

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

EFEITOS DA ALAMANDINA NA FUNÇÃO CARDÍACA PÓS ISQUÊMICA

JÔNATHAS FERNANDES QUEIROZ DE ALMEIDA

Belo Horizonte

2015

Jônathas Fernandes Queiroz de Almeida

EFEITOS DA ALAMANDINA NA FUNÇÃO CARDÍACA PÓS ISQUÊMICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas/Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre, área de concentração em Fisiologia.

Orientador: PROF. DR. ROBSON A. S. SANTOS

Belo Horizonte

2015

043 Almeida, Jônathas Fernandes Queiroz de.
Efeitos da Alamandina na função cardíaca pós isquêmica [manuscrito] /
Jônathas Fernandes Queiroz de. – 2015.

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

Orientador: Robson A. S. Santos.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Isquemia e reperfusão - Teses. 2. Arritmias cardíacas. 3. Alamandina. 4. Fisiologia – Teses. I. Santos, Robson Augusto Souza dos. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612

"EFEITOS DA ALAMANDINA NA FUNÇÃO CARDÍACA PÓS ISQUÊMICA"

JÔNATHAS FERNANDES QUEIROZ DE ALMEIDA


Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 20 de maio de 2015, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



PROF. DR. ALMIR DE SOUSA MARTINS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROF. DR. ANDRÉ RICARDO MASSENSINI
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



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

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

Belo Horizonte, 20 de maio de 2015

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Jacinto e Guiomar, eles foram e sempre serão minha inspiração para todas minhas conquistas. O carinho, incentivo e suporte que recebi deles será sempre retribuído com os resultados dos meus triunfos e meu amor incondicional aos dois.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Robson Augusto Souza dos Santos, pela oportunidade de realizar este trabalho, pela paciência, pelo aprendizado diário e principalmente pelo privilégio da convivência com um pesquisador único.

Aos amigos do Laboratório de Hipertensão, pela ótima convivência, pelo acolhimento e pelos ensinamentos. Especialmente à Renata Cunha pelo auxílio na adaptação às novas metodologias do laboratório.

Aos demais professores do Laboratório de Hipertensão pela agradável convivência e pelos aprendizados.

Aos ilustres técnicos do Laboratório de Hipertensão, José Roberto e Marilene, que sempre auxiliam todos diariamente.

Aos meus pais, aos quais eu devo tudo que me tornei e dedico todas minhas conquistas,

À minha irmã, Janaína, por ser sempre um exemplo para mim.

À minha noiva, Luana, a qual é grande responsável por essa conquista, sempre me auxiliando intelectualmente e sentimentalmente. Companheiros na vida pessoal e acadêmica.

Ao curso da pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia do ICB / UFMG.

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

RESUMO

O infarto do miocárdio (IM) aumenta a predisposição da falência cardíaca e assim que ocorre, leva ao remodelamento estrutural cardíaco. Concomitantemente o fenótipo metabólico também é alterado. As alterações metabólicas do miocárdio estão diretamente ligadas com a sinalização humoral. Podemos dizer então, que o sistema renina angiotensina (SRA) é considerado crítico na regulação da doença do coração isquêmico e contribui para as sequelas patofisiológicas do IM.

O SRA é uma ampla cascata hormonal, composta por basicamente dois eixos contra regulatórios. Um eixo clássico ECA/Ang II/AT1 e outro eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas. O papel da Ang-(1-7) e do seu receptor Mas no infarto e nas arritmias de reperfusão já foram bem estudados, mostrando que a mesma apresenta importantes efeitos cardioprotetores.

Recentemente, Santos *et al.* (2013) descreveram a Alamandina como um novo produto do sistema renina angiotensina (SRA). Formada pela hidrólise catalítica do octapeptídeo Ala-Ang II (Angiotensina A) pela ECA2, a Alamandina é um peptídeo endógeno do tecido cardíaco muito semelhante à Ang-(1-7), diferindo desta em apenas um resíduo de aminoácido. Devido à essa proximidade, a maioria dos efeitos estudados da Alamandina, via receptor MrgD, até o momento também são semelhantes aos da Ang-(1-7).

Devido à recente descrição da Alamandina e de seus efeitos similares aos da Ang-(1-7), coube avaliar os efeitos daquele heptapeptídeo na função pós-isquêmica em corações isolados de ratos. Nossos dados mostraram que a Alamandina apresentou importante efeito cardioprotetor através da redução da área infartada, índice de severidade de arritmias e através da prevenção da queda da pressão sistólica ventricular esquerda e da dP/dt máxima e mínima.

Este trabalho mostra pela primeira vez que a Alamandina apresentou importantes efeitos cardioprotetores em corações isolados de ratos sob o protocolo de isquemia e reperfusão.

Palavras-chave: Alamandina, Isquemia-Reperfusão, Arritmias

ABSTRACT

Myocardial infarction (MI) increases the susceptibility of heart failure and when occurs, it leads to cardiac remodeling. At the same time, the metabolic phenotype is also changed. Myocardial metabolic changes are directly linked with the humoral signaling. Then, we can say that renin angiotensin system (RAS) is considered critical in the regulation of ischemic heart disease and contributes to the pathophysiological consequences of MI.

RAS is a widespread hormonal cascade composed of basically two counter regulatory axes. A classic axis, ACE / Ang II / AT1, and other axis, ACE2 / Ang-(1-7) / Mas. The role of Ang-(1-7) and its Mas receptor in infarction and reperfusion arrhythmia have been well studied, showing that it has significant cardio protective effects.

Recently, Santos et al. (2013) described Alamandine as a new product of RAS. Formed by catalytic hydrolysis of the octapeptide Ala-Ang II (angiotensin A) by ACE2, Alamandine is an endogenous peptide of cardiac tissue very similar to Ang-(1-7), differing only in that one amino acid residue. Because of this proximity, most studied effects of Alamandine via MrgD receptor, are also similar to those of Ang-(1-7).

Due to the recent description of Alamandine and its effects similar to Ang- (1-7), it is interesting to evaluating the effects of that heptapeptide in post-ischemic function in isolated rat hearts.

Our data showed that Alamandina had significant cardioprotective effect by reducing the infarcted area, arrhythmias severity index and by preventing the decrease of left ventricular systolic pressure and maximum and minimum dP/dt.

This review shows for the first time Alamandina showed significant cardioprotective effect in isolated rat hearts under ischemia reperfusion protocol.

Key-words: Alamandine, Ischemia-Reperfusion, Arrhythmia

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema simplificado da cascata clássica do Sistema Renina Angiotensina.

Figura 2. Esquema simplificado do eixo não clássico do Sistema Renina Angiotensina.

Figura 3. Esquema simplificado do eixo não clássico do Sistema Renina Angiotensina.

Figura 4. Visão esquematizada do protocolo utilizado.

Figura 5. Avaliação dos efeitos da Alamandina no período isquêmico.

Figura 6. Avaliação dos efeitos da Alamandina no período isquêmico.

Figura 7. Efeitos da Alamandina no fluxo coronariano, índice de severidade de arritmias (ISA) e na área infartada.

Figura 8. Avaliação do papel do receptor MrgD no efeito cardioprotetor da Alamandina na LVSP, LVEDP e dLVP.

Figura 9. Avaliação do papel do receptor MrgD no efeito cardioprotetor da Alamandina na dP/dt máxima, dP/dt mínima e FC.

Figura 10. Participação do receptor MrgD nos efeitos da Alamandina no fluxo coronariano, índice de severidade de arritmias (ISA) e na área infartada.

Figura 11. Avaliação do papel do receptor Mas no efeito cardioprotetor da Alamandina na LVSP, LVEDP e dLVP.

Figura 12. Avaliação do papel do receptor Mas no efeito cardioprotetor da Alamandina na dP/dt máxima, dP/dt mínima e FC.

Figura 13. Participação do receptor Mas nos efeitos da Alamandina no fluxo coronariano, índice de severidade de arritmias (ISA) e na área infartada.

Figura 14. Avaliação da participação da via da óxido nítrico sintase ou das prostaglandinas no efeito cardioprotetor da Alamandina na LVSP, LVEDP e dLVP.

Figura 15. Avaliação da participação da via da óxido nítrico sintase ou das prostaglandinas no efeito cardioprotetor da Alamandina na dP/dt máxima, dP/dt mínima e FC.

Figura 16. Participação da via das prostaglandinas e do óxido nítrico nos efeitos da Alamandina no fluxo coronariano, índice de severidade de arritmias (ISA) e na área infartada.

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E FÓRMULAS QUÍMICAS

A779	Antagonista do receptor Mas
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
Ang-(1-7)	Angiotensina-(1-7)
Ang-(1-9)	Angiotensina-(1-9)
AT1	Receptor angiotensinérgico do tipo 1
AT2	Receptor angiotensinérgico do tipo 2
AVE	Acidente vascular cerebral
CaCl₂.2H₂O	Cloreto de cálcio di-hidratado
CO₂	Dióxido de carbono
CVLM	Bulbo ventrolateral caudal
DCV	Doenças cardiovasculares
DIC	Doença do coração isquêmico
dLVP	Pressão desenvolvida ventricular esquerda
DPRO	D-Pro ⁷ -Ang-(1-7), antagonista do receptor Mas e do receptor MrgD
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
ECA 2	Enzima Conversora de Angiotensina tipo 2
FC	Frequência cardíaca
H₂O	Água
HOE-140	Antagonista do receptor de bradicinina do tipo 2
IM	Infarto do miocárdio
KCl	Cloreto de potássio
Kg	Quilograma
KH₂PO₄	Fosfato de potássio monobásico
L	Litro
L-NAME	Inibidor da óxido nítrico sintase
LVEDP	Pressão diastólica final ventricular esquerda
LVSP	Pressão sistólica ventricular esquerda
Mas	Receptor Mas da Angiotensina-(1-7)
Max dP/dt	Derivada da pressão sistólica ventricular esquerda pelo

	tempo
Mg	Miligrama
MgSO₄·7H₂O	Sulfato de magnésio hepta-hidratado
Min dP/dt	Derivada da pressão diastólica ventricular esquerda pelo tempo
Mmol	Milimol
MrgD	Receptor acoplado a proteína G do tipo D relacionado ao Mas
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO₃	Bicarbonato de sódio
NEP	Endopeptidase neutra
O₂	Oxigênio
PA	Pressão arterial
PEP	Prolilendopeptidase
pM	Picomolar
RVLM	Bulbo ventrolateral rostral
SHR	Ratos espontaneamente hipertensos
SRA	Sistema Renina Angiotensina
TGR(A1-7)3292	Linhagem de ratos transgênicos que super expressam a Ang-(1-7)

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E FÓRMULAS QUÍMICAS	xi
1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Hipertensão.....	15
1.2 Sistema Renina-Angiotensina.....	16
1.3 Infarto do Miocárdio, arritmias e SRA	21
2. OBJETIVOS	25
2.1 Objetivos gerais	25
2.2 Objetivos específicos	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1 Animais	26
3.2 Coração Isolado (Metodologia de Langendorff)	26
3.3 Análise de área infartada	27
3.4 Delineamento experimental	28
3.5 Análises estatísticas.....	29
4. RESULTADOS.....	30
4.1 Avaliação dos efeitos da Alamandina sob diferentes concentrações.....	30
4.1.1 Função cardíaca	30
4.2 Avaliação do papel do receptor MrgD nos efeitos da Alamandina.....	37
4.2.1 Função Cardíaca	37
4.2.2 Vasomotricidade, área infartada e índice de arritmias.....	40
4.3 Avaliação do papel do receptor Mas nos efeitos da Alamandina.....	42
4.3.1 Função cardíaca	42

4.3.2 Vasomotricidade, área infartada e índice de arritmias	45
4.4 Avaliação da participação da via das prostaglandinas e da óxido nítrico sintase nos efeitos da Alamandina.....	46
4.4.1 Função cardíaca	46
4.4.2 Vasomotricidade, área infartada e índice de arritmias	50
5. DISCUSSÃO	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

1. INTRODUÇÃO

1.1 Hipertensão

A hipertensão arterial apresenta alta prevalência e baixas taxas de controle, sendo considerada um dos principais fatores de risco modificáveis e um dos mais importantes problemas de saúde pública (Al-Ansary *et al.*, 2013). Em 2001, cerca de 7,6 milhões de mortes no mundo foram atribuídas à elevação da pressão arterial (PA) (54% por acidente vascular encefálico – AVE e 47% por doença isquêmica do coração – DIC) (Williams, 2008), sendo a maioria em países de baixo e médio desenvolvimento econômico e mais da metade em indivíduos entre 45 e 69 anos. No Brasil, as doenças cardiovasculares (DCV) têm sido a principal causa de morte. Em 2007 ocorreram 308.466 óbitos por doenças do aparelho circulatório (Duncan *et al.*, 2012).

Além do alto índice de mortalidade, as DCV são ainda responsáveis por alta frequência de internações, ocasionando custos médicos e socioeconômicos elevados. Como exemplo, em 2007 foram registradas 1.157.509 internações por DCV no SUS. Em relação aos custos, em novembro de 2009, houve 91.970 internações por DCV, resultando em um custo de R\$165.461.644,33 (DATASUS, 2013).

A hipertensão é definida como uma pressão sistólica igual ou acima a 140mmHg e uma pressão diastólica igual ou acima a 90mmHg (Chobanian, 2007) mesmo no estado de repouso. Além da relação com o AVE e com a DIC, a hipertensão também é um importante fator de risco para doenças decorrentes de aterosclerose e trombose, que se manifestam, predominantemente, por acometimento cardíaco, cerebral, renal e vascular periférico. Em adição, o aumento persistente da PA é responsável por 25 e 40% da etiologia multifatorial da cardiopatia isquêmica e dos acidentes vasculares cerebrais, respectivamente. Essa multiplicidade de consequências coloca a hipertensão arterial na origem das doenças cardiovasculares e, portanto, caracteriza-a como uma das causas de maior redução da qualidade e expectativa de vida dos indivíduos (Picon *et al.*, 2012).

Podemos definir a hipertensão como primária ou secundária. A hipertensão primária, também conhecida como essencial, é uma doença heterogênea com diferentes pacientes tendo diferentes fatores que a origina. Ainda que esses fatores sejam definidos como desconhecidos, há indicações que a super- ou sub expressão de alguns genes está relacionada com o aumento da PA (Luft, 1998), além de outros fatores como a obesidade, resistência à insulina, alto consumo de álcool e sódio, envelhecimento, sedentarismo, estresse e baixa ingestão de potássio e cálcio (Sever e Poulter, 1989; Elliott *et al.*, 1990). Já a hipertensão secundária é definida como um aumento na PA resultante de um fator identificável, por exemplo doença parênquimal renal, estenose da artéria renal, aldosteronismo primário, entre outros fatores (Rimoldi, Scherrer e Messerli, 2014).

Independente da classificação da hipertensão, sabe-se que o Sistema Renina Angiotensina (SRA) está envolvido na patogênese de várias desordens hipertensivas (Corvol *et al.*, 1994; Laragh, 2001). Além do claro envolvimento do SRA nas formas secundárias de hipertensão, existe, evidências que perturbações no SRA estão envolvidas na hipertensão essencial, por exemplo, há um variação ampla nos níveis plasmáticos de renina em pacientes com hipertensão primária (Laragh, 2001).

1.2 Sistema Renina-Angiotensina

O sistema renina-angiotensina (SRA) é uma ampla cascata hormonal, a qual produz hormônios peptídicos com grande impacto na regulação cardiovascular e na patogênese de doenças cardiovasculares (Bader, 2010). Desde a descoberta que esse sistema opera tanto sistêmico (endócrino), quanto tecidual (parácrino ou autócrino) (Grinstead e Young, 1992) houve uma mudança drástica no seu conceito e importância. Um fator importante que contribuiu para essa nova caracterização do SRA foi a descrição das múltiplas funções deste sistema, além das conhecidas ações renais, como as ações no sistema nervoso central, alterações associadas com crescimento e diferenciação celular, desenvolvimento dos órgãos, reprodução e apoptose (Ilgic e Behnia, 2007).

Durante décadas acreditou-se que o SRA constituía-se de apenas um eixo clássico (Skrbic e Igic, 2009). Como podemos observar na figura 1, em primeiro plano, temos a liberação da renina pelas células justaglomerulares na corrente sanguínea, esta por sua vez irá clivar o precursor angiotensinogênio no decapeptídeo biologicamente inativo angiotensina I (Ang I). Então a enzima conversora de angiotensina (ECA), presente na superfície luminal do endotélio vascular, hidrolisa a Ang I em Angiotensina II (Ang II), o principal peptídeo do eixo clássico, composto por 8 resíduos de aminoácidos e que exerce suas funções quando se liga aos receptores angiotensinérgicos do tipo 1 e 2 (AT1 e AT2) (Ondetti, 1983). A distribuição dos receptores AT1 e AT2 nos tecidos não é uniforme e varia conforme a idade do indivíduo (Barnes *et al.*, 1993), além disso, estes receptores foram identificados em diversos tecidos através de técnicas de bioquímica e biologia molecular, reforçando o conceito já exposto do SRA como sistêmico (endócrino) e local (tecdual, parácrino/autócrino) (Phillips *et al.*, 1979; Dzau, 1988; Wollert e Drexler, 1999).

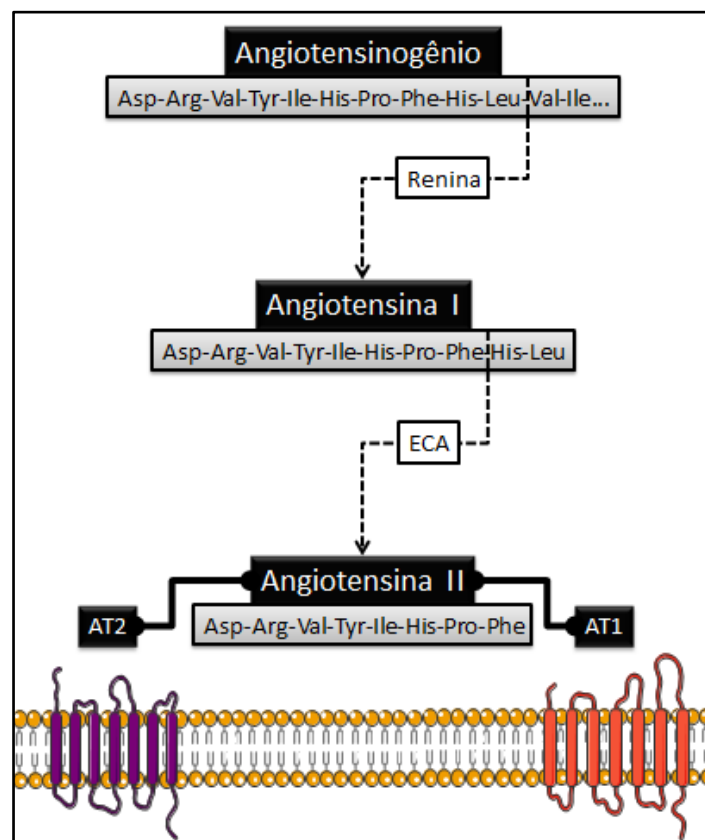


Figura 1: Esquema simplificado da cascata clássica do Sistema Renina Angiotensina. ECA significa enzima conversora de angiotensina; AT1 significa receptor angiotensinérgico do tipo 1; AT2 significa receptor angiotensinérgico do tipo 2.

As ações da Ang II são capazes de aumentar a atividade simpática dirigida para o coração e vasos sanguíneos. O efeito vasoconstritor direto da mesma no músculo liso vascular e a ação indireta via simpático determinam aumento da resistência vascular periférica e, conseqüentemente, da pressão arterial (Rush e Aultman, 2008). Os efeitos decorrentes de quando a Ang II interage com os receptores AT1 são bem conhecidos, no entanto, as ações fisiológicas da Ang II nos receptores AT2 são menos conhecidas o que em parte pode ser explicado pela menor expressão desses quando comparados a expressão do receptor AT1. Apesar dessa desproporcionalidade, tem-se hoje que as ações da Ang II nos receptores AT2 são, na maior parte das vezes, antagônicas às produzidas pela interação Ang II/AT1 (Scheuer e Perrone, 1993), uma vez que a ligação ao receptor AT1 resulta em ações inotrópicas, cronotrópicas, hipertróficas e fibróticas no tecido cardíaco (Bader e Ganten, 2008), a ligação da Ang II ao receptor AT2 resulta em ações antifibróticas, vasodilatadoras, apoptóticas, natriuréticas e anti-inflamatórias (Unger, Paulis e Sica, 2011).

Apesar da Angiotensina II ser a substância ativa mais importante do SRA, outras angiotensinas produzidas têm ações específicas e, entre as melhores caracterizadas até o momento, estão as Angiotensinas III, IV e a Angiotensina-(1-7) (Ang-(1-7)) (Santos, Campagnole-Santos e Andrade, 2000).

A Ang-(1-7) foi descrita em 1988 por Santos e colaboradores, sendo formada a partir da Ang I por uma via independente da ECA (Santos *et al.*, 1988). A primeira ação biológica *in vitro* da Ang-(1-7) foi descrita em 1988 (Schiavone *et al.*, 1988) e a primeira *in vivo* foi descrita em 1989 (Campagnole-Santos *et al.*, 1989), levando, junto a outros artigos, ao reconhecimento da Ang-(1-7) como um peptídeo biologicamente ativo do SRA (Carey e Siragy, 2003; Santos *et al.*, 2005; Ferrario, 2006). Em 2000, uma enzima homóloga à ECA, a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), foi identificada, revelando uma via enzimática distinta ao eixo clássico (Donoghue *et al.*, 2000; Tipnis *et al.*, 2000). Como mostrado na figura 2, a ECA2 forma Angiotensina-(1-9), Ang-(1-9), ao remover o aminoácido leucina da porção C-terminal da Ang I. A Ang-(1-9) é então clivada pela ECA ou pela endopeptidase neutra (NEP) para gerar a Ang-(1-7) (Rice *et al.*, 2004; Ocaranza *et al.*, 2006). Contudo, a formação da Ang-(1-7) diretamente da Ang II pela clivagem do amino ácido C-

terminal fenilalanina é fisiologicamente e biologicamente mais importante (Vickers *et al.*, 2002).

As ações da Ang-(1-7) se dão por um receptor acoplado a proteína G, o receptor Mas. A caracterização deste receptor (Santos, Simoes e Silva, *et al.*, 2003) e o uso dos antagonistas da Ang(1-7), A779 e D-Pro7-Angiotensina-(1-7), levaram à confirmação que as ações da Ang-(1-7) se dão sem a participação direta dos receptores AT1 e AT2 (Botelho *et al.*, 1994; Santos, Haibara, *et al.*, 2003).

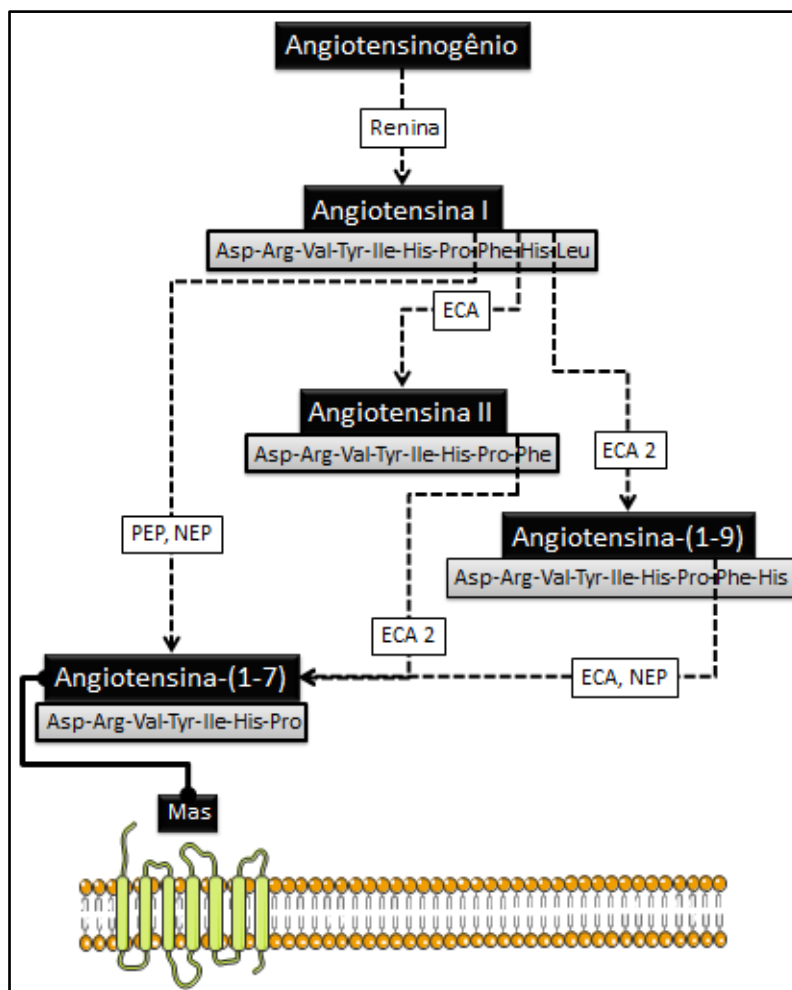


Figura 2: Esquema simplificado do eixo não clássico do Sistema Renina Angiotensina. ECA significa enzima conversora de angiotensina; ECA 2 significa enzima conversora de angiotensina 2; NEP significa endopeptidase neutra; PEP significa prolilendopeptidase; Mas significa receptor Mas da Ang-(1-7).

Os efeitos da Ang-(1-7) ao se ligar ao receptor Mas são similares aos provocados pela ligação entre a Ang II e o receptor AT2, envolvendo ações

anti-hipertensivas, anti-inflamatórias, anti-hipertróficas, vasodilatadoras e antifibróticas (Grobe *et al.*, 2006; Esteban *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2012; Souza *et al.*, 2013). Podemos estabelecer então dois eixos contra regulatórios no SRA, o eixo ECA/Ang II/AT1 com ações deletérias quando super expresso, e o eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas com ações antagônicas à do eixo clássico (Ferreira e Santos, 2005). Contudo, as ações da Ang(1-7) vão além da contra regulação, uma vez que a deleção do receptor Mas leva à disfunção cardíaca (Castro *et al.*, 2006), aumento da pressão arterial (Xu *et al.*, 2008), redução da função reprodutora, aumento da trombogênese (Fraga-Silva *et al.*, 2010) e mudanças significantes no metabolismo da glicose (Santos *et al.*, 2006).

Em 2013 um novo componente do SRA foi descrito por Santos e colaboradores, sendo denominado Alamandina [Ala1-Ang-(1-7)], presente nos tecidos e plasma humano e do rato (Lautner *et al.*, 2013). Como exemplificado na figura 3, evidências mostram que o octapeptídeo Angiotensina A pode ser o substrato para a formação da Alamandina através da hidrólise do aminoácido C-terminal pela ECA2, além do mais, a Alamandina também pode ser formada pela descarboxilação do resíduo de Aspartato N-terminal (Lautner *et al.*, 2013). Assim como observado para a Ang-(1-7), a Alamandina também é um inibidor da ECA, provavelmente devido ao seu papel como substrato da ECA (Paula e Santos, resultados não publicados).

Uma vez que a diferença estrutural entre a Ang-(1-7) e a Alamandina são muito pequenas, diferindo em apenas um resíduo de aminoácido, suas ações biológicas são, na maioria das vezes, semelhantes. Através da interação com o receptor MrgD, a Alamandina provoca vasodilatação dependente de endotélio em anéis de aorta de ratos e camundongos, modula a sensibilidade do barorreflexo após infusão intracerebroventricular, no RVLM produz aumento da pressão sanguínea e queda no CVLM (Lautner *et al.*, 2013). Através da inclusão em HP- β ciclodextrina foi obtida uma formulação oral da Alamandina, produzindo efeitos semelhantes aos já observados com a Ang-(1-7), incluindo efeitos duradouros anti-hipertensivos em animais SHR e diminuição da síntese de colágeno tipo I e III, além de fibronectina em ratos tratados com isoproterenol (Marques *et al.*, 2011). Contudo, antagonicamente à Ang-(1-7), a Alamandina não apresentou efeitos antiproliferativos agudos em dois tipos de células tumorais humanas (Lautner *et al.*, 2013), além de efeitos vasoativos

distintos da Ang-(1-7) na vasculatura de coelhos submetidos à uma dieta aterogênica (Habiyakare *et al.*, 2014).

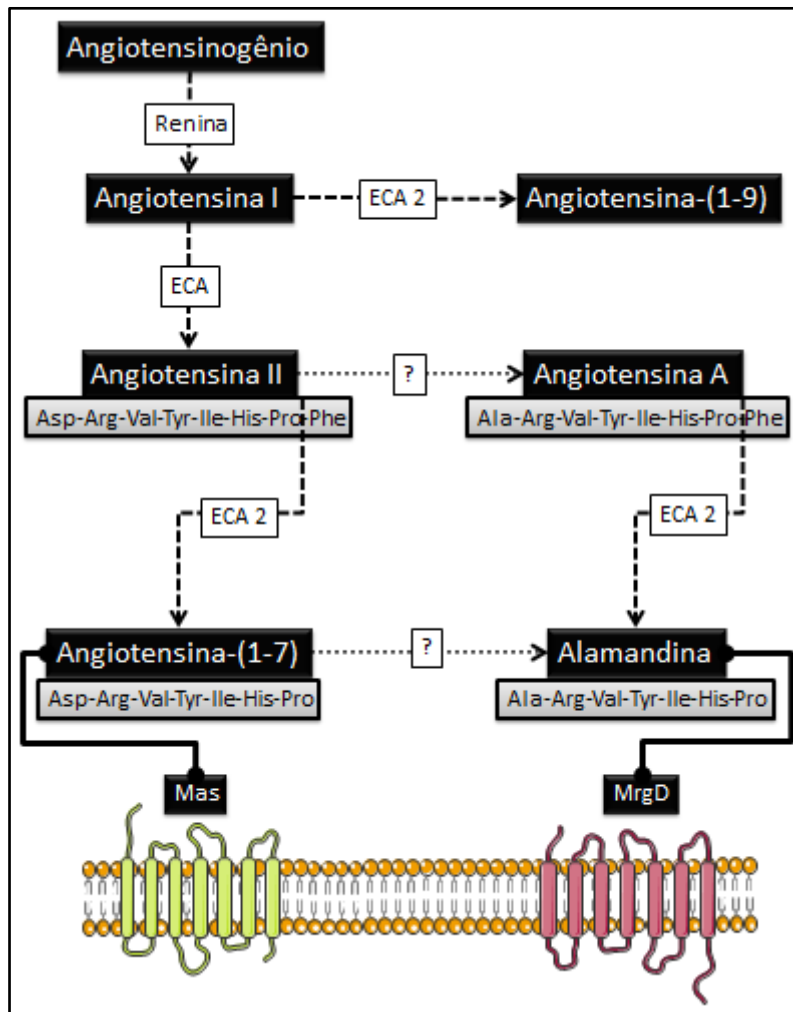


Figura 3: Esquema simplificado do eixo não clássico do Sistema Renina Angiotensina. ECA significa enzima conversora de angiotensina; ECA 2 significa enzima conversora de angiotensina 2; Mas significa receptor Mas da Ang-(1-7); MrgD significa receptor D acoplado a proteína G relacionado ao receptor Mas.

1.3 Infarto do Miocárdio, arritmias e SRA

O infarto do miocárdio (IM) aumenta a predisposição da falência cardíaca e assim que ocorre, leva ao remodelamento estrutural cardíaco na forma de dilatação progressiva do ventrículo esquerdo, assim como hipertrofia local da parede da câmara (Horn *et al.*, 1996). Durante os estágios iniciais do IM há a migração de neutrófilos e macrófagos para a área infartada, iniciando a resposta inflamatória mediada por estresse que ativa a matriz regional de

metaloproteinases, resultando na degradação da matriz extracelular. Esta fase inflamatória com granulação resultante da formação de tecidos é seguida pela fase fibrogênica, na qual os miofibroblastos proliferam e ocorre a deposição de colágeno para formação de uma cicatriz fibrótica reparadora. (Brower *et al.*, 2006).

Concomitantemente com essas mudanças estruturais, o fenótipo metabólico também é alterado (Berthiaume *et al.*, 2012). As alterações metabólicas do miocárdio estão diretamente ligadas com a sinalização humoral. Podemos dizer então, que o SRA é considerado crítico na regulação da doença do coração isquêmico e contribui para as sequelas patofisiológicas do IM (Chen *et al.*, 2013). A Ang II é o principal octapeptídeo do SRA e suas ações podem ocorrer tanto via receptor AT1 ou AT2. A densidade de receptores AT1 no miocárdio aumenta após IM ou isquemia do miocárdio (Lefroy *et al.*, 1996). Tratamentos crônicos com inibidores da enzima conversora de angiotensina ou antagonistas do receptor AT1 atenuaram a dilatação do ventrículo esquerdo, a falência cardíaca e as lesões de isquemia e reperfusão (Sleight, 2002). Além disso, foi mostrado que a Ang II não apresenta efeitos benéficos quando há estabelecimento de isquemia no miocárdio (Mann *et al.*, 2014).

Desde o, já dito, estabelecimento do SRA sendo regulado tanto sistêmico, quanto localmente (Grinstead e Young, 1992), houve um aumento expressivo da quantidade de trabalhos explorando os possíveis efeitos anti-arritmogênicos e cardioprotetores dos componentes do SRA em lesões de isquemia e reperfusão. O próprio trabalho de Grinstead de 1992 mostrou que o uso de inibidores da ECA apresentou efeitos benéficos em arritmias. Tais efeitos foram atribuídos à diminuição da geração da Ang II local e prevenção da degradação da bradicinina. Contudo em 1991, (Campbell *et al.*, 1991), já havia um trabalho mostrando que o tratamento de ratos com inibidores da ECA aumentavam os níveis plasmáticos de Ang-(1-7), o que poderia explicar também os resultados obtidos por Grinstead.

Partindo deste possível potencial da Ang-(1-7) como agente anti-arritmogênico o grupo de Santos e colaboradores iniciou uma investigação dos efeitos da Ang-(1-7) em lesões de isquemia. Começando em 1997, com o primeiro estudo dos efeitos da Ang-(1-7) em corações isolados de ratos

submetidos ao protocolo de isquemia-reperfusão, os dados mostraram, interessantemente, que, em concentrações nanomolares, houve piora nas arritmias de reperfusão em ratos Wistar perfundidos com solução de Krebs-Ringer contendo Ang-(1-7) a 27nM (Neves *et al.*, 1997).

O próximo passo no estudo da Ang-(1-7) como protetor anti-arritmogênico foi desenvolvido após a evidência de que em concentrações mais baixas (2,2nmol/L), a Ang-(1-7) aumentava a resposta vasodilatadora induzida pela bradicinina (Almeida *et al.*, 2000). Assim, foi questionado se os efeitos da Ang-(1-7), em concentrações inferiores a de 27nM, poderiam ser benéficos nas lesões de isquemia e reperfusão. Os resultados mostraram em 2001 que em concentrações mais baixas (0,22nM), a Ang-(1-7) diminuiu a incidência e duração de arritmias pós-isquemia reperfusão em corações isolados de ratos Wistar, sendo estes efeitos bloqueados pelo A-779, o antagonista do receptor Mas, ainda não descrito, e pelo pré tratamento com indometacina (Ferreira, A. J., Santos, R. A. e Almeida, A. P., 2001).

Já no ano seguinte, foi observado o papel da Ang-(1-7) na função pós-isquêmica de corações isolados de ratos Wistar a uma concentração de 0,22nM). Os resultados mostraram que a Ang-(1-7) melhorou a função cardíaca principalmente pela prevenção da queda da tensão sistólica, sem alteração da frequência cardíaca e sem quedas nas \pm dT/dt, indicando um efeito benéfico na função contrátil pós-isquêmica. Todos os efeitos foram bloqueados pelo A-779, HOE-140 (antagonista do receptor B2) e pela indometacina, mas não pelo L-NAME (Ferreira, Santos e Almeida, 2002).

Em 2004, foi elucidado o papel da bomba de sódio no efeito da Ang-(1-7) na propagação de impulsos durante a isquemia-reperfusão. Foi mostrado que a Ang-(1-7) a 10nM hiperpolarizou as células cardíacas e restabeleceu a propagação de impulsos no coração isolado de ratas Sprague-Dawley durante a isquemia-reperfusão, além de aumentar a velocidade de elevação do potencial de ação e melhorar a refratariedade cardíaca (De Mello, 2004). Também em 2004, o grupo de Santos testou a possibilidade da aplicação de bombas biológicas para a produção de ratos transgênicos expressando uma proteína que produz Ang-(1-7). Os resultados mostraram que em ratos TGR(A1-7)3292, que apresentam maiores níveis plasmáticos de Ang-(1-7),

houve redução na duração de arritmias de reperfusão e uma melhora na função pós-isquêmica em corações isolados (Santos *et al.*, 2004).

Com o avanço nas pesquisas proporcionado pelo uso de animais transgênicos, o grupo de Santos e colaboradores começaram a investigação dos efeitos do receptor Mas em camundongos knock-out para este receptor. Utilizando os corações isolados de camundongos C57BL/6, foi mostrado uma redução nas tensões sistólica e diastólica em knock-out para o Mas e wild-type tratados com A-779. Além disso, mudanças nas funções contráteis induzidas pela deleção ou bloqueio do receptor Mas, durante a isquemia-reperfusão foram independentes da frequência cardíaca (Castro *et al.*, 2006).

Assim, uma vez que foi estabelecida a importância anti-arritmogênica da Ang-(1-7), outros artigos mostraram a cardio e citoproteção da Ang-(1-7) contra lesões causadas por isquemia-reperfusão (Liao *et al.*, 2011) e (Wang *et al.*, 2014), respectivamente, comprovando ainda mais a importância do eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas no efeito protetor contra lesões de isquemia-reperfusão.

Recentemente, com a descoberta da Alamandina e devido à sua semelhança estrutural com a Ang-(1-7), surge no eixo SRA um possível novo agente anti-arritmogênico. Assim, em uma primeira etapa, cabe investigar os possíveis efeitos da Alamandina em corações isolados de ratos submetidos ao protocolo de isquemia-reperfusão.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

- Avaliar os efeitos da Alamandina na função cardíaca pós-isquêmica em corações isolados de ratos submetidos ao protocolo de isquemia e reperfusão.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos da Alamandina e elaborar uma curva concentração-resposta em corações isolados de ratos submetidos ao protocolo de isquemia e reperfusão.
- Avaliar a participação do receptor MrgD nos efeitos da Alamandina em corações isolados de ratos submetidos ao protocolo de isquemia e reperfusão.
- Avaliar a participação da via do óxido nítrico nos efeitos da Alamandina em corações isolados de ratos submetidos ao protocolo de isquemia e reperfusão.
- Avaliar a participação da via das prostaglandinas nos efeitos da Alamandina em corações isolados de ratos submetidos ao protocolo de isquemia e reperfusão.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 75 ratos machos Wistar, com 12-14 semanas de idade, pesando entre 250-300g, provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO) – ICB-UFMG. Os animais tiveram livre acesso a água e ração, foram alojados em até 5 animais por caixa e permaneceram em ciclo claro/escuro de 12h/12h.

Os procedimentos neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal – CETEA – UFMG, protocolo número 213/2013.

3.2 Coração Isolado (Metodologia de Langendorff)

Desde o final do século 19, um grande número de pesquisadores utilizaram e ainda utilizam o modelo de coração isolado, mas foi Oscar Langendorff quem consolidou o uso de corações de mamíferos nesta metodologia. Desde então, a metodologia de Langendorff evoluiu e proveu grande quantidade de dados importantes sobre a fisiologia fundamental do coração, envolvendo função contrátil, regulação do fluxo coronariano e o metabolismo cardíaco (Bell, Mocanu e Yellon, 2011).

Aproximadamente 10 minutos após heparinização (100 U.I) intraperitoneal, os animais foram eutanasiados por decapitação. Uma incisão foi realizada abaixo do processo xifoide e seguiu até as margens costais, atravessando as costelas nas linhas axilares anteriores esquerda e direita, criando então uma toracotomia em forma de concha. A parede do peitoral anterior foi rebatida para cima e o pericárdio foi aberto, garantindo acesso aos grandes vasos. O coração foi cuidadosamente retirado através da transecção da aorta descendente, da veia cava inferior, da aorta ascendente e da veia cava superior, sendo transferido para uma placa de petri com solução de Krebs-Ringer gelada. Os corações foram então transportados da sala de cirurgia para o aparato de Langendorff (ADInstruments) onde foram dissecados e canulados pela aorta em um tempo de até 3min para evitar os efeitos deletérios da hipóxia, caso ultrapassassem este período eram descartados.

Após canulados, os corações foram fixados ao aparelho de coração isolado utilizando a metodologia de Langendorff com pressão constante (65 mmHg) e perfundidos com solução nutritora, tamponada (pH: 7,4), aquecida (37°C) e oxigenada (95% de O₂, 5% de CO₂) de Krebs-Ringer contendo 118.4 mmol/l NaCl, 4.7 mmol/l KCl, 1.2 mmol/l KH₂PO₄, 1.2 mmol/l MgSO₄·7H₂O, 2.0 mmol/l CaCl₂·2H₂O, 11.7 mmol/l glicose e 26.5 mmol/l NaHCO₃. Um balão intraventricular foi inserido no ventrículo esquerdo gentilmente através do átrio esquerdo após retirada do apêndice atrial para registrar a pressão sistólica ventricular esquerda (LVSP), pressão diastólica final ventricular esquerda (LVEDP), frequência cardíaca (FC) e dP/dt máxima e mínima. A pressão ventricular esquerda desenvolvida (dLVP) foi obtida pela diferença entre a LVSP e a LVEDP. Os dados foram adquiridos pelo sistema de aquisição de dados PowerLab, LabChart 7 (ADInstruments). Os corações permaneceram em estabilização por 30min e foram submetidos a 30min de isquemia parcial, através da oclusão do ramo descendente anterior coronariano esquerdo, seguidos por 30 min de reperfusão em que a oclusão coronariana era desfeita, na presença ou não da Alamandina (22pM), do antagonista do receptor MrgD, D-Pro-Ang-(1-7) (220pM), do antagonista do receptor Mas, A779 (220pM). O inibidor da óxido nítrico sintase, L-NAME (30mg/Kg), e o inibidor da ciclooxigenase, Indometacina (5mg/Kg), foram administrados intraperitonealmente 1h antes dos experimentos. O índice de arritmias foi baseado no trabalho de Neves e colaboradores, em que a duração de arritmias de até 5min foi dada uma pontuação de 1, até 10min foi dado valor 2, até 15min valor 3, até 20min, valor 6, até 25min valor 9 e até 30min valor 12 (Neves *et al.*, 1997).

3.3 Análise de área infartada

Após término do experimento de coração isolado, os corações foram retirados do aparelho de Langendorff e uma fatia de 2mm foi retirada 4mm abaixo da base do coração. Essa fatia foi então incubada por 30min a 37° C em uma solução de 1% de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio, que reage com a área infartada deixando-a com uma coloração esbranquiçada, enquanto a área não infartada permanece avermelhada.

Após coradas, as fatias foram fotografadas com uma câmera de 13MP e analisadas pelo software ImageJ.

3.4 Delineamento experimental

Os animais foram divididos em dez grupos. Um grupo controle (**C**, n=10); um grupo com Alamandina (**A**, n=10); um grupo com Alamandina na presença do antagonista do receptor MrgD, D-Pro7-Angiotensin-(1-7) (**A + DPRO**, n=8); um grupo controle na presença do D-Pro7-Angiotensin-(1-7) (**C + DPRO**, n=8); um grupo com Alamandina na presença do antagonista do receptor Mas, A779 (**A + A779**, n=6); um grupo controle na presença do antagonista do receptor Mas (**C + A779**, n=6); um grupo controle tratado com inibidor da ciclooxigenase, Indometacina (**C + INDO**, n=5); um grupo com Alamandina tratado com Indometacina (**A + INDO**, n=5); um grupo controle tratado com inibidor da óxido nítrico sintase, L-NAME (**C + L-NAME**, n=5); um grupo com Alamandina tratado com L-NAME (**A + L-NAME**, n=5).

A figura 4 mostra o protocolo experimental de forma esquematizada.

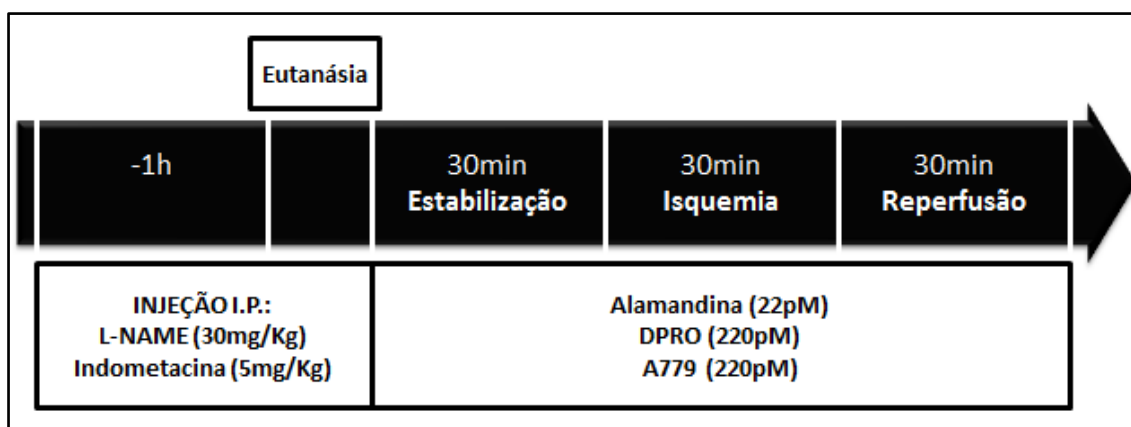


Figura 4: Visão esquematizada do protocolo utilizado. Nos grupos tratados com L-NAME ou Indometacina, as drogas foram injetadas intraperitonealmente 1h antes da eutanásia. Após a Eutanásia, os corações foram perfundidos durante todo o período do protocolo de coração isolado na presença dos antagonistas e agonistas de acordo com cada grupo.

3.5 Análises estatísticas

Nossos resultados foram inicialmente analisados quanto a distribuição gaussiana ou não através do teste d'Agostino and Pearson. Parâmetros cujo resultado não respeitava a distribuição gaussiana foram analisados através do teste T seguido por Mann-Whitney ou one-way ANOVA seguido de Kruskal-Wallis, seguido de Dunn's e Dunnet's. Parâmetros que obedeciam a distribuição gaussiana foram analisados através de testes ANOVA two-way seguido de Bonferroni. Todos os testes foram realizados com o auxílio do software Prisma® 5.0. Foi considerado significativo $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação dos efeitos da Alamandina em diferentes concentrações

Primeiramente, avaliamos os efeitos de diferentes concentrações da Alamandina no coração isolado, buscando, assim, visualizar em qual concentração seria obtido algum efeito cardioprotetor. Foram utilizadas para isso as concentrações de 220pM, 22pM e 2,2pM.

4.1.1 Função cardíaca

A coleta de dados sobre a função contrátil é importante não só para monitorar a estabilidade do coração, mas também para monitorar qualquer distúrbio nos ritmos cardíacos.

A pressão ventricular sistólica esquerda (LVSP) é o valor máximo de pressão atingido pelo ventrículo esquerdo na sístole. Podemos observar nos gráficos 5A e 5B que, no grupo controle (C), após a isquemia, houve um prejuízo significativo da LVSP ($54,56 \pm 6,88$ mmHg) quando comparado com o período basal ($84,57 \pm 11,54$ mmHg), que não foi revertido no período de reperfusão ($65,07 \pm 6,63$ mmHg). Os grupos com Alamandina (A) a 220pM e 22pM, por sua vez, foram capazes de abolir esse efeito deletério da isquemia na LVSP ($74,44 \pm 16,88$ e $66,93 \pm 7,85$ mmHg, respectivamente), mantendo os valores próximos aos basais ($99,10 \pm 17,49$ e $82,29 \pm 8,88$ mmHg, respectivamente). Assim como no grupo C, o grupo A (220pM) e A (22pM) não foram capazes de apresentar melhoras na LVSP no período de reperfusão. O grupo A (2,2pM) não apresentou melhoras na LVSP. Os valores basais ($107,30 \pm 13,19$ mmHg) foram severamente reduzidos no período isquêmico ($54,68 \pm 8,98$ mmHg) e de reperfusão ($52,71 \pm 9,54$ mmHg).

Como podemos observar nos gráficos 5C e 5D, a última pressão diastólica antes da sístole é a pressão ventricular esquerda diastólica final (LVEDP). Este parâmetro é a consequência da complacência ventricular, da pressão e do volume intravascular. Nossos dados não mostraram alterações significativas após o evento isquêmico em relação aos valores basais em nenhum dos grupos. Também não foram observadas alterações nos períodos de reperfusão entre os grupos.

O cálculo da diferença entre a LVSP e a LVEDP resulta na pressão desenvolvida pela ventrículo esquerdo (dLVP). Este é um parâmetro importante para refinar os valores obtidos pela LVEDP, uma vez que são analisados em conjunto com os valores sistólicos.

Como podemos ver nos gráficos 5E e 5F, o período isquêmico ($39,48 \pm 7,64$ mmHg) no grupo C apresentou um prejuízo significativo na dLVP em relação ao período basal ($76,59 \pm 11,30$ mmHg). Este prejuízo foi mantido no período de reperfusão ($47,38 \pm 8,99$ mmHg). No grupo A ($220\mu\text{M}$) e A ($22\mu\text{M}$), houve uma abolição deste efeito deletério no período isquêmico ($56,81 \pm 13,11$ mmHg e $58,87 \pm 8,04$ mmHg, respectivamente) quando comparado com o período basal ($85,33 \pm 15,63$ mmHg e $68,89 \pm 8,92$ mmHg, respectivamente), mostrando um efeito protetor da Alamandina na função cardíaca. Já no grupo A ($2,2\mu\text{M}$) a Alamandina não foi capaz de reverter os efeitos deletérios da isquemia na dLVP, os valores basais foram reduzidos de $89,72 \pm 11,24$ mmHg para $36,47 \pm 11,60$ mmHg no período isquêmico e $27,76 \pm 12,19$ mmHg na reperfusão.

Podemos dizer que dP/dt é o cálculo através de uma derivada da pressão que nos informa a variação da pressão em um determinado intervalo de tempo. De forma mais usual, quanto menos tempo o ventrículo esquerdo leva para aumentar a pressão em seu interior, mais eficaz é sua contratilidade. Dessa forma, a dP/dt máxima é a pressão exigida para a sístole em um determinado tempo, enquanto que a dP/dt mínima é a pressão exigida na diástole.

Partindo deste conceito, como mostrado nos gráficos 6A e 6B, nossos dados mostram que, durante a isquemia ($926,50 \pm 172,30$ mmHg/s) no grupo C, há um prejuízo significativo da dP/dt máxima quando comparado com o período basal ($1761 \pm 219,70$ mmHg/s), que não foi restaurado no período de reperfusão ($1384 \pm 210,1$ mmHg/s). Interessantemente, a Alamandina apenas à $22\mu\text{M}$ foi capaz de abolir o prejuízo causado no período isquêmico ($1629 \pm 202,20$ mmHg/s) em relação ao período basal ($1682 \pm 248,80$ mmHg/s). À $220\mu\text{M}$, a Alamandina não foi capaz de abolir o prejuízo no período isquêmico em relação ao grupo C e à $2,2\mu\text{M}$ o padrão de resposta foi igual ao grupo C.

Os mesmos efeitos foram observados na dP/dt mínima (gráficos 6C e 6D). No grupo C, em relação ao período basal ($1242 \pm 150,90$ mmHg/s) houve queda significativa da dP/dt mínima no período isquêmico ($682,7 \pm 106,10$

mmHg/s). Essa queda não foi observada no período isquêmico do grupo A (22pM) ($1101 \pm 130,00$ mmHg/s), quando comparado com seu período basal ($1179 \pm 118,6$ mmHg/s).

Por fim, a preparação de um coração isolado fica relativamente bradicárdica quando comparada com a frequência *in vivo*. Como apontado nos gráficos 6E e 6F nossos dados mostram que não houveram alterações significativas durante os períodos basal, isquêmico e de reperfusão em todos os grupos. Contudo, interessante, o grupo A (22pM) apresentou valores basais ($279,80 \pm 34,29$ BPM) mais elevados em relação aos valores basais ($186,9 \pm 19,34$ BPM) do grupo C.

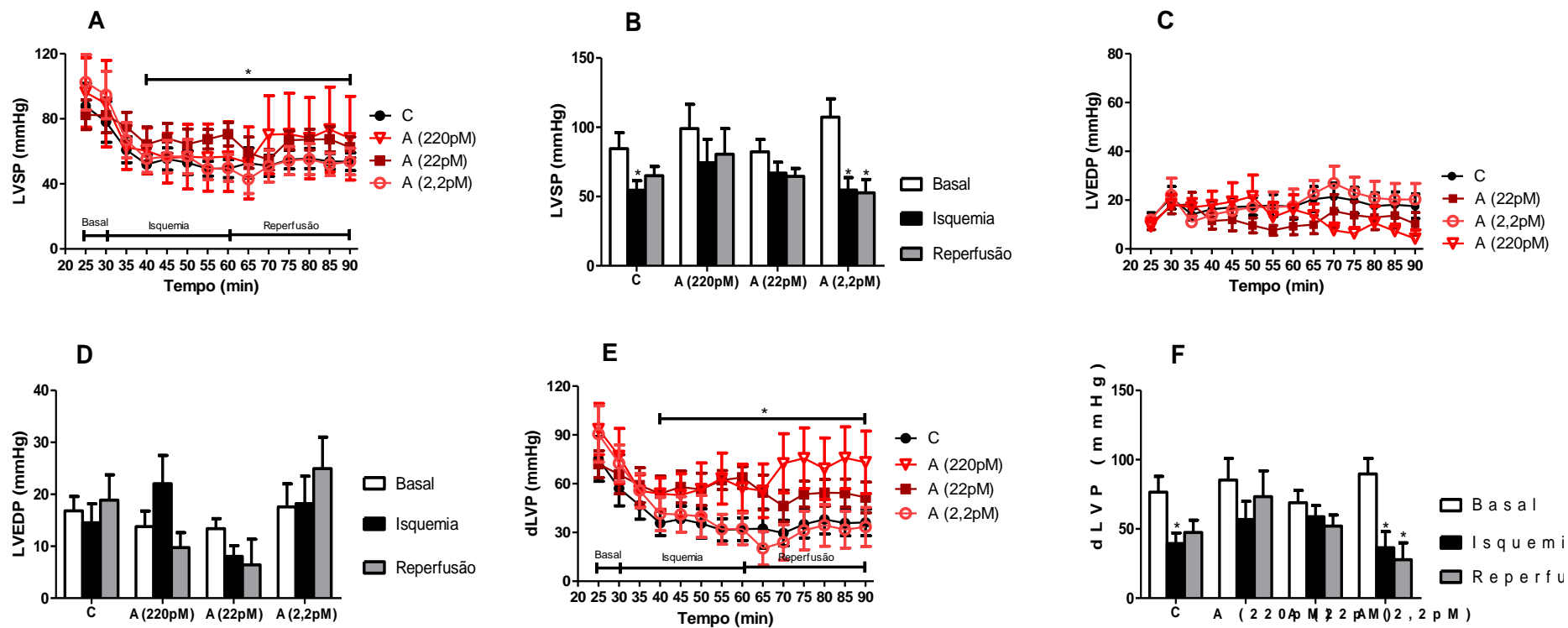


Figura 5: Avaliação dos efeitos da Alamandina no período isquêmico na pressão sistólica ventricular esquerda (LVSP), pressão diastólica final ventricular esquerda (LVEDP) e pressão desenvolvida ventricular esquerda (dLVP). Os gráficos A, C e E mostram as variações da LVSP, LVEDP e dLVP em valores absolutos ao longo do tempo, respectivamente. Os gráficos B, D e F mostram a representação dos eventos em barras. * $P < 0,05$ vs o grupo respectivo no período basal. Teste t, seguido de Mann-Whitney e Two-Way ANOVA seguido de Bonferroni.

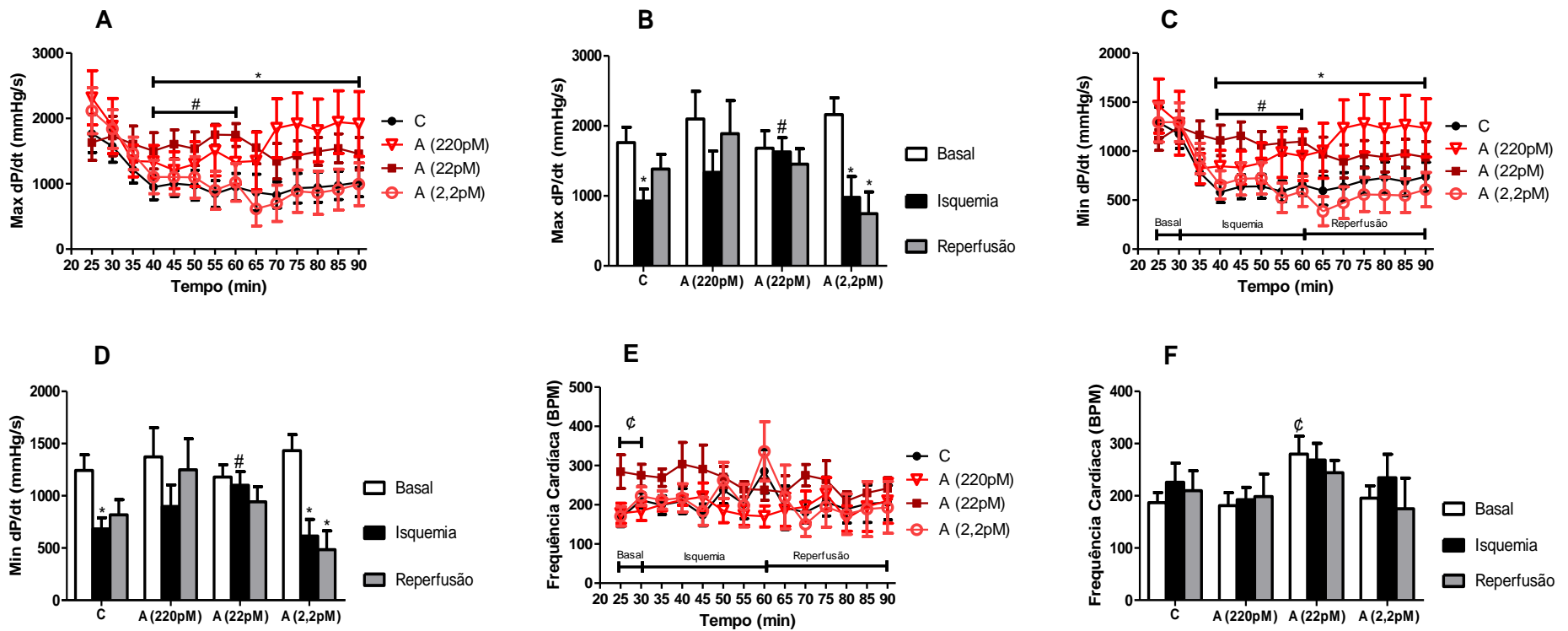


Figura 6: Avaliação dos efeitos da Alamandina no período isquêmico na dP/dt máxima, dP/dt mínima e frequência cardíaca (FC). Os gráficos A, C e E mostram as variações da dP/dt máxima, dP/dt mínima e FC em valores absolutos ao longo do tempo, respectivamente. Os gráficos B, D e F mostram a representação dos eventos em barras. * P < 0,05 vs o respectivo grupo no período basal. # p < 0,05 vs o grupo C no período isquêmico. φ p < 0,05 vs o grupo C no período basal. Teste t, seguido de Mann-Whitney e Two-Way ANOVA seguido de Bonferroni.

4.1.2 Vasomotricidade, área infartada e índice de arritmias

Os experimentos de coração isolado sob pressão constante são interessantes para avaliar a auto-regulação do coração sobre o tônus coronariano, especialmente quando há obstrução deste leito, como no protocolo de isquemia e reperfusão. Sob este protocolo, o fluxo constante faria com que muito mais perfusato passasse no leito coronariano não ocluído, podendo lesar as coronárias por *shear stress*.

Assim, sob pressão constante de 65 mmHg, o fluxo coronariano apresentou uma queda de aproximadamente 30% após isquemia parcial em todos os grupos, quando comparados com seus períodos de estabilização. No período de reperfusão, com a desobstrução do ramo descendente anterior coronariano esquerdo, os valores tenderam a retornar aos valores de estabilização (gráficos 7A e 7B).

Não houveram diferenças significativas entres os grupos, tanto em valores absolutos de fluxo coronariano (gráfico 7A), quanto em valores relativos (delta) (figura 7B). Estes dados mostram que os efeitos apresentados a seguir pela Alamandina são independentes de alterações no fluxo coronariano.

As arritmias cardíacas foram definidas pela presença de taquicardia ventricular ou fibrilação ventricular após a liberação da oclusão do ramo coronariano.

Como ilustrado na gráfico 7C, os animais controle apresentaram um ISA de $4,90 \pm 1,26$. Este índice foi significativamente reduzido na concentração de 22pM de Alamandina para $1,10 \pm 0,58$. Indicando um efeito anti-arritmogênico. À 220pM e 2,2pM a Alamandina não foi capaz de reduzir significativamente o ISA ($3,14 \pm 1,51$ e $3,37 \pm 1,37$, respectivamente).

A necrose do miocárdio é um processo dinâmico, com morte celular não ocorrendo apenas durante a isquemia, como também durante um período da reperfusão. Nossos dados mostram que, no grupo controle foi identificada uma porcentagem de área infartada de $33,85 \pm 4,55\%$. A Alamandina só foi capaz de reduzir significativamente a porcentagem de área infartada à 22pM, levando a $19,64 \pm 2,61\%$ (gráfico 7D). Nas concentrações de 220pM e 2,2pM, a Alamandina não foi capaz de reduzir a porcentagem de área infartada.

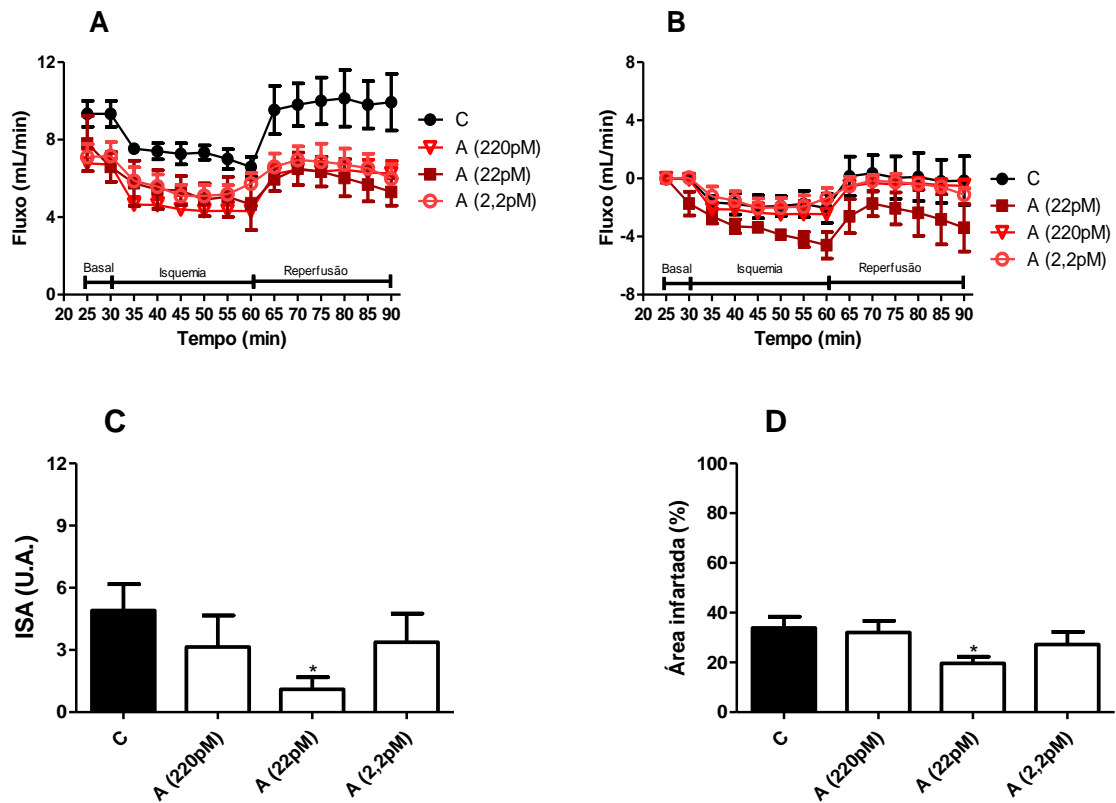


Figura 7: Efeitos da Alamandina no fluxo coronariano, índice de severidade de arritmias (ISA) e na área infartada. O gráfico A representa os valores absolutos do fluxo coronariano, enquanto que o gráfico B representa os valores relativos (delta). O gráfico C representa o ISA em unidade arbitrária (U.A.). O gráfico D representa a porcentagem de área infartada. * $p < 0,05$ vs grupo C. Teste t, seguido de Mann-Whitney e Two-Way ANOVA seguido de Bonferroni.

Partindo destes resultados observados, a concentração de 22pM foi escolhida para realização dos demais experimentos, uma vez que apresentou efeitos cardioprotetores mais evidentes que as concentrações de 220pM e 2,2pM.

4.2 Avaliação do papel do receptor MrgD nos efeitos da Alamandina

4.2.1 Função Cardíaca

Visto que a Alamandina a 22pM apresentou um efeito cardioprotetor significativo em vários parâmetros cardíacos analisados, fez-se importante avaliar o papel do receptor MrgD.

Como esperado, na LVSP, na presença do antagonista não específico do receptor MrgD, o D-Pro7-Ang-(1-7), foi possível observar o restabelecimento do prejuízo na LVSP no período isquêmico ($57,41 \pm 5,47$ mmHg), levando a uma melhora no período de reperfusão ($87,79 \pm 10,86$ mmHg). Na ausência da Alamandina, o DPRO manteve o mesmo padrão de resposta na LVSP (gráficos 8A e 8B).

Já nos gráficos 8C e 8D, nossos dados não mostraram alterações significativas após o evento isquêmico em relação aos valores basais em nenhum dos grupos. Também não foram observadas alterações nos períodos de reperfusão entre os grupos.

Novamente, os gráficos 8E e 8F mostram que, como esperado, na presença do DPRO, os efeitos observados no grupo A + DPRO foram semelhantes ao grupo C, mostrando queda significativa da dLVP no período isquêmico ($41,07 \pm 5,17$ mmHg), com restabelecimento dos valores basais ($62,73 \pm 6,341$ mmHg) no período de reperfusão ($71,56 \pm 13,22$ mmHg). Na ausência da Alamandina, o DPRO não foi capaz de alterar a resposta do grupo controle.

Também foi constatada a participação do receptor MrgD nos efeitos da Alamandina na dP/dt máxima. Como mostrado nos gráficos 9A e 9B, na presença do DPRO, houve abolição do efeito benéfico da Alamandina no período isquêmico ($1074 \pm 144,8$ mmHg/s). Já na ausência da Alamandina, grupo C + DPRO, o DPRO não apresentou nenhum efeito em comparação ao grupo C. Os mesmos efeitos foram observados na dP/dt mínima (gráficos 9C e 9D). Com a combinação entre Alamandina e DPRO houve restabelecimento do prejuízo na dP/dt mínima no período isquêmico ($732,9 \pm 115,3$ mmHg/s).

Os gráficos 9E e 9F não apontaram diferenças na FC entre os grupos.

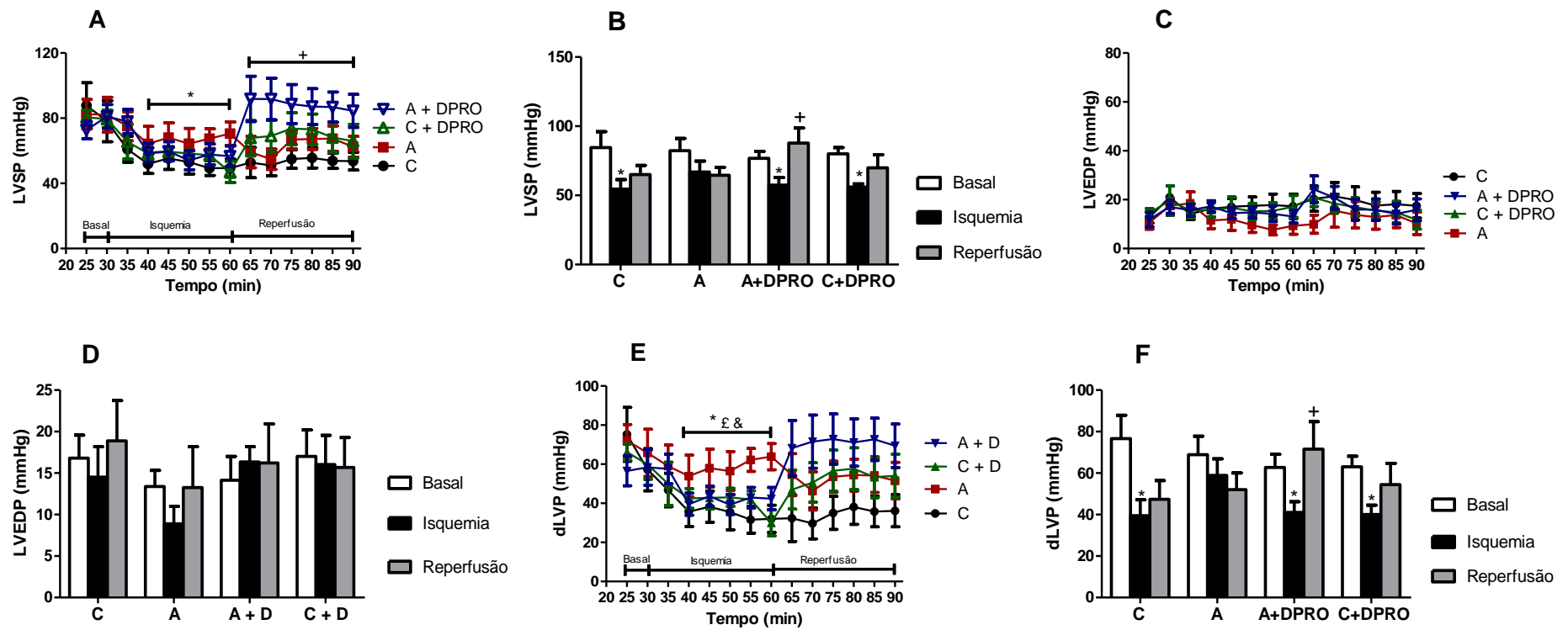


Figura 8: Avaliação do papel do receptor MrgD no efeito cardioprotetor da Alamandina na LVSP, LVEDP e dLVP. Os gráficos A, C e E mostram as variações da LVSP, LVEDP e dLVP em valores absolutos ao longo do tempo, respectivamente. Os gráficos B, D e F mostram a representação dos eventos em barras. * P < 0,05 vs o grupo respectivo no período basal. + p < 0,05 vs o grupo respectivo no período isquêmico. Teste t, seguido de Mann-Whitney e Two-Way ANOVA seguido de Bonferroni.

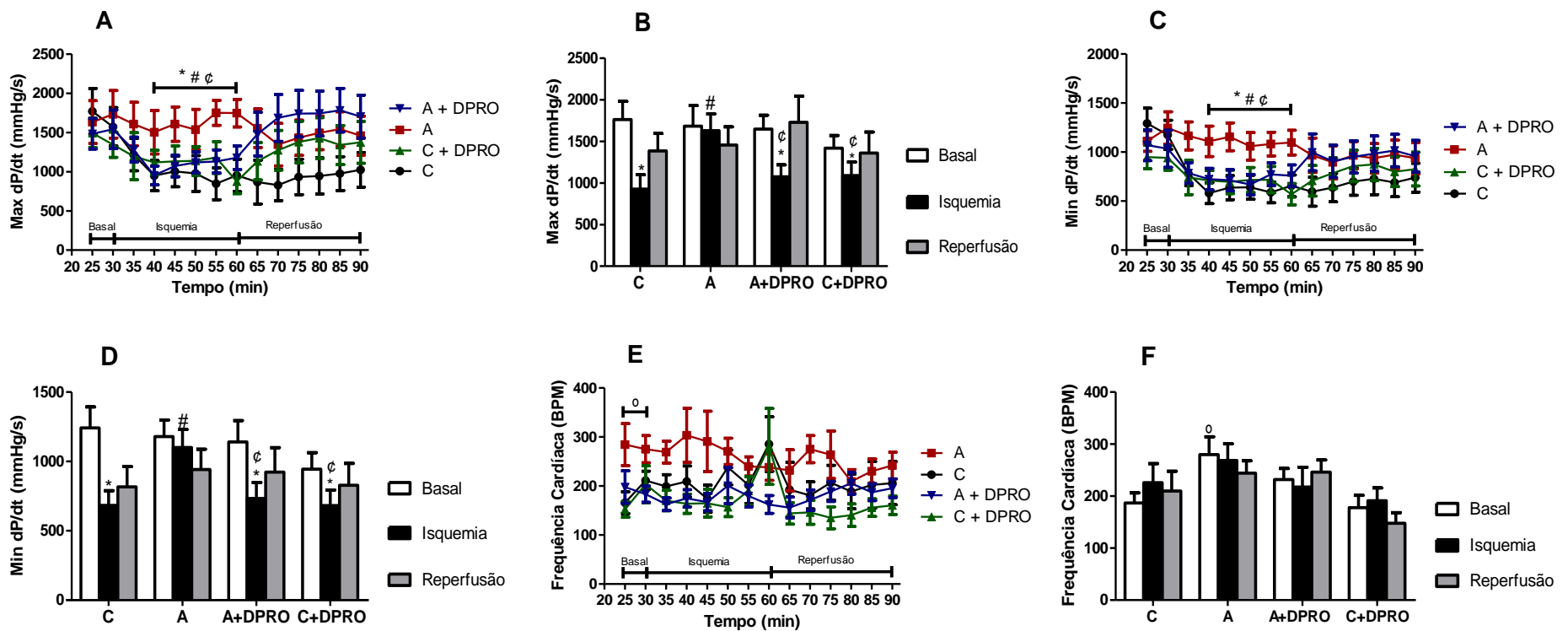


Figura 9: Avaliação do papel do receptor MrgD no efeito cardioprotetor da Alamandina na dP/dt máxima, dP/dt mínima e FC. Os gráficos A, C e E mostram as variações da dP/dt máxima, dP/dt mínima e FC em valores absolutos ao longo do tempo, respectivamente. Os gráficos B, D e F mostram a representação dos eventos em barras. * P < 0,05 vs o grupo respectivo no período basal. # p < 0,05 vs o grupo C no período isquêmico. ϕ p < 0,05 vs o grupo A no período isquêmico. ^o p < 0,05 vs o grupo C no período basal. Teste t, seguido de Mann-Whitney e Two-Way ANOVA seguido de Bonferroni.

4.2.2 Vasomotricidade, área infartada e índice de arritmias.

Utilizando o antagonista do receptor MrgD não foram observadas diferenças significativas entres os grupos, tanto em valores absolutos de fluxo coronariano (gráfico 10A), quanto em valores relativos (delta) (gráfico 10B).

Já no ISA, nossos dados indicam que o efeito anti-arritmogênico da Alamandina é dependente do receptor MrgD, uma vez que a queda do ISA provocada pela Alamandina foi abolida na presença do DPRO, levando os valores a uma média de $4,38 \pm 1,16$. O grupo C + DPRO não apresentou diferenças estatísticas, $4,00 \pm 1,25$, entre os grupos C e "A + DPRO" (gráfico 10C).

Na presença do DPRO, a redução provocada pela Alamandina da área infartada foi abolida ($32,49 \pm 4,07\%$), contudo o DPRO na ausência da Alamandina (grupo C +DPRO) não apresentou diferenças significativas quando comparado com o grupo controle ($38,23 \pm 3,10\%$) (gráfico 10D).

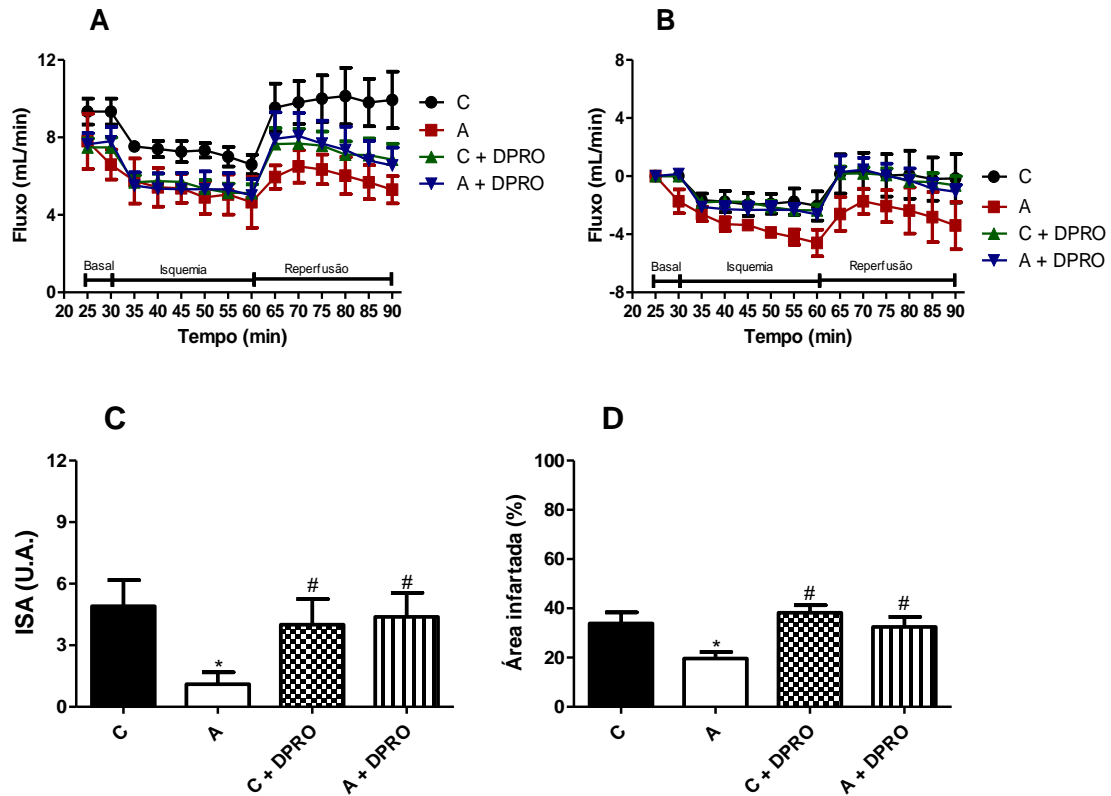


Figura 10: Participação do receptor MrgD nos efeitos da Alamandina no fluxo coronariano, índice de severidade de arritmias (ISA) e na área infartada. O gráfico A representa os valores absolutos do fluxo coronariano, enquanto que o gráfico B representa os valores relativos (delta). O gráfico C representa o ISA em unidade arbitrária (U.A.). O gráfico D representa a porcentagem de área infartada. * $p < 0,05$ vs grupo C. # $p < 0,05$ vs grupo A. Teste t, seguido de Mann-Whitney e Two-Way ANOVA seguido de Bonferroni.

4.3 Avaliação do papel do receptor Mas nos efeitos da Alamandina

4.3.1 Função cardíaca

Não se sabe ao certo se existe a possibilidade da conversão da Alamandina em Ang-(1-7), uma vez que esta via ainda não foi bem descrita (Lautner *et al.*, 2013). Como nossos dados mostraram que o antagonista não seletivo do receptor MrgD, DPRO, anulou os efeitos benéficos da Alamandina, coube investigar se a abolição dos efeitos da Alamandina se davam pelo bloqueio do receptor MrgD, ou se a Alamandina era convertida em Ang-(1-7) e seus efeitos foram abolidos devido à interação do DPRO com o receptor Mas. Utilizamos então o A779, antagonista específico do receptor Mas, para avaliar a participação deste receptor nos efeitos da Alamandina.

Interessantemente, os gráficos 11A e 11B mostram que nos grupos C + A779 e A + A779, houve um prejuízo significativo na LVSP já no período basal ($41,47 \pm 8,45$ mmHg e $46,84 \pm 11,51$ mmHg, respectivamente) quando comparado com o período basal do grupo A ($82,29 \pm 8,88$ mmHg). Não houveram diferenças significativas entre os demais períodos dos grupos C + A779 e A + A779, mostrando um forte efeito depressor do bloqueio do receptor Mas na LVSP.

Corroborando com os dados anteriores, nos gráficos 11C e 11D não foram observadas diferenças significativas na LVEDP na presença do A779, quando comparado com os outros grupos.

Assim como observado na LVSP, a dLVP dos grupos C+A779 e A+A779 sofreram um prejuízo no período basal ($30,12 \pm 7,36$ mmHg e $33,38 \pm 9,52$ mmHg, respectivamente) quando comparada ao período basal do grupo A ($68,89 \pm 8,92$ mmHg), continuando sem alterações significativas ao longo do período isquêmico e de reperfusão (gráficos 11E e 11F).

As derivadas de pressão, dP/dt máxima (gráfico 12A e 12B) e mínima (gráficos 12C e 12D), sofreram o mesmo efeito depressor no período basal. Assim como os parâmetros anteriores, não houveram diferenças significativas entre os períodos basal, isquêmico e de reperfusão.

Não houveram diferenças significativas entre os grupos no parâmetro FC, assim como não houveram diferenças entre os períodos basal, isquêmico e de reperfusão dentro de cada grupo (gráficos 12E e 12F).

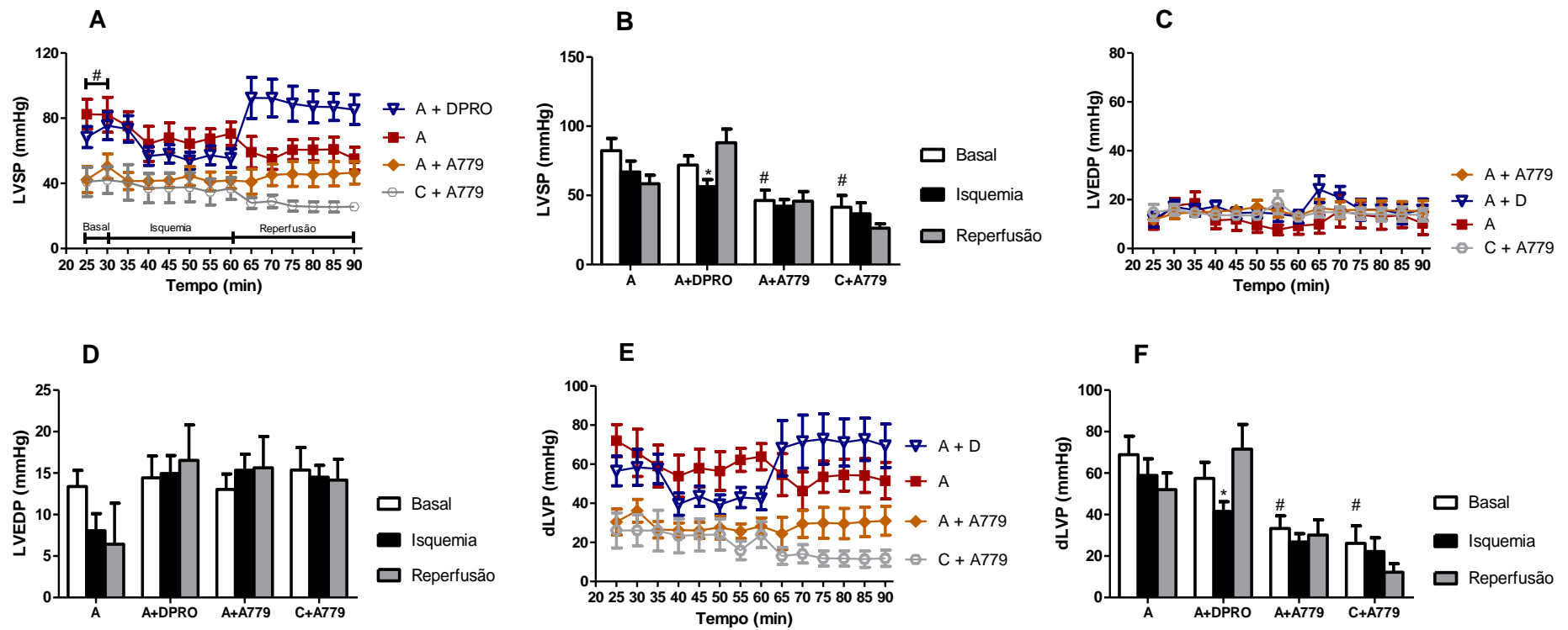


Figura 11: Avaliação do papel do receptor Mas no efeito cardioprotetor da Alamandina na LVSP, LVEDP e dLVP. Os gráficos A, C e E mostram as variações da LVSP, LVEDP e dLVP em valores absolutos ao longo do tempo, respectivamente. Os gráficos B, D e F mostram a representação dos eventos em barras. * $P < 0,05$ vs o grupo respectivo no período basal. # $p < 0,05$ vs o grupo A no período basal. Teste t, seguido de Mann-Whitney e Two-Way ANOVA seguido de Bonferroni.

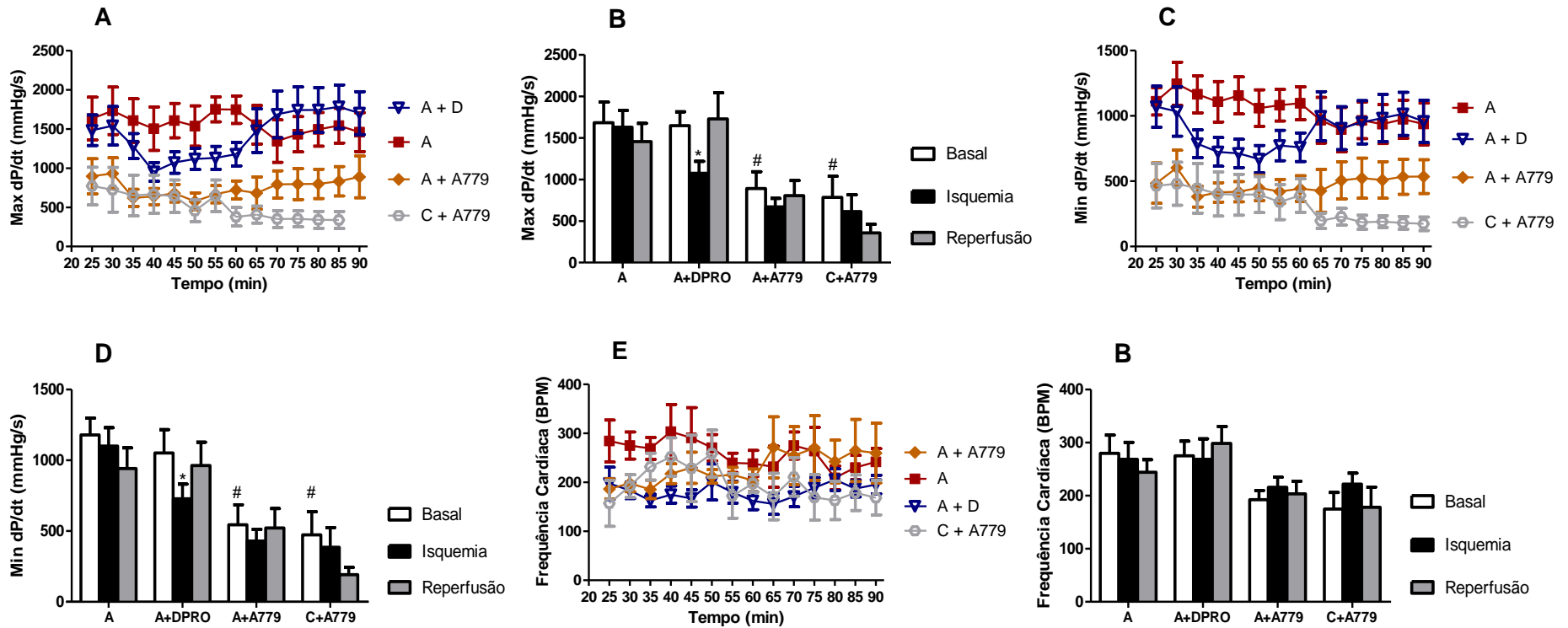


Figura 12: Avaliação do papel do receptor Mas no efeito cardioprotetor da Alamandina na dP/dt máxima, dP/dt mínima e FC. Os gráficos A, C e E mostram as variações da dP/dt máxima, dP/dt mínima e FC em valores absolutos ao longo do tempo, respectivamente. Os gráficos B, D e F mostram a representação dos eventos em barras. * P < 0,05 vs o grupo respectivo no período basal. # p < 0,05 vs o grupo C no período isquêmico. Teste t, seguido de Mann-Whitney e Two-Way ANOVA seguido de Bonferroni.

4.3.2 Vasomotricidade, área infartada e índice de arritmias

Utilizando o antagonista seletivo do receptor Mas, A779, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos, tanto em valores absolutos de fluxo coronariano (gráfico 13A), quanto em valores relativos (delta) (gráfico 13B).

Já no ISA, no grupo A + A779 ($4,75 \pm 2,42$) e C + A779 ($8,16 \pm 1,86$) houve aumento significativo quando comparado com o grupo A, mas não quando comparado com o grupo C (gráfico 13C).

Em relação à porcentagem de área infartada (gráfico 13D), o A779 associado com a Alamandina também aboliu o efeito cardioprotetor da Alamandina isolada, levando um aumento da área infartada para $36,19 \pm 6,21\%$. O mesmo ocorreu com o A779 na ausência da Alamandina, levando a um aumento da área infartada para $43,53 \pm 3,57\%$.

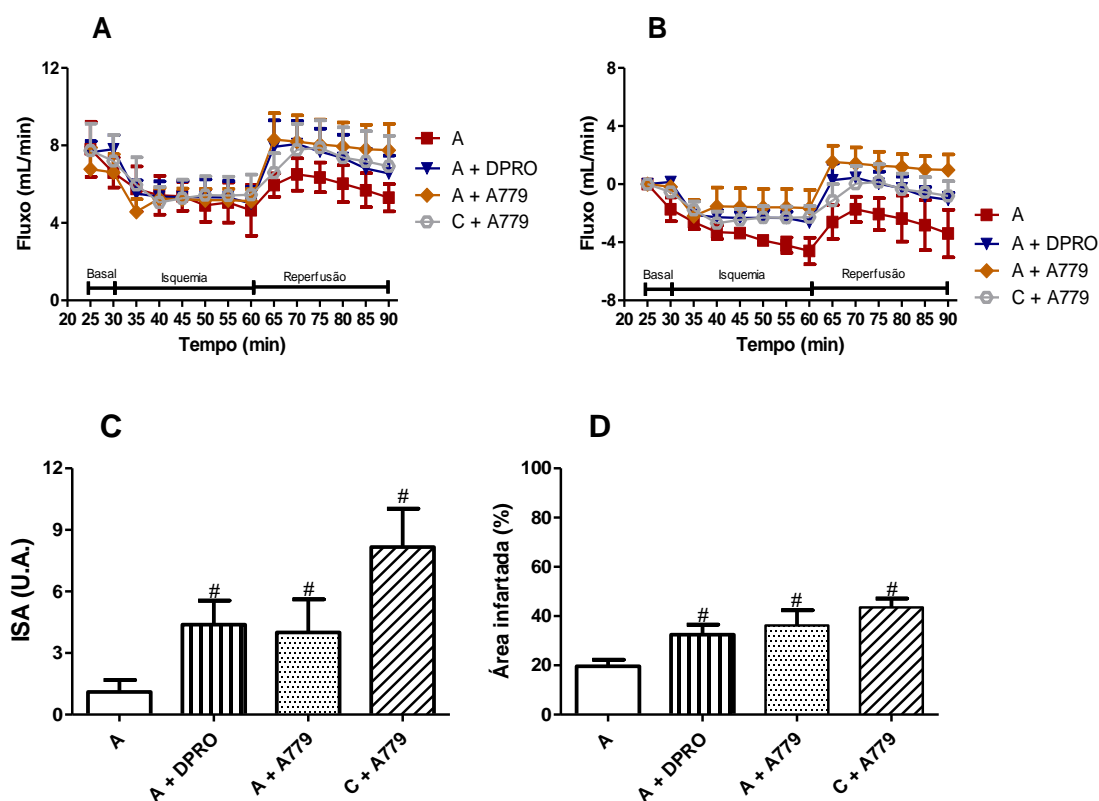


Figura 13: Participação do receptor Mas nos efeitos da Alamandina no fluxo coronariano, índice de severidade de arritmias (ISA) e na área infartada. O gráfico A representa os valores absolutos do fluxo coronariano, enquanto que o gráfico B representa os valores relativos (delta). O gráfico C representa o ISA em unidade arbitrária (U.A.). O gráfico D representa a porcentagem de área infartada. # $p < 0,05$ vs grupo A. Teste t, seguido de Mann-Whitney e Two-Way ANOVA seguido de Bonferroni.

4.4 Avaliação da participação da via das prostaglandinas e da óxido nítrico sintase nos efeitos da Alamandina

4.4.1 Função cardíaca

Já foi mostrado que alguns efeitos cardioprotetores da Ang-(1-7), como a melhora na função cardíaca pós-isquêmica, são dependentes das vias da óxido nítrico sintase (NOS) e das prostaglandinas (Ferreira, Santos e Almeida, 2002; Liao *et al.*, 2011). Deste modo, foram utilizados o inibidor da NOS, L-NAME, e o inibidor da ciclo oxigenase, Indometacina, para avaliar a possível participação destas vias nos efeitos da Alamandina.

Como podemos observar nos gráficos 14A e 14B, a presença do L-NAME não foi capaz de retirar o efeito conservador da LVSP da Alamandina no período isquêmico. Já na presença da Indometacina, foi constatado um prejuízo na LVSP mesmo na presença da Alamandina. Os valores da LVSP passaram de $73,21 \pm 8,06$ mmHg no período basal do grupo "A+INDO" para $43,81 \pm 0,79$ mmHg no período isquêmico e $40,98 \pm 5,72$ mmHg. Estes dados mostram uma possível participação da via das prostaglandinas no efeito cardioprotetor da Alamandina na LVSP.

Já no parâmetro LVEDP não houveram diferenças significativas entre os grupos como mostrado nos gráficos 14C e 14D.

Quanto à dLVP, os gráficos 14E e 14F mostram resultados semelhantes aos parâmetros da LVSP, evidenciando a participação da via das prostaglandinas no efeito cardioprotetor da Alamandina no período isquêmico. Os valores observados no grupo "A+INDO" no período basal, $61,42 \pm 8,85$ mmHg, foram reduzidos significativamente no período isquêmico para $29,89 \pm 1,39$ mmHg, assim como na reperfusão, $29,09 \pm 4,75$ mmHg.

O mesmo não pode ser afirmado da participação da via do óxido nítrico, uma vez que não houve diferença significativa do grupo "A+L-NAME" em relação ao grupo A.

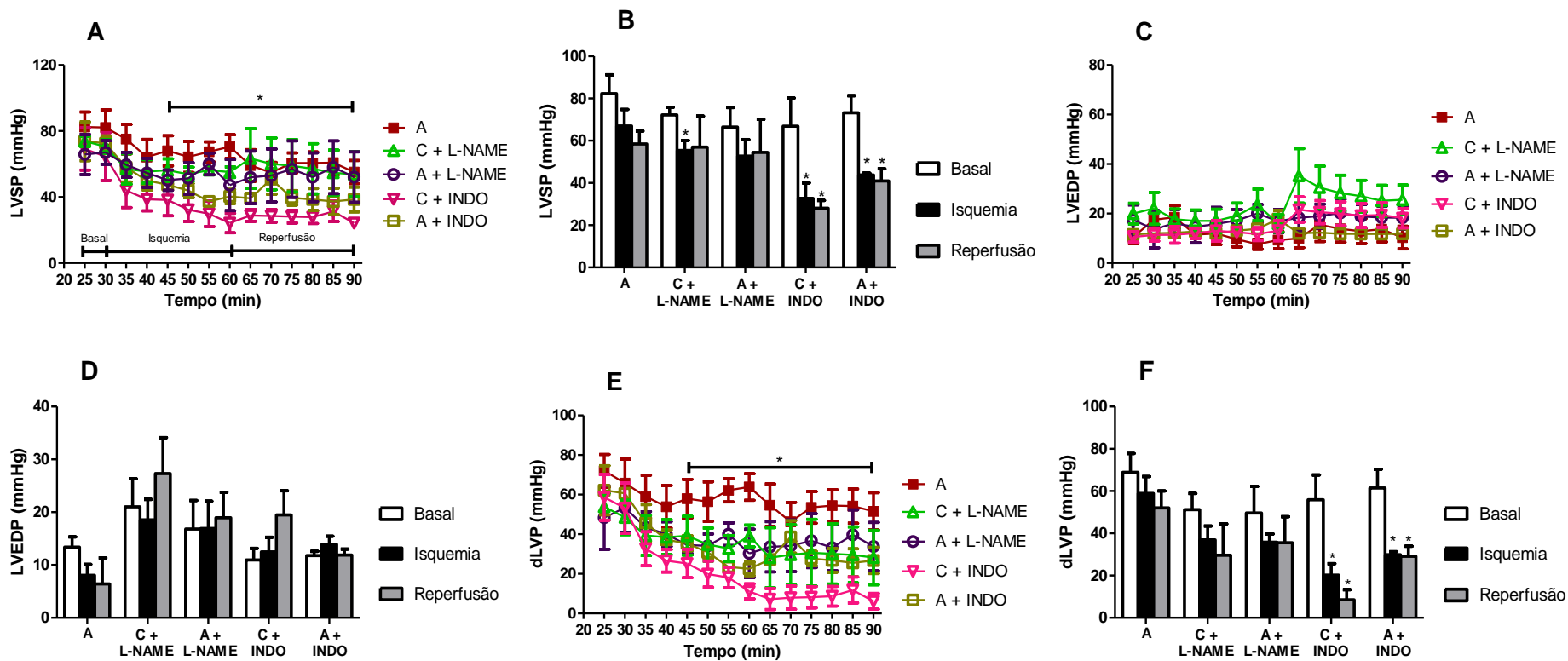


Figura 14: Avaliação da participação da via da óxido nítrico sintase ou das prostaglandinas no efeito cardioprotetor da Alamandina na LVSP, LVEDP e dLVP. Os gráficos A, C e E mostram as variações da LVSP, LVEDP e dLVP em valores absolutos ao longo do tempo, respectivamente. Os gráficos B, D e F mostram a representação dos eventos em barras. * $P < 0,05$ vs o grupo respectivo no período basal. Teste t, seguido de Mann-Whitney e Two-Way ANOVA seguido de Bonferroni.

Como apontado nos gráficos 15A e 15B não foi possível observar qualquer participação do inibidor da óxido nítrico sintase na dP/dt máxima e mínima. Contudo, a participação da via das prostaglandinas no efeito da Alamandina nas derivadas de pressão foi evidenciado na presença da Indometacina. No grupo A+INDO, a dP/dt máxima era de $1509 \pm 369,20$ mmHg/s no período basal, mas acabou sendo reduzida para $687 \pm 39,98$ mmHg/s no período isquêmico e $719,50 \pm 147,70$ mmHg no período de reperfusão. O mesmo ocorreu com a dP/dt mínima do grupo A+INDO (gráficos 15C e 15D), que apresentava valor de $924,30 \pm 138,50$ mmHg no período basal e foi reduzido significativamente para $450,10 \pm 37,38$ mmHg no período isquêmico e $390,30 \pm 88,39$ mmHg no período de reperfusão.

Juntos estes dados mostram que o inibidor da ciclo oxigenase aboliu o efeito cardioprotetor da Alamandina na dP/dt máxima e mínima, pois podemos observar uma redução significativa tanto da dP/dt máxima, quanto da mínima no período de isquemia no grupo A+INDO, quando comparado ao período isquêmico do grupo A.

Quanto à frequência cardíaca foi possível observar uma queda significativa nos valores basais do grupo tratado com Indometacina ($127,30 \pm 31,24$ BPM) em relação ao grupo A ($279,80 \pm 34,29$ BPM). Não houveram diferenças entre os grupos A e "A+L-NAME" ($215,60 \pm 15,49$ BPM) no período basal, assim como não houveram diferenças significativas entre os períodos basais, isquêmicos e de reperfusão entre os grupos (gráficos 15E e 15F).

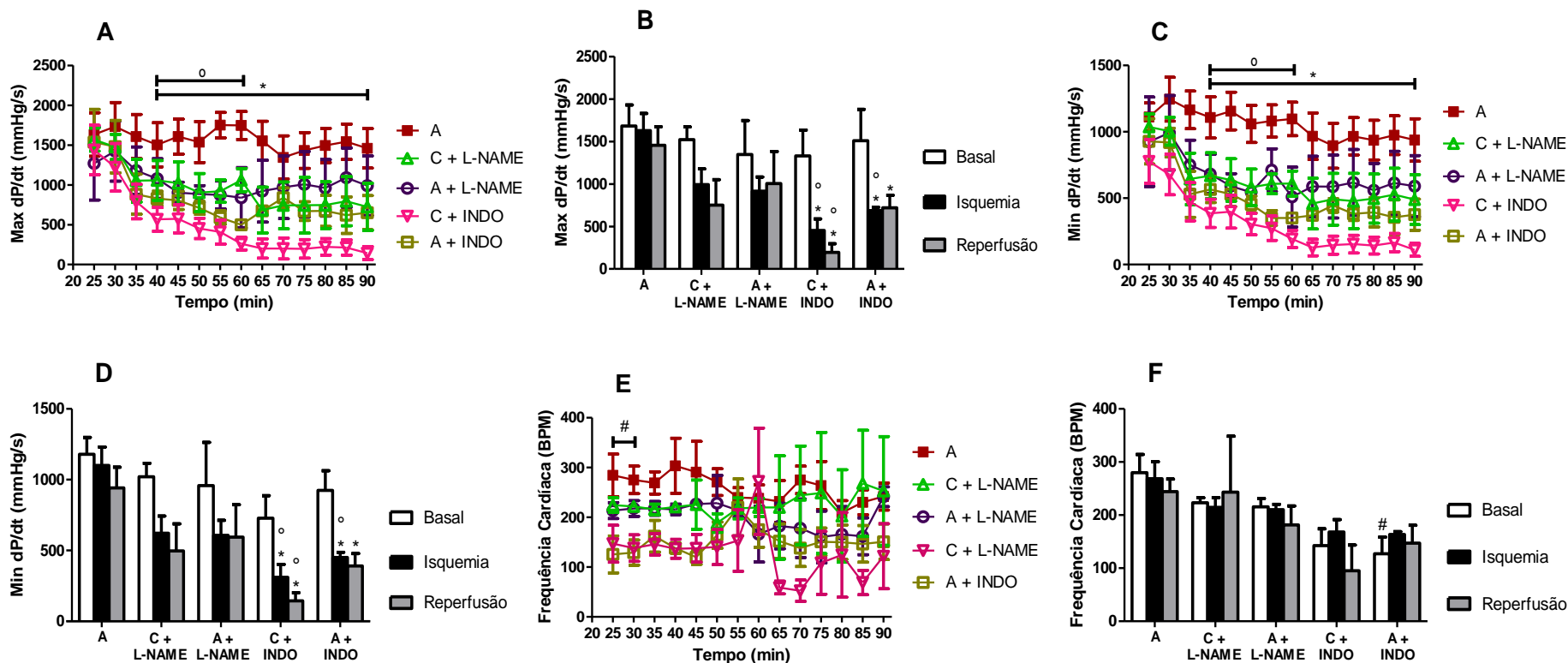


Figura 15: Avaliação da participação da via da óxido nítrico sintase ou das prostaglandinas no efeito cardioprotetor da Alamandina na dP/dt máxima, dP/dt mínima e FC. Os gráficos A, C e E mostram as variações da dP/dt máxima, dP/dt mínima e FC em valores absolutos ao longo do tempo, respectivamente. Os gráficos B, D e F mostram a representação dos eventos em barras. * P < 0,05 vs o grupo respectivo no período basal. ° p < 0,05 vs o grupo A no período isquêmico. # p < 0,05 vs o grupo A no período basal. Teste t, seguido de Mann-Whitney e Two-Way ANOVA seguido de Bonferroni.

4.4.2 Vasomotricidade, área infartada e índice de arritmias

Utilizando o inibidor da ciclo oxigenase, Indometacina, e o inibidor da óxido nítrico sintase, L-NAME, não foram observadas diferenças significativas entres os grupos, tanto em valores absolutos de fluxo coronariano (gráfico 16A), quanto em valores relativos (delta) (gráfico 16B).

Na presença do L-NAME ($4,75 \pm 2,42$) não houveram diferenças significativas no índice de arritmias, tanto em relação quanto ao grupo controle quanto em relação ao grupo somente com Alamandina. Contudo, na presença da Indometacina, houve diferença significativa entre os grupos C + INDO ($7,25 \pm 2,13$) e A + INDO ($5,33 \pm 1,49$) e o grupo A ($1,10 \pm 0,58$) (gráfico 16C).

Quanto à porcentagem de área infartada (figura 16D), o tratamento com o L-NAME ($22,32 \pm 4,54\%$) ou com a Indometacina ($31,51 \pm 5,23\%$) não foram diferentes significativamente nem do grupo C, nem do grupo A.

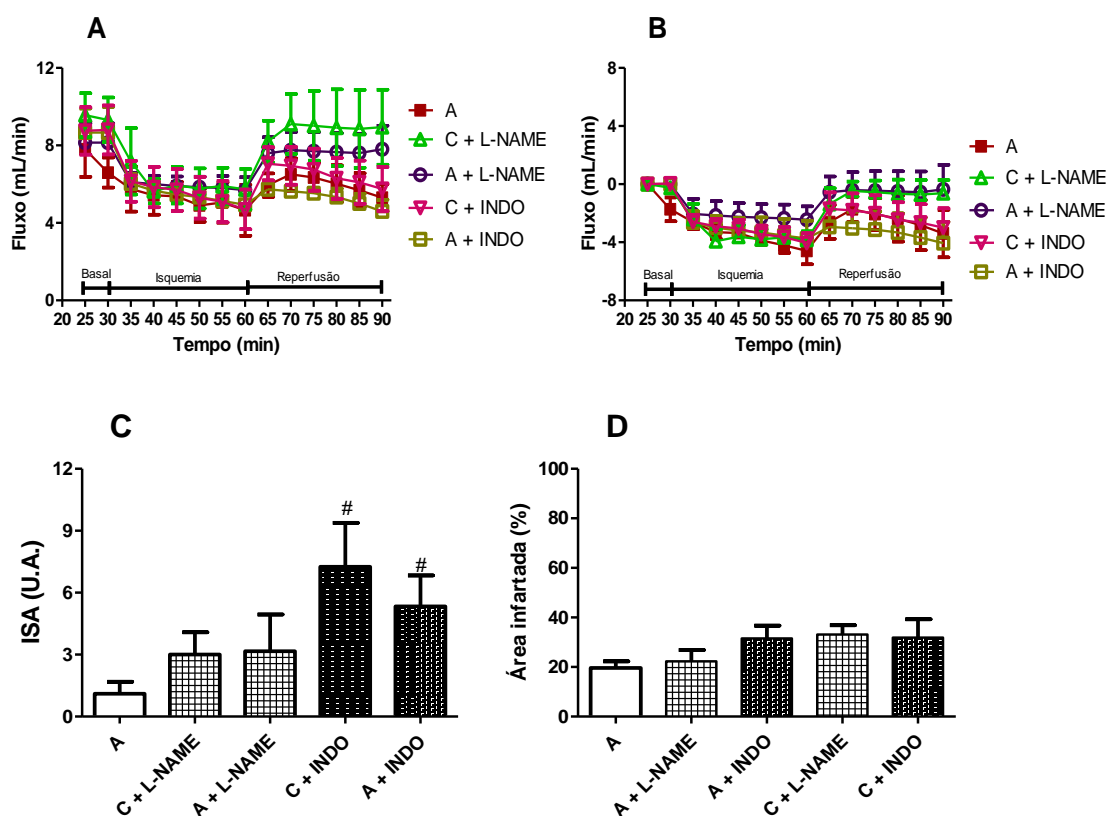


Figura 16: Participação da via das prostaglandinas e do óxido nítrico nos efeitos da Alamandina no fluxo coronariano, índice de severidade de arritmias (ISA) e na área infartada. O gráfico A representa os valores absolutos do fluxo coronariano, enquanto que o gráfico B representa os valores relativos (delta). O gráfico C representa o ISA em unidade arbitrária (U.A.). O gráfico D representa a porcentagem de área infartada. Teste t, seguido de Mann-Whitney e Two-Way ANOVA seguido de Bonferroni.

5. DISCUSSÃO

Este estudo aponta pela primeira vez que a Alamandina, em concentrações picomolares, é capaz de alterar as respostas funcionais cardíacas em corações isolados de ratos sob isquemia e reperfusão. Também mostramos um interessante efeito cardioprotetor da Alamandina através da redução do índice de arritmias e da área infartada. Nossos dados também indicam a participação do receptor MrgD nos seus efeitos, assim como da via das prostaglandinas.

O Primeiro passo do trabalho foi a avaliação da concentração ideal de Alamandina para observar os efeitos esperados. Esses efeitos seriam os mais semelhantes com o heptapeptídeo Ang-(1-7). Uma vez que queríamos observar esta semelhança, nos baseamos no trabalho de Ferreira e colaboradores como ponto de partida (Ferreira, Santos e Almeida, 2002). Neste trabalho eles observaram significantes efeitos cardioprotetores com uma concentração de 220pM. Partindo então desta concentração, utilizamos também as concentrações de 22pM e 2,2pM. Dentre essas, a que respondeu da melhor forma conforme esperávamos foi a concentração de 22pM, sendo então escolhida para os demais experimentos. Está bem descrito na literatura que a Ang-(1-7) apresenta importante efeitos em nano e picomolares (Ferreira, A. J., Santos, R. A. S. e Almeida, A. P., 2001; Ferreira, Santos e Almeida, 2002; Sampaio *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2013), assim não nos surpreendeu que a concentração ideal da Alamandina para o nosso estudo fosse na unidade Picomolar.

Os efeitos da Alamandina, como mostrado neste trabalho, são independentes de alterações no fluxo coronariano, ou seja, não houveram diferenças significativas entre os grupos tratados ou não com os antagonistas e agonistas no fluxo coronariano durante todo o experimento de coração isolado. A queda de fluxo durante o evento isquêmico foi estatisticamente igual em todos os grupos, mas sempre superior ou igual a 30% do fluxo quando comparado com o período basal. A ausência de alteração do fluxo coronariano em relação a grupos controle também ocorre no heptapeptídeo mais similar estruturalmente com a Alamandina, a Ang-(1-7). Estudos mostraram que, em concentrações nanomolares, os efeitos cardioprotetores da Ang-(1-7) são

independentes de alterações no fluxo coronariano em corações isolados de ratos (Ferreira, A. J., Santos, R. A. e Almeida, A. P., 2001; Ferreira, Santos e Almeida, 2002). Mesmo em concentrações mais altas, ainda que nanomolares, a Ang-(1-7) não alterou o fluxo coronariano (Neves *et al.*, 1997). No entanto, nossos dados com a Alamandina e Indometacina são divergentes de Ferreira e colaboradores, uma vez que corações tratados com Indometacina levaram a um aumento do fluxo coronariano no período de reperfusão, na presença ou ausência da Ang-(1-7) (Ferreira, A. J., Santos, R. A. e Almeida, A. P., 2001). Isso pode ser explicado, principalmente, por serem dois peptídeos, que ainda que muito semelhantes, apresentem propriedades diferentes, ou que a Alamandina impediu esse aumento no fluxo coronariano. Para averiguar esta segunda hipótese seria interessante fazer um grupo com indometacina na ausência da Alamandina, o que será feito nos próximos estudos.

Antagonicamente ao fluxo coronariano, vários parâmetros da função cardíaca foram diferentes na presença da Alamandina. A pressão sistólica ventricular esquerda e a pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo sofreram quedas significativas no período isquêmico nos grupos controles, contudo a Alamandina foi capaz de atenuar tais quedas no período isquêmico. Em outros estudos já foram mostrados que os componentes do sistema renina angiotensina são capazes de modular a função contrátil, dentre eles a Ang II (Ford *et al.*, 2001; Seneri *et al.*, 2001; Mufti *et al.*, 2008) e a Ang-(1-7) (Loot *et al.*, 2002; Castro *et al.*, 2006; Castro-Chaves *et al.*, 2009). Nossos dados mostraram que, durante o período isquêmico, houve uma queda significativa na pressão sistólica ventricular esquerda. Na presença da Alamandina, essa queda não ocorreu, indicando um papel cardioprotetor deste heptapeptídeo na função cardíaca. A queda na função sistólica é um acontecimento usual em eventos isquêmicos (Ferreira, Santos e Almeida, 2002; Loot *et al.*, 2002; Mann *et al.*, 2014). Inversamente, alternativas cardioprotetoras tendem a impedir a queda da função sistólica. Sgarra e colaboradores mostraram que o pós-condicionamento com Losartan, antagonista do receptor AT1, em corações isolados submetidos à isquemia global, elevou os níveis sistólico após o evento isquêmico, quando comparado ao grupo controle (Sgarra *et al.*, 2014). Similarmente, os resultados de Ferreira e colaboradores mostraram que o tratamento agudo com Ang-(1-7) em corações isolados de ratos preveniu a

queda da tensão sistólica que ocorreu após a isquemia nos animais controle ou tratados com Ang II (Ferreira, Santos e Almeida, 2002). Liao e colaboradores mostraram em corações isolados de ratos que a Ang-(1-7) aumentou a LVSP após a isquemia e reperfusão (Liao *et al.*, 2011). Traçando então este paralelo com a Ang-(1-7), a Alamandina apresentou mais uma vez efeitos semelhantes na LVSP e na dLVP, estes resultados mostrados pela primeira vez podem explicar parcialmente como a Alamandina apresentou um saldo cardioprotetor quando comparado com os grupos controle.

Já as derivadas de pressão, dP/dt máxima e mínima se comportaram de maneira semelhante às alterações na pressão sistólica e desenvolvida do ventrículo esquerdo. Durante o período isquêmico, com a queda da pressão sistólica, é esperado que o coração leve mais tempo para atingir a pressão necessária para ejetar o sangue na sístole. Foi exatamente o que ocorreu no grupo controle. A isquemia levou a uma queda na dP/dt máxima e mínima. Este efeito deletério foi abolido pela Alamandina. Analogamente, já foi mostrado que a dT/dt, positiva e negativa, não sofreu queda na função cardíaca pós-isquêmica na presença da Ang-(1-7) em corações isolados de ratos, efeito oposto aos animais controles, onde foi evidenciada queda da dT/dt positiva e negativa (Ferreira, Santos e Almeida, 2002).

Os efeitos pressóricos da Alamandina citados acima parecem estar relacionados ao seu receptor MrgD, uma vez que nossos resultados mostram que, na presença do D-Pro7-Ang-(1-7), a manutenção dos valores da LVSP, dLVP e dP/dt máxima e mínima foi abolida. Recentemente foi mostrado que as ações até então descritas da Alamandina se dão pela interação com o receptor MrgD (Lautner *et al.*, 2013). Contudo, o D-PRO é um antagonista não seletivo, podendo agir também no receptor Mas. Assim, para averiguar qualquer participação do receptor Mas nos efeitos da Alamandina no coração, utilizamos o A779 nos corações isolados juntamente com a Alamandina.

Interessantemente, o A779, mesmo na presença ou ausência da Alamandina, reduziu significativamente os níveis basais da LVSP e dLVP, mascarando então qualquer possibilidade de observar uma ligação entre a Alamandina e o receptor Mas. Vários estudos já demonstraram a importância do receptor Mas na função contrátil e estrutural cardíaca. Santos e colaboradores apontaram que a tensão sistólica, e a dT/dt positiva e negativa

eram significativamente menores em corações isolados de camundongos *knock-out* (KO) para o receptor Mas quando comparados com animais *wild-type* (Castro *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2006). Também foi mostrado que não houve produção de óxido nítrico dependente da Ang-(1-7) em cardiomiócitos de animais Mas KO, além de uma disfunção na sinalização de Ca²⁺ (Dias-Peixoto *et al.*, 2008). Castro-Chaves e colaboradores mostraram que a Ang-(1-7) induz efeito inotrópico negativo em músculos papilares de coelhos sem alteração em parâmetros de relaxamento, este efeito é dependente de endotélio e é abolido na presença do A779 (Castro-Chaves *et al.*, 2009). Consequentemente, estes estudos corroboram nossos dados que mostram um prejuízo significativo na pressão sistólica nos corações com A779, mesmo na presença da Alamandina.

Devido à recente caracterização da Alamandina, pouco se sabe sobre a participação da via do óxido nítrico nos seus efeitos. Foi mostrado que o efeito vasodilatador em anéis de aorta de ratos produzido pela Alamandina foi atenuado na presença do L-NAME (Lautner *et al.*, 2013). Nossos dados mostram que, na presença do L-NAME juntamente com a Alamandina, os efeitos na função cardíaca não foram diferentes dos apresentados no grupo apenas com Alamandina. Ferreira e colaboradores mostraram que o efeito benéfico da Ang-(1-7) na tensão sistólica não sofreu alterações na presença do L-NAME (Ferreira, Santos e Almeida, 2002). O bloqueio dos efeitos da Ang-(1-7) pelo L-NAME também não foram observados em estudos prévios de Ferreira (Ferreira, A. J., Santos, R. A. e Almeida, A. P., 2001). Pabla e Curtis mostraram que o NO endógeno não pareceu facilitar a recuperação precoce sistólica e diastólica como resultado de qualquer ação direta sobre o miocárdio (Pabla e Curtis, 1996). Essa ausência de efeito do NO nos protocolos de isquemia e reperfusão podem ocorrer devido ao baixo tempo de oclusão coronariana (Pabla e Curtis, 1995). Assim, observamos que, tal como a Ang-(1-7), os efeitos da Alamandina não pareceram envolver a participação do NO.

Partindo para outra explicação metabólica, observamos os efeitos do inibidor da ciclo oxigenase, a Indometacina. A indometacina levou a um prejuízo significativo no período isquêmico na LVSP, dLVP e máxima e mínima dP/dt na presença ou ausência da Alamandina, não havendo recuperação no período de reperfusão. Ferreira e colaboradores mostraram que em corações isolados de ratos tratados com indometacina, a Ang-(1-7) induziu um aumento

significativo na tensão diastólica (Ferreira, Santos e Almeida, 2002), ilustrando o efeito cardioprotetor das prostaglandinas na função miocárdica pós-isquêmica é provavelmente mediado por receptores prostanoídes do tipo E (Thiemermann e Zacharowski, 2000). Liao e colaboradores mostraram que a Ang-(1-7) protege corações isolados de ratos contra lesões de isquemia e reperfusão, atenuando arritmias ventriculares, apoptose de cardiomiócitos e a produção de malondialdeído e aumentando a LVSP e a atividade da superóxido desmutase, todos estes efeitos podendo envolver a ativação da via das ciclo oxigenases / prostaglandinas (Liao *et al.*, 2011).

Abordando então os efeitos cronotrópicos apresentados através da frequência cardíaca, nós observamos que não houveram diferenças significativas em todos os grupos quando comparados os períodos basal, isquêmico e de reperfusão. Contudo, na presença da Alamandina, houve um aumento significativo na frequência cardíaca no período basal quando comparado com o grupo controle. Lautner e colaboradores não observaram qualquer alteração na frequência cardíaca em ratos SHR tratados com Alamandina incluída em ciclodextrina (Lautner *et al.*, 2013). Castro e colaboradores mostraram em corações isolados de camundongos que em animais WT os níveis de frequência cardíaca basais foram significativamente maiores que os níveis dos animais Mas KO e WT tratados com A779 (Castro *et al.*, 2006). Adicionalmente, dados de Santos e colaboradores apontaram que ratos que expressam níveis mais altos de Ang-(1-7) plasmáticos apresentaram um aumento basal na frequência cardíaca tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Santos *et al.*, 2004). Contudo, pouco se sabe sobre o controle da Ang-(1-7) na frequência cardíaca em corações isolados, faz se interessante então outros estudos para avaliar este parâmetro não só na Ang-(1-7), como também na Alamandina.

Por fim, um dos nossos principais resultados foi a redução do índice de arritmias nos animais tratados com Alamandina quando comparados ao grupo controle, sendo que este efeito atenuador foi totalmente abolido na presença do DPRO. Já foi mostrado por Neves e colaboradores que em concentrações nanomolares, a Ang-(1-7) aumentou o índice de arritmias quando comparado ao grupo controle (Neves *et al.*, 1997), já em concentrações subnanomolares, foi observado que a Ang-(1-7) foi capaz de reduzir significativamente o índice

de severidade de arritmias e a quantidade de arritmias irreversíveis (Ferreira, A. J., Santos, R. A. e Almeida, A. P., 2001). Estes efeitos da Ang-(1-7) são todos mediados pelo receptor Mas, assim, todos foram bloqueados pelo A779. O efeito anti-arritmogênico da Alamandina foi bloqueado pelo D-PRO, o que mostra uma possível participação do receptor MrgD nesse efeito cardioprotetor. No entanto, os esses efeitos da Alamandina também foram bloqueados pelo A779. Como descrito acima, o receptor Mas apresenta importante função no índice de arritmias, aliado a esta propriedade, acreditamos que a concentração utilizada (220pM) de A779 pode ter sido elevada para a concentração de Alamandina (22pM), deprimindo os padrões cardíacos dos corações, impossibilitando a visualização dos efeitos cardioprotetores da Alamandina.

Como já foi dito, a necrose do miocárdio é um processo dinâmico, com morte celular ocorrendo não apenas durante a isquemia, como também durante certo tempo da reperfusão. Nossos dados mostram pela primeira vez que a Alamandina reduziu significativamente a porcentagem de área infartada quando comparado com o grupo controle. Como esperado, os efeitos da Alamandina foram abolidos na presença do D-PRO, indicando participação do receptor MrgD. Interessantemente, a concentração de A779 utilizada foi suficiente para abolir os efeitos cardioprotetores da Alamandina. Os efeitos da Ang-(1-7) e do receptor Mas em áreas infartadas ainda necessita de mais estudos. Loot e colaboradores, utilizado um modelo de rato com falência cardíaca, não observaram diferenças significativas entre a área infartada nos grupos tratados com Ang-(1-7) e o grupo controle, contudo foi observado foi observado uma melhora na função coronariana e preservação da função cardíaca (Loot *et al.*, 2002). Além disso, em ratos com infarto do miocárdio houve aumento significante da imunorreatividade da Ang-(1-7) nos tecidos ao redor da área infartada (Averill *et al.*, 2003). O AVE0991, análogo sintético da Ang-(1-7), também apresentou efeito cardioprotetor em animais submetidos ao protocolo de isquemia e reperfusão, reduzindo a área infartada (Ferreira *et al.*, 2007). A redução da área infartada pode ser uma das principais explicações para os efeitos cardioprotetores da Alamandina na função cardíaca pós-isquêmica, uma vez que aumenta a viabilidade do miocárdio (Ferreira *et al.*, 2007).

Em resumo, nossos dados mostram pela primeira vez que a Alamandina tem importante papel na função cardíaca, prevenindo a redução da LVSP, dLVP e dP/dt máxima e mínima e reduzindo o índice de severidade de arritmias e a porcentagem de área infartada. Estes efeitos parecem envolver a participação do receptor MrgD e a via das prostaglandinas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al-Ansary, L. A. et al. A systematic review of recent clinical practice guidelines on the diagnosis, assessment and management of hypertension. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e53744, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23349738> >.

Almeida, A. P. et al. Angiotensin-(1-7) potentiates the coronary vasodilatory effect of bradykinin in the isolated rat heart. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 6, p. 709-13, Jun 2000. ISSN 0100-879X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10829099> >.

Averill, D. B. et al. Cardiac angiotensin-(1-7) in ischemic cardiomyopathy. **Circulation**, v. 108, n. 17, p. 2141-6, Oct 2003. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14517166> >.

Bader, M. Tissue renin-angiotensin-aldosterone systems: Targets for pharmacological therapy. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 50, p. 439-65, 2010. ISSN 1545-4304. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20055710> >.

Bader, M.; Ganten, D. Update on tissue renin-angiotensin systems. **Journal of Molecular Medicine**, v. 86, n. 6, p. 615-21, Jun 2008. ISSN 0946-2716. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18414822> >.

Barnes, J. M. et al. Identification and characterisation of angiotensin II receptor subtypes in human brain. **European Journal of Pharmacology**, v. 230, n. 3, p. 251-8, Jan 1993. ISSN 0014-2999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8440303> >.

Bell, R. M.; Mocanu, M. M.; Yellon, D. M. Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 50, n. 6, p. 940-50, Jun 2011. ISSN 1095-8584. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21385587> >.

Berthiaume, J. M. et al. Normalizing the metabolic phenotype after myocardial infarction: impact of subchronic high fat feeding. **J Mol Cell Cardiol**, v. 53, n. 1, p. 125-33, Jul 2012. ISSN 1095-8584. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22542451> >.

Botelho, L. M. et al. Plasma angiotensin(1-7) immunoreactivity is increased by salt load, water deprivation, and hemorrhage. **Peptides**, v. 15, n. 4, p. 723-9, 1994. ISSN 0196-9781. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7937353> >.

Brower, G. L. et al. The relationship between myocardial extracellular matrix remodeling and ventricular function. **European Journal of Cardiothoracic Surgery**, v. 30, n. 4, p. 604-10, Oct 2006. ISSN 1010-7940. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16935520> >.

Campagnole-Santos, M. J. et al. Cardiovascular effects of angiotensin-(1-7) injected into the dorsal medulla of rats. **American Journal of Physiology**, v. 257, n. 1 Pt 2, p. H324-9, Jul 1989. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2750946> >.

Campbell, D. J. et al. Differential regulation of angiotensin peptide levels in plasma and kidney of the rat. **Hypertension**, v. 18, n. 6, p. 763-73, Dec 1991. ISSN 0194-911X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1660448> >.

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. 261-71, Jun 2003. ISSN 0163-769X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12788798> >.

Castro, C. H. et al. Effects of genetic deletion of angiotensin-(1-7) receptor Mas on cardiac function during ischemia/reperfusion in the isolated perfused mouse

heart. **Life Science**, v. 80, n. 3, p. 264-8, Dec 2006. ISSN 0024-3205.
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17055538> >.

Castro-Chaves, P. et al. Acute modulation of myocardial function by angiotensin 1-7. **Peptides**, v. 30, n. 9, p. 1714-9, Sep 2009. ISSN 1873-5169.
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19524627> >.

Chen, Y. et al. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and risk of myocardial infarction in an updated meta-analysis based on 34993 participants. **Gene**, v. 522, n. 2, p. 196-205, Jun 2013. ISSN 1879-0038.
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23566835> >.

Chobanian, A. V. Clinical practice. Isolated systolic hypertension in the elderly. **The New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 8, p. 789-96, Aug 2007. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17715411> >.

Corvol, P. et al. Renin-secreting tumors. **Endocrinology and Metabolism clinics in North America**, v. 23, n. 2, p. 255-70, Jun 1994. ISSN 0889-8529.
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8070421> >.

DATASUS. **Informações sobre mortalidade e informações demográficas.** DATASUS. Ministério da Saúde 2013.

De Mello, W. C. Angiotensin (1-7) re-establishes impulse conduction in cardiac muscle during ischaemia-reperfusion. The role of the sodium pump. **Journal of the Renin Angiotensin Aldosterone System**, v. 5, n. 4, p. 203-8, Dec 2004. ISSN 1470-3203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15803439> >.

Dias-Peixoto, M. F. et al. Molecular mechanisms involved in the angiotensin-(1-7)/Mas signaling pathway in cardiomyocytes. **Hypertension**, v. 52, n. 3, p. 542-8, Sep 2008. ISSN 1524-4563. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18695148> >.

Donoghue, M. et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. **Circulation Research**, v. 87, n. 5, p. E1-9, Sep 2000. ISSN 1524-4571. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10969042> >.

Duncan, B. B. et al. Doenças Crônicas Não Transmissíveis no Brasil: prioridade para enfrentamento e investigação **Revista de Saúde Pública**, v. 46, p. 126-134, 2012.

Dzau, V. J. Molecular and physiological aspects of tissue renin-angiotensin system: emphasis on cardiovascular control. **Journal of Hypertension**, v. 6, n. 3, p. S7-12, Dec 1988. ISSN 0952-1178. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3066879> >.

Elliott, P. et al. Sodium, potassium, body mass, alcohol and blood pressure in three United Kingdom centres (the INTERSALT study). **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 44, n. 9, p. 637-45, Sep 1990. ISSN 0954-3007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2261896> >.

Esteban, V. et al. Angiotensin-(1-7) and the G protein-coupled receptor MAS are key players in renal inflammation. **PLoS One**, v. 4, n. 4, p. e5406, 2009. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19404405> >.

Ferrario, C. M. Angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7): an evolving story in cardiovascular regulation. **Hypertension**, v. 47, n. 3, p. 515-21, Mar 2006. ISSN 1524-4563. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16365192> >.

Ferreira, A. J. et al. **Attenuation of isoproterenol-induced cardiac fibrosis in transgenic rats harboring an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein in the heart** Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease: Original Research: 1-14 p. 2009.

Ferreira, A. J. et al. The nonpeptide angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist AVE-0991 attenuates heart failure induced by myocardial infarction. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 292, n. 2, p. H1113-9, Feb 2007. ISSN 0363-6135. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17056670> >.

Ferreira, A. J. et al. New cardiovascular and pulmonary therapeutic strategies based on the Angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin-(1-7)/mas receptor axis. **International Journal of Hypertension**, v. 2012, p. 147825, 2012. ISSN 2090-0392. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22319643> >.

Ferreira, A. J.; Santos, R. A. Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 4, p. 499-507, Apr 2005. ISSN 0100-879X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15962175> >.

Ferreira, A. J.; Santos, R. A.; Almeida, A. P. Angiotensin-(1-7): cardioprotective effect in myocardial ischemia/reperfusion. **Hypertension**, v. 38, n. 3 Pt 2, p. 665-8, Sep 2001. ISSN 1524-4563. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11566952> >.

Ferreira, A. J.; Santos, R. A.; Almeida, A. P. Angiotensin-(1-7) improves the post-ischemic function in isolated perfused rat hearts. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 9, p. 1083-90, Sep 2002. ISSN 0100-879X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12219180> >.

Ferreira, A. J.; Santos, R. A. S.; Almeida, A. P. **Angiotensin-(1-7): Cardioprotective Effect in Myocardial Ischemia/Reperfusion** Hypertension: American Heart Association. 38: 665-668 p. 2001.

Ford, W. R. et al. Angiotensin II reduces infarct size and has no effect on post-ischaemic contractile dysfunction in isolated rat hearts. **British Journal of**

Pharmacology, v. 134, n. 1, p. 38-45, Sep 2001. ISSN 0007-1188. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11522595> >.

Fraga-Silva, R. A. et al. ACE2 activation promotes antithrombotic activity. **Molecular Medicine**, v. 16, n. 5-6, p. 210-5, 2010 May-Jun 2010. ISSN 1528-3658. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20111697> >.

Grinstead, W. C.; Young, J. B. The myocardial renin-angiotensin system: existence, importance, and clinical implications. **Am Heart J**, v. 123, n. 4 Pt 1, p. 1039-45, Apr 1992. ISSN 0002-8703. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1549968> >.

Grobe, J. L. et al. Chronic angiotensin-(1-7) prevents cardiac fibrosis in DOCA-salt model of hypertension. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology.**, v. 290, n. 6, p. H2417-23, Jun 2006. ISSN 0363-6135. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16415071> >.

Habiyakare, B. et al. Reduction of angiotensin A and alamandine vasoactivity in the rabbit model of atherogenesis: differential effects of alamandine and Ang(1-7). **International Journal of Experimental Pathology**, v. 95, n. 4, p. 290-5, Aug 2014. ISSN 1365-2613. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24953785> >.

Horn, M. et al. Preservation of left ventricular mechanical function and energy metabolism in rats after myocardial infarction by the angiotensin-converting enzyme inhibitor quinapril. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 27, n. 2, p. 201-10, Feb 1996. ISSN 0160-2446. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8720418> >.

Igic, R.; Behnia, R. Pharmacological, immunological, and gene targeting of the renin-angiotensin system for treatment of cardiovascular disease. **Current Pharmaceutical Design**, v. 13, n. 12, p. 1199-214, 2007. ISSN 1873-4286. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17504230> >.

Laragh, J. H. Abstract, closing summary, and table of contents for Laragh's 25 lessons in pathophysiology and 12 clinical pearls for treating hypertension. **American Journal of Hypertension**, v. 14, n. 12, p. 1173-7, Dec 2001. ISSN 0895-7061. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11775122> >.

Lautner, R. Q. et al. Discovery and characterization of alamandine: a novel component of the renin-angiotensin system. **Circulation Research**, v. 112, n. 8, p. 1104-11, Apr 2013. ISSN 1524-4571. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23446738> >.

Lefroy, D. C. et al. Regional changes in angiotensin II receptor density after experimental myocardial infarction. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 28, n. 2, p. 429-40, Feb 1996. ISSN 0022-2828. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8729073> >.

Liao, X. et al. Cyclooxygenase mediates cardioprotection of angiotensin-(1-7) against ischemia/reperfusion-induced injury through the inhibition of oxidative stress. **Mol Med Rep**, v. 4, n. 6, p. 1145-50, 2011 Nov-Dec 2011. ISSN 1791-3004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21874245> >.

Loot, A. E. et al. Angiotensin-(1-7) attenuates the development of heart failure after myocardial infarction in rats. **Circulation**, v. 105, n. 13, p. 1548-50, Apr 2002. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11927520> >.

Luft, F. C. Molecular genetics of human hypertension. **Journal of Hypertension**, v. 16, n. 12 Pt 2, p. 1871-8, Dec 1998. ISSN 0263-6352. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9886871> >.

Mann, S. et al. Effects of acute angiotensin II on ischemia reperfusion injury following myocardial infarction. **Journal of Renin Angiotensin Aldosterone System**, Dec 2014. ISSN 1752-8976. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25487980> >.

Marques, F. D. et al. An oral formulation of angiotensin-(1-7) produces cardioprotective effects in infarcted and isoproterenol-treated rats. **Hypertension**, v. 57, n. 3, p. 477-83, Mar 2011. ISSN 1524-4563. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21282558> >.

Mufti, S. et al. Angiotensin II-dependent loss of cardiac function: mechanisms and pharmacological targets attenuating this effect. **Journal of Cellular Physiology**, v. 217, n. 1, p. 242-9, Oct 2008. ISSN 1097-4652. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18528823> >.

Neves, L. A. et al. Effect of angiotensin-(1-7) on reperfusion arrhythmias in isolated rat hearts. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, n. 6, p. 801-9, Jun 1997. ISSN 0100-879X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9292120> >.

Ocaranza, M. P. et al. Enalapril attenuates downregulation of Angiotensin-converting enzyme 2 in the late phase of ventricular dysfunction in myocardial infarcted rat. **Hypertension**, v. 48, n. 4, p. 572-8, Oct 2006. ISSN 1524-4563. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16908757> >.

Ondetti, M. A. Biochemistry of the renin-angiotensin system. Introduction. **Federation Proceedings**, v. 42, n. 10, p. 2722-3, Jul 1983. ISSN 0014-9446. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6305730> >.

Pabla, R.; Curtis, M. J. Effects of NO modulation on cardiac arrhythmias in the rat isolated heart. **Circulation Research**, v. 77, n. 5, p. 984-92, Nov 1995. ISSN 0009-7330. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7554153> >.

Pabla, R.; Curtis, M. J. Effect of endogenous nitric oxide on cardiac systolic and diastolic function during ischemia and reperfusion in the rat isolated perfused heart. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 28, n. 10, p. 2111-21, Oct 1996. ISSN 0022-2828. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8930806> >.

Phillips, M. I. et al. Evidence for an endogenous brain renin-angiotensin system. **Federation Proceedings**, v. 38, n. 9, p. 2260-6, Aug 1979. ISSN 0014-9446. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/222621> >.

Picon, R. V. et al. Trends in prevalence of hypertension in Brazil: a systematic review with meta-analysis. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. e48255, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23118964> >.

Rice, G. I. et al. Evaluation of angiotensin-converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism. **Biochemical Journal**, v. 383, n. Pt 1, p. 45-51, Oct 2004. ISSN 1470-8728. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15283675> >.

Rimoldi, S. F.; Scherrer, U.; Messerli, F. H. Secondary arterial hypertension: when, who, and how to screen? **European Heart Journal**, v. 35, n. 19, p. 1245-54, May 2014. ISSN 1522-9645. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24366917> >.

Rush, J. W.; Aultman, C. D. Vascular biology of angiotensin and the impact of physical activity. **Applied Physiology Nutrition and Metabolism**, v. 33, n. 1, p. 162-72, Feb 2008. ISSN 1715-5312. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18347668> >.

Sampaio, W. O. et al. Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. **Hypertension**, v. 49, n. 1, p. 185-92, Jan 2007. ISSN 1524-4563. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17116756> >.

Santos, R. A. et al. Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brainstem. **Hypertension**, v. 11, n. 2 Pt 2, p. 1153-7, Feb 1988. ISSN 0194-911X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2831145> >.

Santos, R. A. et al. Impairment of in vitro and in vivo heart function in angiotensin-(1-7) receptor MAS knockout mice. **Hypertension**, v. 47, n. 5, p. 996-1002, May 2006. ISSN 1524-4563. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16567589> >.

Santos, R. A. et al. Expression of an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein produces cardioprotective effects in rats. **Physiol Genomics**, v. 17, n. 3, p. 292-9, May 2004. ISSN 1531-2267. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15039487> >.

Santos, R. A. et al. Angiotensin-(1-7) and its receptor as a potential targets for new cardiovascular drugs. **Expert Opinion on Investigation Drugs**, v. 14, n. 8, p. 1019-31, Aug 2005. ISSN 1744-7658. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16050794> >.

Santos, R. A. et al. Characterization of a new selective antagonist for angiotensin-(1-7), D-pro7-angiotensin-(1-7). **Hypertension**, v. 41, n. 3 Pt 2, p. 737-43, Mar 2003. ISSN 1524-4563. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12623989> >.

Santos, R. A. et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**, v. 100, n. 14, p. 8258-63, Jul 2003. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12829792> >.

Scheuer, D. A.; Perrone, M. H. Angiotensin type 2 receptors mediate depressor phase of biphasic pressure response to angiotensin. **American Journal of Physiology**, v. 264, n. 5 Pt 2, p. R917-23, May 1993. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8498601> >.

Schiavone, M. T. et al. Release of vasopressin from the rat hypothalamo-neurohypophysial system by angiotensin-(1-7) heptapeptide. **Proceedings of National Academy of Science of the USA**, v. 85, n. 11, p. 4095-8, Jun 1988.

ISSN 0027-8424. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3375255> >.

Serteri, G. G. et al. Cardiac angiotensin II formation in the clinical course of heart failure and its relationship with left ventricular function. **Circulation Research**, v. 88, n. 9, p. 961-8, May 2001. ISSN 1524-4571. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11349007> >.

Sever, P. S.; Poulter, N. R. A hypothesis for the pathogenesis of essential hypertension: the initiating factors. **Journal of Hypertension Suppl.**, v. 7, n. 1, p. S9-12, Feb 1989. ISSN 0952-1178. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2709190> >.

Sgarra, L. et al. Intermittent losartan administration triggers cardiac post-conditioning in isolated rat hearts: role of BK2 receptors. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. e88542, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24520397> >.

Skrbic, R.; Igic, R. Seven decades of angiotensin (1939-2009). **Peptides**, v. 30, n. 10, p. 1945-50, Oct 2009. ISSN 1873-5169. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19595728> >.

Sleight, P. Angiotensin II and trials of cardiovascular outcomes. **American Journal of Cardiology**, v. 89, n. 2A, p. 11A-16A; discussion 16A-17A, Jan 2002. ISSN 0002-9149. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11835905> >.

Souza, Á. et al. Angiotensin II type 1 receptor blockade restores angiotensin-(1-7)-induced coronary vasodilation in hypertrophic rat hearts. **Clinical Science (Lond)**, v. 125, n. 9, p. 449-59, Nov 2013. ISSN 1470-8736. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23718715> >.

Thiemermann, C.; Zacharowski, K. Selective activation of E-type prostanoid(3)-receptors reduces myocardial infarct size. A novel insight into the

cardioprotective effects of prostaglandins. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 87, n. 1, p. 61-7, Jul 2000. ISSN 0163-7258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10924742> >.

Tipnis, S. R. et al. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. **The Journal of Biology Chemistry**, v. 275, n. 43, p. 33238-43, Oct 2000. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10924499> >.

Unger, T.; Paulis, L.; Sica, D. A. Therapeutic perspectives in hypertension: novel means for renin-angiotensin-aldosterone system modulation and emerging device-based approaches. **European Heart Journal**, v. 32, n. 22, p. 2739-47, Nov 2011. ISSN 1522-9645. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21951628> >.

Vickers, C. et al. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. **The Journal of Biology Chemistry**, v. 277, n. 17, p. 14838-43, Apr 2002. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11815627> >.

Wang, L. et al. Ang-(1-7) offers cytoprotection against ischemia-reperfusion injury by restoring intracellular calcium homeostasis. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 63, n. 3, p. 259-64, Mar 2014. ISSN 1533-4023. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24193198> >.

Williams, B. The year in hypertension. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 51, n. 18, p. 1803-17, May 2008. ISSN 1558-3597. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18452788> >.

Wollert, K. C.; Drexler, H. The renin-angiotensin system and experimental heart failure. **Cardiovascular Research**, v. 43, n. 4, p. 838-49, Sep 1999. ISSN 0008-6363. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10615411> >.

Xu, P. et al. Endothelial dysfunction and elevated blood pressure in MAS gene-deleted mice. **Hypertension**, v. 51, n. 2, p. 574-80, Feb 2008. ISSN 1524-4563. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18180400> >.