupo CGEN-856S. Não é observada diferença na frequência de contração entre ANG II +CGEN-856S e CGEN-856S.

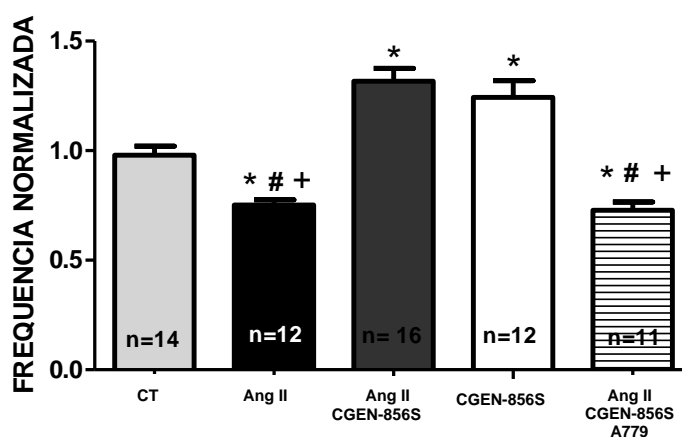


Figura 19: Tratamentos com CGEN-856S antagonizam os efeitos de Ang II na frequência de contração. **CT**- controle; **ANG II**- Angiotensina II 100nM; **ANGII+CGEN-856S**- Angiotensina II 100nM mais CGEN-856S 100nM; **CGEN-856S**- CGEN-856S 100nM; **ANGII+CGEN-856S+A779**- Angiotensina II 100nM mais CGEN-856S 100nM mais A779 1 μ M. n= número de células. *=p<0,05 quando comparado com o grupo **CT**. #=p<0,05 quando comparado com o grupo **ANGII+CGEN-856S**. +=p<0,05 quando comparado com o grupo **CGEN-856S**.

6. DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, um grande número de estudos vem esclarecendo os efeitos cardioprotetores do eixo Ang-(1-7)/Mas, que antagonizam os efeitos da via Ang II/AT1. Em decorrência dessas descobertas, um grande interesse farmacológico foi criado. Levando-se em consideração a grande importância do cardiomiócito para o bom funcionamento de todo o sistema cardiovascular, ele se transformou em um dos alvos de estudos. Para investigar as funções do eixo Ang-(1-7)/Mas nos cardiomiócitos, o primeiro questionamento que deveria ser resolvido era se as células ventriculares possuíam, em sua membrana, o receptor Mas. Tallant *et al.* (2005) e Dias-Peixoto *et al.* (2012) descreveram a presença deste receptor tanto em células neonatais quanto em células de adulto. Posteriormente, Dias-Peixoto *et al.* (2008) e Gomes *et al.* (2010) descreveram os efeitos diretos sobre os cardiomiócitos e também descreveram o mecanismo de ação desse eixo.

Este cenário promissor estimulou vários grupos de pesquisa a investigar e desenvolver possíveis agonistas do receptor Mas, que por sua vez, também tivessem efeitos cardioprotetores e que pudessem proporcionar vantagens farmacológicas sobre a Ang-(1-7). Entre estes novos agonistas, destacam-se o agonista não peptídico AVE 0991 (WEIMER *et al.*, 2002) e os agonistas peptídeos CGEN-856 e CGEN-857 (SHEMESH *et al.*, 2008). Como aconteceu com a Ang-(1-7), o primeiro foco de interesse foi os efeitos cardioprotetores sistêmicos. Savergnini *et al.* (2010) demonstraram que os peptídeos CGEN-856 e CGEN-857 produziam um efeito vasodilatador mediado pelo receptor Mas. Além disso, estes peptídeos apresentaram efeito anti-arritmogênico e melhoraram a função cardíaca após um evento isquêmico. O CGEN-856S reduziu a hipertrofia causada pelo tratamento com isoproterenol, reduziu a pressão arterial de ratos SHR, após o tratamento crônico. Além disso, o CGEN-856S apresenta baixa afinidade de ligação aos receptores de angiotensina II. Peluso *et al.* (2014) demonstrou que CGEN-856S foi capaz de ativar a via AKT/eNOS em diferentes modelos celulares, da mesma maneira que a Ang-(1-7). Entretanto, estes efeitos não foram estudados em cardiomiócitos. Desta forma, o presente estudo, investigou a possível ativação destas vias nos cardiomiócitos. Com esse objetivo, cardiomiócitos ventriculares adultos foram

isolados de camundongos C57BL6 e tratados durante vinte minutos com diferentes concentrações de CGEN-856S e CGGEN-857V. O tempo de tratamento foi estipulado levando em consideração trabalhos anteriores (DIAS-PEIXOTO *et al.*, 2008; GOMES *et al.*, 2010). Apesar do peptídeo não ser homólogo a Ang-(1-7), as concentrações escolhidas foram de 1 μ M, 100nM, 10nM. Dias-Peixoto *et al.*(2008) fizeram uma curva concentração-resposta da Ang-(1-7), variando de 100 μ M a 0.1 nM e perceberam que o tratamento com as concentrações 1 μ M, 100nM, 10nM e 1nM causavam o aumento na produção de óxido nítrico, sendo que a concentração 10nM produziu maior aumento. Gomes *et al.* (2010) utilizaram a Ang-(1-7) na concentração de 100 nM em todos os seus experimentos. Savergnini *et al.* (2013), em seus experimentos utilizando células ovarianas de hamster (CHO), utilizaram o peptídeo CGEN-856S nas concentrações de 100nM e 1 nM. No presente estudo, o peptídeo foi testado nas concentrações 1 μ M, 100nM, 10nM. Os resultados encontrados foram, de maneira geral, semelhantes àqueles encontrados por Dias-Peixoto *et al.* (2008), entretanto algumas pequenas diferenças podem ser apontadas. Em Dias-Peixoto *et al.* (2008), embora não tenha havido diferenças entre os grupos que promoveram aumento da produção de óxido nítrico, o grupo 10nM se destacou com um resultado absoluto muito maior que os outros. No presente trabalho, os três grupos testados também promoveram aumentos significativos na produção do NO em relação ao controle, entretanto, os resultados entre os grupos foram semelhantes, não havendo nenhum grupo que se sobressaísse sobre os outros. Além disso, no trabalho realizado por Dias-Peixoto *et al.* (2008), o aumento da produção de óxido nítrico foi numericamente maior que o encontrado no presente estudo. A partir destes resultados uma nova questão foi levantada: A intensidade do aumento da produção de óxido nítrico é diferente entre os novos agonistas e a Ang-(1-7)? Esta pergunta logo foi respondida ao longo dos demais experimentos.

Resultados diferentes foram encontrados quando o peptídeo CGEN-857V foi utilizado. Nas concentrações 1 μ M, 100nM, 10nM, foi possível observar um ligeiro aumento na produção de óxido nítrico, todavia esse aumento não foi significativo. Savergnini *et al.* (2010) demonstraram que este peptídeo também apresenta efeito vasodilatador dependente de endotélio, porém o efeito do

CGEN-857V foi significativamente menor quando comparado com o CGEN-856S, o que de certa forma é similar ao encontrado neste estudo. Devido ao fato de o peptídeo possuir menor ação, é possível que as concentrações utilizadas neste estudo não tenham sido suficientes para promover o aumento significativo da produção de óxido nítrico, sendo necessário investigar outras concentrações.

Após ter sido comprovada a influência CGEN-856S na produção de óxido nítrico nas concentrações 1 μ M, 100nM e 10nM, foi investigado a influência do tempo de incubação. Como a produção de óxido nítrico foi semelhante independentemente da concentração utilizada, utilizou-se a concentração 100nM no experimento de decurso temporal. No trabalho de Dias-Peixoto *et al.* (2008) cardiomiócitos ventriculares adultos foram incubados durante quinze minutos com a Ang-(1-7), os grupos experimentais foram: controle, cinco minutos, dez minutos e quinze minutos. Segundo os resultados obtidos, todos os grupos apresentaram aumento significativo na produção de óxido nítrico em relação ao grupo controle. Entre os grupos testados, dez e quinze minutos apresentam aumentos significativamente maiores que cinco minutos, e apesar de não apresentarem diferenças significativas, o grupo quinze minutos foi numericamente maior que o grupo dez minutos. No presente trabalho, o tempo de incubação foi de 35 minutos, com capturas de imagens continuamente. Esta diferença metodológica no tempo de incubação foi promovida pelo fato de que embora no trabalho de Dias-Peixoto *et al.* (2008) os grupos dez e quinze minutos não sejam significativamente diferentes, a produção de óxido nítrico no grupo quinze minutos foi numericamente maior. Esta tendência de aumento na produção de óxido nítrico pode ter sido mascarada pelo pequeno intervalo de tempo de captura de imagens.

Devido à possibilidade do CGEN-856S também agir no receptor Mas, foi realizada a comparação entre CGEN-856S e Ang-(1-7) em relação à produção de óxido nítrico. No trabalho de Dias-Peixoto *et al.* (2008), Ang-(1-7) na concentração de 10nM levou a um aumento na produção de óxido em aproximadamente 150%. No entanto, no presente estudo, a Ang-(1-7) induziu um aumento de aproximadamente 25% na fluorescência do DAF. Savergnini *et al.* (2013) compararam os efeitos de Ang-(1-7) e CGEN-856S na fosforilação de AKT e observaram que não houve diferença significativa entre os grupos. Os

resultados encontrados no presente estudo confirmam os achados de Savergnini uma vez que não foi observada diferença significativa entre Ang-(1-7) e CGEN-856S com relação à produção de óxido nítrico.

Tendo sido respondidos os questionamentos relativos ao efeito na produção de óxido nítrico e a comparação com a Ang-(1-7), passou-se a investigar as vias de sinalização intracelular estimuladas pela ligação de CGEN-856S. Utilizando esta linha de pensamento, a primeira questão a ser respondida é se a produção de óxido nítrico observada acontece via ligação ao receptor Mas. Savergnini *et al.* (2010, 2013) demonstraram que os efeitos vasodilatadores foram causados via receptor Mas, e que o CGEN-856S não foi capaz de fosforilar AKT em células CHO-K1 (células que não apresentam o receptor Mas constitutivamente). Peluso *et al.* (2014) demonstraram que os efeitos do CGEN-856S sobre AKT/eNOS e FOXO1 é via Mas. O experimento realizado utilizando cardiomiócitos ventriculares de camundongos C57BL6 nocaute para o receptor Mas corrobora os resultados anteriores, comprovando que independentemente da concentração utilizada, CGEN-856S foi incapaz de produzir aumento na produção de óxido nítrico.

Utilizando a técnica de *Western Blot*, foi demonstrado que cardiomiócitos ventriculares isolados de camundongos C57BL6, tratados com CGEN-856S promovem a fosforilação de AKT no resíduo S473. Dias-Peixoto *et al.* (2008) descreveram que o tratamento agudo com Ang-(1-7) produzia um aumento da fosforilação de AKT (S473) em cardiomiócitos ventriculares adultos. Savergnini *et al.* (2013) e Peluso *et al.* (2014) mostraram a fosforilação de AKT (S473) após o tratamento com CGEN-856S em CHO-K1. Estes resultados sustentam a ideia de que o peptídeo age de maneira muito semelhante a Ang-(1-7), se ligando ao receptor Mas, fosforilando AKT (S473) e produzindo óxido nítrico. É bem provável que haja a fosforilação de eNOS e ela seja a principal sintetizadora de óxido nítrico, mas este experimento não foi realizado no presente trabalho.

Conhecendo a ação do peptídeo nos tratamentos agudos, é de grande valia investigar os efeitos cardioprotetores crônicos do peptídeo. Para tal, foi utilizado um agonista hipertrófico muito bem descrito, a Ang II (SADOSHIMA *et al.*, 1995), com o objetivo de induzir estresse cardíaco e observar os efeitos do peptídeo quando tratado concomitantemente. Como era

esperado, o tratamento com Ang II promoveu o aumento da área celular e a translocação de GRK-5 para o núcleo. Descrito anteriormente por Martini *et al.* (2008), GRK-5 fosforila HDAC II promovendo a translocação de HDAC II para o citosol. O DNA livre de HDACII torna-se acessível a fatores de transcrição pró-hipertróficos, dentre eles MEF2 que possibilita a ativação de genes envolvidos na hipertrofia cardíaca. O tratamento concomitante com Ang II e CGEN-856S preveniu tanto o aumento da área celular quanto a translocação de GRK-5. Gomes *et al.* (2010) obtiveram resultado semelhante quando realizaram tratamento por 36 horas com Ang II e Ang-(1-7). Entretanto no trabalho de Gomes *et al.* (2010), o fator de transcrição avaliado foi o NFAT. NFAT é um fator de transcrição gênico envolvido com genes hipertróficos, que é translocado para o núcleo quando as células estão expostas a fatores hipertróficos como Ang II. Além disso, o tratamento com CGEN-856S isoladamente por 36 horas não promoveu mudanças na área celular e na translocação de GRK-5. Resultado semelhante foi observado Gomes *et al.* (2010) utilizando cardiomiócitos incubados com apenas Ang-(1-7).

O tratamento com Ang II, CGEN-856S na presença do A-779 (um antagonista do receptor Mas), apresenta resultado semelhante ao encontrado apenas com o tratamento com Ang II. Este resultado corrobora com dados de produção de óxido nítrico em camundongos nocaute para o receptor Mas, que demonstram que os efeitos do CGEN-856S acontecem via receptor Mas. Para comprovar a participação do óxido nítrico no efeito anti-hipertrófico do CGEN-856S, cardiomiócitos neonatais foram tratados com Ang II, CGEN-856S e L-NAME (inibidor das óxido nítrico sintases). O resultado obtido foi semelhante aquele encontrado apenas com Ang II, comprovando a participação de óxido nítrico no efeito cardioprotetor do CGEN-856. Este resultado se assemelha ao que foi encontrado por Gomes *et al.* (2010). Estes resultados indicam que o CGEN-856S, da mesma forma que a Ang-(1-7), leva produção de óxido nítrico, com este exercendo importante ação anti-hipertrófica. No entanto vale ressaltar que além dos efeitos anti-hipertróficos da via óxido nítrico, pouco é sabido sobre a ação direta do CGEN-856S em proteínas relacionadas com as vias hipertróficas como CaMKII, PKC e GSK-3 β e a sua possível participação na modulação da produção de espécies reativas de oxigênio.

Outro parâmetro importante para avaliação da função cardíaca é a função contrátil, o Ca^{+2} é um importante segundo mensageiro no cardiomiócito, exercendo, dentre outras funções, papel essencial para a contração cardíaca (BERS, 2003). Desta forma, a frequência de contração de culturas de cardiomiócitos neonatais de ratos wistar foi investigada. O tratamento crônico com Ang II reduziu significativamente a frequência de contração em relação ao controle. De maneira oposta, o grupo Ang II mais CGEN-856S e o grupo CGEN-856S isolado apresentaram frequência de contração significativamente maior. O grupo contendo Ang II, CGEN-856S e A779 apresentou redução na frequência de contração semelhante à encontrada no grupo Ang II, esta semelhança permite concluir que o aumento na frequência de contração da cultura é decorrente da ativação do receptor Mas. Estes resultados, em conjunto com os demais, demonstram que o tratamento com o CGEN-856S antagoniza os efeitos deletérios da Ang II. Estes efeitos cardioprotetores acontecem via receptor Mas, simulando o eixo Ang-(1-7)/Mas

7. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, é possível concluir que CGEN-856S, novo agonista do receptor Mas, age no eixo Ang-(1-7)/Mas de forma semelhante à Ang-(1-7), promovendo o aumento na produção de NO. Este NO produzido atuará prevenindo os efeitos hipertróficos gerados pelo tratamento crônico com Ang II. Além de antagonizar os efeitos hipertróficos, CGEN-856S também antagonizou a redução na frequência de contração gerada por Ang II. Desta maneira este novo agonista apresenta-se como um potencial candidato farmacológico para o tratamento de doenças cardiovasculares.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENINA, N.; BADER, M.; WALTHER, T. Imprinting of the murine MAS protooncogene is restricted to its antisense RNA. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 290, p. 1072-1078, 2002.

AMBROZ, C.; CLARK, A.; CATT, K.J. The mas oncogene enhances angiotensin-induced $[Ca^{+2}]_i$ responses in cells with pre-existing angiotensin II receptors. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1133, p. 107-111, 1991.

BENTER, I.F.; DIZ, D.I.; FERRARIO, C.M. Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). **Peptides**, v.14, n. 4, p. 679-684, 1993.

BENTER, I.F.; DIZ, D.I.; FERRARIO, C.M. Pressor and reflex sensitivity is altered in spontaneously hypertensive rats treated with angiotensin-(1-7). **Hypertension**, v. 26, n. 6, p. 1138-1144, 1995.

BERS, D.M. Cardiac excitation-contraction coupling. **Nature**, v. 10, p. 198-205, 2002.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method of quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BUENO, O.F.; DE WINDT, L.J.; TYMITZ, K.M.; WITT, S.A.; KIMBALL, T.R.; KLEVITSKY, R.; HEWETT, T.E.; JONES, S.P.; LEFER, D.J.; PENG, C.F.; KITSIS, R.N.; MOKKENTIN, J.D. The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensates cardiac hypertrophy in transgenic mice. **The EMBO Journal**, v. 19, n. 23, p. 6341-6350, 2000.

BUSH, E.; FIELITZ, J.; MELVIN, L.; MARTINEZ-ARNOLD, M.; MCKINSEY, T.A.; PLICHTA, R.; OLSON, E.N. A small molecular activator of cardiac hypertrophy uncovered in a chemical screen for modifiers of calcineurin signaling pathway. **PNAS**, v. 101, p. 2870-2875, 2004.

BUSTAMANTE, J. O.; RUKNUDIN, A.; SACHS, F. Stretch-Activated Channels in Heart Cells: Relevance to Cardiac Hypertrophy. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 17, n. 2, p. S110-S113, 1991.

CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J.; DIZ, D.I.; SANTOS, R.A.S.; KHOSLA, M.C.; BROSNIHAN, K.B.; FERRARIO, C.M. Cardiovascular effects of angiotensin-(1-7) injected into dorsal medulla of rats. **American Journal of Physiology**, v. 257, n. 1, p. H324-H329, 1989.

CAREY, R.M.; SIRAGY, H.M. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation, **Endocrinology Reviews**, v. 24, n. 3, p.261-271, 2003.

CHOBANIAN, A.V. The hypertension paradox – More uncontrolled disease despite improved therapy. **The New England Journal of Medicine**, Waltham vol. 361, n.9, p. 848 – 887. 2009.

DE GASPARO, M.; CATT, K.J.; INAGAMI, T.; WRIGHT, J.W.; UNGER, T. International union of pharmacology, XXIII. The angiotensin II receptors. **Pharmacology Reviews**, v. 52, n.3, p. 414-472, 2000.

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

DIAS-PEIXOTO, M.F.; FERREIRA, A.J.; ALMEIDA, P.W.M.; BRAGA, V.B.A.; COUTINHO, D.C.O.; MELO, D.S.; FILHO, A.G.; MELO, M.B.; GRECO, L.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J.; LIMA, R.F.; SANTOS, R.A.S.; GUATIMOSIM. The cardiac expression of Mas receptor is responsive to different physiological and pathological stimuli. **Peptides**, v. 35, p. 196-201, 2012.

DONOGHUE, M.; HSIEH, F; BARONAS, E. A novel angiotensin-converting enzyme –related carboxipeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin-1-9. **Circulation Research**, v. 87, n. 5, p. E1-9, 2000.

FERREIRA, A.J.; SANTOS, R.A.S. Cardiovascular actions of Ang-(1-7). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.38, n, 4, p. 499-507, 2005.

FERREIRA, A.J.; SANTOS, R.A.S.; BRADFORD, C.N. Therapeutic implications of the vasoprotective axis of renin-angiotensin system in cardiovascular diseases. **Hypertension**, v. 55, n. 2, p. 207-213, 2010.

Global atlas on cardiovascular disease prevention and control, World Health Organization, New York, 2011.

GOMES, E.R.M.; LARA, A.A.; ALMEIDA, P.W.M.; GUIMARÃES, D.; RESENDE, R.R.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J.; BADER, M.; SANTOS, R.A.S.; GUATIMOSIM, S. Angiotensin-(1-7) prevents cardiomyocyte pathological remodeling through a nitric oxide/guanosine 3'5'-cyclic monophosphate-dependent pathway. **Hypertension**, v. 55, n, 1, p. 153-160, 2010.

GOMES, E.R.M.; SANTOS, R.A.S.; GUATIMOSIM, S. Angiotensin-(1-7) –Mediated signaling in Cardiomyocytes. **International Journal of Hypertension**, v2012, p.1-9, 2012.

HAQ, S.; CHOUKROUN, G.; KANG, Z.B.; RANU, H.; MATSUI, T.; ROSENZWEIG, A.; MOKKENTIN, J.D.; ALESSANDRINI, A.; WOODGETT, J.; HAJJAR, R. ;MICHAEL, A.; FORCE, T. Glycogen Synthase Kinase-3 β is a negative regulator of cardiomyocyte hypertrophy. **The Journal of Cell Biology**, v.151, n. 1, p. 117-129, 2000.

HARDT, S.E.; SADOSHIMA, J. Glycogen synthase kinase-3b: a novel regulator of cardiac hypertrophy and development. **Circulation Research**, v. 90, p. 1055-1063, 2002.

HUANG, E.S. Predicting ligands for orphan GPCRs. **Drug Discovery Today**, v.10, n. 1, p. 69–73, 2005.

JACKSON, T.R., BLAIR, L.A., MARSHALL, J., GOEDERT, M., HANLEY, M.R. The mas oncogene encodes an angiotensin receptor. **Nature**, v. 335, p. 437– 440, 1988.

JESSUP, J.A.; TRASK, A.J.;CHAPPELL, M.C.;NAGATA S.;KATO, J.; KITAMURA, K; FERRARIO, C.M. Localization of the novel angiotensin peptide, angiotensin-(1-12), in heart and kidney of hypertensive and normotensive rats. **American Journal Physiology: Heart Circulatory Physiology**, v. 294, n. 6, p. H2614-8, 2008.

KLIGER, Y.; GOFER, E.; WOOL, A.; TOPORIK, A.; APATOFF, A.; OLSHANSKY, M. Predicting proteolytic sites in extracellular proteins: only halfway there. **Bioinformatics**. v. 15, n. 8, p.1049-55, 2008.

KOSTENIS, E.; MILLIGAN, G.; CHRISTOPOULOS, A.; SANCHEZ-FERRER, C.F.; HERINGER-WALTHER, S.; SEXTON, P.M.; GEMBARDT, F.; KELLETT, E.; MARTINI, L.; VANDERHEYDEN, P.; SCHULTHEISS, H.P.; WALTHER, T. G-protein-coupled receptor mas is a physiological antagonist of the angiotensin ii type 1 receptor. **Circulation**, v. 111, p. 1806-1813, 2005.

MARQUES, F.D.; FERREIRA, A.J.; SINISTERRA, R.D.M.; JACOBY, B.A.; SOUZA, F.B.; CALIARI, M.V.; SILVA, G.A.B.; MELO, M.B.; NADU, A.P.; SOUZA, L.E.; IRIGOYEN, M.C.C.;ALMEIDA, A.P.;SANTOS, R.A.S. An oral formulation of angiotensin-(1-7) produces cardioprotective effects in infarcted and isoproterenol treated rats. **Hypertension**, v. 57, n. 5, p. 477-483.

MARTINI, J.S.; RAAKE, P.; VINGE, L.E.; DEGEORGE, B.R.; CHUPRUN, J.K.; HARRIS, D.M.; GAO, E.; ECKHART, A.D.; PITCHER, J.A.; KOCH, W.J. Uncovering G protein-coupled receptor kinase-5 as a histone deacetylase kinase in the nucleus of cardiomyocytes. **PNAS**, v. 105, n. 34, p. 12457–12462, 2008.**MEDICAL**

McKINSEY, T.A.; OLSON, E.N. Toward transcriptional therapies for the failing heart: chemical screens to modulate genes. **The Journal of Clinical Investigation**. v.115, n.3, p.538-546, 2005.

MOLKENTIN, J.D.; LU, J.R.; ANTOS, C.L.; MARKHAM, B.; RICHARDSON, J.; ROBBINS, J.; GRANT, S.R.; OLSON, E.N. A calineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. **Cell**, v. 93, p. 215-228, 1998.

PASSIER, R.; ZENG, H.; FREY, N.; NAYA, F.J.; NICOL, R.L.; McKINSEY, T.A.;OVERBEEK, P.; RICHARDSON, J.S.; GRANT, S.R.; OLSON, E.N. CaM Kinase signaling induces cardiac hypertrophy and activates the MEF2 transcription factor in vivo. **The Journal of Clinical Investigation**. v.105, p. 1395-1406, 2000.

PELUSO, A.; PASSOS-SILVA, D.; ETELVINO, G.; ROTMAN, G.; SANTOS, R.A. The novel Mas agonist, CGEN 856S, promotes Akt/eNOS activation and anti-proliferation with FOXO1 involvement. **The FASEB Journal**, v. 28, n. 1, supplement 1097.3, 2014.

ROCKMAN, H.A., KOCH, W.J.; LEFKOWITZ, R.J. Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. **Nature**, v. 415, p. 206-212, 2002.

SADOSHIMA, J.; IZUMO, S. Molecular characterization of angiotensin II induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. **Circulation Research**. v.76, p. 1-15, 1995.

SANTOS, R.A.S.; BROSNIHAN, K.B.; CHAPPELL, M.C.; PESQUERO J.; CHERNICKY, C.L.; GREENE, L.J.; et al. Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brainstem. **Hypertension**, v.11, p. 1153-1157, 1988.

SANTOS, R.A.S.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J.; ANDRADE, S.P. Angiotensin-(1-7): na update. **Regulatory Peptides**, v. 91, n.1-3, p. 45-62, 2000.

SAVERGNINI, S.Q.; BEIMAN, M.; LAUTNER, R.Q.; DE PAULA-CARVALHO, V.; ALLAHDADI, K.; PESSOA, D.C.; COSTA-FRAGA, F.P.; FRAGA-SILVA, R.A.; COJOCARU, G.; COHEN, Y.; BADER, M.; DE ALMEIDA, A.P.; ROTMAN, G.; SANTOS, R.A.S. Vascular relaxation, antihypertensive effect, and cardioprotection of a novel peptide agonist of the MAS receptor. **Hypertension**, v. 56, n. 1, p. 112-120, 2010.

SAVERGNINI, S.Q.; LANZER, D.; CARVALHO, M.B.L.; FERREIRA, A.J.; SILVA, G.A.B.; MARQUES, F.D.; PELUSO, A.A.B; BEIMAN, M.; COJOCARU, G.; COHEN, Y.; ALMEIDA, A.P.; ROTMAN, G.; SANTOS, R.A.S. The Novel Mas agonist, CGEN-856S, Attenuates Isoproterenol-Induced Cardiac Remodeling and Myocardial Infarction Injury in Rats. **Plos One**, v. 8, n.8, e57757, 2013.

SHEMESH, R.; TOPORIK, A.; LEVINE, Z.; HECHT, I.; ROTMAN, G. WOOL, A.; DAHARY, D.; GOFER, E.; KLIGER, Y.; SOFFER, M.A.; ROSENBERG, A.; ESHEL, D.; COHEN, Y. Discovery and validation of novel peptide agonists for G-protein-coupled receptors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, p. 34643-34649, 2008.

SUGDEN P.H.; CLERK A. Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy. **Journal of Molecular Medicine**, v. 76, 725-46, 1998.

TALLANT, E.A.; FERRARIO, C.M.; GALLAGHER, P.E. Angiotensin-(1-7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the Mas receptor. **American Journal of Physiology**, v. 289, n. 4, p. H1560-H1566, 2005.

TIPNIS, S.R.; HOOPER, N.M.; HYDE, R.; KARRAN, E.; CHRISTIE, G.; TURNER, A.J. A human homolog of angiotensin-converting enzyme: cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxipeptidase. **The journal of Biological Chemistry**, v. 275. n. 43, p. 33238-33243, 2000.

UNGER, T. The role of the renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease. **American Journal of Cardiology**, New York, v. 89, n. 2, p. 3A - 10A. 2002.

VEGA, R.B.; BASSEL-DUBY, R. OLSON, E.N. Control of cardiac Growth and function by calcineurin signaling. **JBC**, 2003.

VICKERS, C.; HALES, P.; KAUSHIK, V.; GAVIN, J.; TANG, J.; GODBOUT, K.; PARSONS, T.; BARONAS, E.; HSIEH, F.; ACTON, S.; PATANE, M.; NICHOLS, A.; TUMMINO, P. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxipeptidase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 17, p. 14838-14843, 2002.

VOLPE, M.; MUSUMECI, B.; DE PAOLIS, P.; SAVOIA, C.; MORGANTI, A. Angiotensin II AT₂ receptor subtype: an uprising frontier in cardiovascular disease?. **Journal of Hypertension**, v. 21, n. 8, p. 1429-1443, 2003.

WIEMER, G.; DOBRUCKI, L.W.; LOUKA, F.R.; MALINSKI, T.; HEITSCH, H. AVE 0991, a Nonpeptide Mimic of the Effects of Angiotensin-(1-7) on the Endothelium. **Hypertension**, v. 40, p. 847-852, 2002.

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**, v.45, p.711-719, 1986.

YOUNG, M.; FUNDER, J.W. Aldosterone and the Heart. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 11, n.6, 2000.

ZHANG, T.; MCKINSEY, T.A.; CHANG, S.; ANTOS, C.L.; OLSON, E.N. Class II histone deacetylases act as signal-responsive repressors of cardiac hypertrophy. **Cell**, v. 110, p. 479-488, 2002.